

Том 89, Номер 3

ISSN 0320-9725
Март 2024



БИОХИМИЯ



СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 3, 2024

- Механизм ингибирования алармонсинтеза микобактерий синтетическим аналогом эрогоргиаена
Р.Ю. Сидоров, А.Г. Ткаченко 383
- Провоспалительная активация подавляет TRAIL-индуцированный апоптоз клеток острого миелоидного лейкоза
М.И. Кобякова, А.С. Сенотов, К.С. Краснов, Я.В. Ломовская, И.В. Одинокова, А.А. Колотова, А.М. Ермаков, А.И. Звягина, И.С. Фадеева, Е.И. Фетисова, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев 395
- Причина токсичности имидазолиевых ионных жидкостей – их действие на плазматическую мембрану
С.С. Соколов, Е.А. Смирнова, Т.И. Рокицкая, Ф.Ф. Северин 406
- Роль аминокислот каталитического домена интегразы ВИЧ-1, I182, R187, K188, в процессах обратной транскрипции и интеграции
Т.Ф. Кихай, Ю.Ю. Агапкина, Т.А. Приказчикова, М.В. Вдовина, С.П. Шехтман, С.В. Фомичева, С.П. Королев, М.Б. Готтих 418
- Влияние экспрессии киназы фокальных контактов и винкулина на параметры миграции нормальных и опухолевых эпителиоцитов
Е.С. Соломатина, А.В. Ковалева, А.В. Творогова, И.А. Воробьев, А.А. Саидова 432
- Сыворотка крови человека препятствует действию EGFR/HER2-таргетного препарата лапатиниба на рост и экспрессию генов клеток плоскоклеточной карциномы SK-BR-3
Н.А. Шабан, М.М. Раевский, Г.С. Захарова, В.О. Шипунова, С.М. Деев, М.В. Сунцова, М.И. Сорокин, А.А. Буздин, Д.Э. Камашев 447
- Структурно- и катион-зависимый механизм взаимодействия трициклических антидепрессантов с NMDA-рецептором по данным молекулярного моделирования
Д.А. Белинская, Н.Н. Шестакова 469
- Роль микробиома кишечника и амилоидов бактерий в развитии синуклеинопатий (обзор)
Н.П. Трубицина, А.Б. Матиив, Т.М. Рогоза, А.А. Зудилова, М.Д. Безгина, Г.А. Журавлева, С.А. Бондарев 487
- Связь повышенного уровня гомоцистеина с нарушением метаболизма фолатов и дефицитом витаминов группы В при раннем дебюте рассеянного склероза
В.И. Людыно, Е.А. Цымбалова, Е.А. Чернявская, Е.Ю. Скрипченко, Г.Н. Бисага, А.В. Дмитриев, И.Н. Абдурасулова 509
- Протективная активность инактивированной вакцины против бешенства с использованием адъюванта на основе флагеллина
О.О. Сокол, Н.А. Никитин, Е.А. Евтушенко, О.В. Карпова, И.Н. Матвеева, С.А. Гринь, В.М. Попова, И.В. Иванов, Ю.Н. Федоров, И.Ю. Литенкова 523

CONTENTS

Vol. 89, Issue 3, 2024

The Mechanism of Mycobacterial (p)ppGpp Synthetase Inhibition by Synthetic Erogorgiaene Analog <i>R. Y. Sidorov and A. G. Tkachenko</i>	383
Pro-Inflammatory Activation Suppresses TRAIL-Induced Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells <i>M. I. Kobyakova, A. S. Senotov, K. S. Krasnov, Ya. V. Lomovskaya, I. V. Odinokova, A. A. Kolotova, A. M. Ermakov, A. I. Zvyagina, I. S. Fadeeva, E. I. Fetisova, V. S. Akatov, and R. S. Fadeev</i>	395
The Imidazolium Ionic Liquids Toxicity Is Due to Their Effect on the Plasma Membrane <i>S. S. Sokolov, E. A. Smirnova, T. I. Rokitskaya, and F. F. Severin</i>	406
Role of I182, R187 and K188 Amino Acids of the Catalytic Domain of HIV-1 Integrase in the Processes of Reverse Transcription and Integration <i>T. F. Kikhai, Yu. Yu. Agapkina, T. A. Prikazchikova, M. V. Vdovina, S. P. Shekhtman, S. V. Fomicheva, S. P. Korolev, and M. B. Gottikh</i>	418
Suppression of FAK Kinase Expression Decreases the Lifetime of Focal Adhesions and Inhibits Migration of Normal and Tumor Epitheliocytes in a Wound Healing Assay <i>E. Solomatina, A. Kovaleva, A. Tvorogova, I. Vorobjev, and A. Saidova</i>	432
Human Blood Serum Antagonizes Effects of EGFR/HER2-Targeted Drug Lapatinib on Squamous Carcinoma SK-BR-3 Cell Growth and Gene Expression <i>N. Shaban, M. Raevskiy, G. Zakharova, V. Shipunova, S. Deyev, M. Suntsova, M. Sorokin, A. Buzdin, and D. Kamashev</i>	447
Structure- and Cation-Dependent Mechanism of the Interaction of Tricyclic Antidepressants with NMDA Receptor According to Molecular Modeling Data <i>D. A. Belinskaia and N. N. Shestakova</i>	469
Role of the Gut Microbiome and Bacterial Amyloids in the Development of Synucleinopathies (Review) <i>N. P. Trubitsina, A. B. Matiiv, T. M. Rogoza, A. A. Zudilova, M. D. Bezgina, G. A. Zhouravleva, and S. A. Bondarev</i>	487
Association of Increased Homocysteine Level with Impaired Folate Metabolism and Vitamins B Deficiency in Early Onset of Multiple Sclerosis <i>V. I. Lioudyno, E. A. Tsymbalova, E. A. Chernyavskaya, E. Y. Scripchenko, G. N. Bisaga, A. V. Dmitriev, and I. N. Abdurasulova</i>	509
Protective Activity of Inactivated Rabies Vaccine Using Flagellin-Based Adjuvant <i>O. O. Sokol, N. A. Nikitin, E. A. Evtushenko, O. V. Karpova, I. N. Matveeva, S. A. Gryn, V. M. Popova, I. V. Ivanov, Y. N. Fedorov, and I. Y. Litenkova</i>	523

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ АЛАРМОНСИНТЕАЗ МИКОБАКТЕРИЙ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНАЛОГОМ ЭРОГОРГИАЕНА

© 2024 Р.Ю. Сидоров^{1,2*}, А.Г. Ткаченко^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, 614000 Пермь, Пермский край, Россия; электронная почта: sidorov.r@iegmt.ru

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614990 Пермь, Пермский край, Россия

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 09.01.2024

Принята к публикации 09.01.2024

Синтез алармонов (p)ppGpp (гуанозинтетрафосфата и гуанозинпентафосфата) вносит значительный вклад в процессы торможения метаболизма бактерий, контроля над скоростью их роста, вирулентности, бактериальной персистенции и формирования биоплёнок. Продукцию регуляторных молекул (p)ppGpp осуществляют бактериальные ферменты (p)ppGpp-синтетазы суперсемейства гомологов RelA/SpoT двух типов: длинные бифункциональные RSH-белки и малые алармонсинтетазы. В данной работе при помощи методов ферментативной кинетики и концентрационно-зависимого ингибирования исследуются детали механизма действия 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентановой кислоты (ДМНП) в отношении белков Rel_{Msm} и RelZ, (p)ppGpp-синтезас *Mycobacterium smegmatis* обоих типов, и белка Rel_{Mtb} *Mycobacterium tuberculosis*. Обнаружена способность соединения ДМНП подавлять активность белка Rel_{Mtb}. В соответствии с результатами исследований ферментативной кинетики ДМНП проявляет себя как неконкурентный ингибитор, действующий на белки Rel_{Msm} и RelZ. Анализ молекулярного докинга позволил определить вероятное место связывания ДМНП – вблизи активного сайта синтетазного домена (p)ppGpp-синтезас. Исследование вносит вклад в разработку нового класса соединений ингибиторов алармонсинтезас, к которым относится релацин и его производные, а также изучаемое соединение ДМНП – синтетический аналог метаболита морских кораллов эрогоргиаена. В отличие от традиционных антибиотиков, ингибиторы алармонсинтезас оказывают влияние на метаболические пути, связанные со строгим ответом. Хотя эти пути не являются ключевыми для бактерий, они регулируют формирование адаптационных механизмов. Сочетание традиционных антибиотиков, действующих на растущие клетки, и новых соединений, блокирующих адаптацию микроорганизмов, потенциально способно решить актуальные проблемы резистентности к антибиотикам и бактериальной персистенции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: (p)ppGpp, алармоны, микобактерии, гомологи RelA/SpoT, малые алармонсинтетазы, ингибиторы алармонсинтезас.

DOI: 10.31857/S0320972524030019 EDN: WLOHBB

ВВЕДЕНИЕ

Механизмы адаптации бактерий способны противодействовать бактерицидному действию антибиотиков, обеспечивая выживание клеток возбудителя при лечении бактериальных инфекций. Одним из таких механизмов является персистенция – способность популяции бактерий формировать временно нерастущую субпопуляцию

клеток-персистеров, нечувствительную к антибиотикам [1]. Клетки-персистеры переживают действие антибиотика благодаря замедлению клеточного метаболизма. После окончания курса лечения антибиотиком персистеры способны возобновить растущий фенотип. В результате этого многие бактериальные инфекции, такие как туберкулёз, характеризуются рецидивирующим течением, связанным с эндогенной реактивацией болезни [2, 3].

Принятые сокращения: ДМНП – 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентановая кислота; (p)ppGpp – гуанозинтетрафосфат и гуанозинпентафосфат; RSH – гомологи RelA/SpoT.

* Адресат для корреспонденции.

Риск рецидива способствует повышению необходимой продолжительности курса антибиотикотерапии [4]. Исследования демонстрируют, что укороченный курс терапии туберкулёза ведёт к большей доле рецидивов [5]. Кроме того, многие виды бактерий, в том числе микобактерии туберкулёза, формируют биоплёнки [6]. В глубоких слоях биоплёнок создаются условия истощения питательного субстрата, что способствует замедлению метаболизма и формированию персистерных клеток [7]. Регуляторные пути *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированные с образованием биоплёнок и персистенцией, делают вклад в формирование хронической туберкулёзной инфекции [6].

Таким образом, в терапии бактериальных инфекций возрастает потребность в новых средствах лечения, способных к преодолению механизмов адаптации бактерий. Одним из подходов к решению данных проблем может быть разработка соединений, воздействующих на строгий ответ, адаптивную реакцию бактерий на стресс, которая регулируется сигнальными молекулами алармонов гуанозинтетрафосфатом и гуанозинпентафосфатом ((p)ppGpp) [8]. Повышенные внутриклеточные концентрации алармонов ((p)ppGpp) ассоциированы с проявлениями персистенции, толерантности и резистентности у широкого диапазона видов бактерий. Напротив, устранение способности продуцировать алармоны у бактерий приводит к потере данных фенотипов [9]. Так, нокаутный штамм *M. tuberculosis* Δrel_{Mtb} , неспособный к продукции ((p)ppGpp), характеризуется сниженной толерантностью к изониазиду, нарушением адаптации к голоданию [10], нарушением способности к хронической инфекции в модели мышей и дефектом формирования биоплёнок [11]. Приведённые факты подтверждают важную роль строгого ответа в формировании свойств бактерий, затрудняющих лечение инфекции.

Синтез и гидролиз алармонов ((p)ppGpp) осуществляют преимущественно белки суперсемейства гомологов RelA/SpoT (RSH), среди которых вы-

деляют две основные группы: длинные и короткие RSH (рис. 1). Длинные гомологи RelA/SpoT – группа в основном бифункциональных ферментов, способных как к синтезу, так и к гидролизу алармонов. Короткие гомологи RelA/SpoT включают две подгруппы: малые алармонсинтетазы, способные только к синтезу алармонов, и малые алармонгидролазы, способные только к их гидролизу [12].

Соединения класса ингибиторов алармонсинтетаз, такие как релацин [13] и его производные [14–16], аскорбиновая кислота [17], GSK-X9 [10], 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентановая кислота (ДМНП) [18, 19], являются перспективными средствами противодействия адаптационным механизмам бактерий [20]. Ингибиторы алармонсинтетаз подавляют ((p)ppGpp)-синтезирующую активность ферментов суперсемейства RSH. Таким образом, ингибирование синтеза ((p)ppGpp) снижает клеточные процессы, индуцируемые алармонами, такие как вирулентность, образование биоплёнок и персистенция [20]. В данном исследовании проведён анализ ферментативной кинетики ((p)ppGpp)-синтетаз *Mycobacterium smegmatis* Rel_{Msm} (EC 2.7.6.5 и 3.1.7.2) и $RelZ$ (EC 2.7.6.5) в присутствии ранее установленного ингибитора алармонсинтетаз ДМНП [18, 19]. Кроме того, проведён анализ подавления активности белка *M. tuberculosis* Rel_{Mtb} (EC 2.7.6.5 и 3.1.7.2) для дальнейшего изучения эффектов этого ингибитора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование генов rel_{Msm} и $relZ$ *M. smegmatis* и rel_{Mtb} *M. tuberculosis* в экспрессионный вектор. Для продукции исследуемых белков сконструированы рекомбинантные плазмиды pET23b- $relNTD$, pET23b- $relZ$ и pET23b- rel_{Mtb} . Вставки кодирующих последовательностей генов амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы Phusion («Thermo Fisher Scientific», США) на матрице лизата *M. smegmatis* MC²155 для генов rel_{Msm}

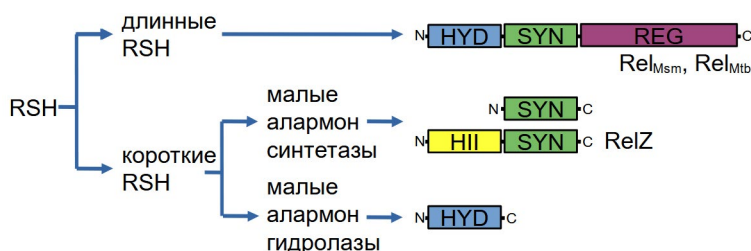


Рис. 1. Доменный состав ферментов суперсемейства RSH, катализирующих синтез и гидролиз алармонов ((p)ppGpp). Бифункциональные длинные RSH, такие как Rel_{Msm} из *M. smegmatis* и Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis*, включают гидролазный (HYD) и синтетазный (SYN) домены в каталитической доле, а также C-терминальный регуляторный домен (REG). Монофункциональные короткие RSH содержат либо гидролазный, либо синтетазный домен. $RelZ$ из *M. smegmatis* является необычной малой алармонсинтетазой, так как содержит также домен РНКазы HII (HII)

Таблица 1. Названия и последовательности праймеров для ПЦР

Название	Последовательность (5'→3')
relMsm (pET) NdeI	gGGgGGTGACA <u>cat</u> ATGGTCGACGAGCCAG
relNTD (pET) HindIII	GTGAACACGAA <u>aAgCTt</u> CTGCGTGGCG
relZ (pET) NdeI	TGGAc <u>AtATGC</u> ACCACCCCCCGT
relZ (pET) HindIII	aGC <u>AagCTt</u> GCCCTGCAGCTTCTCGA
relMtb (pET) NdeI	aca <u>cata</u> TGGCCGAGGACCAGCTCACGGC
relMtb (pET) HindIII	tga <u>aagctt</u> CGCGCCGAGGTCACCCGGTA
relZ seq	CGCCTCGACAAAAGTGAGCT
relMtb seq	GATGGCGGTATAGAGTGCTGACA

Примечание. Сайты рестрикции подчёркнуты, некоплементарные матрице нуклеотиды приведены в нижнем регистре.

и *relZ* либо инактивированной культуры *M. tuberculosis* H37Rv для гена *relMtb*. Праймеры для ПЦР в этом исследовании синтезированы компанией «Евроген» (Россия) (табл. 1). Пара праймеров, relMsm (pET) NdeI и relNTD (pET) HindIII, амплифицирует область *N*-терминального домена гена *relMsm* и разработана на основе публикации Jain et al. [21], где описан минимальный фрагмент белка Rel_{Msm}, сохраняющий (p)ppGpp-синтетазную активность – RelNTD. Вставка полноразмерного гена *relZ* амплифицирована с использованием праймеров relZ (pET) NdeI и relZ (pET) HindIII. Вставка кодирующей последовательности гена *relMtb* получена в реакции с праймерами relMtb (pET) NdeI и relMtb (pET) HindIII. Вставка *relNTD* клонирована напрямую в pET23b. Вставка *relZ* клонирована в промежуточный вектор pAL2 («Евроген»), вставка *relMtb* – в промежуточный вектор pTZ57R («Thermo Fisher Scientific») при помощи TA-клонирования. Для этого к вставке добавляли адениловые концы в ходе реакции с Taq-полимеразой. Клонирование в pET23b проводили путём осаждения ДНК вставки этанолом, обработки вектора и вставки рестриктазами NdeI и HindIII, а затем T4 ДНК-лигазой («Thermo Fisher Scientific»). Наличие ожидаемых вставок в pET23b верифицировано ПЦР, а затем секвенированием с использованием стандартных праймеров T7 promoter и T7 terminator, а также с праймерами, специфичными средней области соответствующих генов: relZ seq и relMtb seq. Полученными плазмидами со слиянием кодирующих последовательностей генов с *C*-терминальным 6xHisTag трансформировали штамм *Escherichia coli* BL21(DE3).

Продукция и очистка белков. Культуры *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET23b-*relNTD*, pET23b-*relZ* или pET23b-*relMtb* выращивали в пробирках со средой LB с 50 мкг/мл ампициллина до оптической плотности 0,6–1,0 при 600 нм, далее хранили при

4 °C и использовали для инокуляции в колбы. Для этого 2 мл культуры центрифугировали, осаждённые клетки ресуспендировали и переносили в колбу с 50 мл свежей среды LB с ампициллином, культивировали при 37 °C при вращении 120 об./мин. При достижении культурой оптической плотности 0,3–0,6 добавляли 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид. Спустя 3–4 ч после индукции при 30 °C культуру центрифугировали и удаляли среду. Клетки ресуспендировали в 1 мл буфера для белков (20 мМ Tris-HCl/500 мМ NaCl, pH 7,4) и разрушали при воздействии ультразвука на льду в течение 30 с по 3 раза при амплитуде 35% с перерывами в 30 с, затем центрифугировали в течение 5 мин при 15 000 *g* при 4 °C для разделения растворимой и нерастворимой фракций. Белки очищали при помощи набора HisPur Ni-NTA Spin Purification Kit («Thermo Fisher Scientific»). Растворимую фракцию белка с добавлением 5 мМ имидазола наносили на предварительно уравновешенную буфером для белков (5 мМ имидазол) центрифужную колонку с Ni-NTA-агарозой, инкубировали при мягком качении на льду в течение 30–60 мин для связывания гистидиновых меток белков с ионом никеля. Раствор с несвязавшимися белками удаляли центрифугированием 2 мин при 700 *g* и 4 °C. Затем связавшийся белок промывали 2 мл буфера для белков (25 мМ имидазол). Оставшуюся фракцию белка смывали с колонки в 3 этапа 200 мкл буфера для белков (250–500 мМ имидазол). Полученные растворы белков анализировали при помощи Ds-Na-ПААГ-электрофореза относительно стандарта Precision Plus Protein Dual Xtra («Bio-Rad», США). Концентрацию белка оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000C («Thermo Fisher Scientific»). Коэффициенты экстинкции и молекулярную массу белков рассчитывали при помощи инструмента ExPASy ProtParam.

Определение активности алармонсинтеаз.

Реакционная смесь с белком RelNTD (35 мкл) включала 40 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 27 мМ (NH₄)₂SO₄, 5%-ный метанол (v/v), 0 или 600 мкМ ДМНП, 0–3000 мкМ GTP, 4 мМ ATP, 1–2 мкМ RelNTD (0,5 ч инкубации при 37 °C) [18]. Реакционная смесь с RelZ (35 мкл) включала 40 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ MgCl₂, 500 мМ NaCl, 5%-ный метанол (v/v), 0 или 600 мкМ ДМНП, 0–4000 мкМ GDP, 4 мМ ATP, 1–2 мкМ RelZ (0,5 ч инкубации при 37 °C), согласно публикации Murdeshwar и Chatterji [22] с некоторыми модификациями. Реакции по ингибированию Rel_{Mtb} в диапазоне концентраций ДМНП проводили в условиях, описанных в публикации Singal et al. [23] с некоторыми модификациями. В реакционную смесь (70 мкл) включали 40 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 15 мМ MgCl₂, 1 мМ GTP, 4 мМ ATP, 0,5–1 мкМ Rel_{Mtb}, 0 или 5%-ный метанол (v/v), 0–600 мкМ ДМНП (0,5 ч инкубации при 37 °C). Для остановки реакции к образцам добавляли 1/10 объёма пробы 0,4 N хлорной кислоты, затем центрифугировали их при 15 000 g в течение 5 мин для удаления преципитата. Супернатант разводили в 4 раза в деионизированной воде. Концентрации нуклеотидов в образцах определяли посредством обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии по методу, описанному в литературе [18, 24]. Хроматографический анализ проводили на системе LC-20A («Shimadzu», Япония), образцы разделяли на колонке Luna C18 (5 мкм, 250 мм × 4,6 мм) («Phenomenex», США), подвижная фаза – раствор 0,5%-ного CH₃CN/99,5%-ного 50 мМ KH₂PO₄, pH 4,6. Идентификацию пиков проводили в области спектра 254 нм на основании сравнения времени удержания нуклеотидов в реакционных смесях и в растворах нуклеотидов GTP, GDP, ATP, AMP («Sigma-Aldrich», США). Активность ферментов (p)ppGpp-синтеаз количественно оценивали по изменению концентрации субстрата GTP (Rel_{Mtb}) или продукта AMP (RelNTD, RelZ).

Анализ *in silico*. База данных AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) послужила источником предсказанных трёхмерных структур (p)ppGpp-синтеаз Rel_{Mtb} (P9WHG9), Rel_{Msm} (A0QWJ6) и RelZ (A0R4I7). Инструмент Protein Structure Alignment от «Schrödinger Maestro» использовали для пространственного выравнивания белков-мишеней. Расчёты молекулярного докинга проводились с помощью сервера Blind Docking Server (<http://bio-hpc.eu/software/blind-docking-server/>).

Статистический анализ. Для визуализации и статистической обработки данных по ферментативной кинетике при помощи нелинейной регрессии использовали программу GraphPad Prism 8.0. Выбор при сравнении моделей по уравнению Михаэлиса–Ментен или уравнению Хилла осуществ-

ляли при помощи информационного критерия Акаике. Значимость различий в параметрах уравнения оценивали при помощи *t*-теста. При оценке нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Данные графиков представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, а данные в таблице параметров уравнения Хилла представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Для визуализации и статистической обработки данных по ингибированию белка Rel_{Mtb} использовали пакет Python Seaborn. При определении концентрации полумаксимального ингибирования ([I]₅₀) использовали расчёт по функции с 3 параметрами с помощью Quest Graph IC₅₀ Calculator.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ферментативная кинетика длинной (p)ppGpp-синтеазы/гидролазы Rel_{Msm}. Для изучения механизма ранее установленного ингибиторного действия ДМНП [18] проведены эксперименты по ферментативной кинетике *N*-терминального домена длинной бифункциональной (p)ppGpp-синтеазы/гидролазы Rel_{Msm}. Данный белок RelNTD имеет *N*-терминальные гидролазный и синтеазный домены, но лишён *C*-терминального регуляторного домена. Он представляет собой минимальную каталитически активную форму Rel_{Msm}, демонстрирующую повышенную (p)ppGpp-синтеазную активность [21].

Активность RelNTD анализировали в диапазоне концентраций субстрата GTP от 0 до 3000 мкМ при добавке 600 мкМ ДМНП в сравнении с контролем без ингибитора. Rel_{Msm} катализирует (p)ppGpp-синтеазную реакцию, протекающую согласно уравнению GTP/GDP + ATP ↔ ppGpp/ppGpp + AMP [25]. Скорость реакции определяли по изменению концентрации продукта AMP в реакционной смеси (рис. 2, а).

Результаты экспериментов по ферментативной кинетике демонстрируют способность ДМНП подавлять активность RelNTD (рис. 2, б). ДМНП способен к ингибированию очищенного *N*-терминального домена белка Rel_{Msm} (рис. 2, в), не теряя активности в отношении варианта белка без *C*-терминального домена. Таким образом, предполагаемое место связывания ДМНП локализуется в области синтеазного или гидролазного доменов Rel_{Msm}, но не в области регуляторного домена.

При помощи метода нелинейной регрессии произведён фиттинг уравнений зависимости скорости реакции от концентрации субстрата GTP, согласно уравнению Михаэлиса–Ментен и согласно уравнению сигмоидной кривой Хилла (рис. 2, б), и определены параметры функции (табл. 2, а).

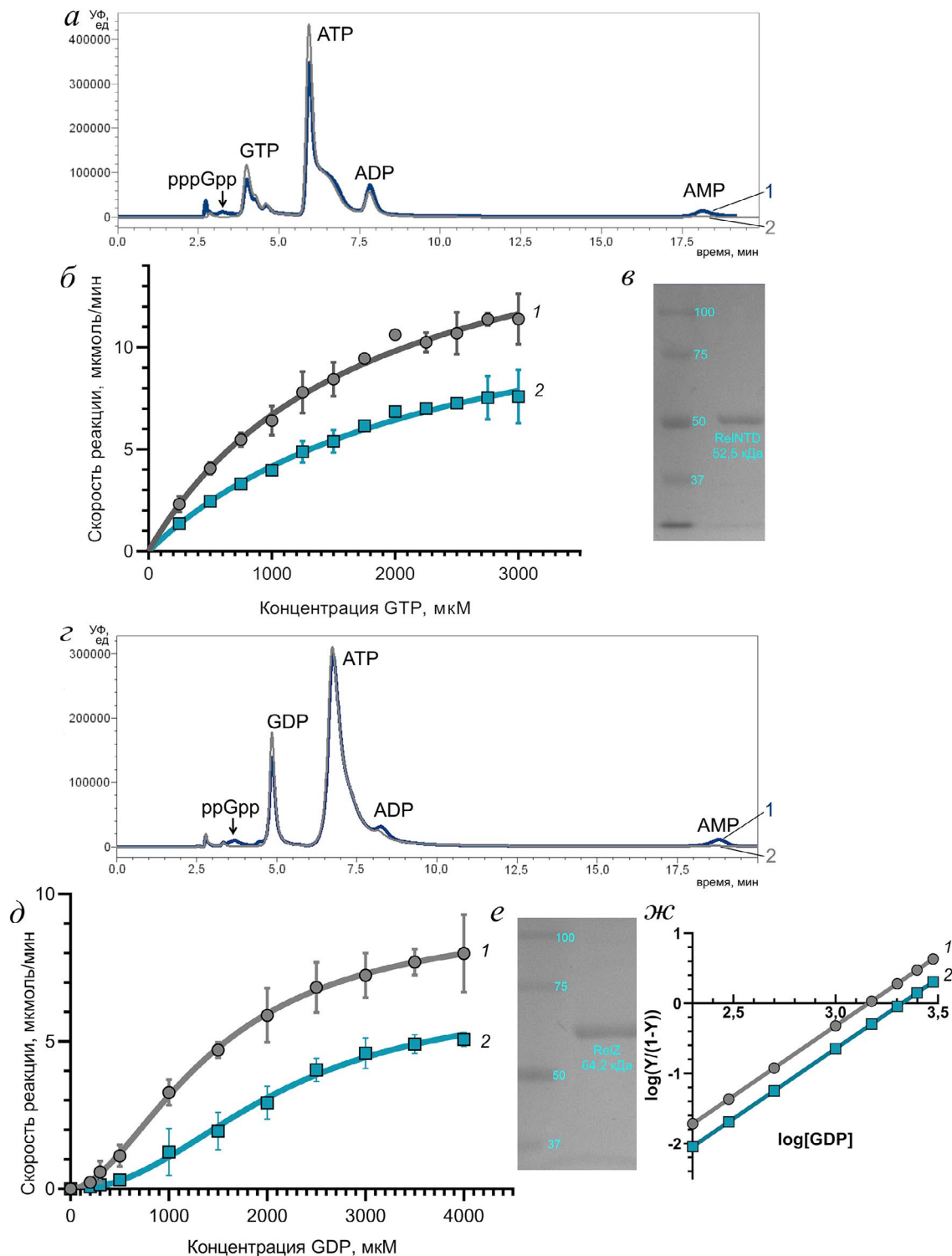


Рис. 2. Влияние ингибитора ДМНП на ферментативную кинетику (p)ppGpp-синтетаз *M. smegmatis*. *а* – Хроматографический анализ нуклеотидов в образцах, взятых из ферментативной реакции с RelNTD спустя: 1 – 0 ч или 2 – 0,5 ч (детекция при 254 нМ, 1 мМ GTP, 4 мМ ATP). *б* – Анализ ферментативной кинетики *N*-терминального домена белка Rel_{Msm} из *M. smegmatis*. Приведены кривые зависимости скорости реакции (расчёт на 1 мкмоль белка) от концентрации субстрата GTP: 1 – в отсутствии добавки ингибитора; 2 – при добавлении 600 мкМ ДМНП. *в* – Ds-Na-ПААГ-электрофорез очищенного фермента RelNTD. *г* – Хроматографический анализ нуклеотидов в образцах, взятых из ферментативной реакции с RelZ спустя: 1 – 0 ч или 2 – 0,5 ч (детекция при 254 нМ, 1 мМ GDP, 4 мМ ATP). *д* – Анализ ферментативной кинетики малой алармонсинтетазы RelZ из *M. smegmatis*. Приведены кривые зависимости скорости реакции (расчёт на 1 мкмоль белка) от концентрации субстрата GDP: 1 – в отсутствии добавки ингибитора; 2 – при добавлении 600 мкМ ДМНП. *е* – Ds-Na-ПААГ-электрофорез очищенного фермента RelZ. *ж* – График Хилла для реакции с RelZ: 1 – в отсутствии добавки ингибитора; 2 – при добавлении 600 мкМ ДМНП

Таблица 2. Параметры уравнения в зависимости от концентрации ингибитора ДМНП

Белок RelNTD – параметры уравнения Михаэлиса–Ментен				
Концентрация ДМНП, мкМ	V_{max} , мкмоль/мин	K^{GTP}_m , мкМ	R^2	
0	$18,5 \pm 2,3$	1760 ± 218	0,95	
600	$14,2 \pm 2,6$	2412 ± 376	0,95	
Белок RelZ – параметры уравнения Хилла				
Концентрация ДМНП, мкМ	V_{max} , мкмоль/мин	$K^{GDP}_{0,5}$, мкМ	h	R^2
0	$9,3 \pm 0,7$	1447 ± 172	$1,8 \pm 0,2$	0,97
600	$6,5 \pm 0,9$	2105 ± 310	$2,2 \pm 0,4$	0,96

Сравнение двух моделей по информационному критерию Акаике продемонстрировало большее совпадение экспериментальных данных по RelNTD с моделью по уравнению Михаэлиса–Ментен (вероятность корректности модели – 76,6% без добавки и 76,8% с добавкой ДМНП). Исследователи, ранее проводившие эксперименты по ферментативной кинетике полноразмерного белка Rel_{Msm}, обнаружили, что данные описываются уравнением Хилла [15].

Расчёт значимости различий в параметрах в отсутствии и в присутствии ДМНП по *t*-тесту показывает, что значения максимальной скорости реакции V_{max} имеют статистически значимые различия ($p = 0,01$), в отличие от константы Михаэлиса K^{GTP}_m ($p = 0,13$). Таким образом, ДМНП является неконкурентным ингибитором в отношении *N*-терминального домена длинного RSH-белка Rel_{Msm}. В то же время ранее в научных публикациях описывались ингибиторы алармонсинтетаз только с конкурентным [15] или смешанным [15, 17] типами ингибирования.

Ферментативная кинетика малой алармонсинтетазы RelZ. Помимо длинного RSH-белка Rel_{Msm}, нами исследована также ферментативная кинетика малой алармонсинтетазы *M. smegmatis* RelZ, в отношении которой ДМНП также является ингибитором [19]. Монофункциональная (p)ppGpp-синтетаза RelZ катализирует реакцию $GTP/GDP/GMP + ATP \rightarrow pppGpp/ppGpp/pGpp + AMP$. В качестве субстрата использовали GDP, к которому RelZ имеет большую аффинность по сравнению с GTP [25]. Активность RelZ анализировали в диапазоне концентраций субстрата ATP от 0 до 4000 мкМ в присутствии 600 мкМ ДМНП или в его отсутствии. Скорость реакции определяли по изменению концентрации продукта AMP (рис. 2, з).

Результаты экспериментов по ферментативной кинетике RelZ демонстрируют способность ДМНП ингибировать очищенный фермент (рис. 2, д, е). Параметры кривых зависимости скорости

реакции от концентрации субстрата также просчитаны как для уравнения Хилла (табл. 2, б), так и для уравнения Михаэлиса–Ментен. Сравнение моделей по критерию Акаике продемонстрировало большее совпадение экспериментальных данных с моделью по уравнению Хилла (вероятность корректности модели – 99,7% без добавки и 99,8% с добавкой ДМНП). ДМНП не оказывает влияние на кооперативное связывание субстрата белком RelZ (рис. 2, ж).

Расчёт по *t*-тесту значимости различий в параметрах катализируемой RelZ реакции в присутствии ДМНП или в его отсутствии (табл. 2, б) демонстрирует следующие результаты: значения V_{max} имеют статистически значимые различия ($p = 0,02$), в отличие от $K^{GDP}_{0,5}$ и коэффициента Хилла ($p = 0,07$ и $p = 0,39$ соответственно). Таким образом, ДМНП является неконкурентным ингибитором как в отношении длинной алармонсинтетазы Rel_{Msm}, так и в отношении малой алармонсинтетазы RelZ.

Анализ подавления активности Rel_{Mtb}. В результате выравнивания последовательностей аминокислот белков Rel_{Msm} и Rel_{Mtb} посредством BLASTp обнаружена высокая степень совпадений в 95%. Поэтому далее мы исследовали способность ДМНП подавлять pppGpp-синтезирующую активность Rel_{Mtb}, основной и единственной функциональной (p)ppGpp-синтетазы/гидролазы *M. tuberculosis* [26]. Результаты исследования демонстрируют способность ДМНП подавлять активность Rel_{Mtb} (рис. 3). Активность фермента снижается по мере увеличения концентрации ДМНП. Кроме того, активность Rel_{Mtb} возрастает при добавлении 5%-ного метанола приблизительно на 40%. Ранее эффект увеличения (p)ppGpp-синтезирующей активности при добавке метанола в реакционную смесь обнаруживали при анализе активности RelA [27], Rel_{Msm} [18] и RelZ [19]. Расчёт концентрации полумаксимального ингибирования $[I]_{50}$ на основании полученных данных указывает значение в 362 мкМ ДМНП. Таким образом, ДМНП способен

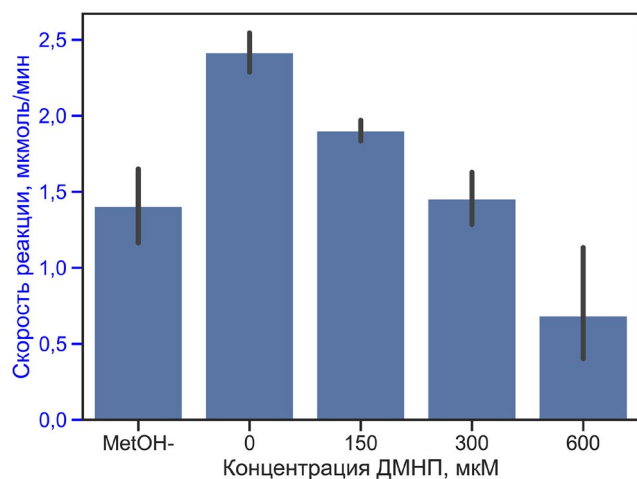


Рис. 3. pppGpp-Синтезирующая активность длинного RSH-белка Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis* в диапазоне концентраций ДМНП (0–600 мкМ) в 5%-ном метаноле. Скорость реакции оценивается по изменению концентрации субстрата GTP. MetOH- – реакция без добавки метанола и ДМНП

подавлять активность фермента строгого ответа у микобактерии туберкулёза и потому имеет потенциал применения при антибиотикотерапии туберкулёзной инфекции.

Молекулярный докинг ДМНП со структурами (p)ppGpp-синтетаз, предсказанными AlphaFold.

Перспективным подходом к выявлению механизмов действия новых соединений является сочетание предсказаний структур посредством AlphaFold с моделированием молекулярного докинга для анализа взаимодействия белок-лиганд [28]. Чтобы установить вероятное место связывания ингибитора ДМНП на поверхности (p)ppGpp-синтетаз, мы провели анализ с использованием молекулярного докинга *in silico*. Структуры экспериментально установленных белков-мишеней (Rel_{Mtb}, Rel_{Msm}, RelZ) были получены с помощью базы данных предсказанных структур белков AlphaFold [29]. Данные белки относятся к одному суперсемейству RSH [12] и потому характеризуются значительной долей совпадений последовательности аминокислот (Rel_{Msm} с Rel_{Mtb}: 95%; RelZ с Rel_{Msm}/Rel_{Mtb}: 29,27%). Исходя из этого, было выдвинуто предположение об общем механизме действия ДМНП в отношении исследуемых белков. В результате пространственного выравнивания трёх белков-мишеней идентифицированы области структурного сходства. Для малой алармонсинтетазы RelZ не характерны гидролазный и регуляторный домены, которые присутствуют у длинных RSH-белков Rel_{Msm} и Rel_{Mtb} [30]. В свою очередь, длинные RSH не имеют домена РНКазы НII, специфического для RelZ [22]. Структурное сходство было обнаружено в областях синтетазного домена, характерного

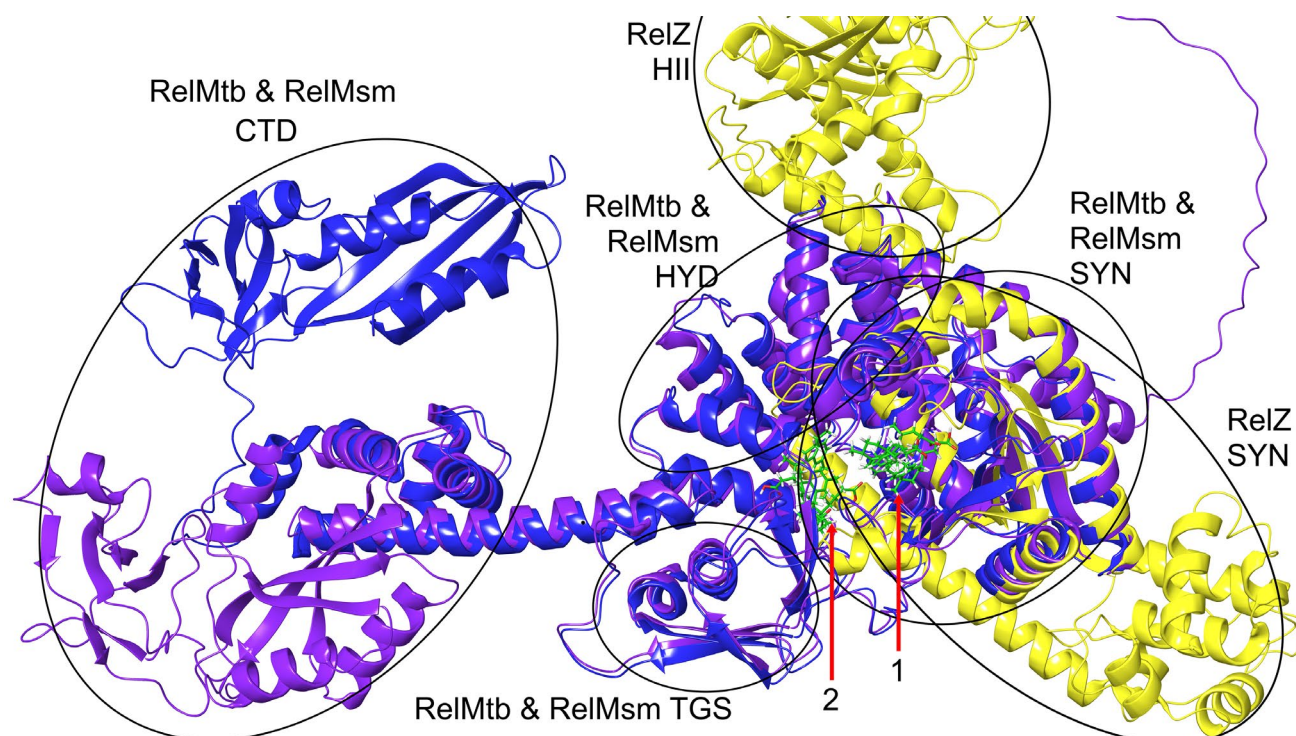


Рис. 4. Пространственное выравнивание и результаты молекулярного докинга трёхмерных структур белков-мишеней *M. tuberculosis* Rel_{Mtb} (синий), *M. smegmatis* Rel_{Msm} (фиолетовый) и RelZ (жёлтый), предсказанных AlphaFold. SYN – синтетазный домен; HYD – гидролазный домен; CTD – регуляторный C-терминальный домен; TGS – домен TGS; HII – домен РНКазы НII. Кластеры связывания ДМНП (зелёный): 1 – соответствующий активному сайту синтетазного домена, 2 – располагающийся вблизи активного сайта синтетазного домена

для всех трёх белков-мишеней (рис. 4). Аминокислоты этих областей в трёхмерных структурах Rel_{Mtb}, Rel_{Msm} и RelZ были изолированы и использованы для расчётов молекулярного докинга ДМНП ко всей выделенной поверхности белков при помощи сервера Achilles Blind Docking Server [31].

По результатам расчётов выявлены вероятные сайты связывания ДМНП на поверхности белков (рис. 4). Кластер № 1 имеет эффективные энергии связывания (Rel_{Mtb}: -7,6 ккал/моль, Rel_{Msm}: -7,2 ккал/моль, RelZ: -5,4 ккал/моль) и соответствует активному центру синтетазного домена (рис. 4). В данном кластере ДМНП характеризуется взаимодействиями с аминокислотами Arg242 и Tyr309 Rel_{Mtb}, которые ответственны за связывание субстрата GTP/GDP и модификация которых приводит к потере активности [26]. Однако взаимодействие в данном сайте не согласуется с экспериментальными данными ферментативной кинетики, указывающими на неконкурентный механизм действия ДМНП, который не препятствует взаимодействию фермента с субстратом. Кластер № 2 имеет сходные энергии связывания (Rel_{Mtb}: -6,3 ккал/моль, Rel_{Msm}: -6,7 ккал/моль, RelZ: -5,8 ккал/моль) и располагается вблизи активного центра (p)ppGpp-синтетаз (рис. 4). Связывание ДМНП в данной области не препятствует связыванию субстрата, но может приводить к субоптимальной каталитической активности белков-мишеней, что согласуется с неконкурентным типом ингибирования, обнаруженным в экспериментальных исследованиях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы продемонстрировали способность ДМНП подавлять (p)ppGpp-синтезирующую активность микобактериальных белков семейства RelA/SpoT-гомологов в экспериментах с очищенными белками в условиях *in vitro*. Ингибиторная активность ДМНП исследована не только в отношении длинных RSH-белков Rel_{Msm} из *M. smegmatis* (рис. 2, б) и Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis* (рис. 3), но и в отношении короткого RSH-белка – малой алармонсинтетазы *M. smegmatis* RelZ (рис. 2, д). Несмотря на то что существование малых алармонсинтез было обнаружено сравнительно недавно [32], уже накоплен массив данных, касающихся их значимой роли в метаболизме алармонов (p)ppGpp и в адаптивных механизмах у *Staphylococcus aureus* [33], *Vibrio cholerae* [34], а также многих других видов бактерий [12]. Однако способность соединений из класса ингибиторов алармонсинтез подавлять не только длинные, но и малые алармонсинтетазы до сих пор исследована недостаточно: известно лишь то, что релацин оказался неспособен подавлять активность малой

алармонсинтетазы RelQ из *Enterococcus faecalis* [35]. Таким образом, экспериментальные данные о способности ДМНП подавлять активность малой алармонсинтетазы RelZ из *M. smegmatis* могут указывать на перспективу применения этого соединения для более полноценного подавления строгого ответа видов бактерий, имеющих, помимо длинных RSH-белков, также и малые алармонсинтетазы.

В предыдущей работе мы исследовали активность соединения ДМНП в отношении полноразмерного белка Rel_{Msm} [18], а в данной работе показана способность ДМНП подавлять активность Rel_{Msm}, лишённого регуляторного домена (RelNTD) (рис. 2, б). Тот факт, что ДМНП сохраняет свою активность в отсутствие регуляторного домена, локализует наиболее вероятное место его связывания в гидролазном или синтетазном домене Rel_{Msm} (рис. 1).

При исследовании ферментативной кинетики *N*-терминального домена Rel_{Msm} в диапазоне концентрации субстрата GTP было обнаружено соответствие данных кривой по уравнению Михаэлиса–Ментен, в то время как ферментативная кинетика полноразмерного Rel_{Msm} в данных литературы [15] соответствовала уравнению Хилла. Уравнение Хилла обычно используется для описания кинетики кооперативных ферментов с аллостерической регуляцией. Отсутствие кооперации у изолированного *N*-терминального домена Rel_{Msm} указывает на ключевую роль *C*-терминального регуляторного домена для аллостерической регуляции активности Rel_{Msm}, так как RelNTD демонстрирует неспособность к олигомеризации в отличие от полноразмерного Rel_{Msm} [21].

Алармоны связывают Rel_{Msm} в аллостерическом сайте в *C*-терминальном домене, для которого показана способность взаимодействовать с pppGpp [36]. Для Rel_{Msm} продемонстрирован механизм отрицательной обратной связи, когда pppGpp, ppGpp или pGpp подавляют его синтетическую активность [25]. Кроме того, недавние исследования обнаружили наличие аллостерического сайта связывания pppGpp между гидролазной и синтетазной областями *N*-терминального домена RelA из *E. coli* и Rel из *Bacillus subtilis*, который также участвует в положительной регуляции синтетазной активности [37].

Малая алармонсинтаза RelZ продемонстрировала сигмоидальную кинетику (рис. 2, д) с $h = 1,8 \pm 0,2$ (табл. 2, б). В растворе этот фермент существует в гексамерной форме, которая является необходимой для его активности [38]. Олигомерная структура RelZ может служить основой для кооперативного связывания. Ранее сигмоидальная кинетика наблюдалась также для малой алармонсинтетазы RelQ из *S. aureus* с коэффициентом

Хилла в диапазоне от $1,2 \pm 0,3$ до $2,1 \pm 0,4$ в зависимости от субстрата и добавленного алармона [39]. Для RelZ описано ингибирование активности посредством продукта $pppGpp$, но не $ppGpp$, который образуется при конверсии субстрата GDP [25]. Кроме того, для малой алармонсинтетазы SAS1 *B. subtilis* показана положительная регуляция посредством связывания $pppGpp$ в аллостерическом сайте [40].

Исследования ферментативной кинетики белков Rel_{Msm} и RelZ при воздействии ингибитора ДМНП в диапазоне концентраций субстрата позволили установить его тип ингибирования в отношении данных белков (рис. 2, б, д). ДМНП характеризуется неконкурентным типом ингибирования в отношении обеих алармонсинтеаз, то есть не конкурирует с субстратами GDP и GTP за активный сайт синтетазного домена (табл. 2). Описанные в литературе ингибиторы алармонсинтеаз, для которых проводились исследования ферментативной кинетики, обладают отличным от ДМНП типом ингибирования: конкурентный тип у аналога релацина AC [15], смешанный тип у витамина C [17] и аналога релацина AB [15].

В экспериментах по дозозависимому ингибированию *in vitro* установлена способность ДМНП подавлять активность синтеза $pppGpp$ фермента Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis*. Соединение GSK-X9, для которого также установлена активность *in vitro* в отношении N-терминальной области белка Rel_{Mtb}, демонстрирует способность снижать вызываемую голоданием толерантность *M. tuberculosis* к антибиотике изониазиду [10]. Хотя ДМНП характеризуется менее эффективным значением концентрации полумаксимального ингибирования $[I]_{50}$ в 362 мкМ в сравнении с мощным ингибитором X9 ($[I]_{50} = 16$ мкМ), полученным в результате высокопроизводительного скрининга, ДМНП обладает более широким спектром установленных мишеней (р) $pppGpp$ -синтеаз микобактерий и имеет потенциал применения при разработке соединений, воздействующих на персистенцию бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод о том, что механизм действия аналога эрогоргиана ДМНП заключается в неконкурентном связывании (р) $pppGpp$ -синтеаз микобактерий. ДМНП проявляет активность в отношении длинных RSH-белков *M. smegmatis* Rel_{Msm} и *M. tuberculosis* Rel_{Mtb}, а также короткого RSH-белка малой алармонсинтетазы *M. smegmatis* RelZ, подавляя их (р) $pppGpp$ -синтезирующую активность. Таким образом, ДМНП является представителем класса ингибиторов алармонсинтеаз. Данный класс потенциально может иметь клиническое значение для борьбы с рецидивирующими бактериальными инфекциями, сложность лечения которых обусловлена, среди прочего, механизмами, ассоциированными с алармонами (р) $pppGpp$: персистенцией бактерий, толерантностью к антибиотикам и способностью к образованию биопленок.

Вклад авторов. Р.Ю. Сидоров – конструирование плазмид, наработка и выделение белков, проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, написание текста; А.Г. Ткаченко – концепция и руководство работой, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание 124020500028-4).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории органического синтеза Пермского государственного национального исследовательского университета за работу по химическому синтезу ДМНП.

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. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N. Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment, *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 320-330, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>.
2. Shao, Y., Song, H., Li, G., Li, Y., Li, Y., Zhu, L., Lu, W., and Chen, C. (2021) Relapse or re-infection, the situation of recurrent tuberculosis in Eastern China, *Front. Cell. Infect.*, **11**, 638990, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.638990>.
3. Rosser, A., Marx, F. M., and Pareek, M. (2018) Recurrent tuberculosis in the pre-elimination era, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **22**, 139-150, <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0590>.
4. Mandal, S., Njikan, S., Kumar, A., Early, J. V., and Parish, T. (2019) The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery, *Microbiology (Reading)*, **165**, 492-499, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000760>.
5. Grace, A. G., Mittal, A., Jain, S., Tripathy, J. P., Satyanarayana, S., Tharyan, P., and Kirubakaran, R. (2019) Shortened treatment regimens versus the standard regimen for drug-sensitive pulmonary tuberculosis, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **12**, CD012918, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012918.pub2>.

6. Niño-Padilla, E. I., Velazquez, C., and Garibay-Escobar, A. (2021) Mycobacterial biofilms as players in human infections: a review, *Biofouling*, **37**, 410-432, <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1925886>.
7. Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., and Singh, P. K. (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria, *Science*, **334**, 982-986, <https://doi.org/10.1126/science.1211037>.
8. Gupta, K. R., Arora, G., Mattoo, A., and Sajid, A. (2021) Stringent response in Mycobacteria: from biology to therapeutic potential, *Pathogens (Basel, Switzerland)*, **10**, 1417, <https://doi.org/10.3390/pathogens10111417>.
9. Hobbs, J. K., and Boraston, A. B. (2019) (p)ppGpp and the stringent response: an emerging threat to antibiotic therapy, *ACS Infect. Dis.*, **5**, 1505-1517, <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00204>.
10. Dutta, N. K., Klinkenberg, L. G., Vazquez, M. J., Segura-Carro, D., Colmenarejo, G., Ramon, F., Rodriguez-Miquel, B., Mata-Cantero, L., Porras-De Francisco, E., Chuang, Y.-M., Rubin, H., Lee, J. J., Eoh, H., Bader, J. S., Perez-Herran, E., Mendoza-Losana, A., and Karakousis, P. C. (2019) Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence, *Sci. Adv.*, **5**, eaav2104, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2104>.
11. Weiss, L. A., and Stallings, C. L. (2013) Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp, *J. Bacteriol.*, **195**, 5629-5638, <https://doi.org/10.1128/JB.00759-13>.
12. Atkinson, G. C., Tenson, T., and Haurlyuk, V. (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life, *PLoS One*, **6**, e23479, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>.
13. Wexselblatt, E., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kaspy, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., and Ben-Yehuda, S. (2012) Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response, *PLoS Pathog.*, **8**, e1002925, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>.
14. Wexselblatt, E., Kaspy, I., Glaser, G., Katzhendler, J., and Yavin, E. (2013) Design, synthesis and structure-activity relationship of novel Relacin analogs as inhibitors of Rel proteins, *Eur. J. Med. Chem.*, **70**, 497-504, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.036>.
15. Syal, K., Flentie, K., Bhardwaj, N., Maiti, K., Jayaraman, N., Stallings, C. L., and Chatterji, D. (2017) Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e00443-17, <https://doi.org/10.1128/AAC.00443-17>.
16. Beljantseva, J., Kudrin, P., Jimmy, S., Ehn, M., Pohl, R., Varik, V., Tozawa, Y., Shingler, V., Tenson, T., Rejman, D., and Haurlyuk, V. (2017) Molecular mutagenesis of ppGpp: turning a RelA activator into an inhibitor, *Sci. Rep.*, **7**, 41839, <https://doi.org/10.1038/srep41839>.
17. Syal, K., Bhardwaj, N., and Chatterji, D. (2017) Vitamin C targets (p)ppGpp synthesis leading to stalling of long-term survival and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **364**, fnw282, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw282>.
18. Tkachenko, A. G., Kashevarova, N. M., Sidorov, R. Y., Nesterova, L. Y., Akhova, A. V., Tsyganov, I. V., Vaganov, V. Yu., Shipilovskikh, S. A., Rubtsov, A. E., and Malkov, A. V. (2021) A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases, *Cell Chem. Biol.*, **28**, 1420-1432.e9, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.01.018>.
19. Sidorov, R. Yu., and Tkachenko, A. G. (2023) DMNP, a synthetic analog of erogorgiaene, inhibits the ppGpp synthetase activity of the small alarmone synthetase RelZ, *BIO Web Conf.*, **57**, 08002, <https://doi.org/10.1051/bioconf/20235708002>.
20. Danchik, C., Wang, S., and Karakousis, P. C. (2021) Targeting the *Mycobacterium tuberculosis* stringent response as a strategy for shortening tuberculosis treatment, *Front. Microbiol.*, **12**, 744167, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744167>.
21. Jain, V., Saleem-Batcha, R., China, A., and Chatterji, D. (2006) Molecular dissection of the mycobacterial stringent response protein Rel, *Protein Sci.*, **15**, 1449-1464, <https://doi.org/10.1110/ps.062117006>.
22. Murdeshwar, M. S., and Chatterji, D. (2012) MS_RHII-RSD, a dual-function RNase HII-(p)ppGpp synthetase from *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol.*, **194**, 4003-4014, <https://doi.org/10.1128/JB.00258-12>.
23. Singal, B., Balakrishna, A. M., Nartey, W., Manimekalai, M. S. S., Jeyakanthan, J., and Grüber, G. (2017) Crystallographic and solution structure of the N-terminal domain of the Rel protein from *Mycobacterium tuberculosis*, *FEBS Lett.*, **591**, 2323-2337, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12739>.
24. Akhova, A. V., and Tkachenko, A. G. (2019) HPLC-UV method for simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in *Mycobacterium smegmatis*, *Acta Chromatogr.*, **31**, 45-48, <https://doi.org/10.1556/1326.2017.00344>.
25. Petchiappan, A., Naik, S. Y., and Chatterji, D. (2020) RelZ-mediated stress response in *Mycobacterium smegmatis*: pGpp synthesis and its regulation, *J. Bacteriol.*, **202**, e00444-19, <https://doi.org/10.1128/JB.00444-19>.
26. Bag, S., Das, B., Dasgupta, S., and Bhadra, R. K. (2014) Mutational analysis of the (p)ppGpp synthetase activity of the Rel enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*, *Arch. Microbiol.*, **196**, 575-588, <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0996-9>.

27. Pedersen, F. S., and Kjeldgaard, N. O. (1977) Analysis of the *relA* gene product of *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 91-97, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11573.x>.
28. Wong, F., Krishnan, A., Zheng, E. J., Stärk, H., Manson, A. L., Earl, A. M., Jaakkola, T., and Collins, J. J. (2022) Benchmarking AlphaFold-enabled molecular docking predictions for antibiotic discovery, *Mol. Syst. Biol.*, **18**, e11081, <https://doi.org/10.15252/msb.202211081>.
29. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., and Velankar, S. (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D439-D444, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
30. Steinchen, W., and Bange, G. (2016) The magic dance of the alarmones (p)ppGpp, *Mol. Microbiol.*, **101**, 531-544, <https://doi.org/10.1111/mmi.13412>.
31. Sánchez-Linares, I., Pérez-Sánchez, H., Cecilia, J. M., and García, J. M. (2012) High-throughput parallel blind virtual screening using BINDSURF, *BMC Bioinformatics*, **13**, S13, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S14-S13>.
32. Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., and Tozawa, Y. (2008) Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **67**, 291-304, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06018.x>.
33. Salzer, A., Keinhörster, D., Kästle, C., Kästle, B., and Wolz, C. (2020) Small alarmone synthetases RelP and RelQ of *Staphylococcus aureus* are involved in biofilm formation and maintenance under cell wall stress conditions, *Front. Microbiol.*, **11**, 575882, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575882>.
34. Dasgupta, S., Basu, P., Pal, R. R., Bag, S., and Bhadra, R. K. (2014) Genetic and mutational characterization of the small alarmone synthetase gene *relV* of *Vibrio cholerae*, *Microbiology (Reading)*, **160**, 1855-1866, <https://doi.org/10.1099/mic.0.079319-0>.
35. Gaca, A. O., Kudrin, P., Colomer-Winter, C., Beljantseva, J., Liu, K., Anderson, B., Wang, J. D., Rejman, D., Potrykus, K., Cashel, M., Hauryliuk, V., and Lemos, J. A. (2015) From (p)ppGpp to (pp)pGpp: characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*, *J. Bacteriol.*, **197**, 2908-2919, <https://doi.org/10.1128/JB.00324-15>.
36. Syal, K., Joshi, H., Chatterji, D., and Jain, V. (2015) Novel pppGpp binding site at the C-terminal region of the Rel enzyme from *Mycobacterium smegmatis*, *FEBS J.*, **282**, 3773-3785, <https://doi.org/10.1111/febs.13373>.
37. Roghanian, M., Van Nerom, K., Takada, H., Caballero-Montes, J., Tamman, H., Kudrin, P., Talavera, A., Dzhygyr, I., Ekström, S., Atkinson, G. C., Garcia-Pino, A., and Hauryliuk, V. (2021) (p)ppGpp controls stringent factors by exploiting antagonistic allosteric coupling between catalytic domains, *Mol. Cell*, **81**, 3310-3322.e6, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.026>.
38. Krishnan, S., Petchiappan, A., Singh, A., Bhatt, A., and Chatterji, D. (2016) R-loop induced stress response by second (p)ppGpp synthetase in *Mycobacterium smegmatis*: functional and domain interdependence, *Mol. Microbiol.*, **102**, 168-182, <https://doi.org/10.1111/mmi.13453>.
39. Yang, N., Xie, S., Tang, N. Y., Choi, M. Y., Wang, Y., and Watt, R. M. (2019) The Ps and Qs of alarmone synthesis in *Staphylococcus aureus*, *PLoS One*, **14**, e0213630, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213630>.
40. Steinchen, W., Schuhmacher, J. S., Altegoer, F., Fage, C. D., Srinivasan, V., Linne, U., Marahiel, M. A., and Bange, G. (2015) Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p)ppGpp synthetase by an alarmone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 13348-13353, <https://doi.org/10.1073/pnas.1505271112>.

THE MECHANISM OF MYCOBACTERIAL (p)ppGpp SYNTHETASE INHIBITION BY SYNTHETIC EROGORGIAENE ANALOG

R. Y. Sidorov^{1,2*} and A. G. Tkachenko^{1,2}

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, the Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 614000 Perm, Russia; e-mail: sidorov.r@iegm.ru*

² *Perm State University, 614990 Perm, Russia*

The synthesis of (p)ppGpp alarmones plays a vital role in the regulation of metabolism cessation, growth rate control, virulence, bacterial persistence, and biofilm formation. The RelA/SpoT homologs superfamily proteins are responsible for (p)ppGpp alarmone synthesis, including long bifunctional RSH proteins and small alarmone synthetases. This study employs enzyme kinetics and dose-dependent inhibition

methods to investigate the specific mechanism of action of DMNP involving Rel_{Msm} and RelZ proteins, which are (p)ppGpp synthetases in *Mycobacterium smegmatis* belonging to both types, as well as Rel_{Mtb} protein from *Mycobacterium tuberculosis*. The compound DMNP has demonstrated its capability to inhibit the activity of the Rel_{Mtb} protein. According to enzyme kinetics analysis, DMNP acts as a noncompetitive inhibitor targeting the Rel_{Msm} and RelZ proteins. Molecular docking analysis allowed to localize the DMNP binding site in proximity to the (p)ppGpp synthetase domain active site. This study advances the development of alarmone synthetase inhibitor class of compounds, which includes relacin and its derivatives, alongside the investigated compound DMNP – a synthetic analog of the marine coral metabolite erogorgiaene. Unlike the conventional antibiotics, alarmone synthetase inhibitors target metabolic pathways linked to the stringent response. Although these pathways are not essential for bacteria, they regulate the development of adaptation mechanisms. Combining the conventional antibiotics that target actively growing cells with compounds that impede bacterial adaptation may potentially address prevailing challenges associated with antimicrobial resistance and bacterial persistence.

Keywords: (p)ppGpp, alarmones, mycobacteria, RelA/SpoT homologs, small alarmone synthetases, alarmone synthetase inhibitors

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ TRAIL-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

© 2024 М.И. Кобякова^{1,2*}, А.С. Сенотов¹, К.С. Краснов¹, Я.В. Ломовская¹,
И.В. Одинокова¹, А.А. Колотова¹, А.М. Ермаков¹, А.И. Звягина¹, И.С. Фадеева¹,
Е.И. Фетисова¹, В.С. Акатов¹, Р.С. Фадеев¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: margaritakobyakova@mail.ru

²Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦИГ СО РАН,
630060 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 09.10.2023

После доработки 17.11.2023

Принята к публикации 12.12.2023

Лиганд семейства фактора некроза опухоли, индуцирующий апоптоз (TRAIL/Apo2L), является многообещающим агентом для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) благодаря избирательной способности индуцировать апоптотическую гибель опухолевых клеток, не повреждая при этом нормальные клетки. Однако возникновение резистентности у клеток ОМЛ к TRAIL ограничивает его потенциал в качестве антилейкемического агента. Ранее мы выявили повышение устойчивости клеток ОМЛ человека THP-1 к TRAIL-индуцированной гибели при их липополисахарид (ЛПС)-зависимой провоспалительной активации и в *in vitro* модели ЛПС-независимой провоспалительной активации – в долговременной культуре клеток высокой плотности. В этом исследовании мы изучали механизмы данного феномена с помощью вестерн-блот анализа, анализа ферментативной активности каспазы 3, количественной ПЦР с обратной транскрипцией и проточной цитометрии. Результаты показали, что повышение резистентности к TRAIL-индуцированной гибели у клеток ОМЛ THP-1 при их провоспалительной активации связано со снижением поверхностной экспрессии проапоптотических рецепторов TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5, а также повышением содержания представителей семейства IAPs – Livin и cIAP2. Результаты этой статьи дают новые представления о роли воспаления в формировании устойчивости клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета, в частности TRAIL.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острый миелоидный лейкоз, резистентность, провоспалительная клеточная активация, TRAIL-индуцированная клеточная гибель.

DOI: 10.31857/S0320972524030026 EDN: WLKLVV

ВВЕДЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) занимают второе место по распространённости среди лейкозов и составляют 25% из всех злокачественных новообразований у детей [1]. На сегодняшний день основным способом лечения ОМЛ остаётся химиотерапия [1, 2]. Однако 15–30% пациентов не достигают ремиссии после индукционной терапии, и более чем у 60% пациентов в течение первых трёх

лет развивается рецидив [1]. Применение химиотерапевтических препаратов также вызывает ряд серьёзных негативных побочных эффектов [3]. Поэтому ведётся поиск новых направленных терапевтических подходов для лечения данного заболевания [2]. Иммуный цитокин семейства фактора некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз (TRAIL), быстро привлёк внимание в качестве нового терапевтического агента для лечения острых форм миелоидного лейкоза благодаря

Принятые сокращения: ВПК – клеточная культура высокой плотности; ЛПС – липополисахарид; НПК – клеточная культура низкой плотности; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; FADD – Fas-ассоциированный домен смерти; cFLIP – белок, ингибирующий FADD-подобный IL-1P-превращающий фермент; IAP – белок, ингибирующий апоптоз; TRAIL – цитокин семейства фактора некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз.

* Адресат для корреспонденции.

способности избирательно вызывать гибель опухолевых клеток, не вызывая цитотоксичности *in vivo* [4, 5]. В доклинических исследованиях была показана потенциальная терапевтическая эффективность препаратов на основе TRAIL [4, 5]. Однако, как и для большинства противоопухолевых препаратов, устойчивость к TRAIL-индуцированной гибели ограничивает его клиническую эффективность [4, 5]. Поэтому исследование клеточных и молекулярных механизмов, опосредующих устойчивость к цитотоксическому действию TRAIL, является актуальным на сегодняшний день. Приобретение устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели может быть опосредовано как подавлением внутриклеточных TRAIL-зависимых проапоптотических сигнальных путей [5, 6], так и нарушением экспрессии TRAIL-рецепторов на клеточной поверхности, включая потерю рецепторов DR4 и DR5, или увеличением количества рецепторов-ловушек DcR1 и DcR2 [5, 7]. В своих ранних работах мы продемонстрировали повышение устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели при их липополисахарид (ЛПС)-зависимой провоспалительной активации и в *in vitro* модели ЛПС-независимой провоспалительной активации – в долговременной культуре клеток высокой плотности (ВПК) [8, 9]. Известно, что нарушение регуляции гуморальных медиаторов воспаления (цитокинов, хемокинов и ростовых факторов) при ОМЛ может создавать микроокружение, активирующее пролиферацию, выживаемость и лекарственную устойчивость лейкозных клеток [10]. Также хорошо известно, что провоспалительные цитокины и ростовые факторы могут повышать устойчивость клеток ОМЛ к клеточной гибели за счёт активации воспалительных сигнальных путей, регулирующих внутриклеточное содержание антиапоптотических белков [11]. В то же время механизмы резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели, опосредованные воспалением, остаются неизвестными. В данной работе мы выявили, что провоспалительная активация клеток ОМЛ может приводить к снижению количества проапоптотических TRAIL-рецепторов на их поверхности и препятствовать активации внутриклеточного проапоптотического сигнального пути TRAIL.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белка izTRAIL. Для получения растворимой тримерной формы белка izTRAIL был синтезирован мотив изолейциновой застёжки и ген *TRAIL* [12, 13], который в дальнейшем клонировали в плазмидном векторе pET101 («Novagen», США). Полученным геном трансформировали

штамм *Escherichia coli* BL21(DE3), и методом микробного синтеза с последующей очисткой металл-аффинной хроматографией получали тримерную форму izTRAIL с молекулярной массой около 80 кДа, согласно методу Fadeev et al. [14].

Культура клеток и условия культивирования. В работе использовали клетки ОМЛ человека линии ТНР-1, полученные из Американской коллекции типовых клеточных культур (АТСС, США). Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco», США), содержащей 40 мкг/мл гентамицина сульфата («Sigma-Aldrich»), при 37 °С и 5% CO₂ в газовой фазе. Клетки высевали в количестве 5·10³ в 100 мкл питательной среды в лунки U-образного 96-луночного культурального планшета. Через 1 сутки после посева количество клеток в лунке увеличивалось до 1·10⁴ (1·10⁵ кл./мл), и мы использовали их как культуры низкой плотности (далее ТНР-1НПК). Через 5 суток культивирования без смены питательной среды количество клеток в лунке выросло до 1·10⁵ (1·10⁶ кл./мл), формируя трёхмерный многоклеточный агрегат – высокоплотную клеточную культуру (далее ТНР-1ВПК). Для активации провоспалительного фенотипа (ТНР-1ЛПС) клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки в присутствии 10 мкг/мл ЛПС из *E. coli* O111:B4 («Sigma-Aldrich») в течение 24 ч [5, 9].

Оценка цитотоксического действия белка izTRAIL проводилась по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления izTRAIL) культурах через 1, 2, 4, 8 и 24 ч после добавления izTRAIL. Количество живых клеток после инкубации с izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления резазурина («Sigma-Aldrich»). Для этого к клеткам добавляли резазурин (30 мкг/мл), инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37 °С и 5% CO₂ в инкубаторе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 («Tecan», Швейцария) [5, 9].

Вестерн-блот анализ. Для получения клеточного лизата использовали буферный раствор RIPA («Santa Cruz Biotechnology», США). Электрофоретическое разделение белка проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с помощью камеры Mini-Protean Tetra cell и источника тока PowerPac Universal Power Supply («Bio-Rad», США). Перенос на 0,2 мкм нитроцеллюлозные мембраны («Bio-Rad») проводили при помощи системы переноса Trans-Blot Turbo, используя набор реагентов Trans-Blot Turbo Transfer Kit («Bio-Rad»), согласно инструкции

производителя. Блокирование неспецифического связывания мембран проводили в 3%-ном растворе БСА в 0,1%-ном Tris-буферном физиологическом растворе с полисорбатом 20 (TBST). Окраска первичными антителами проводилась в течение ночи при температуре +4 °С. После проводили окраску вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре. Хемилюминесцентную детекцию блотов проводили гель-документатором ChemiDoc MP («Bio-Rad») с использованием субстрата Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad»). Для анализа использовали следующие первичные антитела: FLIP, Caspase-8 («Enzo», США); GAPDH, FADD («Santa Cruz»); BID («Cell Signaling Technology», США); вторичные антитела: Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate («Bio-Rad»), Anti-mouse IgG HRP-linked («Santa Cruz»). Количественный анализ интенсивности белковых полос проводили с помощью денситометрии, с использованием программного обеспечения Image Lab 6.0 («Bio-Rad»).

Анализ поверхностной экспрессии рецепторов к TRAIL. Для анализа поверхностной экспрессии рецепторов к TRAIL клетки отмывали в буфере Cell Staining Buffer («BioLegend», США). Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител к APC anti-human CD261 (TRAIL-R1, DR4), PE anti-human CD262 (TRAIL-R2, DR5), ALEXA Fluor 647 anti-human CD263 (TRAIL-R3, DcR1), PE anti-

human CD264 (TRAIL-R4, DcR2) («BioLegend»). Для оценки возможности неспецифического связывания антител клетки окрашивали антителами APC Mouse IgG1 к isotype Ctrl, FITC Mouse IgG1 к isotype Ctrl, PE Mouse IgG1 к isotype, PE Mouse IgG2a к isotype, APC Mouse IgG2a к isotype («BioLegend»). Окрашивание проводилось в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте с последующей фиксацией 2%-ным раствором параформальдегида. Анализ проводили методом проточной цитометрии на приборе BD Accuri C6 («BD Bioscience», США). В каждом эксперименте анализировали 30 000 событий. Гистограммы экспрессии рецепторов к TRAIL строили с помощью программного обеспечения FlowJo v10 («BD Bioscience»).

Анализ ферментативной активности каспазы 3 проводили с помощью коммерческого набора Caspase-3 Activity Assay Kit («Cell Signaling Technology»), следуя рекомендациям производителя, на планшетном спектрофлуориметре Infinite F200 («Tecan»).

Анализ содержания cleaved PARP1/2. Для анализа экспрессии неактивной формы поли(ADP-рибоза)-полимеразы cleaved PARP1/2 (Asp214) клетки отмывали в буфере Cell Staining Buffer, после чего инкубировали в течение ночи при температуре -20 °С в буфере True-Phos™ Perm Buffer («BioLegend»). Окрашивание проводили в буфере

Таблица 1. Характеристика используемых в работе праймеров мРНК для проведения ПЦР в реальном времени

№	Название	Последовательность (5' → 3')	T _m , °С	Длина продукта (bp)
1	NAIP F	GGGGACTTCGTCTGGGATTC	59,82	127
	NAIP R	CTGGCCAGTGGAAGGAAAGT	59,89	
2	BIRC2 F	CTGATTCCTCCGGCTCTGCG	60,59	133
	BIRC2 R	AGCACGAGCAAGACTCCTTT	59,61	
3	BIRC3 F	TCCATGGGTCAACATGCCA	59,89	140
	BIRC3 R	CTCCTGGGCTGTCTGATGTG	60,11	
4	XIAP F	TGGCGCTCATCGAGGGA	60,43	113
	XIAP R	TGTCTGCAGGTACACAAGTTTATAG	59,19	
5	BIRC5 F	TTCAAGGAGCTGGAAGGCTG	59,96	141
	BIRC5 R	GCAACCGGACGAATGCTTTT	60,04	
6	BIRC6 F	AGAAAGGGATGATGCAAGTACG	58,46	122
	BIRC6 R	CTACCTGGGCTGCTGAACTC	60,11	
7	BIRC7 F	GGCCTCCTTCTATGACTGGC	59,89	109
	BIRC7 R	GCAGAAGAAGCACCTCACCT	59,96	
8	BIRC8 F	GGAGAGGAAAAGCGTTGTGC	59,76	128
	BIRC8 R	TCTTCACTATGCATGGCGGG	60,18	

Cell Staining Buffer с использованием моноклонального антитела PE anti-human cleaved PARP1/2 (Asp214) («BioLegend»). Для оценки неспецифического связывания клетки окрашивали контрольным антителом PE Mouse IgG1 к изотипа Ctrl. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Анализ экспрессии проводили с использованием проточного цитометра BD Accuri C6.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Праймеры мРНК для выбранных генов *NAIP*, *BIRC2*, *BIRC3*, *XIAP*, *BIRC5*, *BIRC6*, *BIRC7*, *BIRC8* были сконструированы с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (National Library of Medicine, США) с учтёнными параметрами включения интрона и допуска вариантов альтернативного сплайсинга. Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора innuPREP RNA Mini Kit 2.0 («Analytik Jena», Германия). Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор реактивов для синтеза кДНК на матрице РНК MMLV RT («Евроген, Россия»). Общую реакционную смесь инкубировали 30 мин при 38 °С в амплификаторе Bio-Rad C1000 Thermal Cycler («Bio-Rad»). Синтез и амплификацию кДНК проводили с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR («Евроген») на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR («Thermo Fisher Scientific», США) и программного обеспечения QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.2 («Thermo Fisher Scientific»). Уровни экспрессии были количественно определены путём измерения значений порога цикла (Ct) и нормализованы к β-актину (ACTB) и гену, кодирующему субъединицу А сукцинатдегидрогеназы (SADH). Для измерения изменения экспрессии генов использовали веб-сервис RT² Profiler PCR Data Analysis («Quagen», Нидерланды) и подсчитывали fold change в каждом образце по сравнению с контрольной группой. Различия при $p < 0,05$ считались значимыми.

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трёх повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма–Сидака, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Повышение TRAIL-резистентности клеток ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС сопровождается снижением поверхностной экспрессии рецепторов DR4 и DR5. Клетки ОМЛ человека линии ТНР-1, культивируемые в условиях высокой плотности

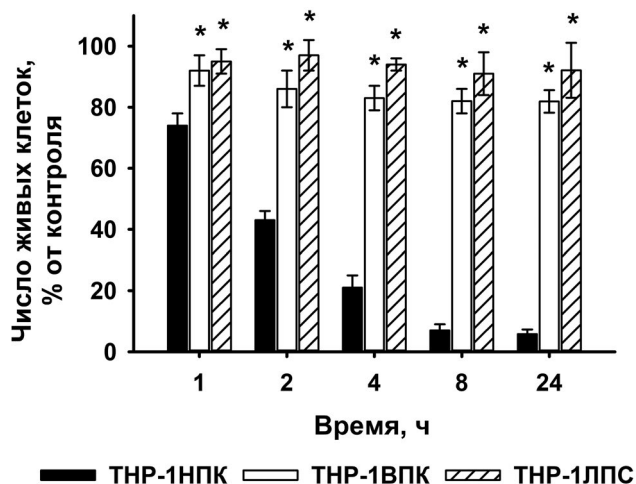


Рис. 1. Жизнеспособность клеток ТНР-1НПК, ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС после инкубации со 100 нг/мл izTRAIL в течение 1, 2, 4, 8 и 24 ч. Данные приведены в виде среднего значения ± SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками ТНР-1 НПК

(ТНР-1ВПК), низкой плотности (ТНР-1НПК) и обработанные в течение 24 ч 10 мкг/мл липополисахарида (далее ТНР-1ЛПС), подвергали воздействию 100 нг/мл izTRAIL в течение 0, 1, 2, 4, 8 и 24 ч. Из рис. 1 видно, что клетки ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС были гораздо устойчивее к действию izTRAIL по сравнению с клетками ТНР-1НПК. Так, число живых клеток ТНР-1ВПК и ТНР-1НПК после 24 ч инкубации со 100 нг/мл izTRAIL составляло более 80%, в свою очередь, клеток ТНР-1НПК – менее 10%, что согласуется с ранее полученными нами результатами [8, 9]. Стоит отметить, что в своих предыдущих работах мы показали, что в клетках ТНР-1, культивируемых в условиях ВПК, происходит активация ряда воспалительных сигнальных путей, регулируемых транскрипционным ядерным фактором каппа-Би (NF-κB), а также клетки приобретают фенотипические черты, характерные для воспалительной клеточной активации [8, 9].

Далее в работе мы рассмотрели активность ключевых белков-участников TRAIL-зависимого проапоптотического сигнального пути, которые могут регулировать чувствительность опухолевых клеток к действию TRAIL. Одной из основных причин повышения устойчивости к TRAIL-опосредованной гибели принято считать снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL DR4 (TRAIL-R1) и DR5 (TRAIL-R2), а также увеличение экспрессии рецепторов-ловушек для TRAIL – DcR1 (TRAIL-R3) и DcR2 (TRAIL-R4) – на внешней клеточной мембране [5, 7, 15, 16]. Поэтому мы исследовали экспрессию данных рецепторов на внешней клеточной мембране у клеток ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС. Анализ экспрессии проапоптотических рецепторов TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5 показал снижение числа клеток, несущих TRAIL-R1/DR4,

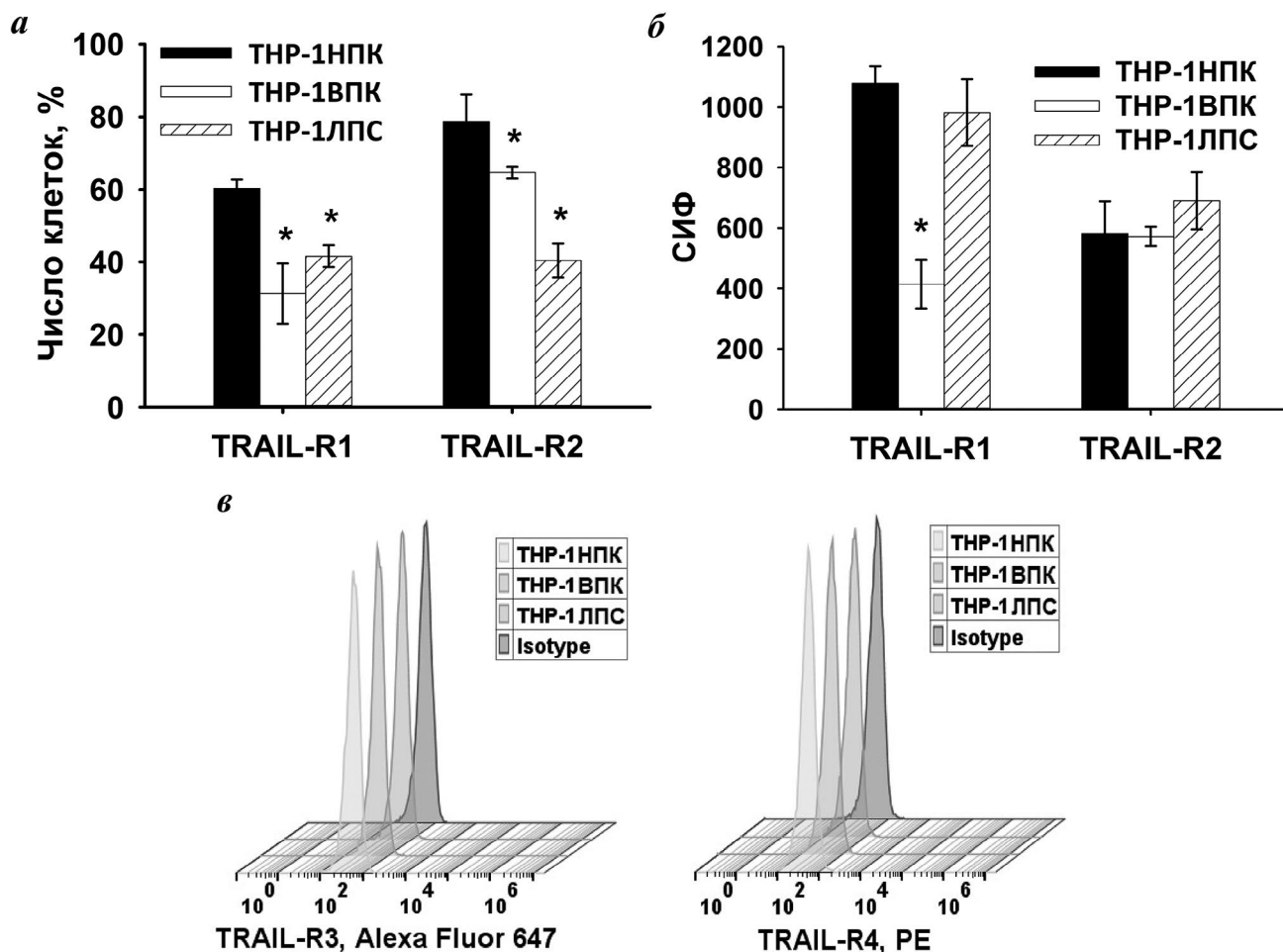


Рис. 2. Поверхностная экспрессия рецепторов к TRAIL у клеток THP-1НПК, THP-1ВПК и THP-1ЛПС. *а* – Число клеток в популяции THP-1ВПК и THP-1ЛПС, несущих проапоптотические рецепторы TRAIL-R1/DR4 или TRAIL-R2/DR5, в сравнении с клетками THP-1НПК. *б* – Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) антител APC anti-human CD261 (DR4) и PE anti-human CD262 (DR5) в клетках THP-1ВПК и THP-1ЛПС, несущих проапоптотические рецепторы TRAIL-R1/DR4 или TRAIL-R2/DR5, в сравнении с клетками THP-1НПК. *в* – Гистограммы экспрессии антиапоптотических рецепторов TRAIL-R3/DcR1 и TRAIL-R4/DcR2 на поверхности клеток THP-1НПК, THP-1ВПК и THP-1ЛПС. Isotype – контроль изотипа антител. По оси ординат представлено число анализируемых событий. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками THP-1 НПК

с 60 ± 2 до 31 ± 8 и $41 \pm 2\%$, а также снижение числа клеток, несущих TRAIL-R2/DR5, с 80 ± 6 до 61 ± 2 и $40 \pm 3\%$ в культуре THP-1ВПК и THP-1ЛПС соответственно (рис. 2, *а, б*).

Также для клеток THP-1ВПК было выявлено снижение поверхностной экспрессии рецептора TRAIL-R1/DR4 (рис. 2, *а, б*). Далее мы обнаружили отсутствие антиапоптотических рецепторов TRAIL-R3/DcR1 и TRAIL-R4/DcR2 на поверхности как чувствительных к действию TRAIL клеток THP-1 в НПК, так и TRAIL-резистентных клеток THP-1ВПК и THP-1ЛПС (рис. 2, *в*).

Активация внутриклеточного TRAIL-зависимого проапоптотического сигнального пути полностью подавляется в TRAIL-резистентных клетках THP-1ЛПС, но не THP-1ВПК. Другой, не менее важной причиной повышения устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели

может являться подавление внутриклеточных TRAIL-зависимых проапоптотических сигнальных путей [6]. Известно, что взаимодействие лиганда TRAIL с проапоптотическими рецепторами TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5 на внешней мембране клетки приводит к запуску внешнего пути апоптоза [17, 18, 19–21]. Ключевым событием процесса индукции и реализации TRAIL-индуцированной гибели является связывание лиганда TRAIL с рецептором, что приводит к тримеризации рецепторов, присоединению к рецептору адаптерного белка FADD (Fas-ассоциированный домен смерти) и прокаспазы 8 и формированию многокомпонентного сигнального комплекса DISC, на базе которого происходит автокаталитический протеолиз неактивной прокаспазы 8 в активную инициаторную каспазу [20–22]. Далее каспаза 8 инициирует протеолитическую конверсию цитозольного белка Bid

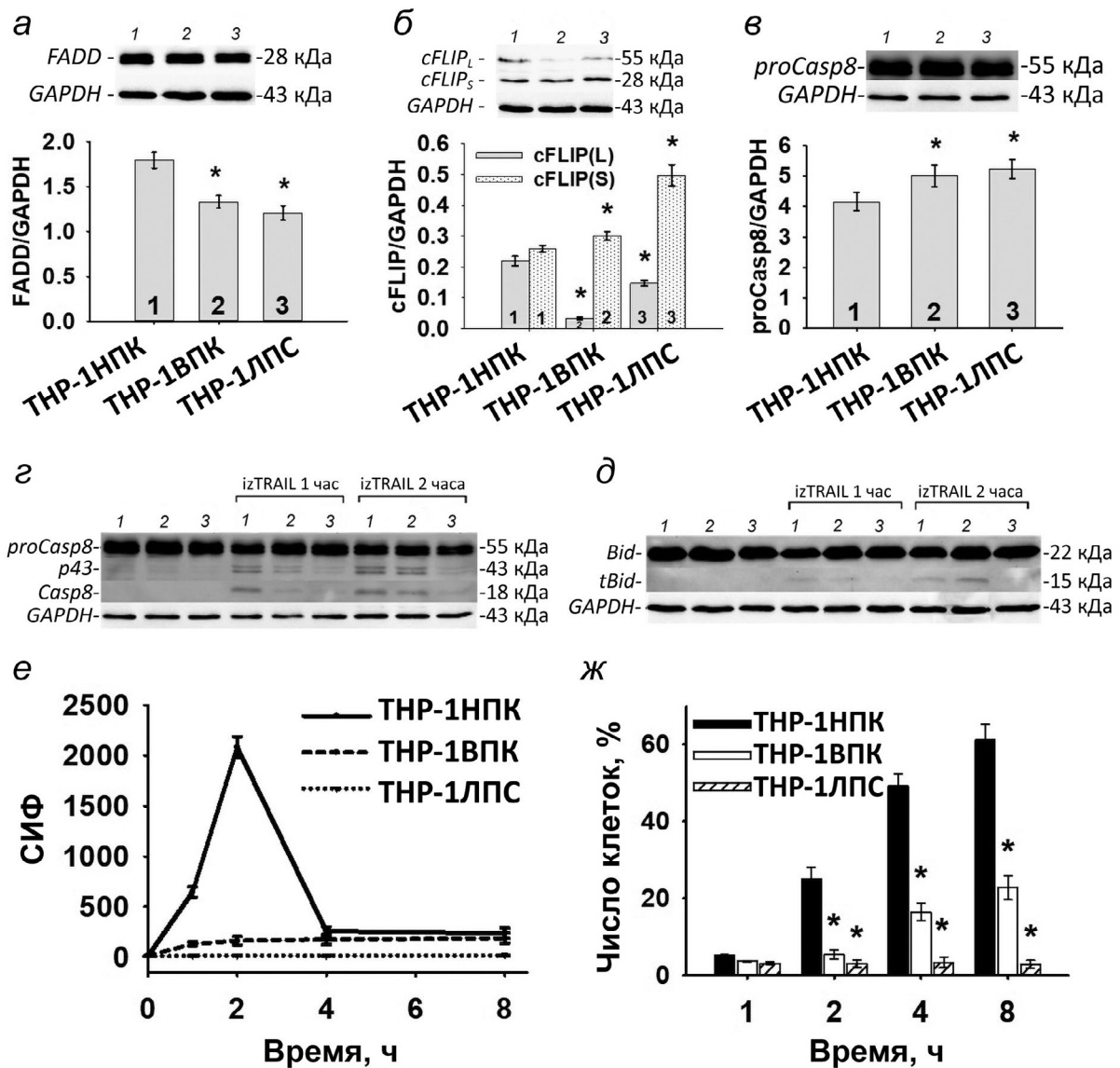


Рис. 3. Анализ активации внутриклеточного TRAIL-зависимого проапоптотического сигнального пути в TRAIL-резистентных клетках THP-1ВПК и THP-1ЛПС. Содержание белков FADD (а), cFLIP (б) и прокаспазы 8 (в) в клетках THP-1ВПК (1 столбец), THP-1НПК (2 столбец) и THP-1ЛПС (3 столбец) относительно референсного белка GAPDH. Содержание белков каспазы 8 (г) и tBid (д) в клетках THP-1ВПК (1 столбец), THP-1НПК (2 столбец) и THP-1ЛПС (3 столбец) до и после 1 и 2 ч обработки 100 нМ izTRAIL относительно референсного белка GAPDH. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) AMC (е) и число клеток, содержащих cleaved PARP1/2 (Asp214) (ж), в популяции THP-1НПК, THP-1ВПК и THP-1ЛПС до и после 1, 2, 4 и 8 ч обработки 100 нг/мл izTRAIL относительно референсного белка GAPDH. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками THP-1 в НПК

в усечённую форму – tBid, которая связывается с белками BAX и BAK, индуцируя тем самым выход из межмембранного пространства митохондрии ряда проапоптотических факторов и активации эффекторных каспаз 3/7 [21, 23]. В свою очередь, антиапоптотический белок cFLIP может подавлять передачу проапоптотического TRAIL-сигнального пути [23]. Показано, что в большинстве случаев при злокачественных новообразованиях cFLIP гиперэкспрессирован [21, 23]. Таким образом, изменение содержания белков FADD, cFLIP, прокаспазы 8 и Bid, а также активной каспазы 8 и tBid

может регулировать чувствительность опухолевых клеток к действию TRAIL. В связи с этим далее в работе мы проводили исследование активации внутриклеточного TRAIL-зависимого проапоптотического сигнального пути, для чего определяли содержание белков FADD, cFLIP, каспазы 8, tBid в резистентных клетках THP-1ВПК и THP-1ЛПС в сравнении с чувствительными к действию TRAIL клетками THP-1НПК.

Из рис. 3 видно, что в TRAIL-резистентных клетках THP-1ВПК и THP-1ЛПС наблюдается небольшое снижение содержания адаптерного белка

FADD ($p \leq 0,05$) и длинной изоформы cFLIP – cFLIP_L ($p \leq 0,05$), не препятствующей аутокатализу каспазы 8 [24, 25], и не изменяется содержание прокаспазы 8 по сравнению с клетками ТНР-1НПК, чувствительными к действию TRAIL.

Далее мы выявили, что после 2 ч обработки 100 нг/мл izTRAIL содержание активной каспазы 8 (p18) в клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС было ниже по сравнению с клетками ТНР-1НПК ($p \leq 0,05$ для всех клеточных вариантов). В то же время после 2 ч обработки 100 нг/мл izTRAIL наличие tBid было характерно только для клеток ТНР-1НПК и ТНР-1ВПК, но не ТНР-1ЛПС (рис. 3, г, д). Поскольку мы обнаружили, что повышение устойчивости клеток ОМЛ ТНР-1ВПК сопровождалось увеличением содержания в них проапоптотического белка tBid, который опосредует пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, выход из межмембранного пространства митохондрии ряда проапоптотических факторов и активацию эффекторных каспаз [21, 26], далее мы провели определение ферментативной активности каспазы 3, а также определение содержания cleaved PARP-1 в резистентных клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС в сравнении с чувствительными к действию TRAIL клетками ТНР-1НПК. Ферментативную активность каспазы 3 оценивали по накоплению флуорогенного АМС, который высвобождается из Ac-DEVD-АМС при расщеплении каспазой 3.

Показано, что после инкубации со 100 нг/мл izTRAIL ферментативная активность каспазы 3 была существенно ниже в клетках ТНР-1ВПК по сравнению с клетками ТНР-1НПК (рис. 3, е). Далее, мы обнаружили, что после обработки 100 нг/мл izTRAIL число клеток, содержащих неактивную форму поли(ADP-рибоза)-полимеразы cleaved PARP1/2 (Asp214), основного маркера апоптоза, среди TRAIL-резистентных клеток ТНР-1ВПК было значительно ниже в сравнении с клетками ТНР-1НПК (рис. 3, ж). Мы не обнаружили cleaved PARP1/2 (Asp214) и изменений в ферментативной активности каспазы 3 в клетках ТНР-1ЛПС после инкубации со 100 нг/мл izTRAIL (рис. 3, е, ж), что согласуется с представленными выше результатами о содержании в них проапоптотического белка tBid после инкубации со 100 нг/мл izTRAIL (рис. 3, д).

В TRAIL-резистентных клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС повышается экспрессия представителей семейства IAPs (IAP – белок, ингибирующий апоптоз). Хорошо известно, что активная каспаза 8 может индуцировать апоптотический каскад как за счёт прямого процессинга эффекторных каспаз 3/7, так и опосредованно, через tBid-зависимую сборку апоптосомы с активацией каспазы 9 и последующим процессингом каспаз 3/7 [21, 27]. В связи с тем, что при инкубации с izTRAIL у TRAIL-резистентных клеток ТНР-1ВПК происходила акти-

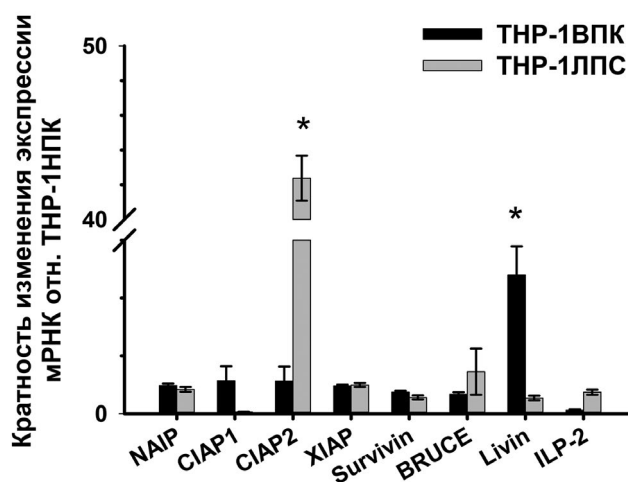


Рис. 4. Уровень экспрессии мРНК генов белков семейства IAPs (BIRC) в клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС в сравнении с клетками ТНР-1НПК. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p < 0,05$ в сравнении с клетками ТНР-1 в НПК

вация каспазы 8 и образование tBid, но не повышение активности каспазы 3, а у клеток ТНР-1ЛПС, в свою очередь, происходила активация каспазы 8, но не образовывался tBid и не повышалась активность каспазы 3, мы предположили, что данный эффект может быть связан с непосредственным ингибированием как активности каспаз 8 и 3, так и сборки апоптосомы. Главными внутриклеточными ингибиторами панкаспазной активности являются белки семейства IAP (BIRC), образующие комплексы с каспазами с последующей их протеосомальной деградацией [27, 28]. Поэтому мы исследовали уровень экспрессии генов всех белков семейства IAPs в резистентных клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС в сравнении с чувствительными к действию TRAIL клетками ТНР-1НПК.

Было показано, что в TRAIL-резистентных клетках ТНР-1ВПК достоверно ($p \leq 0,05$) в $4,8 \pm 1,5$ раза повышался уровень экспрессии гена белка ML-IAP/livin, ингибитора каспаз 3, 7 и 9 [27, 28, 29], в клетках ТНР-1ЛПС в $42,3 \pm 2,5$ раза повышался уровень экспрессии гена белка cIAP2, ингибитора каспаз 3, 7, 8 и 10 [24, 28, 30], относительно клеток ТНР-1НПК, чувствительных к действию TRAIL (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитокин TRAIL – мембранно-связанный белок семейства фактора некроза опухоли (ФНО), представленный на внешней клеточной мембране цитотоксических Т-клеток, НК-клеток и миелоидных дендритных клеток. Данный белок является одним из главных молекулярных эффекторов

противоопухолевого иммунитета и индуцирует селективный рецептор-опосредованный апоптоз трансформированных клеток, связываясь с мембранными рецепторами DR4 и DR5 [17, 31]. Из-за своей способности специфически вызывать гибель у опухолевых клеток, не затрагивая нормальные, TRAIL вызвал восторженный интерес во всём мире в качестве потенциальной терапии онкологических заболеваний, включая ОМЛ [32, 33]. Однако клинические исследования, основанные на использовании рекомбинантных человеческих белков TRAIL или агонистических моноклональных антител против рецепторов к TRAIL (DR4/5), не продемонстрировали клиническую эффективность даже в сочетании с традиционной химиотерапией [32–34], что значительно снизило интерес к использованию TRAIL в терапии злокачественных новообразований. За последнее десятилетие исследования показали, что только небольшая часть опухолевых клеток чувствительна к TRAIL, в то время как большинство клеток опухолей устойчивы к этому белку, что ограничивает потенциал терапии злокачественных новообразований на его основе [21]. Ранее мы обнаружили повышение устойчивости клеток ОМЛ к действию TRAIL при их провоспалительной активации в двух моделях: в *in vitro* модели ЛПС-независимой провоспалительной активации – в долговременной культуре клеток высокой плотности (ТНР-1ВПК) – и при их ЛПС-зависимой провоспалительной активации (ТНР-1ЛПС) [8, 9]. Интерес к данным *in vitro* моделям обусловлен в первую очередь тем, что в научном поле появляется всё больше данных, предполагающих важную роль воспаления не только в возникновении и развитии злокачественных новообразований, но и в возникновении и/или повышении лекарственной устойчивости и резистентности опухолевых клеток к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета [9, 35–39]. Однако вопрос о механизмах данного феномена остаётся открытым.

Наши результаты показывают, что при провоспалительной активации клеток ОМЛ повышение их устойчивости к действию TRAIL в *in vitro* модели ЛПС-независимой провоспалительной активации – в долговременной культуре клеток высокой плотности (ТНР-1ВПК) – и при их ЛПС-зависимой провоспалительной активации (ТНР-1ЛПС) сопровождается снижением поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4/5 и содержания внутриклеточного проапоптотического адаптерного белка FADD, а также снижением содержания активной длинной изоформы проапоптотического белка cFLIP_L. Как уже было отмечено выше, снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL DR4 (TRAIL-R1) и DR5 (TRAIL-R2) на внешней клеточной мембране [5, 7],

а также изменение содержания белка FADD могут регулировать чувствительность опухолевых клеток к действию TRAIL [40]. В то же время мы выявили и различия в активации проапоптотического TRAIL-индуцированного сигнального пути между клетками ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС. Так, в TRAIL-резистентных клетках ТНР-1ВПК, в отличие от клеток ТНР-1ЛПС, при инкубации с izTRAIL инициировалось образование активной каспазы 8 и активатора сборки апоптосомы – укороченной формы tBid. Однако мы обнаружили в клетках ТНР-1ВПК незначительное повышение TRAIL-индуцированной активности эффекторных каспаз 3/7 и накопления белка cPARP в сравнении с TRAIL-чувствительными клетками ТНР-1ЛПС, что свидетельствует о слабом развитии TRAIL-индуцированного апоптоза. Мы связываем это с увеличением экспрессии ингибитора эффекторных каспаз – белка Livin, и ингибитора выхода цитохрома c и сборки апоптосомы – белка Bcl-2, повышение содержания которого в клетках ТНР-1ВПК было показано ранее [9]. В случае с клетками, обработанными ЛПС, ингибирование TRAIL-индуцированного апоптоза может происходить на начальном этапе, путём блокирования активации инициаторных каспаз 8/10, за счёт многократно возросшей экспрессии cIAP2, что согласуется с результатами других исследовательских групп [41, 42]. Стоит подчеркнуть, что экспрессия Livin, Bcl-2 и cIAP2 находится под транскрипционным контролем ядерного фактора NF-κB [43–47], активация которого в клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС нами была показана ранее [9].

Результаты представленной работы дают новые представления о роли воспаления и клеточного микроокружения в формировании устойчивости клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета, в частности TRAIL. Полученные результаты представляют интерес для понимания молекулярных механизмов уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора, а также показывают принципиальную возможность коррекции устойчивости опухолевых клеток к медиаторам противоопухолевого иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов резистентности клеток ОМЛ к гибели, индуцированной действием эффекторов противоопухолевого иммунитета, остаётся крайне актуальной задачей. В настоящей работе показан новый возможный механизм уклонения клеток ОМЛ от молекулярного эффектора противоопухолевого иммунитета цитокина TRAIL при использовании *in vitro* моделей. Данный механизм основан на провоспалительной клеточной

активации и реализуется через снижение экспрессии на клеточной поверхности проапоптотических рецепторов TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5 и повышение содержания антиапоптотических факторов Livin и cIAP2.

Вклад авторов. Р.С. Фадеев, М.И. Кобякова, А.С. Сенотов, В.С. Акатов – концепция и руководство работой; М.И. Кобякова, А.С. Сенотов, К.С. Краснов, И.В. Одинокова, А.А. Колотова, А.М. Ермаков, Е.И. Фетисова – проведение экспериментов; М.И. Кобякова, А.С. Сенотов, Я.В. Ломовская, И.С. Фадеева, А.И. Звягина – обсуждение результатов исследова-

ния; М.И. Кобякова, А.С. Сенотов – написание текста; Р.С. Фадеев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-01025-23-01.

Благодарности. В работе использовали оборудование центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

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. Premnath, N., and Madanat, Y. F. (2023) Paradigm shift in the management of acute myeloid leukemia – approved options in 2023, *Cancers*, **15**, 3002, <https://doi.org/10.3390/cancers15113002>.
2. Totiger, T. M., Ghoshal, A., Zabroski, J., Sondhi, A., Bucha, S., Jahn, J., Feng, Y., and Taylor, J. (2023) Targeted therapy development in acute myeloid leukemia, *Biomedicines*, **11**, 641, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020641>.
3. Van den Boogaard, W. M. C., Komninos, D. S. J., and Vermeij, W. P. (2022) Chemotherapy side-effects: not All DNA damage is equal, *Cancers*, **14**, 627, <https://doi.org/10.3390/cancers14030627>.
4. Razeghian, E., Suksatan, W., Sulaiman Rahman, H., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Hassanzadeh, A., Marofi, F., Yazdanifar, M., and Jarahian, M. (2021) Harnessing TRAIL-induced apoptosis pathway for cancer immunotherapy and associated challenges, *Front. Immunol.*, **12**, 699746, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699746>.
5. Lomovskaya, Y. V., Kobayakova, M. I., Senotov, A. S., Lomovsky, A. I., Minaychev, V. V., Fadeeva, I. S., Shtatnova, D. Y., Krasnov, K. S., Zvyagina, A. I., Akatov, V. S., and Fadeev, R. S. (2022) Macrophage-like THP-1 cells derived from high-density cell culture are resistant to TRAIL-induced cell death via down-regulation of death-receptors DR4 and DR5, *Biomolecules*, **12**, 150, <https://doi.org/10.3390/biom12020150>.
6. Zhang, L., and Fang, B. (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer, *Cancer Gene Ther.*, **12**, 228-237, <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700792>.
7. Cheng, J., Hylander, B. L., Baer, M. R., Chen, X., and Repasky, E. A. (2006) Multiple mechanisms underlie resistance of leukemia cells to Apo2 Ligand/TRAIL, *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 1844-1853, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0050>.
8. Kobayakova, M. I., Lomovskaya, Y. V., Senotov, A. S., Lomovsky, A. I., Minaychev, V. V., Zvyagina, A. I., Solovieva, M. E., Fadeeva, I. S., Akatov, V. S., and Fadeev, R. S. (2021) Appearance of signs of differentiation and pro-inflammatory phenotype in acute myeloid leukemia cells THP-1 with an increase in their TRAIL resistance in cell aggregates *in vitro*, *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol.*, **15**, 97-105, <https://doi.org/10.1134/S1990747821010050>.
9. Kobayakova, M., Lomovskaya, Y., Senotov, A., Lomovsky, A., Minaychev, V., Fadeeva, I., Shtatnova, D., Krasnov, K., Zvyagina, A., Odinokova, I., Akatov, V. S., and Fadeev, R. S. (2022) The increase in the drug resistance of acute myeloid leukemia THP-1 cells in high-density cell culture is associated with inflammatory-like activation and anti-apoptotic Bcl-2 Proteins, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7881, <https://doi.org/10.3390/ijms23147881>.
10. Binder, S., Luciano, M., and Horejs-Hoeck, J. (2018) The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): a focus on pro- and anti-inflammatory mediators, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **43**, 8-15, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.08.004>.
11. Li, X., Miao, H., Zhang, Y., Li, W., Li, Z., Zhou, Y., Zhao, L., and Guo, Q. (2015) Bone marrow microenvironment confers imatinib resistance to chronic myelogenous leukemia and oroxylin A reverses the resistance by suppressing Stat3 pathway, *Arch. Toxicol.*, **89**, 121-136, <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1226-6>.
12. Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., and Tanaka, T. (1998) An isoleucine zipper peptide forms a native-like triple stranded coiled coil in solution, *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055, <https://doi.org/10.1093/protein/11.11.1051>.
13. Ganten, T. M., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Buchler, P., Haas, T. L., Schader, M. B., Untergasser, A., Stremmel, W., and Walczak, H. (2006) Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2640-2646, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2635>.

14. Fadeev, R., Chekanov, A., Solovieva, M., Bezborodova, O., Nemtsova, E., Dolgikh, N., Fadeeva, I., Senotov, A., Kobyakova, M., Evstratova, Y., Yakubovskaya, R., and Akatov, V. (2019) Improved anticancer effect of recombinant protein Iztrail combined with Sorafenib and peptide iRGD, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 525, <https://doi.org/10.3390/ijms20030525>.
15. Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family, *J. Exp. Med.*, **186**, 1165-1170, <https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1165>.
16. Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain, *Immunity*, **7**, 813-820, [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80399-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80399-4).
17. Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Rauch, C. T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL, *EMBO J.*, **16**, 5386-5397, <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5386>.
18. Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *Science*, **276**, 111-113, <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.111>.
19. Stolfi, C., Pallone, F., and Monteleone, G. (2012) Molecular targets of TRAIL-sensitizing agents in colorectal cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 7886-7901, <https://doi.org/10.3390/ijms13077886>.
20. Wajant, H. (2019) Molecular mode of action of TRAIL receptor agonists – common principles and their translational exploitation, *Cancers*, **11**, 954, <https://doi.org/10.3390/cancers11070954>.
21. Pimentel, J. M., Zhou, J.-Y., and Wu, G. S. (2023) The role of TRAIL in Apoptosis and immunosurveillance in cancer, *Cancers*, **15**, 2752, <https://doi.org/10.3390/cancers15102752>.
22. Beyer, K., Baukloh, A.-K., Stoyanova, A., Kamphues, C., Sattler, A., and Kotsch, K. (2019) Interactions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) with the immune system: implications for inflammation and cancer, *Cancers*, **11**, 1161, <https://doi.org/10.3390/cancers11081161>.
23. Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., and Gores, G. J. (2007) cFLIP_L prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **292**, G1337-G1346, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00497.2006>.
24. Smyth, P., Sessler, T., Scott, C. J., and Longley, D. B. (2020) FLIP(L): the pseudo-caspase, *FEBS J.*, **287**, 4246-4260, <https://doi.org/10.1111/febs.15260>.
25. Boatright, K. M., Deis, C., Denault, J.-B., Sutherlin, D. P., and Salvesen, G. S. (2004) Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L), *Biochem. J.*, **382**, 651-657, <https://doi.org/10.1042/BJ20040809>.
26. Wang, Y., and Tjandra, N. (2013) Structural insights of tBid, the caspase-8-activated Bid, and its BH3 domain, *J. Biol. Chem.*, **288**, 35840-35851, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503680>.
27. Berthelet, J., and Dubrez, L. (2013) Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs), *Cells*, **2**, 163-187, <https://doi.org/10.3390/cells2010163>.
28. Cetraro, P., Plaza-Diaz, J., MacKenzie, A., and Abadía-Molina, F. (2022) A review of the current impact of inhibitors of apoptosis proteins and their repression in cancer, *Cancers*, **14**, 1671, <https://doi.org/10.3390/cancers14071671>.
29. Kasof, G. M., and Gomes, B. C. (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member, *J. Biol. Chem.*, **276**, 3238-3246, <https://doi.org/10.1074/jbc.M003670200>.
30. Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases, *EMBO J.*, **17**, 2215-2223, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2215>.
31. Alizadeh Zeinabad, H., and Szegezdi, E. (2022) TRAIL in the treatment of cancer: from soluble cytokine to nanosystems, *Cancers*, **14**, 5125, <https://doi.org/10.3390/cancers14205125>.
32. Montinaro, A., and Walczak, H. (2023) Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a long walk with thrilling discoveries, *Cell Death Differ.*, **30**, 237-249, <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01059-z>.
33. Dijk, M. V., Murphy, E., Morrell, R., Knapper, S., O'Dwyer, M., Samali, A., and Szegezdi, E. (2011) The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes AML with myelomonocytic differentiation to TRAIL mediated apoptosis, *Cancers*, **3**, 1329-1350, <https://doi.org/10.3390/cancers3011329>.
34. Dubuisson, A., and Micheau, O. (2017) Antibodies and derivatives targeting DR4 and DR5 for cancer therapy, *Antibodies*, **6**, 16, <https://doi.org/10.3390/antib6040016>.
35. Singh, N., Baby, D., Rajguru, J., Patil, P., Thakkannavar, S., and Pujari, V. (2019) Inflammation and cancer, *Ann. Afr. Med.*, **18**, 121, https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18.
36. Niu, J., Peng, D., and Liu, L. (2022) Drug resistance mechanisms of acute myeloid leukemia stem cells, *Front. Oncol.*, **12**, 896426, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.896426>.
37. Jones, V. S., Huang, R.-Y., Chen, L.-P., Chen, Z.-S., Fu, L., and Huang, R.-P. (2016) Cytokines in cancer drug resistance: cues to new therapeutic strategies, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1865**, 255-265, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.005>.

38. Mirzaei, S. A., Dinmohammadi, F., Alizadeh, A., and Elahian, F. (2019) Inflammatory pathway interactions and cancer multidrug resistance regulation, *Life Sci.*, **235**, 116825, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116825>.
39. Sohrab, S. S., Raj, R., Nagar, A., Hawthorne, S., Paiva-Santos, A. C., Kamal, M. A., El-Daly, M. M., Azhar, E. I., and Sharma, A. (2023) Chronic inflammation's transformation to cancer: a nanotherapeutic paradigm, *Molecules*, **28**, 4413, <https://doi.org/10.3390/molecules28114413>.
40. Safa, A. R., and Pollok, K. E. (2011) Targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for cancer therapy, *Cancers*, **3**, 1639-1671, <https://doi.org/10.3390/cancers3021639>.
41. Huang, Y., Yang, X., Xu, T., Kong, Q., Zhang, Y., Shen, Y., Wei, Y., Wang, G., and Chang, K. (2016) Overcoming resistance to TRAIL-induced apoptosis in solid tumor cells by simultaneously targeting death receptors, c-FLIP and IAPs, *Int. J. Oncol.*, **49**, 153-163, <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3525>.
42. Werner, T. A., Nolten, I., Dizdar, L., Riemer, J. C., Schütte, S. C., Verde, P. E., Raba, K., Schott, M., Knoefel, W. T., and Krieg, A. (2018) IAPs cause resistance to TRAIL-dependent apoptosis in follicular thyroid cancer, *Endocr. Relat. Cancer*, **25**, 295-308, <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0479>.
43. Zhao, X., Laver, T., Hong, S. W., Twitty, G. B., Jr., Devos, A., Devos, M., Benveniste, E. N., and Nozell, S. E. (2011) An NF- κ B p65-cIAP2 link is necessary for mediating resistance to TNF- α induced cell death in gliomas, *J. Neurooncol.*, **102**, 367-381, <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0346-y>.
44. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschoopp, J. (2001) NF- κ B signals induce the expression of c-FLIP, *Mol. Cell Biol.*, **21**, 5299-5305, <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001>.
45. Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., and Aggarwal, B. B. (2010) Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1799**, 775-787, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004>.
46. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2**, 17023, <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
47. Jeong, Y., Lim, J., and Kim, H. (2019) Lycopene inhibits reactive oxygen species-mediated NF- κ B signaling and induces apoptosis in pancreatic cancer cells, *Nutrients*, **11**, 762, <https://doi.org/10.3390/nu11040762>.

PRO-INFLAMMATORY ACTIVATION SUPPRESSES TRAIL-INDUCED APOPTOSIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

M. I. Kobyakova^{1,2*}, A. S. Senotov¹, K. S. Krasnov¹, Ya. V. Lomovskaya¹,
I. V. Odinokova¹, A. A. Kolotova¹, A. M. Ermakov¹, A. I. Zvyagina¹, I. S. Fadeeva¹,
E. I. Fetisova¹, V. S. Akatov¹, and R. S. Fadeev¹

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: margaritaikobyakova@mail.ru

² Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630060 Novosibirsk, Russia

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) is a promising agent for the treatment of AML due to its specific apoptosis-inducing effect on tumor cells but not normal cells. However, the emergence of resistance in AML cells to TRAIL limits its potential as an antileukemic agent. Previously, we revealed an increase in the resistance of human AML THP-1 cells to TRAIL-induced death during their LPS-dependent proinflammatory activation and in an *in vitro* model of LPS-independent proinflammatory activation - in a long-term high-density cell culture. In this study, we investigated the mechanisms of this phenomenon using western blot analysis, caspase 3 enzymatic activity analysis, quantitative reverse transcription-PCR, and flow cytometry. The results showed that increased resistance to TRAIL-induced cell death of AML THP-1 cells during their pro-inflammatory activation is associated with a decrease in the surface expression of the proapoptotic receptors TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5, as well as with an increased content of members of the IAPs family - Livin and cIAP2. The results of this article open up new insights into the role of inflammation in the formation of resistance of AML cells to the action of mediators of antitumor immunity, in particular TRAIL.

Keywords: acute myeloid leukemia, resistance, pro-inflammatory cell activation, TRAIL-induced cell death

ПРИЧИНА ТОКСИЧНОСТИ ИМИДАЗОЛИЕВЫХ ИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ – ИХ ДЕЙСТВИЕ НА ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ

© 2024 С.С. Соколов, Е.А. Смирнова, Т.И. Рокицкая, Ф.Ф. Северин*

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

Поступила в редакцию 15.11.2023

После доработки 05.12.2023

Принята к публикации 22.12.2023

Ионные жидкости (ИЖ) – органические соли с низкой температурой плавления, которая обусловлена тем, что боковые алкильные цепи, химически связанные с ионом, затрудняют кристаллизацию ИЖ. Низкая температура плавления ИЖ привела к их широкому использованию в качестве относительно безвредных растворителей. Однако ИЖ обладают токсическими свойствами, механизм которых в значительной степени неизвестен, поэтому идентификация клеточных мишеней ИЖ имеет практическое значение. В работе мы показали, что имидазолиевые ИЖ не способны проникать через модельные мембраны, не повреждая их. Мы также обнаружили, что инактивация помп множественной лекарственной устойчивости в клетках дрожжей не увеличивает их чувствительность к имидазолиевым ИЖ. Последнее указывает, что мишень токсичности имидазолиевых ИЖ находится не в цитоплазме. Таким образом, можно предположить, что нарушение барьерных свойств плазматической мембраны является основной причиной токсичности небольших концентраций имидазолиевых ИЖ. Мы также показали, что добавки имидазолиевых ИЖ восстанавливают рост клеток с кинетически заблокированным гликолизом. По-видимому, вызванное ИЖ небольшое нарушение плазматической мембраны в некоторых случаях может быть полезным для клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионные жидкости, множественная лекарственная устойчивость, *Saccharomyces cerevisiae*.

DOI: 10.31857/S0320972524030031 EDN: WLNHUPP

ВВЕДЕНИЕ

Ионные жидкости (ИЖ) – это органические соли, находящиеся в жидком состоянии при температуре ниже точки кипения воды, что достигается за счет высокой объемности и асимметрии ионов, затрудняющих кристаллизацию молекул [1]. Обычно ИЖ содержат крупноразмерные азотсодержащие катионы, такие как аммоний, имидазолий, пиридиний, пиперидиний, пирролидиний или фосфорсодержащий катион (например, фосфоний). Интерес к ИЖ обусловлен, прежде всего, их использованием в промышленности как экологически относительно безвредных растворителей – менее

вредных, чем, например, серная кислота. Однако из-за плохой биоразлагаемости ИЖ могут долго сохраняться в окружающей среде. Катионы и анионы с малой токсичностью используются для получения ИЖ с полезной биологической активностью: антибактериальной, противогрибковой, антихолинэргической, местноанестезирующей [2–4]. Изучаются потенциальные антираковые свойства ИЖ [5, 6]. По причине практической важности ИЖ их токсическое действие изучалось на широком спектре биологических объектов: бактерии, грибы, растения, животные, культуры клеток человека. По той же причине токсические концентрации ИЖ измерялись достаточно тщательно [7–10].

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; ИЖ – ионная жидкость; КОЕ – колониеобразующие единицы; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ПМ – плазматическая мембрана; ФХ – фосфатидилхолин; GFP – зеленый флуоресцентный белок; PI – пропидия йодид; YP – дрожжевой экстракт пептон; YPD – YP с глюкозой.

* Адресат для корреспонденции.

Хорошо известно, что токсичность в первую очередь зависит от типа катиона и длины его боковой цепи [11–13]. Было продемонстрировано, что большинство ИЖ на основе имидазола проявляют более высокую токсичность по сравнению с обычными органическими растворителями, такими как метанол и дихлорметан [14, 15]. Однако информации о механизмах токсичности ИЖ немного. Подавляющее большинство работ о токсичности ИЖ ограничивается измерением токсичных концентраций разнообразных ИЖ для микроорганизмов.

Большое количество работ посвящено ингибирующему действию ИЖ на различные ферменты в экспериментальных системах *in vitro*. Доказано, что ИЖ на основе пиридиния и имидазолия ответственны за ингибирование активности ряда ферментов. Особенно опасным представляется эффект ингибирования ацетилхолинэстеразы, фермента, ответственного за регуляцию неврологических процессов [16]. Насколько отражают эти работы реальный эффект ИЖ на клетку? Способны ли ИЖ проникнуть внутрь клетки? Иными словами, если ИЖ подействовала на внутриклеточные ферменты, не значит ли это, что плазматическая мембрана (ПМ) уже разрушена? По своей химической структуре многие ИЖ являются липофильными катионами, а это означает, что они потенциально способны проникать через мембрану. Так, многие липофильные катионы являются субстратами/конкурентными ингибиторами и/или активаторами белков множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), защищающих клетки от чужеродных веществ [17–19]. В то же время одним из наиболее характерных эффектов липофильных катионов на клетку является повреждение плазматической мембраны [20]. Если вещество не может проникать внутрь клетки, не повреждая наружную мембрану, это означает, что такое повреждение, вероятно, вносит существенный вклад в токсический эффект этого вещества.

В данной работе мы изучили, могут ли имидазолиевые ИЖ проникать внутрь клетки без нарушения барьерных свойств ПМ. Мы показали, что имидазолиевые ИЖ не способны проникать через модельные мембраны, не повреждая их. Мы также показали, что наиболее токсичные имидазолиевые ИЖ стимулируют экспрессию помп МЛУ. Тем не менее, по нашим данным, делеция генов МЛУ не увеличивает чувствительность клеток к имидазолиевым ИЖ. Это хорошо согласуется с данными о неспособности имидазолиевых ИЖ проникать через мембрану, но оставляет вопрос о механизме активации МЛУ открытым. Мы также показали, что добавки имидазолиевых ИЖ восстанавливают рост клеток с кинетически заблокированным гликолизом. Последнее ука-

зывает, что в этом случае небольшое нарушение плазматической мембраны является полезным для клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и анализ скоростей их роста. В этом исследовании мы использовали штаммы *S. cerevisiae* с генетическим фоном W303 MATa *ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3* и BY4741 MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*. Штамм дельта *tps1* является производным W303, описанным ранее [21]. Штамм дельта *pdr1pdr3* описан в работа Galkina et al. [22]. Штамм PDR5-GFP получен из коллекции «Invitrogen» GFP (зеленый флуоресцентный белок) и является производным BY4741 [23]. Для анализа минимальных ингибирующих концентраций (МИК) химических веществ для штаммов дикого типа клетки, взятые из логарифмически растущей культуры, доводили до оптической плотности (ОП) при 550 нм, равной 0,05, с помощью SpectrostarNano («BMG LABTECH», Германия) и переносили в виде клеточных суспензий в 96-луночный планшет («Eppendorf», Германия). Клетки выращивали в течение 16 ч при 30 °C и 750 об./мин в планшетном спектрофотометре со следующими настройками: температура – 30 °C; встряхивание пластины (500 об./мин). ОП измеряли с помощью SpectrostarNano при 550 нм. Для сравнения относительных скоростей роста мы проанализировали увеличение ОП для штаммов дикого типа и мутантных штаммов.

Исследуемые вещества. C4Mim-Cl (хлорид 1-н-бутил-3-метилимидазолия); C6Mim-Cl (хлорид 1-н-гексил-3-метилимидазолия); C8Mim-Cl (хлорид 1-н-октил-3-метилимидазолия); C10Mim-Cl (хлорид 1-н-децил-3-метилимидазолия); C12Mim-Cl (хлорид 1-н-додецил-3-метилимидазолия); C14Mim-Cl (хлорид 1-н-тетрадецил-3-метилимидазолия); C16Mim-Cl (1-н-гексадецил-3-метилимидазолия хлорид); C4Mlm-BF4 (тетрафторборат 1-н-бутил-3-метилимидазолия); C6Mlm-BF4 (тетрафторборат 1-н-гексил-3-метилимидазолия); C8Mlm-BF4 (1-н-октил-3-метилимидазолия тетрафторборат); C10Mlm-BF4 (1-н-децил-3-метилимидазолия тетрафторборат); C12Mlm-BF4 (1-н-додецил-3-метилимидазолия тетрафторборат); C12TRP (додецилтрифенилфосфоний); FCCP-карбонилцианид-4-(трифторметокси)-фенилгидразон; карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон; 2-(4-морфолино) этансульфоновая кислота (Mes); трис(гидроксиметил) аминметан (Tris) и пальмитиновая кислота были получены от фирмы «Sigma» (США). Липиды 1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилхолин (ФХ); 1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилглицерол; 1,2-дифитаноил-ФХ; 1,2-ди-

фитанил-ФХ и холестерин были получены от фирмы «Avanti Polar Lipids» (США).

Анализ влияния исследуемых веществ на рост *trp1* в присутствии глюкозы. Дрожжевые клетки дельта *trp1*, взятые из логарифмической культуры, выращенной на YPEtOH (дрожжевой экстракт пептона (YP)-этанол), доводили до ОП 0,2 при 550 нм в SpectrostarNano. Глюкозу добавляли до конечной концентрации 0,06%. Клеточную суспензию переносили в каждую лунку 96-луночного планшета («Greiner», Германия) по 0,1 мл на лунку. В среду добавляли тестируемые вещества. Этанол добавляли до конечной концентрации 2% в качестве растворителя или отдельно. Клетки выращивали в течение 16 ч при температуре 30 °С при встряхивании планшета со скоростью 500 об./мин на приборе SpectrostarNano; ОП измеряли при 550 нм каждые 5 мин.

Анализ накопления Pdr5-GFP в клетках дрожжей. Клетки, в которых к гену *PDR5* был присоединен ген *GFP*, выращивали в течение ночи на твердой среде YPD (YP с глюкозой), а затем ресуспендировали до плотности 2×10^4 клеток на мл в жидкой среде YPD. Флуоресценцию белка Pdr5-GFP оценивали с помощью проточного цитометра CytoFlex («Beckman», США) после 1 ч предварительной инкубации с ингибиторами (или растворителем) при 30 °С с использованием длины волны возбуждения 488 нм на эмиссионном фильтре (525/540 нм). Гистограммы представляют собой среднее значение популяций клеток из отдельных биологических экспериментов. В каждом эксперименте анализировали не менее 10 000 событий.

Измерение транспорта протонов через мембрану липосом. Проницаемость бислоиных фосфолипидных мембран для ионов водорода оценивали с помощью ранее предложенной и несколько модифицированной методики [24]. Для приготовления липосом, нагруженных пиранином, 5,3 мг 1-пальмитоил-2-олеоил-ФХ, 1,2 мг 1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилглицерола, 2,5 мг холестерина и 1 мг пальмитиновой кислоты растворили в хлороформе, а затем высушили в струе азота в пробирке с круглым дном. После этого липиды были ресуспендированы в 1 мл буферного раствора (20 mM Mes [A2], 20 mM Tris, 20 mM Tricine, 100 mM хлорид калия; pH 6,0), содержащего 0,5 mM pH-чувствительного флуоресцентного красителя пиранина. Суспензию тщательно встряхивали, затем замораживали при -18 °С и размораживали. Процедуру повторяли 3 раза. Моноламелярные липосомы приготавливали путем экструзии через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 0,1 мкм с помощью экструдера («Avanti Polar Lipids»). Чтобы перевести липосомы в раствор без пиранина, образец пропускали через гельфильтрационную колонку, содержащую декстрановый гель

(Sephadex G-50) и уравновешенную тем же буфером. Далее, в ходе эксперимента липосомы разбавляли в этом буфере с pH 6,0; в начале эксперимента pH внутри и снаружи липосом был одинаков. Протонный градиент создавался на мембране липосом увеличением pH водного раствора до значения pH 8,0 путем титрования добавлением КОН. В момент времени $t = 0$ с к липосомам добавляли требуемую концентрацию ИЖ. Для измерения скорости увеличения pH внутри липосом добавляли 1 mM ксилен-пиридиниум бромид, чтобы потушить флуоресценцию вытекшего пиранина. Внутрилипосомальный pH оценивали по измерению флуоресценции на длине волны 505 нм при возбуждении на 455 нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия). В конце каждого эксперимента добавляли 1 мкМ ласалоцида А для полного выравнивания pH внутри и снаружи липосом. Для предотвращения образования разности потенциалов на липосомальной мембране эксперименты проводили в присутствии 10 нМ валиномицина. С целью уменьшить спонтанное выравнивание pH температура поддерживалась на уровне 15 °С.

Плоская бислоиная липидная мембрана формировалась из 2%-ного (w/v) раствора дифитаноил-ФХ или дифитанил-ФХ в декане на отверстии в перегородке, разделяющей на два отсека тefлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [24]. Диаметр отверстия составлял 0,8 мм. Буферный раствор содержал 10 mM Mes, 10 mM Tris, 100 mM хлорида калия; pH = 6,8. Эксперименты проводились при комнатной температуре (23–25 °С). Электрический ток регистрировался в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавалась на хлорсеребряные электроды, помещенные через агаровые мосты в тefлоновую ячейку с двух сторон мембраны. Ток измерялся с помощью пэтч-клэмп усилителя ОЕС-2 («ОПУС», Россия), оцифровывался с помощью NI-DAQmx («National Instruments», США) и анализировался с использованием компьютерной программы WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (University of Strathclyde, UK).

Сравнение окраски клеток пропидий йодидом (PI) и способности формировать колониеобразующие единицы (КОЕ). Дрожжевые клетки W303, взятые из логарифмической культуры, разбавляли водой до ОП при 550 нм, равной 0,1. К аликвоте клеток (300 мкл) добавляли PI до концентрации 0,5 мкг/мл и тестируемые ИЖ, затем инкубировали 1 ч при 30 °С. Аликвоту клеток разводили в 160 раз и наносили пятнами по 10 мкл на чашки с YPD, через сутки подсчитывали количество КОЕ. Флуоресценцию PI в клетках оценивали с помощью проточного цитометра CytoFlex. В качестве отрицательного контроля использовали

клетки без добавления ИЖ. В качестве положительного контроля использовали клетки, предварительно убитые нагреванием при 95 °С в течение 5 мин. Кривые соответствуют среднему значению флуоресценции популяций клеток из отдельных биологических экспериментов. В каждом эксперименте анализировали не менее 10 000 событий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что токсичность имидазолиевых ИЖ возрастает с увеличением длины углеводородного «хвоста» молекулы [7, 10]. Мы определили минимальные ингибирующие рост концентрации (МИК) ряда имидазолиновых и аммонийных ИЖ для дрожжей *S. cerevisiae*. Как и ожидалось, токсичность тестируемых ИЖ возрастает по мере увеличения липофильности ($\log P$) (таблица П1 в Приложении). Далее, мы сосредоточились на исследовании наиболее токсичных имидазолиевых ИЖ, а именно: C12Mim-Cl, C14Mim-Cl и C16Mim-Cl. Структурные формулы представлены на рис. 1.

Эксперименты на модельных мембранах. Мы сосредоточились на проверке двух гипотез о механизме влияния ИЖ на клеточный метаболизм. Согласно первому предположению, мишень токсичности ИЖ находится внутри клетки. Согласно второму предположению, ИЖ влияют на ПМ клеток. Мы проверили, могут ли имидазолиевые ИЖ проникать через липидный бислой, не повреждая его. Таким свойством обладают проникающие липофильные ионы [25–27]. Для облегчения проникновения катионных имидазолиевых ИЖ мы формировали плоскую бислойную липидную мембрану (БЛМ) из дифитанил-ФХ,

липида, содержащего простые эфирные связи [28]. После добавления 10 или 20 мкМ C12Mim-Cl ток через мембрану при прикладывании напряжения 50 мВ в момент времени $t = 0$ с увеличивался по сравнению с немодифицированной БЛМ (рис. 2, а). Записи имели вид нерегулярных флуктуаций тока.

Из-за большой разницы в скачке дипольного потенциала на границе мембрана–вода для липидов с простыми и сложными эфирными связями различия в токах проникающих катионов в мембранах составляют десятки раз [28, 29]. Чтобы убедиться, что стационарный ток не вызван транспортом ИЖ через мембрану, мы провели такие же измерения на БЛМ, сформированной из дифитаноил-ФХ (рис. 2, б). Однако, как видно из рис. 2, значения тока для 10 мкМ C12Mim-Cl были очень близки ($5,8 \pm 2,8$ пА и $12,6 \pm 3,7$ пА для дифитанил-ФХ и дифитаноил-ФХ), а для 20 мкМ значения тока для дифитанил-ФХ были во много раз меньше тока в случае с дифитаноил-ФХ ($12,6 \pm 3,7$ и $71,7 \pm 4,5$ пА соответственно). Эти результаты однозначно говорят о том, что увеличение проводимости БЛМ в присутствии имидазолиевых ИЖ не связано с током самих ИЖ через мембрану, а, скорее всего, определяется формированием дефектов, проводящих ионы электролита. В то же время ионная жидкость P66614, проникающий катион, проходит через липидные мембраны, и этот процесс значительно ускоряется при уменьшении скачка дипольного потенциала [30].

Некоторые липофильные катионы в комплексе с жирной кислотой обладают протонофорным эффектом: они проходят через мембрану в одном направлении как индивидуальные катионы, а в обратном – в паре со свободной жирной кислотой, т.е. в электронейтральной форме. Протонофорный цикл завершает переход протонированной

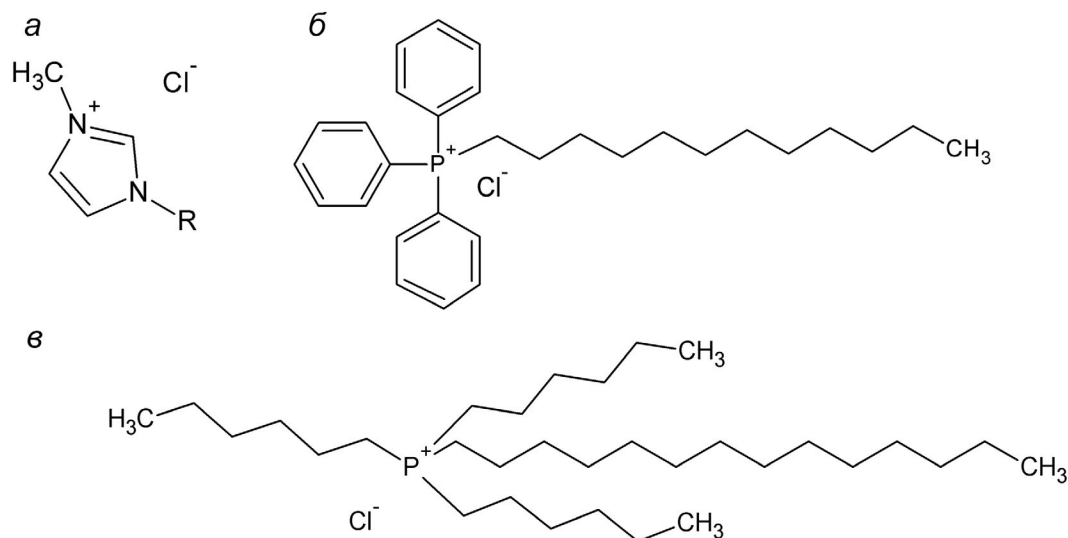


Рис. 1. Структурные формулы наиболее токсичных имидазолиевых ИЖ: C12Mim-Cl (а); C14Mim-Cl (б) и C16Mim-Cl (в)

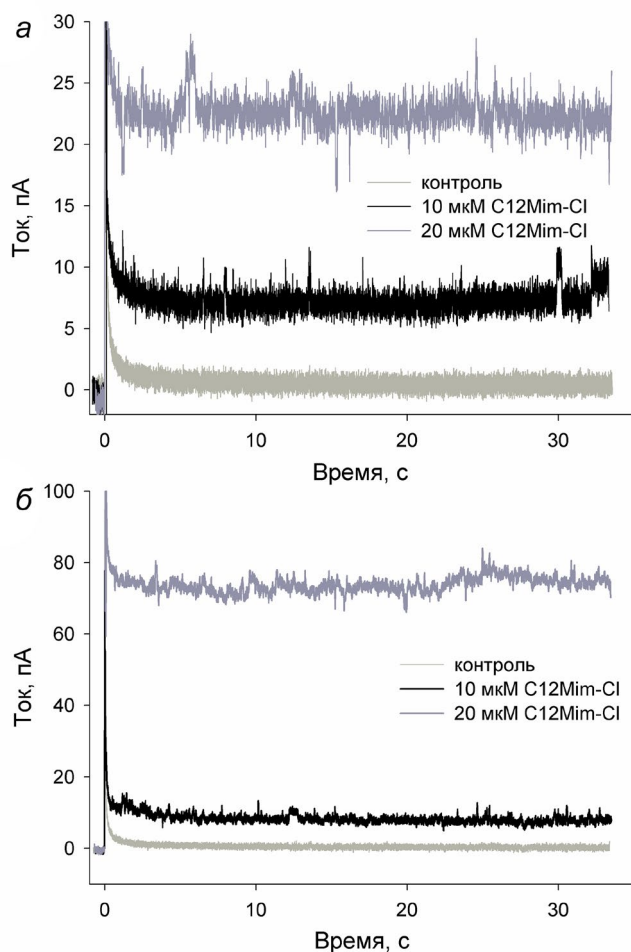


Рис. 2. Записи кинетик тока через БЛМ после прикладывания напряжения 50 мВ в начальный момент времени до (светло-серые кривые) и после добавления 10 мкМ (черные кривые) и 20 мкМ (темно-серые кривые) C12Mim-Cl. БЛМ формировали из дифитанил-ФХ (а) или дифитаноил-ФХ (б)

жирной кислоты через мембрану и диссоциация протона [31, 32]. Липосомы, содержащие рН-чувствительный краситель пиранин, служат удобным инструментом для детекции протонной активности различных веществ. На рис. 3, а продемонстрирована кинетика выравнивания рН снаружи и внутри пиранин-содержащих липосом, вызванная добавкой протонатора карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона (ХКФ) или ионной жидкости Р66614. Ранее было показано, что при низких концентрациях Р66614 проходит через липидный бислой, не повреждая его, а при высоких концентрациях – увеличивает неспецифическую проводимость мембраны [30]. Важно отметить, что добавка незлектрогенного K^+/H^+ -обменника ласалоцида А в конце эксперимента приводила к примерно одинаковому увеличению флуоресценции пиранина в опытной пробе (содержащей 2 мкМ Р66614) и в контрольной. Это означает, что пиранин под влиянием Р66614 в течение экспе-

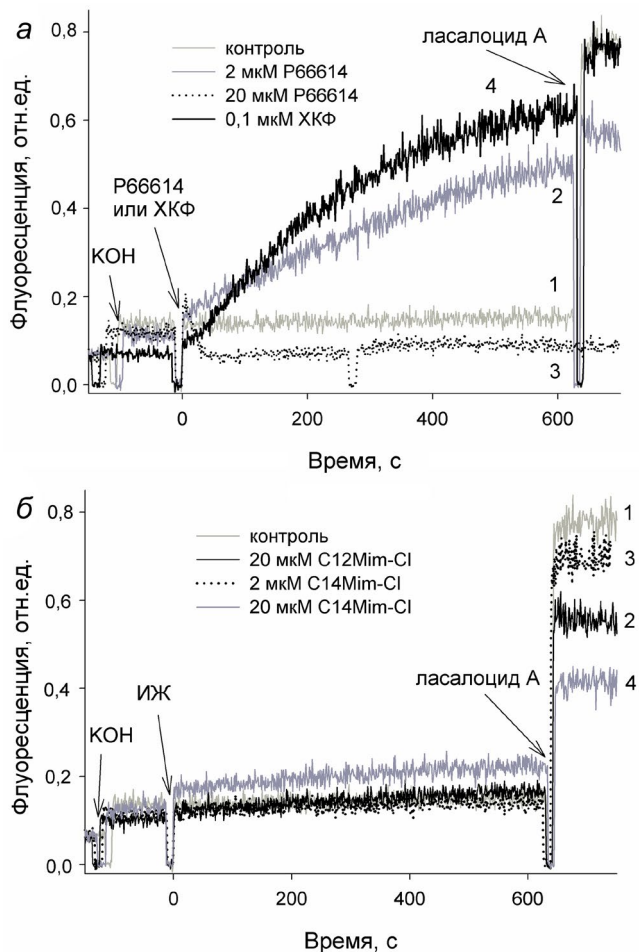


Рис. 3. Измерение способности имидазольевых ИЖ переносить протоны через липосомальную мембрану в модельной системе липосом, нагруженных флуоресцентным зондом пиранином. а – Кинетика изменения рН внутри липосом в контроле (кривая 1, контроль), в присутствии 0,1 мкМ ХКФ (кривая 2), в присутствии 2 мкМ Р66614 (кривая 3) и 20 мкМ Р66614 (кривая 4). б – Кинетика изменения рН внутри липосом в контроле (кривая 1), в присутствии 20 мкМ C12Mim-Cl (кривая 2), 2 мкМ (кривая 3) или 20 мкМ (кривая 4) C14Mim-Cl

римента не выходил из липосом наружу. Иными словами, протонотворный эффект Р66614 не являлся следствием повреждения мембран липосом. Таким образом, добавка Р66614 к липосомам через несколько минут вызывала выравнивание протонного градиента. Однако при увеличении концентрации Р66614 до 20 мкМ происходило быстрое уменьшение флуоресценции, которое не изменялось при дальнейшем добавлении ласалоцида А. Очевидно, что при высокой концентрации Р66614 происходил полный выход пиранина и его флуоресценция тушилась ксилен-пиридиниум бромидом во внешнем буфере.

Другая ситуация наблюдалась с имидазольевыми ИЖ. Как можно видеть на рис 3, б, добавка C12Mim-Cl и C14Mim-Cl в концентрации

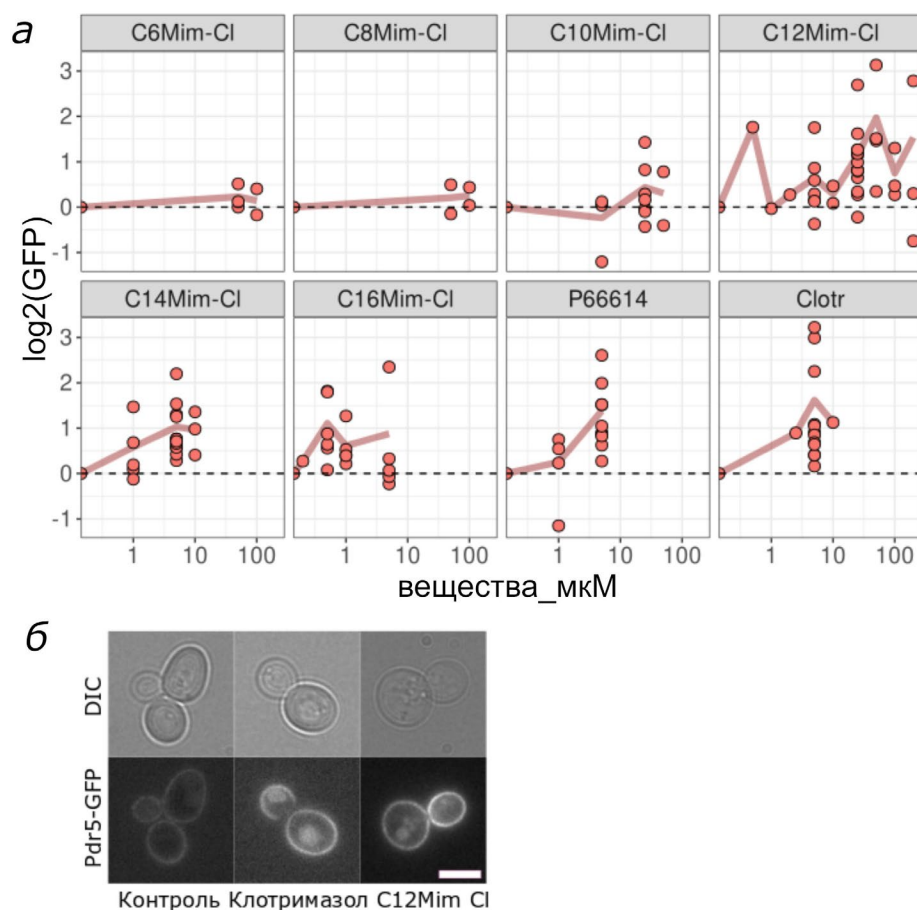


Рис. 4. ИЖ увеличивают содержания Pdr5-GFP. *а* – Сравнение увеличения количества Pdr5-GFP через 1 ч после добавления ИЖ и стандартного индуктора Pdr5-GFP клотримазола с помощью проточной цитометрии. По оси X отложена логарифмическая шкала концентрация веществ в мкМ; по оси Y – логарифмическая шкала флуоресценции Pdr5-GFP в клетках относительно клеток без добавления веществ (значение 0). Каждая точка – независимый биологический повтор. *б* – Световая и флуоресцентная микроскопия клеток, содержащих Pdr5-GFP, через 1 ч после добавления C12Mim-Cl и стандартного индуктора Pdr5-GFP клотримазола. Размерный отрезок – 5 мкМ

2 или 20 мкМ не вызвала постепенного увеличения флуоресценции пиранина. Однако в случае 20 мкМ C14Mim-Cl или C12Mim-Cl последующая добавка ласалоцида А приводила к примерно полумаксимальному увеличению флуоресценции. Следовательно, C14Mim-Cl в этой концентрации вызывал утечку пиранина из липосом.

Таким образом, данные на липосомах указывают, что имидазолиевые ИЖ не индуцируют протонный транспорт через липидные мембраны самостоятельно или в комплексе с жирной кислотой (которая специально добавлялась на стадии приготовления липосом), но образуют поры или дефекты, через которые проникает пиранин. Однако нельзя исключить, что ИЖ все же могут проникать внутрь клетки, например, через транспортеры в ПМ.

Исследование связи токсичности ИЖ и экспрессии помп МЛУ. Известно, что большинство липокатионов являются субстратами помп МЛУ и вызывают усиление экспрессии этих помп [17–19].

Следовательно, если имидазолиевые ИЖ не проникают через ПМ, то не должны вызывать рост экспрессии помп МЛУ. Для оценки относительного содержания МЛУ был использован штамм PDR5-GFP *S. cerevisiae*, в котором к гену одного из основных транспортеров МЛУ Pdr5 была добавлена последовательность, кодирующая белок GFP [22]. Этот конструкт позволил оценить относительное содержание Pdr5 по уровню интенсивности флуоресценции GFP в клетках. Как видно из рис. 4, имидазолиевые ИЖ с длиной радикала менее C12 не вызывают существенного увеличения уровня флуоресценции Pdr5-GFP. Однако добавление ИЖ с длиной радикала C12 или более вызывало значительное усиление флуоресценции Pdr5-GFP, сравнимое с усилением от хорошо известного индуктора экспрессии Pdr5 – клотримазола [22], который был использован нами в качестве положительного контроля (рис. 4). Наибольшую активацию оказывало добавление C12Mim-Cl. Вопрос о механизме активации имидазолиевыми ИЖ экспрессии

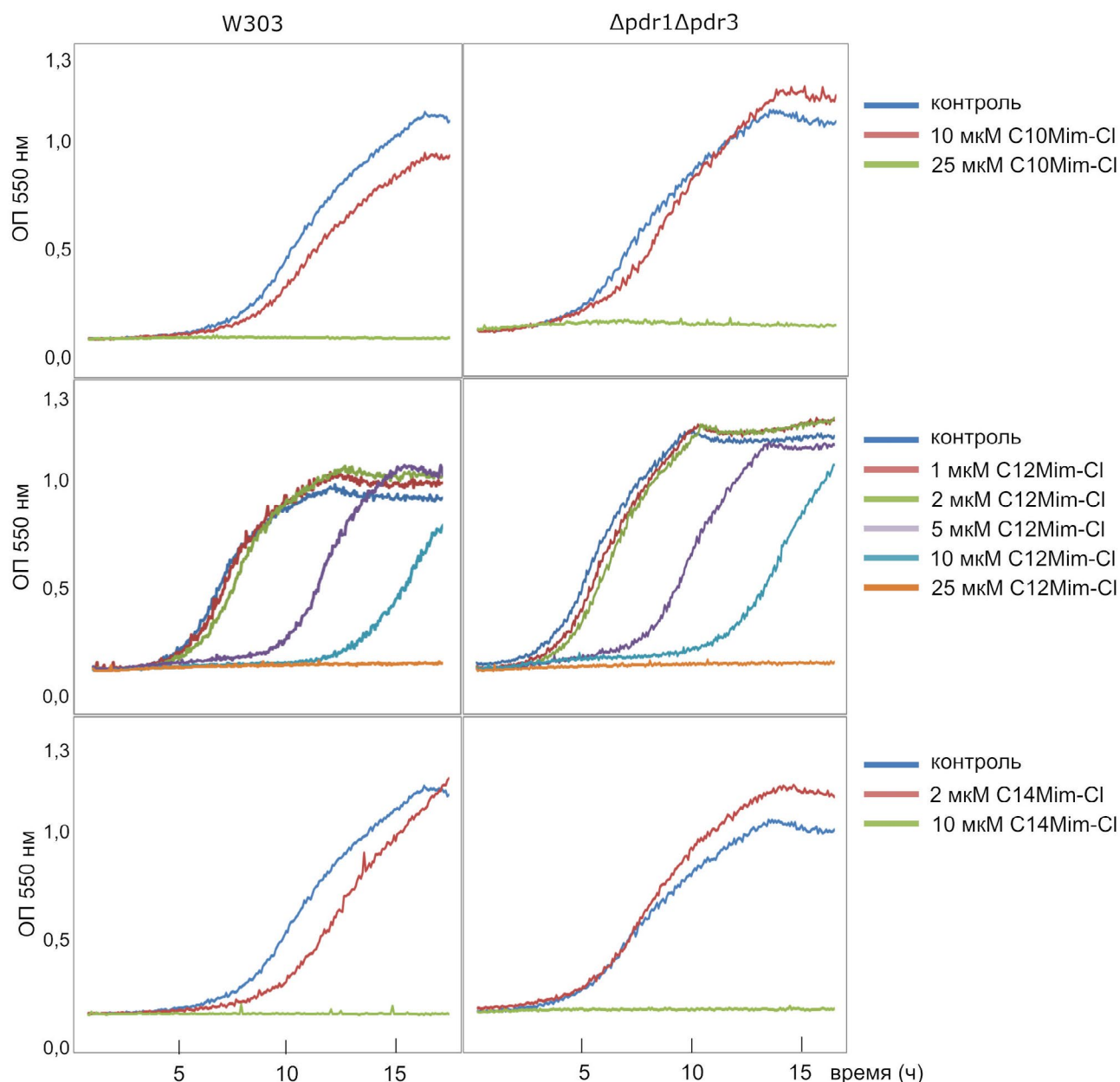


Рис. 5. Белки МЛУ не влияют на скорость роста *S. cerevisiae* в присутствии различных концентраций ИЖ. Типичные кривые роста культуры клеток *S. cerevisiae* дикого типа W303 и штамма дельта *pdr1pdr3* с нарушенной активацией МЛУ. По оси X отложено время в часах; по оси Y – ОП при 550 нм культуры клеток

белков МЛУ остается открытым, поскольку опыты на искусственных мембранах говорят об их неспособности проникать через неповрежденную искусственную мембрану. Возможно, ИЖ проникают внутрь клетки, нарушая барьерные свойства липидного бислоя ПМ или через белки ПМ. Наконец, нельзя исключить, что ИЖ активируют экспрессию помп МЛУ косвенным образом, увеличивая проницаемость ПМ для ксенобиотиков из культуральной среды.

Для проверки внутриклеточной токсичности имидазолиевых ИЖ мы оценили влияние делеции помп МЛУ на их токсичность. Как показано

на рис. 5, делеция генов двух основных факторов транскрипции белков МЛУ, *PDR1* и *PDR3* [33, 34], не повлияла на снижение скорости роста под действием ИЖ. Это наблюдение свидетельствует в пользу гипотезы стимуляции имидазолиевыми ИЖ экспрессии МЛУ через воздействие на ПМ без вхождения внутрь клетки.

Оценка кинетики накопления мертвых клеток после добавки ИЖ. Если причина токсичности имидазолиевых ИЖ – нарушение целостности ПМ, то можно ожидать, что динамика накопления непроницающего красителя PI внутри клетки будет совпадать с динамикой клеточной смерти.

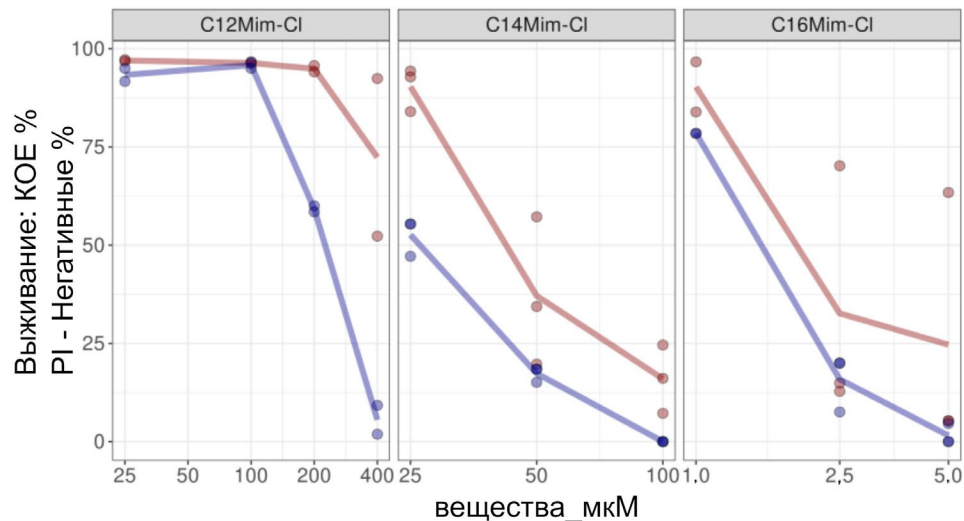


Рис. 6. Сравнение выживаемости клеток *S. cerevisiae* после воздействия имидазолиевых ИЖ, C12Mim-Cl, C14Mim-Cl и C16Mim-Cl, по числу КОЕ (синие кривые) и доле PI-негативных клеток (красные кривые). По оси X отложена концентрация ИЖ в мкМ; по оси Y – выживание относительно контроля без добавления веществ, в процентах

Если же имидазолиевые ИЖ отравляют клетки изнутри, то сначала под их действием клетки умрут, т.е. потеряют способность образовывать колонии, и только потом начнут окрашиваться PI. Мы добавили к клеткам *S. cerevisiae* имидазолиевые ИЖ, C12Mim-Cl, C14Mim-Cl и C16Mim-Cl, инкубировали 1 ч при 30 °С, затем измерили выживаемость по числу КОЕ, а также оценили долю PI-положительных клеток. Как показано на рис. 6, для всех трех ИЖ окраска PI почти совпадает с потерей способности формировать КОЕ. Небольшое отставание окраски клеток по PI, возможно, объясняется временной стадией неполного нарушения укладки фосфолипидов плазматической мембраны под действием ИЖ, достаточной для прохождения небольших молекул, но не приводящей к полному лизису. Такая ситуация наблюдалась при добавлении 20 мкМ C12Mim-Cl к бислойной мембране: мембрана не разрушалась, но при этом становилась проницаемой для небольших ионов (рис. 2).

Снятие гликолитического блока под действием ИЖ. Таким образом, наши данные указывают, что причина токсичности – действие на плазматическую мембрану. Важно отметить, что в определенном диапазоне концентраций вызванное ИЖ нарушение укладки фосфолипидов ПМ приводило к нарушению ее барьерных свойств, но не к лизису клеток. Дополнительные подтверждения тому, что имидазолиевые ИЖ в низких концентрациях могут менять физиологию клеток, мы получили на разработанной нами ранее экспериментальной системе, позволяющей проводить скрининг химических веществ на способность восстанавливать рост штамма дрожжей *S. cerevisiae* с делецией гена *TPS1* в присутствии глюкозы.

Штамм дельта *tps1* хорошо растет на неферментируемых источниках углерода, но не способен расти в присутствии глюкозы [35], так как не может регулировать поступление глюкозы в гликолиз [36, 37]. При добавлении глюкозы клетки штамма дельта *tps1* тратят весь доступный фосфат на фосфорилирование глюкозы и не могут осуществить вторую стадию гликолиза, для которой также необходим неорганический фосфат [38–40]. Кроме того, накопление фосфатов сахаров в цитоплазме токсично для клеток [41, 42]. Ранее нами было показано, что некоторые липофильные катионы, являющиеся митохондриальными ядами или поверхностно-активными веществами, снижают расход фосфатов на синтез АТФ митохондриями, стимулируя синтез глицеробисфосфата и снимая блокировку цепи гликолиза [21].

В данной работе мы показали, что ИЖ с $\log P \geq 0,99$ способны восстанавливать рост штамма дельта *tps1* на среде в присутствии глюкозы (рис. 7) (детали получения и обработки данных показаны на рис. П1 в Приложении). Важно отметить, что диапазон концентраций, в которых вещества C10Mim-Cl и C12Mim-Cl стимулируют рост клеток *tps1*, шире, чем у хорошо изученного проникающего катиона, митохондриального разобщителя C12TPP [31]. Возможно, вызванное ИЖ нарушение укладки фосфолипидов стимулирует гидролиз АТФ: очевидно, репарация мембраны и/или восстановление внутриклеточного гомеостаза, нарушенного при повреждении ПМ, являются энергоемкими процессами. Мы предполагаем, что такая стимуляция гидролиза АТФ является причиной способности ИЖ стимулировать рост клеток дельта *tps1* в присутствии глюкозы.

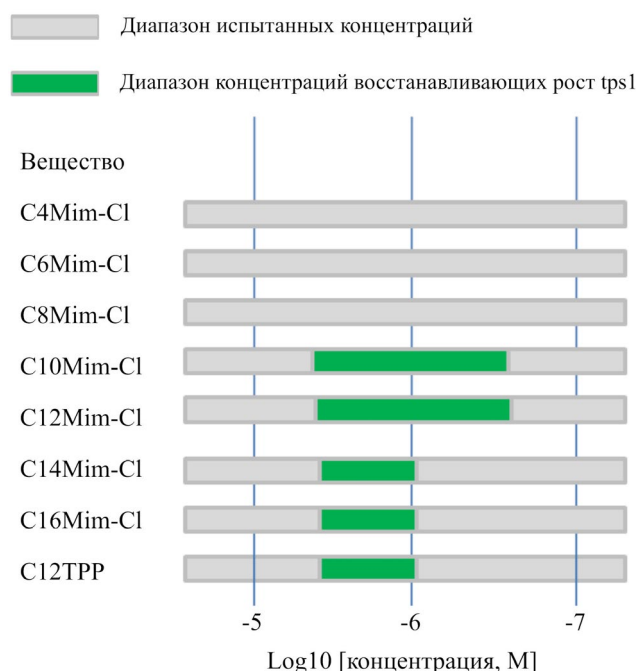


Рис. 7. ИЖ способны восстанавливать рост клеток дельта *trp1* в присутствии глюкозы. Испытанные концентрации ИЖ, не вызывающие стимуляции, показаны серым цветом. Зеленым цветом показаны концентрации, соответствующие восстановлению роста штамма дельта *trp1* на среде YP-этанол в присутствии глюкозы

Таким образом, вызванное ИЖ небольшое нарушение плазматической мембраны в некоторых случаях может быть полезным для клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные указывают, что гидрофобные имидазолиевые ИЖ, примененные в определенном диапазоне концентраций, вызывают нарушение барьерных свойств ПМ. Этот вывод основан, прежде всего, на результатах опытов с модельными мембранами. Эти эксперименты показали, что ИЖ не проходят через БЛМ, но, вероятно, формируют дефекты, проводящие ионы электролита. Более того, результаты опытов с пиранин-содержащими липосомами указывают, что ИЖ вызывает утечку этого вещества из липосом, а значит поры могут быть достаточно большого размера: молекулярный вес пиранина – 524 г/моль.

Интересно, что вызванное имидазолиевыми ИЖ нарушение ПМ не всегда является вредным для клеток. Наоборот, это нарушение позволяет клеткам штамма дельта *trp1* преодолеть гликолитический блок и продолжить рост после добавления глюкозы. Видимо, блок снимается за счет увеличения концентрации неорганического фосфата, который образуется при гидролизе АТФ, вызванном

нарушением ПМ (см. раздел «Результаты и обсуждение»). Кроме того, гидрофобные имидазолиевые ИЖ стимулируют экспрессию помп МЛУ, при этом инактивация помп МЛУ не влияет на токсичность этих ИЖ. Следовательно, можно говорить об эффекте гормезиса имидазолиевых ИЖ: их, теоретически, можно использовать для увеличения устойчивости клеток к широкому спектру ксенобиотиков-субстратов МЛУ. По нашим данным, наиболее перспективное вещество для такого применения – C12Mim-Cl.

Отдельно стоит вопрос о механизме активации помп МЛУ имидазолиевыми ИЖ. Теоретически возможны три варианта: (1) сами ИЖ в микроколичествах проникают в клетку и активируют экспрессию МЛУ; (2) возможно, ИЖ позволяют ксенобиотикам, находящимся в культуральной среде, проникать внутрь и, таким образом, стимулировать экспрессию МЛУ; (3) наконец, не исключено, что вызванное ИЖ нарушение ПМ ингибирует транспортеры ПМ, откачивающие из клетки естественные продукты метаболизма – активаторы МЛУ, таким образом, вызывая их накопление в цитоплазме и активацию МЛУ. Возможность такого сценария обсуждается в обзоре Knorre et al. [43]. Поэтому изучение механизмов активации ИЖ МЛУ требует отдельного исследования.

Итак, в нашей работе было показано, что основная причина токсичности имидазолиевых ионных жидкостей – их действие на плазматическую мембрану. Причем воздействие ИЖ в сублетальных концентрациях и возникающее в его результате небольшое нарушение ПМ (в некоторых случаях) может быть полезным для клетки.

Вклад авторов. С.С. Соколов – проведение экспериментов на клетках дрожжей, написание статьи; Е.А. Смирнова – проведение экспериментов на клетках дрожжей; Т.И. Рокицкая – проведение экспериментов на искусственных мембранах и липосомах; Ф.Ф. Северин – концепция, написание текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 22-24-00533).

Благодарности. Мы благодарим Ксению Егорову за консультации и предоставленные реактивы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Welton, T. (1999) Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.*, **99**, 2071-2084, <https://doi.org/10.1021/cr980032t>.
2. Kudlak, B., Owczarek, K., and Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents – a review, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **22**, 11975-11992, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4794-y>.
3. Ferraz, R., Branco, L. C., Prudêncio, C., Noronha, J. P., and Petrovski, Z. (2011) Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients, *ChemMedChem*, **6**, 975-985, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100082>.
4. Hough, W. L., Smiglak, M., Rodríguez, H., Swatloski, R. P., Spear, S. K., Daly, D. T., Pernak, J., Grisel, J. E., Carliss, R. D., Soutullo, M. D., Davis, J. H., Jr., and Rogers, R. D. (2007) The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients, *New J. Chem.*, **31**, 1429-1436, <https://doi.org/10.1039/B706677P>.
5. Kumar, V., and Malhotra, S. V. (2009) Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 4643-4646, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.06.086>.
6. Dias, A. R., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Ferraz, R., and Prudêncio, C. (2017) The anticancer potential of ionic liquids, *ChemMedChem*, **12**, 11-18, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600480>.
7. Gonçalves, A. R. P., Paredes, X., Cristino, A. F., Santos, F. J. V., and Queirós, C. S. G. P. (2021) Ionic liquids – a review of their toxicity to living organisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5612, <https://doi.org/10.3390/ijms22115612>.
8. Maculewicz, J., Świacka, K., Stepnowski, P., Dołzonek, J., and Białk-Bielińska, A. (2022) Ionic liquids as potentially hazardous pollutants: Evidences of their presence in the environment and recent analytical developments, *J. Hazard Mater.*, **437**, 129353, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129353>.
9. Sanches, M. V., Freitas, R., Oliva, M., Cuccaro, A., Monni, G., Mezzetta, A., Guazzelli, L., and Pretti, C. (2023) Toxicity of ionic liquids in marine and freshwater microorganisms and invertebrates: state of the art, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **30**, 39288-39318, <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25562-z>.
10. Flieger, J., and Flieger, M. (2020) Ionic liquids toxicity-benefits and threats, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6267, <https://doi.org/10.3390/ijms21176267>.
11. Docherty, K. M., and Kulpa, C. F., Jr. (2005) Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.*, **7**, 185-189, <https://doi.org/10.1039/B419172B>.
12. Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczobutt, J., Hoffmann, J., Ondruschka, B., Filser, J., and Jastorff, B. (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **58**, 396-404, [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00105-2).
13. Couling, D. J., Bernot, R. J., Docherty, K. M., Dixon, J. K., and Maginn, E. J. (2006) Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling, *Green Chem.*, **8**, 82-90, <https://doi.org/10.1039/B511333D>.
14. Stasiewicz, M., Mulkiewicz, E., Tomczak-Wandzel, R., Kumirska, J., Siedlecka, E. M., Gołbiowski, M., Gajdus, J., Czerwicka, M., and Stepnowski, P. (2008) Assessing toxicity and biodegradation of novel, environmentally benign ionic liquids (1-alkoxymethyl-3-hydroxypyridinium chloride, saccharinate and acesulfamates) on cellular and molecular level, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**, 157-165, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.08.011>.
15. Garcia, M. T., Gathergood, N., and Scammells, P. J. (2005) Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology, *Green Chem.*, **7**, 9, <https://doi.org/10.1039/b411922c>.
16. Pham, T. P. T., Cho, C.-W., and Yun, Y.-S. (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review, *Water Res.*, **44**, 352-372, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.030>.
17. Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillion, J. P., Konings, W. N., and Goffeau, A. (1996) Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p, *J. Biol. Chem.*, **271**, 31543-31548, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31543>.
18. Gros, P., Talbot, F., Tang-Wai, D., Bibi, E., and Kaback, H. R. (1992) Lipophilic cations: a group of model substrates for the multidrug-resistance transporter, *Biochemistry*, **31**, 1992-1998, <https://doi.org/10.1021/bi00122a014>.
19. Fetisova, E. K., Avetisyan, A. V., Izyumov, D. S., Korotetskaya, M. V., Chernyak, B. V., and Skulachev, V. P. (2010) Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 selectively protects MDR (Pgp 170)-negative cells against oxidative stress, *FEBS Lett.*, **584**, 562-566, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.002>.
20. Sokolov, S., Zyrina, A., Akimov, S., Knorre, D., and Severin, F. (2023) Toxic effects of penetrating cations, *Membranes*, **13**, 841, <https://doi.org/10.3390/membranes13100841>.
21. Sokolov, S. S., Smirnova, E. A., Markova, O. V., Kireeva, N. A., Kirsanov, R. S., Khailova, L. S., Knorre, D. A., and Severin, F. F. (2020) Lipophilic cations rescue the growth of yeast under the conditions of glycolysis overflow, *Biomolecules*, **10**, 1345, <https://doi.org/10.3390/biom10091345>.

22. Galkina, K. V., Besedina, E. G., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2018) Penetrating cations induce pleiotropic drug resistance in yeast, *Sci. Rep.*, **8**, 8131, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26435-z>.
23. Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature*, **425**, 686-691, <https://doi.org/10.1038/nature02026>.
24. Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, **67**, 534-535, <https://doi.org/10.1021/j100796a529>.
25. Liberman, E. A., and Topaly, V. P. (1969) Permeability of bimolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions [in Russian], *Biofizika*, **14**, 452-461.
26. Ebert, A., Hanneschlaeger, C., Goss, K.-U., and Pohl, P. (2018) Passive permeability of planar lipid bilayers to organic anions, *Biophys. J.*, **115**, 1931-1941, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.09.025>.
27. Rokitskaya, T. I., Aleksandrova, E. V., Korshunova, G. A., Khailova, L. S., Tashlitsky, V. N., Luzhkov, V. B., and Antonenko, Y. N. (2022) Membrane permeability of modified butyltriphenylphosphonium cations, *J. Phys. Chem. B*, **126**, 412-422, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c08135>.
28. Il'yasova, T. M., Rokitskaya, T. I., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., and Skulachev, V. P. (2012) Substitution of ether linkage for ester bond in phospholipids increases permeability of bilayer lipid membrane for SkQ1-type penetrating cations, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1038-1043, <https://doi.org/10.1134/S0006297912090118>.
29. Pickar, A. D., and Benz, R. (1978) Transport of oppositely charged lipophilic probe ions in lipid bilayer membranes having various structures, *J. Membr. Biol.*, **44**, 353-376, <https://doi.org/10.1007/BF01944229>.
30. Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A., Luzhkov, V. B., Kirsanov, R. S., Aleksandrova, E. V., Korshunova, G. A., Tashlitsky, V. N., and Antonenko, Y. N. (2021) Lipophilic ion aromaticity is not important for permeability across lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1863**, 183483, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183483>.
31. Severin, F. F., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cherepanov, D. A., Mokhova, E. N., Vyssokikh, M. Y., Pustovidko, A. V., Markova, O. V., Yaguzhinsky, L. S., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663-668, <https://doi.org/10.1073/pnas.0910216107>.
32. Rokitskaya, T. I., Khailova, L. S., Korshunova, G. A., and Antonenko, Y. N. (2023) Efficiency of mitochondrial uncoupling by modified butyltriphenylphosphonium cations and fatty acids correlates with lipophilicity of cations: Protonophoric vs leakage mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1865**, 184183, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184183>.
33. Kean, L. S., Grant, A. M., Angeletti, C., Mahé, Y., Kuchler, K., Fuller, R. S., and Nichols, J. W. (1997) Plasma membrane translocation of fluorescent-labeled phosphatidylethanolamine is controlled by transcription regulators, PDR1 and PDR3, *J. Cell Biol.*, **138**, 255-270, <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.255>.
34. Thakur, J. K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S.-J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D. P., Gulshan, K., Li, D. K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W. S., Cormack, B. P., Wagner, G., and Näär, A. M. (2008) A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi, *Nature*, **452**, 604-609, <https://doi.org/10.1038/nature06836>.
35. Hohmann, S., Bell, W., Neves, M. J., Valckx, D., and Thevelein, J. M. (1996) Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis, *Mol. Microbiol.*, **20**, 981-991, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02539.x>.
36. Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P., and Wiemken, A. (1992) Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation, *Eur. J. Biochem.*, **209**, 951-959, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17368.x>.
37. Vuorio, O. E., Kalkkinen, N., and Londesborough, J. (1993) Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **216**, 849-861, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18207.x>.
38. Van Heerden, J. H., Wortel, M. T., Bruggeman, F. J., Heijnen, J. J., Bollen, Y. J. M., Planqué, R., Hulshof, J., O'Toole, T. G., Wahl, S. A., and Teusink, B. (2014) Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells, *Science*, **343**, 1245114, <https://doi.org/10.1126/science.1245114>.
39. Thevelein, J. M., and Hohmann, S. (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?, *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 3-10, [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)88938-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)88938-0).
40. Teusink, B., Walsh, M. C., van Dam, K., and Westerhoff, H. V. (1998) The danger of metabolic pathways with turbo design, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 162-169, [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01205-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01205-5).
41. Gibney, P. A., Schieler, A., Chen, J. C., Bacha-Hummel, J. M., Botstein, M., Volpe, M., Silverman, S. J., Xu, Y., Bennett, B. D., Rabinowitz, J. D., and Botstein, D. (2018) Common and divergent features of galactose-1-phosphate and fructose-1-phosphate toxicity in yeast, *Mol. Biol. Cell*, **29**, 897-910, <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-11-0666>.

42. Peeters, K., Van Leemputte, F., Fischer, B., Bonini, B. M., Quezada, H., Tsytonok, M., Haesen, D., Vanthienen, W., Bernardes, N., Gonzalez-Blas, C. B., et al. (2017) Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras, *Nat. Commun.*, **8**, 922, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01019-z>.
43. Knorre, D. A., Galkina, K. V., Shirokovskikh, T., Banerjee, A., and Prasad, R. (2020) Do multiple drug resistance transporters interfere with cell functioning under normal conditions?, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1560-1569, <https://doi.org/10.1134/S0006297920120081>.

THE IMIDAZOLIUM IONIC LIQUIDS TOXICITY IS DUE TO THEIR EFFECT ON THE PLASMA MEMBRANE

S. S. Sokolov, E. A. Smirnova, T. I. Rokitskaya, and F. F. Severin*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; email: severin@belozersky.msu.ru*

Ionic liquids (ILs) are organic salts with a low melting point, which is due to the fact that alkyl side chains chemically bonded to the ion hinder the crystallization of ILs. The low melting point of ILs has led to their widespread use as relatively harmless solvents. However, ILs have toxic properties, the mechanism of which is largely unknown, so identifying the cellular targets of ILs is of practical importance. In our work, we showed that imidazolium ILs are not able to penetrate model membranes without damaging them. We also found that inactivation of multidrug resistance (MDR) pumps in yeast cells does not increase their sensitivity to imidazolium ILs. The latter indicates that the target of the toxicity of imidazolium ILs is not in the cytoplasm. Thus, our data suggest that the disruption of the plasma membrane barrier function is the main cause of the toxicity of low concentrations of imidazolium ILs. We also showed that supplementation with imidazolium ILs restores the growth of cells with kinetically blocked glycolysis. Our data indicate that IL-induced minor disruption of the plasma membrane may, in some cases, be beneficial for the cells.

Keywords: ionic liquids, multidrug resistance, *Saccharomyces cerevisiae*

РОЛЬ АМИНОКИСЛОТ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1, I182, R187, K188, В ПРОЦЕССАХ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ИНТЕГРАЦИИ

© 2024 Т.Ф. Кихай^{1**}, Ю.Ю. Агапкина^{1,2#}, Т.А. Приказчикова¹, М.В. Вдовина¹,
С.П. Шехтман¹, С.В. Фомичева³, С.П. Королев^{1,2}, М.Б. Готтих^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: kih.t1996@yandex.ru

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

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.12.2023

После доработки 18.01.2024

Принята к публикации 18.01.2024

В основе структурной организации интегразы ВИЧ-1 лежит тетрамер, сформированный двумя димерами белка. В составе этого тетрамера каталитический домен одной из субъединиц первого димера взаимодействует с N-концевым доменом субъединицы из второго димера. Именно тетрамерная структура позволяет правильно позиционировать два конца вирусной ДНК относительно ДНК клетки и осуществлять каталитические функции интегразы – 3'-процессинг и перенос цепи. Однако в ходе репликативного цикла ВИЧ-1 интеграна отвечает не только за этап интеграции: она участвует в обратной транскрипции, а также необходима на стадии формирования капсида вновь образуемых вирионов. Предполагается, что интеграна ВИЧ-1 является структурно-динамичным белком, и от ее структуры зависят ее биологические функции. Соответственно, изучение взаимодействий между доменами интегразы, обеспечивающими ее структуру, важно для понимания ее множественных функций. В настоящей работе исследована роль трех аминокислот каталитического домена, I182, R187 и K188, из области контакта двух димеров интегразы в структуре тетрамера в протекании стадий обратной транскрипции и интеграции. Установлено, что остаток R187 чрезвычайно важен для формирования правильной структуры интегразы, необходимой на всех этапах ее функциональной активности. Остаток I182 необходим для успешной интеграции и не важен для обратной транскрипции, а остаток K188, наоборот, участвует в формировании структуры интегразы, важной для эффективной обратной транскрипции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус иммунодефицита человека типа 1, интеграна, интеграция, обратная транскрипция.

DOI: 10.31857/S0320972524030047 EDN: WKSAES

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) относится к семейству ретровирусов, он поражает иммунную систему человека, вызывая ВИЧ-инфекцию и СПИД. Жизненный

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотный остаток; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа; ИН – интеграна; ОТ – обратная транскриптаза.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

цикл ВИЧ-1 начинается с проникновения вируса в клетку, за которым следует синтез ДНК-копии вирусной РНК, осуществляемый вирусной обратной транскриптазой (ОТ). Этот процесс происходит внутри вирусного капсида в составе сложного РНК-белкового комплекса, в который входит вирусная РНК и ферменты: ОТ и интеграна (ИН). ИН связывает синтезированную ДНК-копию и катализирует две последовательные реакции – отщепление динуклеотида GT с 3'-концов вирусной ДНК (3'-процессинг) и последующее ее встраивание в ДНК инфицированной клетки (перенос цепи). Процесс интеграции – это важнейшая каталитическая

функция ИН в репликативном цикле вируса. Замены аминокислот активного центра ИН, D64, D116 и E152, приводят к полной потере ее каталитической активности и инактивации вируса [1]. Однако показано, что замены некоторых других аминокислот не влияют на каталитическую активность ИН, но тем не менее существенно снижают инфекционность вируса. Это связано с тем, что ИН участвует в разных стадиях жизненного цикла ВИЧ-1 и взаимодействует с разными вирусными и клеточными белками [2].

Так, известно, что ИН и ОТ взаимодействуют между собой [3], и нарушение этого взаимодействия в результате аминокислотных замен в ИН отрицательно влияет на эффективность обратной транскрипции, при этом количество ОТ и вирусной РНК в вирионе остается на уровне вируса дикого типа [4–6]. Эксперименты с использованием метода CLIP-seq продемонстрировали, что ИН непосредственно взаимодействует с вирусной геномной РНК [7]. Эти взаимодействия влияют на морфологию вирусных частиц, при их нарушении рибонуклеопротеиновый комплекс обнаруживается вне оболочки капсида, часто оказывается ассоциирован с вирусной мембраной. Неправильная локализация вирусного генома также может быть причиной нарушения обратной транскрипции [7]. Предполагается и еще один косвенный механизм влияния ИН на эффективность обратной транскрипции. Показано, что аминокислотная замена S130S в ИН приводит к уменьшению уровня вирусного капсида в цитоплазме и снижению его стабильности. Возможно, это обусловлено тем, что у вируса с мутантной ИН снижено включение в состав вириона циклофилина А (СурА) – клеточного кофактора капсидного белка ВИЧ-1 [8].

Установлено также, что стадия репарации повреждений клеточного генома, возникающих в результате интеграции в него вирусной ДНК, обеспечивается в результате взаимодействия ИН с клеточными белками [9, 10]. Таким образом, функции ИН в жизненном цикле ВИЧ-1 не ограничиваются только интеграцией, она обладает и другими важными некаталитическими функциями.

ИН ВИЧ-1 относится к классу полинуклеотидтрансфераз и имеет трехдоменную структурную организацию. *N*-Концевой домен (1–50 а.о.) содержит консервативный ННСС-мотив, координирующий ион цинка. Каталитический домен (51–212 а.о.) включает активный центр фермента, представляющий собой мотив DD35E, аминокислоты которого координируют два иона магния. *C*-Концевой домен (213–288 а.о.) богат положительно заряженными аминокислотами и обладает SH3-подобной структурой [11].

В настоящее время полная структура ИН ВИЧ-1 не определена. Однако структура комплекса ИН с

вирусной ДНК, в составе которого происходит интеграция вирусной ДНК в клеточную и который называется интасомой, реконструирована на основании структур, полученных для других ретровирусов. В ней ИН обладает тетрамерной [12, 13] или гексадекамерной структурой, причем гексадекамер сформирован из четырех тетрамеров [14].

В структуре интасомы ВИЧ-1, предложенной в работе Passos et al. [13], ИН представлена в виде тетрамера, составленного из двух димеров. В каждом из димеров одна субъединица предоставляет активный центр для катализа, а другая – участвует в поддержании структуры интасомы. При этом каталитические домены тех субъединиц, которые формируют активные центры, сближены с *N*-концевыми доменами противоположных субъединиц. Эти пограничные области взаимодействия каталитического и *N*-концевого доменов ИН также сближены и с вирусной ДНК. Соответственно, аминокислоты, расположенные в области междоменного контакта, могут быть вовлечены в разные взаимодействия, осуществляемые ИН, и влиять на разные процессы, в которых она участвует. Так, ранее было показано, что замены некоторых аминокислот участка 180–188 существенно снижают эффективность обратной транскрипции, возможно, из-за нарушения связывания мутантных вариантов ИН с ОТ и/или нарушения мультимерной структуры ИН [15].

В настоящей работе мы проанализировали влияние замен аминокислот I182A, R187A и K188A на эффективность обратной транскрипции и интеграции, а также, получив рекомбинантные белки, детально исследовали влияние этих замен на каталитические функции ИН, ее способность связывать ДНК и РНК, ее взаимодействие с ОТ и мультимеризацию. Обнаружено, что все эти замены в той или иной мере действительно влияют на репликативную способность вируса, однако причины этого влияния у разных мутантов различны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды, олигонуклеотиды и ферменты.

В работе были использованы следующие плазмиды: pLTRLuc, кодирующая геном псевдовируса, представленный репортерным геном люциферазы светлячка; pCMVΔ8.2R, кодирующая вирусные белки за исключением Env («Addgene», США); pCMV-VSVG, кодирующая белок оболочки вируса везикулярного стоматита («Addgene»); pET-15b_ИН, кодирующая интегразу ВИЧ-1 с His₆-тагом на *N*-конце; pGGW-GST-ИН, кодирующая интегразу ВИЧ-1 с GST-тагом на *N*-конце; получена на основе вектора pGGW-GST. Варианты pCMVΔ8.2R_mut, pET-15b_ИН и pGGW-GST-ИН с мутациями в гене интегразы

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность праймеров (5'→3')
I182As	cccttttctttaaattgtgggcgaatactgccatttgactgctg
I182Aas	cagcagtagacaatggcagtagtcccccacaattttaaagaagaagggg
R187As	aatggcagtagtcccccacaattttaaagaagaagggggattggg
R187Aas	cccaatccccctttgtctttaaattgtggatgaatactgccatt
K188As	cccaatccccctgtctttaaattgtggatgaatactgc
K188Aas	gcagtagtcccccacaattttaaagaagcaggggggattgggg
U5B	gtgtggaaaatctctagcagt
U5B-2	gtgtggaaaatctctagca
U5A	actgtagagattttccacac

(замены I182A, R187A и K188A) получены методом Quick Change II сайт-направленного мутагенеза («Agilent Technologies», США) с использованием праймеров, представленных в табл. 1.

Также в табл. 1 представлены олигонуклеотиды U5B, U5B-2 и U5A, формирующие ДНК-субстраты ИН для тестирования ее каталитической и ДНК/РНК-связывающей активности.

Приводим последовательность рибоолигонуклеотида, формирующего шпильку TAR (TAR-РНК) – gggucucucugguagaccagaucugagccugggagcucucuggsuaacuaggaaccs.

В работе были использованы следующие ферменты: ИН ВИЧ-1 дикого типа (ИН_wt) и с заменами аминокислот I182A, R187A и K188A (ИН_I182A, ИН_R187A и ИН_K188A) с His₆-тагом на N-конце; выделяли по методике, описанной ранее [16], соответствующие белки с GST-тагом на N-конце; выделяли по методике, описанной ниже в подразделе «Экспрессия и выделение ИН с GST-тагом».

Обратная транскриптаза ВИЧ-1 гетеродимер р51/р66 с His₆-тагом на N-конце каждой субъединицы любезно предоставлена к.б.н. В.Т. Валуевым-Эллистоном (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия).

Ведение клеточной культуры. Клетки НЕК 293Т культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («Invitrogen», США), в инкубаторе с температурой 37 °С и увлажненной атмосферой, содержащей 5% CO₂.

Подготовка ВИЧ-подобных псевдовиральных частиц. Сборку ВИЧ-подобных псевдовиральных частиц проводили согласно ранее опубликованной методике [17]. Для этого клетки НЕК 293Т котрансфицировали тремя плазмидами: рLTRLuc, кодирующей люциферазу светлячка, рCMVΔ8.2R или рCMVΔ8.2R-mut, содержащей соответствующие

мутации в гене ИН, и рCMV-VSVG, используя кальций-фосфатную трансфекцию. Через 48 ч собирали супернатанты, псевдовirus концентрировали центрифугированием при 30 000 g в течение 2 ч и ресуспендировали в PBS. Уровень р24 определяли с помощью ИФА-набора ВИЧ-1 «р24-антиген» («Вектор Бест», Россия).

Трансдукция клеток. Клетки НЕК 293Т инфицировали добавлением псевдовirusов в клеточную среду в конечной концентрации 100 пг р24 на 10⁵ клеток. Клетки собирали через 24 ч после инфицирования, подсчитывали количество клеток и измеряли активность люциферазы в клеточных лизатах с использованием считывателя микропланшетов SYNERGY H1 («BioTek», США) и набора системы анализа люциферазы («Promega», США). Полученные данные нормализовали по количеству клеток.

Количественный ПЦР. Через 24 ч после трансдукции клеток НЕК 293Т псевдовиральными частицами выделяли суммарную фракцию ДНК и определяли количество общей и интегрированной вирусной ДНК, как описано ранее [18].

Экспрессия и выделение ИН с GST-тагом. Для получения ИН_wt и ее мутантных форм ИН_I182A, ИН_R187A и ИН_K188A, несущих N-концевую GST-метку, клетки CodonPlus *Escherichia coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой, кодирующей GST-IN (pGGW-GST-IN) или ее мутантным вариантом; ночную культуру (10 мл) переносили в 300 мл среды 2,5% LB («VWR», США), и культуру клеток выращивали до поглощения 0,8 при 600 нм. Экспрессию рекомбинантного белка индуцировали добавлением 1 мМ ИПТГ, продукцию белка осуществляли в течение 16 ч при 18 °С. Затем клетки центрифугировали (40 мин, 4 °С, 4000 об./мин), ресуспендировали в 80 мл буфера А (50 мМ Tris-HCl (pH 7,8); 1 М NaCl; 10% глицерин; 4 мМ β-меркапто-

этанол) и подвергали обработке ультразвуком. После этого нерастворимый клеточный дебрис удаляли центрифугированием (30 мин, 4 °С, 10 000 *g*), а супернатант добавляли к 1 мл глутатион-сефарозы («Thermo Scientific», США), уравновешенной буфером А, и инкубировали 3 ч при 4 °С. Затем смолу трижды промывали 50 мл буфера А. Белок элюировали 1 мл буфера Б (50 мМ Tris-HCl (pH 7,8); 1 М NaCl; 10% глицерин; 4 мМ β-меркаптоэтанол; 50 мМ глутатион) в нескольких фракциях. Элюаты белков диализировались в буфере А. Перед замораживанием к образцам был добавлен глицерин до концентрации 20%.

Анализ обмена субъединиц ИН. Анализ субъединичного обмена был выполнен, как описано ранее [19]. Смешивали ИН с GST-тагом (100 нМ) и ИН с His₆-тагом (100 или 200 нМ) и инкубировали в буфере В (20 мМ HEPES (pH 7,5); 100 мМ NaCl; 7,5 мМ MgCl₂; 2 мМ β-меркаптоэтанол и 0,1% (v/v) NP-40) в течение 60 мин при комнатной температуре. Образцы центрифугировали в течение 2 мин при 1000 *g* для удаления неспецифических агрегатов. Супернатанты инкубировали с глутатион-сефарозой, предварительно обработанной 0,1 мг/мл БСА, в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации смолу промывали, а связанные белки элюировали буфером Г (50 мМ Tris-HCl (pH 6,8); 1% SDS; 10% глицерин; 100 мМ β-меркаптоэтанол; 0,0025% бромфеноловый синий). Элюат анализировали с помощью вестерн-блота.

Получение радиоактивно меченых субстратов ИН и TAR-РНК. Для получения радиоактивно меченых ДНК-субстратов ИН и TAR-РНК проводили 5'-фосфорилирование 10 пмоль олигонуклеотидов U5B, U5B-2 или TAR-РНК, используя 2 пмоль [γ-³²P] АТФ и Т4-полинуклеотидкиназу (10 единиц активности), в течение 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл 0,25 М ЭДТА, добавляли 10 пмоль комплементарного олигонуклеотида U5A (только для получения ДНК-субстратов ИН) и 20 мкл 3М CH₃COONa; объем смеси доводили до 100 мкл milli-Q H₂O. Затем Т4-полинуклеотидкиназу экстрагировали 100 мкл смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25/24/1), и радиоактивно меченый ДНК-субстрат или TAR-РНК осаждали спиртом. Радиоактивность измеряли по Черенкову на счетчике Delta-300 («Tracor», Нидерланды).

Определение каталитической активности ИН. Для реакции 3'-концевого процессинга использовали 5 нМ ДНК-дуплекс [5'-³²P] U5B/U5A; для реакции переноса цепи – 10 нМ ДНК-дуплекс [5'-³²P] U5B-2/U5A. Эти дуплексы инкубировали со 100–800 нМ ИН в буфере, содержащем 20 мМ HEPES (pH 7,2), 7,5 мМ MgCl₂ и 1 мМ ДТТ, при 37 °С в течение 1 ч, как описано в работе Shadrina et al. [20]. ДНК осаж-

дали и анализировали электрофорезом в 20%-ном денатурирующем ПААГ. Гель визуализировали на приборе GE Typhoon FLA 9500 PhosphorImager («Molecular Dynamics», США). Эффективность 3'-концевого процессинга определяли по соотношению интенсивностей полос, соответствующих U5B и U5B-2; переноса цепи – полос, соответствующих U5B-2 и более высоко идущим продуктам с использованием программы ImageQuant™ 5.0.

Анализ взаимодействия ИН с ДНК-субстратом и TAR-РНК методом торможения в геле. Инкубировали 5 нМ ³²P-меченные ДНК-субстрат U5B/U5A или TAR-РНК с белками ИН_{wt}, ИН_{I182A}, ИН_{R187A} и ИН_{K188A} в концентрации, возрастающей в интервале от 0 до 500 нМ, в 20 мкл буфера (20 мМ HEPES (pH 7,2); 7,5 мМ MgCl₂; 1 мМ ДТТ; 10% глицерин; 50 мМ NaCl) в течение 30 мин при 20 °С, после чего смеси помещали в лед. Сформированные комплексы анализировали методом геле-электрофореза в 8%-ном ПААГ при 60 В в течение 3–4 ч в буфере, содержащем 20 мМ Tris-acetate (pH 7,2) и 7,5 мМ MgCl₂, при 4 °С. Гель высушивали и визуализировали на приборе GE Typhoon FLA 9500 PhosphorImager. Определяли эффективность образования комплекса ИН/TAR-РНК или ИН/ДНК в (%) при изменении концентрации фермента с использованием программы ImageQuant™ 5.0. Данные, полученные по результатам трех экспериментов, аппроксимировали с помощью уравнения (1):

$$[\text{эффективность образования комплекса, \%}] = \frac{V_{\max} \cdot [\text{ИН}]}{K_d + [\text{ИН}]}, \quad (1)$$

с использованием программы GraphPad Prism 8.0.1, где V_{\max} – максимальная эффективность связывания, [ИН] – концентрация ИН в нМ, K_d – константа диссоциации в нМ, и рассчитывали значения константы диссоциации K_d .

Анализ взаимодействия ИН с ОТ методом соосаждения. Для оценки взаимодействия ИН_{wt} и ее мутантов ИН_{I182A}, R187A, K188A с ОТ использовали метод соосаждения белков на глутатион-сефарозе. Для этого ИН с GST-тагом получали, как описано выше, но не элюировали с глутатион-сефарозы. Для определения количества иммобилизованной ИН фракции глутатион-сефарозы (10, 20, 30 мкл) обрабатывали элюирующим буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 10% глицерина, 100 мМ β-меркаптоэтанол, ~0,0025% бромфеноловый синий, нагревали до 90 °С в течение 5 мин и анализировали с помощью геле-электрофореза в 12%-ном ПААГ по Лэммли. Гель прокрашивали Кумасси, и количество ИН оценивали относительно нанесенных на этот же гель образцов ИН с известной концентрацией.

Далее, количество глутатион-сефарозы, содержащее 50 пмоль ИН, инкубировали с 50 пмоль His₆-ОТ в 250 мкл буфера, содержащего 20 mM HEPES (pH 7,5), 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 27,5 mM CH₃COOK, 0,5% (w/v) Triton X-100, при 4 °C в течение 30 мин при перемешивании. После этого смолу дважды отмывали 600 мкл того же буфера. Связанные со смолой белки элюировали буфером, содержащим 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 10% глицерина, 100 mM β-меркаптоэтанол, ~0,0025% бромфеноловый синий, при нагревании до 90 °C в течение 5 мин и разделяли в 12%-ном ПААГ по Лэммли с последующим вестерн-блот-анализом.

Вестерн-блот-анализ. Образцы белка анализировали на наличие GST- или His₆-метки с кроличьими анти-GST («Sigma», США) и мышинными анти-His₆-антителами («Sigma») соответственно. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к мышши («Sigma») и к кролику («Sigma») соответственно. Визуализацию специфических белковых полос осуществляли с использованием субстрата Clarity Western ECL («Bio-Rad», США) с помощью прибора ChemiDoc MP («Bio-Rad»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние аминокислотных замен I182A, R187A и K188A в составе интегразы на эффективность ранних стадий репликации ВИЧ-1. Для анализа роли аминокислот I182, R187 и K188 ИН в репликации вируса мы использовали VSV-G-псевдотипированный репликативно некомпетентный вектор на основе ВИЧ-1 [17], который является удобной моделью для изучения ранних этапов жизненного цикла вируса: обратной транскрипции и интеграции. Сборка псевдовиральных частиц осуществлялась путем трансфекции клеток НЕК 293Т тремя плазмидами, кодирующими: 1) G-белок вируса везикулярного стоматита (VSV), 2) геном псевдовируса, в котором вирусные гены заменены на репортерный ген люциферазы светлячка, находящийся под контролем вирусного LTR-промотора, 3) структурные белки для формирования капсида вирусной частицы и ферменты ВИЧ-1. Для получения векторов с мутантными вариантами ИН, содержащими замены исследуемых аминокислот на аланин, в плазмиду, кодирующую ИН, вводились соответствующие мутации методом сайт-направленного мутагенеза. У всех полученных вирусных частиц определяли уровень р24. Клетки НЕК 293Т трансдуцировали, добавляя псевдовиральные частицы в конечной концентрации 100 пг р24 на 10⁵ клеток (при этом множественность инфекции (МОИ) была равна единице). За эффективностью трансдукции клеток НЕК 293Т псевдовирус-

ными частицами следили по уровню экспрессии люциферазы светлячка.

Для всех псевдовирусов с мутантными вариантами ИН мы обнаружили снижение продукции люциферазы, по сравнению с вектором, содержащим ИН дикого типа (ИН_wt) (рис. 1). Наибольший эффект оказывала мутация R187A – сигнал люминесценции был снижен в 50 раз. Эти данные согласуются с описанными ранее в работах Takahata et al. [21] и Lu et al. [22]. Замена I182A также оказывала существенное влияние на репликацию вируса – сигнал люминесценции снижался в 10 раз. Замена K188A приводила к снижению продукции люциферазы в 1,5 раза. Таким образом, можно сказать, что исследуемые нами аминокислоты ИН действительно играют важную роль на ранних этапах репликации ВИЧ-1 – обратной транскрипции или интеграции ВИЧ-1.

Влияние аминокислотных замен в интегразе на стадии обратной транскрипции и интеграции. Для выяснения конкретной стадии, на которую влияют замены I182A, R187A и K188A в структуре ИН, использовали метод Alu-специфичного ПЦР [18] и измеряли уровень тотальной вирусной кДНК и интегрированной кДНК в клетках после трансдукции псевдовиральными частицами дикого типа и с заменами в ИН (рис. 2).

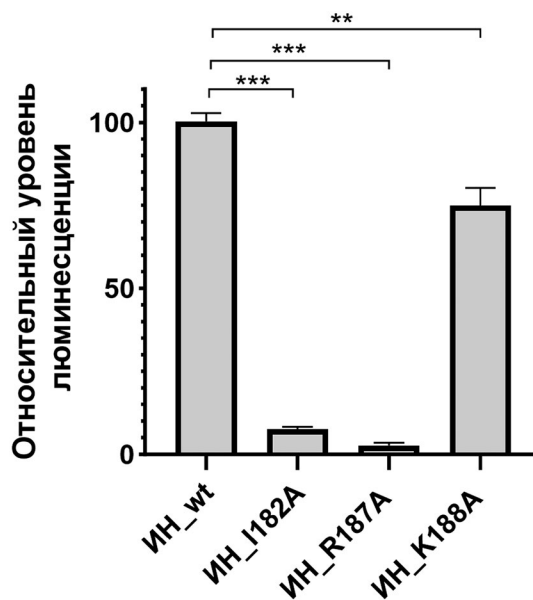


Рис. 1. Относительный уровень люминесценции люциферазы светлячка в клетках, трансдуцированных псевдовирусами с ИН дикого типа (ИН_wt) и ее мутантными вариантами: ИН_I182A, ИН_R187A и ИН_K188A. Сигнал люциферазы измеряли через 24 ч после трансдукции, и результаты нормализовали на экспрессию люциферазы псевдовируса с ИН_wt. Представлены средние значения трех независимых экспериментов. Значимость определялась двусторонним дисперсионным анализом с поправкой Шидека на множественные сравнения; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

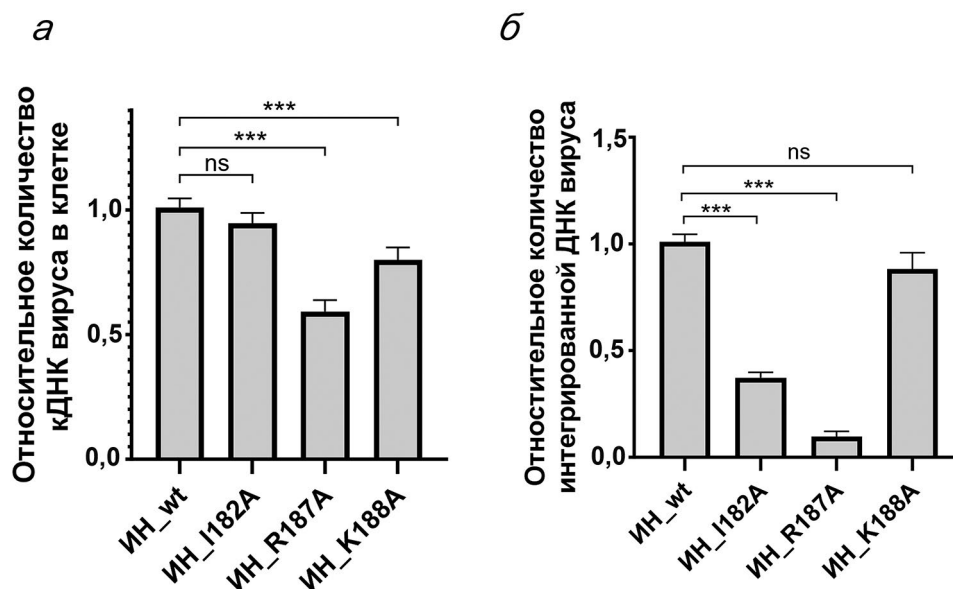


Рис. 2. Относительное количество общей вирусной кДНК (а) и интегрированной вирусной кДНК (б) после трансдукции клеток НЕК 293Т псевдовирусами с ИН_wt и мутантными белками. Представлены средние значения трех независимых экспериментов. Значимость определялась двусторонним дисперсионным анализом с поправкой Шидака на множественные сравнения; *** $p < 0,001$; ns – не значимо

Изменение уровня всей вирусной кДНК указывает на изменение эффективности обратной транскрипции, а интегрированной кДНК – интеграции.

Оказалось, что замена R187A приводит к снижению эффективности обеих стадий: обратной транскрипции и интеграции. При этом влияние замены R187A на интеграцию оказалось сильнее: количество интегрированной вирусной кДНК снижалось в 10 раз, а общей вирусной кДНК – только в 1,8 раз. Замена I182A влияла только на стадию интеграции, снижая количество интегрированной кДНК в 3 раза. Замена K188A приводила к снижению количества общей вирусной кДНК в 1,5 раза и практически не влияла на стадию интеграции. Детектируемое незначительное уменьшение уровня интегрированной ДНК, скорее всего, связано с пониженным уровнем тотальной вирусной ДНК (рис. 2, а).

Таким образом, аминокислотные замены I182A, R187A и K188A в составе ИН влияют на разные этапы репликации вируса. Для выяснения причин этого влияния мы проанализировали эффект этих замен на каталитическую активность ИН, ее способность связывать ДНК и РНК, а также на ее взаимодействие с ОТ.

Характеристика каталитической активности мутантных вариантов ИН. Для исследования влияния аминокислотных замен на свойства ИН методом сайт-направленного мутагенеза были получены векторы для прокариотической экспрессии вариантов ИН с заменами I182A, R187A и K188A. Все мутантные белки содержали на N-конце His₆-таг для очистки на Ni-NTA-агарозе.

Степень чистоты полученных препаратов ИН составила не менее 90%.

В процессе репликации вируса ИН осуществляет две последовательные реакции: 3'-концевой процессинг, при котором происходит отщепление динуклеотида GT с 3'-концов вирусной ДНК, и перенос цепи, который заключается во встраивании процессированной вирусной ДНК в клеточную ДНК. Обе эти реакции можно имитировать *in vitro* по стандартным методикам [20]. Для проведения реакции 3'-процессинга *in vitro* был использован дуплекс [5'-³²P] U5B/U5A, последовательность которого соответствует концевой последовательности фрагмента U5 вирусной кДНК. На 5'-конец процессируемой цепи U5B, которая в результате реакции превращалась в укороченный на два нуклеотида продукт, была введена радиоактивная метка. В реакции переноса цепи в качестве и субстрата, и мишени использовался дуплекс [5'-³²P] U5B-2/U5A, в котором цепь U5B уже была укорочена на два нуклеотида (U5B-2).

Мы проверили каталитическую активность мутантных вариантов ИН в реакции 3'-процессинга (рис. 3, а) и переноса цепи (рис. 3, б), используя разные концентрации белка. Каталитическая активность ИН_K188A сохранялась на уровне фермента дикого типа (ИН_wt) (рис. 3, а – дорожки 4, 5 и 2, 3 соответственно; рис. 3, б – дорожки 2, 3 и 8, 9 соответственно). Активность ИН_I182A была снижена на 50% по сравнению с ИН дикого типа (рис. 3, а – дорожки 6–9; рис. 3, б – дорожки 4, 5). ИН_R187A оказалась каталитически не активна в реакции переноса цепи (рис. 3, б – дорожки 6, 7)

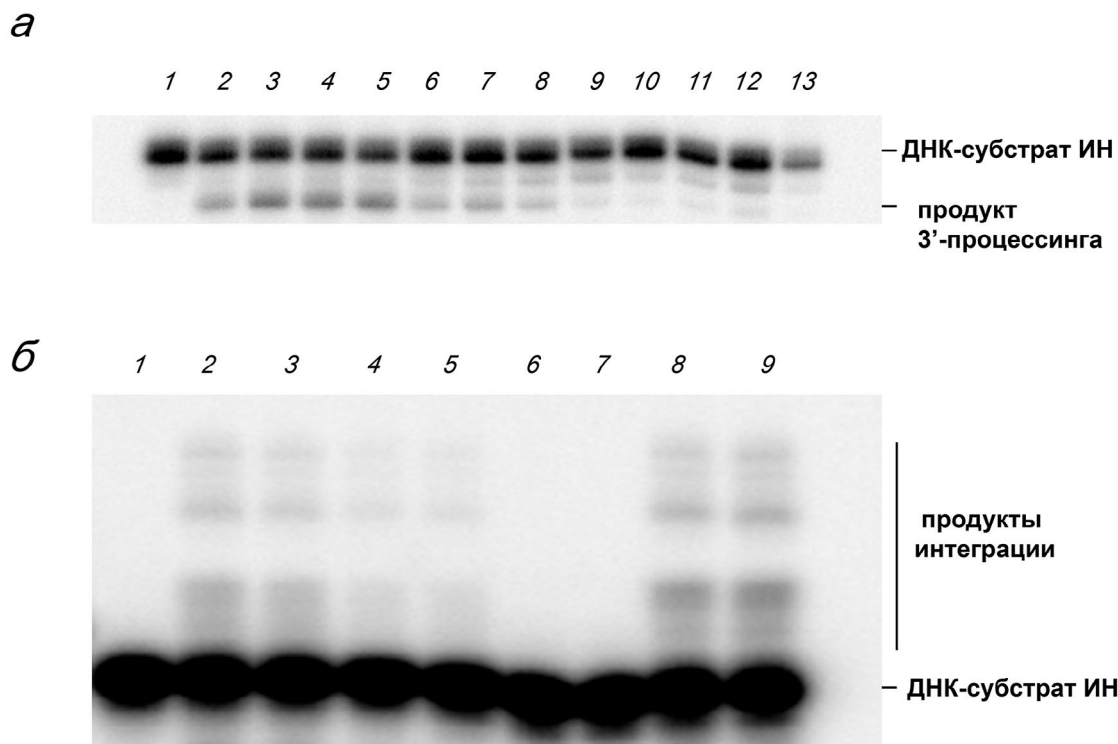


Рис. 3. Электрофоретический анализ каталитической активности ИН_wt и мутантов ИН_I182A, ИН_R187A, ИН_K188A в реакциях 3'-процессинга (а) и переноса цепи (б). а – Дуплекс U5B/U5A без ИН (дорожка 1); в присутствии ИН_wt (дорожки 2, 3); в присутствии ИН_K188A (дорожки 4, 5); в присутствии ИН_I182A (дорожки 6–9); в присутствии ИН_R187A (дорожки 10–13). Реакцию проводили с 5 нМ ДНК-дуплексом и увеличивающимися концентрациями ИН: 100 нМ (дорожки 2, 4, 6, 10); 200 нМ (дорожки 3, 5, 7, 11); 400 нМ (дорожки 8, 12) и 800 нМ (дорожки 9, 13). б – Дуплекс U5B-2/U5A без ИН (дорожка 1); в присутствии ИН_wt (дорожки 2, 3); в присутствии ИН_K182A (дорожки 4, 5); в присутствии ИН_I187A (дорожки 6, 7); присутствии ИН_R188A (дорожки 8, 9). Реакцию проводили с 10 нМ ДНК-дуплексом и концентрациями ИН: 100 нМ (дорожки 2, 4, 6, 8) и 200 нМ (дорожки 3, 5, 7, 9)

и проявляла не более 10% активности по сравнению с ИН_wt в реакции 3'-процессинга (рис. 3, а – дорожки 10–13).

Характеристика ДНК-связывающей активности мутантных вариантов ИН. Каталитическая активность ИН зависит как от структуры ее активного центра, так и от способности связывать ДНК-субстрат. Мы проверили способность мутантных вариантов ИН связывать 21-звенный ДНК-субстрат (дуплекс [5'-³²P] USB/U5A). На рис. 4, а и в табл. 2 представлены результаты связывания ДНК-субстрата для всех исследуемых вариантов ИН, полученные методом торможения в геле.

Все исследуемые аминокислотные замены оказывали влияние на эффективность образования

комплекса ИН с ДНК-субстратом, однако это влияние заметно различалось (рис. 4, а). Замена R187A вызвала очень сильное снижение эффективности связывания ДНК – K_d увеличилась более чем в 13 раз по сравнению с ИН дикого типа (табл. 2). Замена I182A тоже ухудшала связывание ДНК, но в меньшей степени – K_d возросла почти в 9 раз. При этом, несмотря на 100-кратный избыток белков, по сравнению с ДНК, нам не удалось достичь 100%-ной эффективности образования комплекса ИН с ДНК. Замена K188A не оказывала заметного влияния на эффективность связывания субстрата – K_d была в 2,4 раза выше, чем для ИН дикого типа, но эта мутация не препятствовала 100%-ному связыванию ДНК уже при концентрации ИН 350–400 нМ.

Таблица 2. Константы диссоциации комплексов ИН с ДНК и РНК

ИН	ИН_wt	ИН_I182A	ИН_R187A	ИН_K188A
K_d (ИН/ДНК), нМ	25 ± 3	220 ± 60	330 ± 20	60 ± 5
K_d (ИН/РНК), нМ	21 ± 5	67 ± 17	82 ± 12	36 ± 3

Примечание. Приведено среднее значение со стандартным отклонением, полученное по результатам как минимум трех независимых экспериментов.

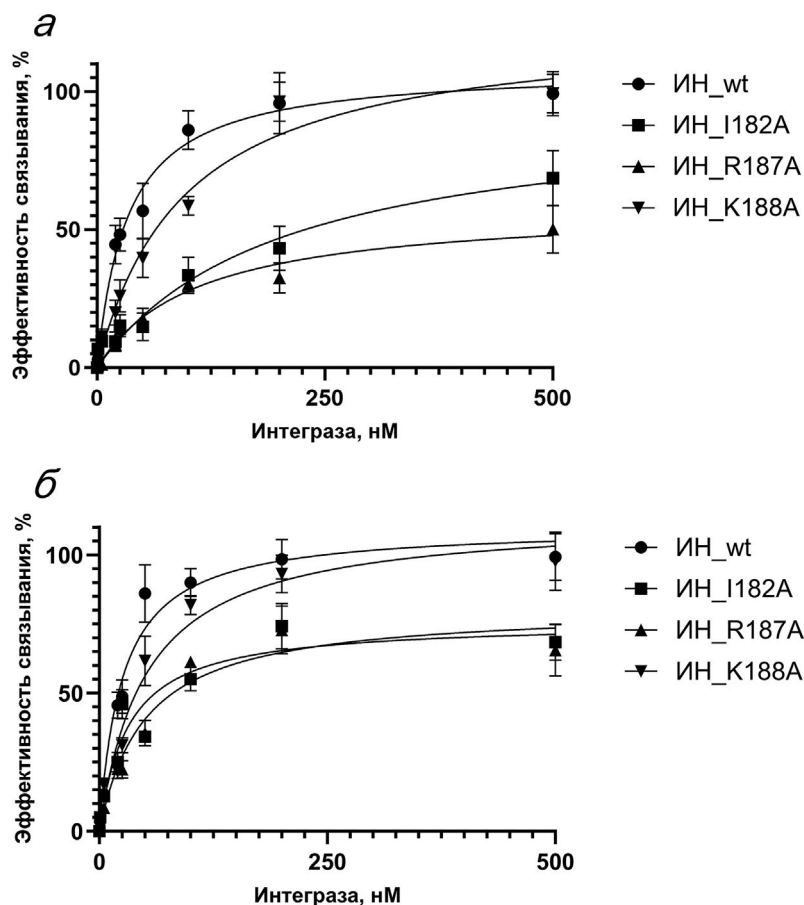


Рис. 4. Влияние аминокислотных замен I182A, R187A и K188A в ИН на эффективность ее связывания с ДНК-субстратом и с TAR-РНК. *а* – Кривые связывания ИН с ДНК-дуплексом U5B/U5A, полученные методом торможения в геле. 5 нМ ДНК-субстрат инкубировали с ИН в разных концентрациях: 0, 25, 50, 100, 200 и 500 нМ. *б* – Кривые связывания ИН с TAR-РНК, полученные методом торможения в геле. 5 нМ TAR-РНК инкубировали с ИН в разных концентрациях: 0, 25, 50, 100, 200, 500 нМ

Характеристика РНК-связывающей активности мутантных ИН. Установлено, что ИН непосредственно взаимодействует с вирусной геномной РНК, и аминокислотные замены в ИН, которые ухудшают это связывание, приводят к образованию неинфекционных вирионов [6, 23]. При этом ИН проявляет явное предпочтение к отдельным структурным элементам вирусной РНК, например, к шпильке TAR (Trans Activation Response) [7].

Мы проверили, как замены I182A, R187A и K188A в ИН влияют на ее РНК-связывающую способность. Для этого мы использовали фрагмент РНК ВИЧ-1 – TAR-РНК, к которой, как указано выше, ИН имеет повышенное сродство. Оказалось, что, как и в случае с ДНК, все мутации снижали эффективность связывания, однако это снижение было не столь сильным (рис. 4, б). Для ИН_I182A и ИН_R187A K_d увеличивалась в 3,1 и в 3,9 раз соответственно, а замена K188A снижала эффективность связывания в 1,7 раза (табл. 2).

Влияние замен I182A, R187A, K188A на взаимодействие ИН с обратной транскриптазой. Для

проверки влияния аминокислотных замен в ИН на ее взаимодействие с ОТ использовали рекомбинантные белки: ИН с GST-тагом и ОТ с His₆-тагом. ОТ инкубировали с разными вариантами ИН, затем проводили осаждение образовавшихся комплексов на глутатион-сефарозе и с помощью вестерн-блот-анализа определяли количество ОТ, соосажденной с ИН_wt и всеми мутантными белками. Оказалось, что ни одна из аминокислотных замен в ИН не оказывает заметного влияния на ее взаимодействие с ОТ (рис. 5).

Влияние замен I182A, R187A, K188A в ИН на ее мультимеризацию. Предполагается, что ИН ВИЧ-1 является структурно-динамичным белком и способна образовывать множество олигомерных форм в растворе. В связи с этим мы исследовали, как замены I182A, R187A и K188A влияют на динамическое равновесие между субъединицами ИН. Для этого мы использовали метод обмена субъединицами, аналогичный предложенному в работе McKee et al. [19]. ИН_wt с GST-тагом инкубировали с ИН_wt или мутантными вариантами ИН,

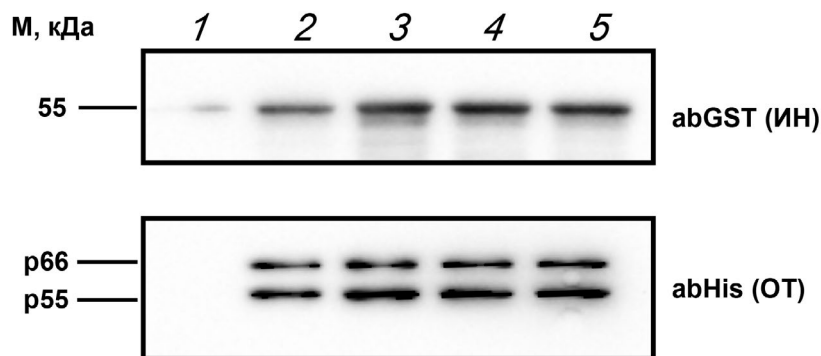


Рис. 5. Анализ взаимодействия ОТ с ИН дикого типа (ИН_wt) и с заменами I182A, R187A, K188A, содержащими *N*-концевой GST-таг, методом соосаждения на глутатион-сефарозе. ОТ при отсутствии ИН (дорожка 1); ОТ в присутствии ИН_wt (дорожка 2); ОТ в присутствии ИН_I182A (дорожка 3); ОТ в присутствии ИН_R187A (дорожка 4); ОТ в присутствии ИН_K188A (дорожка 5). Инкубация ИН и ОТ в концентрации 250 нМ проводилась в течение 30 мин при 4 °С

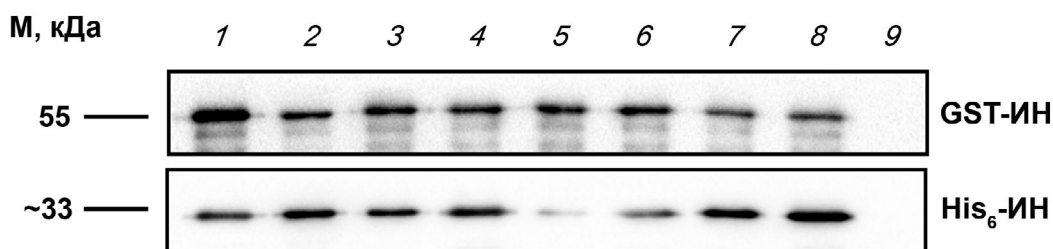


Рис. 6. Анализ эффективности обмена субъединицами для ИН_wt и с заменами I182A, R187A и K188A. 100 нМ GST-ИН инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с белками, содержащими His₆-таг: ИН_wt (дорожки 1, 2), ИН_K182A (дорожки 3, 4), ИН_I187A (дорожки 5, 6), ИН_R188A (дорожки 7, 8). Концентрации белков с His₆-тагом: 100 нМ (дорожки 1, 3, 5, 7) и 200 нМ (дорожки 2, 4, 6, 8). Дорожка 9 – контроль без GST-ИН

содержащими His₆-таг, затем проводили осаждение образовавшихся комплексов на глутатион-сефарозе и с помощью вестерн-блот-анализа определяли количество соосажденного белка с His₆-тагом, который должен соосаждаться, только если эффективно происходит обмен субъединицами. Оказалось, что только замена R187A нарушала динамический обмен между субъединицами (рис. 6; дорожки 5 и 6), замены аминокислот I182 и K188 ему не препятствовали (рис. 6; дорожки 3, 4 и 7, 8 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аминокислоты каталитического домена ИН, находящиеся на стыке взаимодействия с *N*-концевым доменом, в том числе консервативный мотив 186K RK188, давно являются предметом исследований. Предполагалось, что этот мотив является сигналом ядерной локализации ИН [24]. Однако это предположение еще в 2000 году было опровергнуто, и было показано, что мутации в этом регионе приводят к существенному снижению эффективности обратной транскрипции [25]. Это подтверждалось и в последующих

работах [6, 22]. В ряде работ установлено участие аминокислот этого региона в мультимеризации ИН [12, 15, 19, 26], и именно с этим связывалось их влияние на репликацию вируса. Elliott et al. [6] и Kessl et al. [7] показали, что нарушение тетрамеризации ИН, вызванное мутациями R187A и K188E, препятствует ее связыванию с вирусной РНК, что приводит к нарушению морфологии вириона и за счет этого влияет на репликацию вируса. Влияние на мультимеризацию ИН остатка I182 специально не изучалось, но было обнаружено, что замена I182A снижает эффективность обратной транскрипции [21].

Мы решили более детально выяснить причины ухудшения обратной транскрипции при заменах аминокислот, находящихся на стыке взаимодействия каталитического и *N*-концевого доменов двух димеров ИН в структуре ее тетрамера, и выбрали аминокислоты I182, R187 и K188. По данным рентгеноструктурного анализа, все они направлены в сторону *N*-концевого домена другой субъединицы [PDB 5U1C [13]] и, следовательно, могут участвовать в образовании тетрамера (рис. 7). Все исследуемые аминокислоты были заменены на аланин, поскольку мы посчитали, что использованная ранее замена K188E [6] может слишком

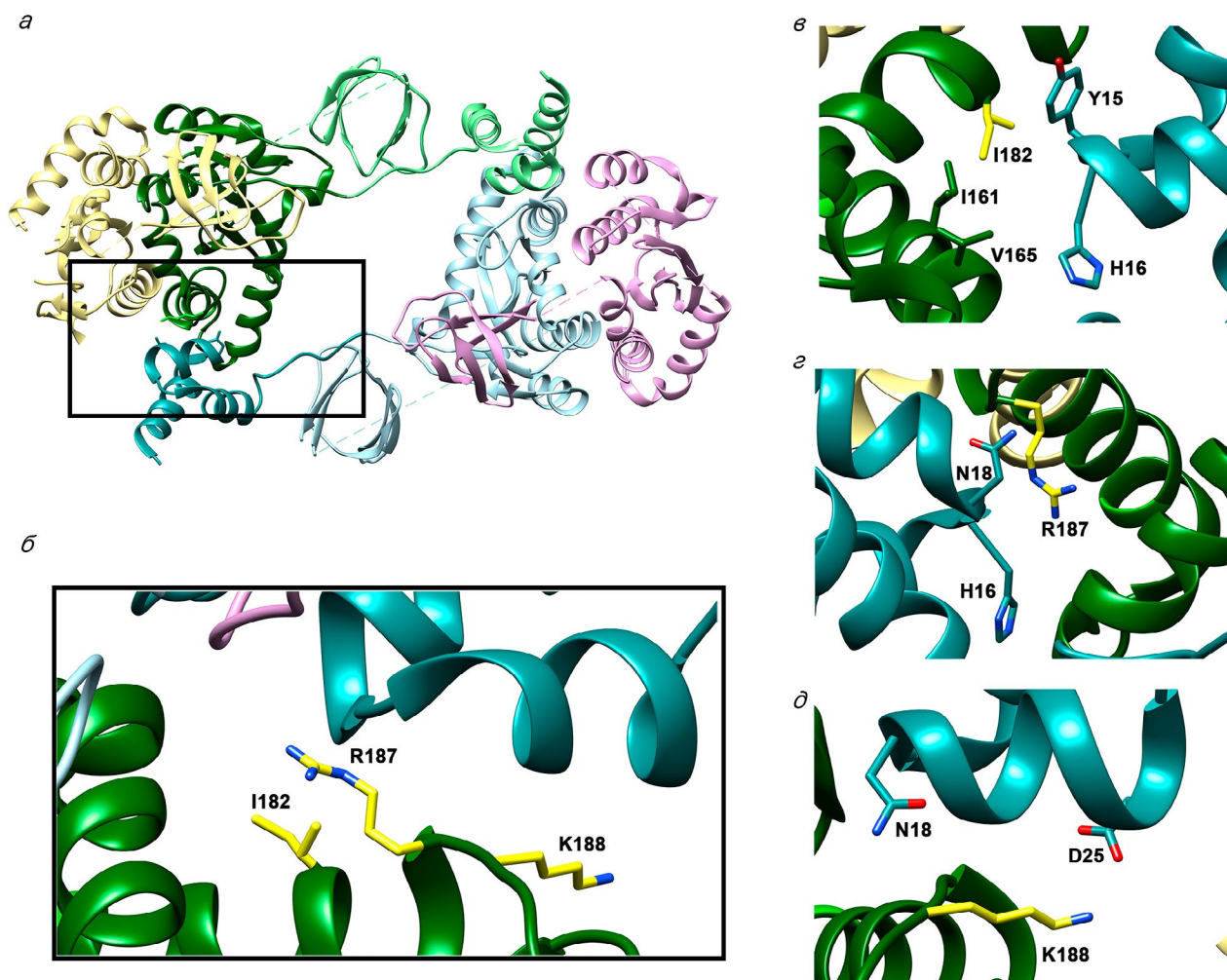


Рис. 7. Расположение аминокислот I182, R187 и K188 в структуре ИН (по данным Passos et al. [13] (PDB 5U1C)). *a* – Структура тетрамера ИН ВИЧ-1. Разными цветами отмечены отдельные субъединицы ИН. *б* – Прямоугольником выделено и увеличено место расположения аминокислот I182, R187 и K188 (выделены ярко-желтым) каталитического домена одной субъединицы (выделен зеленым) и *N*-концевого домена другой субъединицы (выделен бирюзовым). *в–д* – Окружение аминокислот I182, R187 и K188 соответственно

сильно менять общую структуру ИН и не позволяет выяснить роль только одной аминокислоты.

В первую очередь с использованием псевдовиральных частиц мы подтвердили, что эти аминокислоты действительно важны для эффективной репликации вируса. Однако при определении стадии, которая нарушается при заменах исследуемых аминокислот, выяснилось, что не все замены влияют на обратную транскрипцию. Замена R187A существенно снижала эффективность обратной транскрипции, замена K188A вызывала незначительное снижение, а замена I182A вообще не влияла на эту стадию. Помимо этого, мы впервые установили, что замены I182A и R187A сильно снижают эффективность интеграции (рис. 2). Для того чтобы выяснить причины такого поведения мутантных псевдовиралов, мы получили рекомбинантные варианты ИН с этими же заменами и исследовали их свойства.

В соответствии с литературными данными [6], замена R187A приводила к нарушению мультимеризации ИН (рис. 6) и существенно снижала аффинность ИН к РНК (рис. 4, б; табл. 2). Именно эти два фактора, очевидно, объясняют зафиксированную в нашей работе низкую эффективность обратной транскрипции в случае этой замены в ИН. Отметим, однако, что мы не обнаружили влияния замены R187A на связывание ИН с ОТ (рис. 5). Это указывает на необязательность мультимерного состояния ИН для ее взаимодействия с ОТ. Кроме того, мы впервые установили, что замена R187A очень сильно подавляет способность ИН связывать ДНК-субстрат (рис. 4, а) и, соответственно, катализировать встраивание вирусной ДНК в геном клетки (рис. 2, б). Столь драматическое влияние замены R187A на функции ИН можно объяснить двумя причинами. Так, гуанидиновая группа остатка R187 может образовывать бидентантные

водородные связи [27] с карбонильным кислородом боковой цепи остатка N18 (рис. 7, з). Однако более вероятно альтернативное образование водородных связей гуанидиновой группировки с карбонильным кислородом в пептидной цепи у остатка N16, которое раньше было предсказано в работах Hare et al. [12] и Passos et al. [13]. Этот остаток гистидина входит в состав важного структурного ННСС-мотива *N*-концевого домена ИН. Кроме того, предсказана водородная связь остатка R187 с вирусной ДНК [13]. Именно поэтому замена R187A оказывает такое существенное влияние. Таким образом, аминокислота R187 несет важную функцию, обеспечивающую правильную структуру ИН, необходимую как для каталитических, так и некаталитических ее функций.

В отличие от замены R187A, замена K188A не влияла на эффективность интеграции, что согласуется с тем, что ИН_K188A проявляла такую же каталитическую активность в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи, как и ИН_wt (рис. 3), хотя мы и наблюдали незначительное снижение аффинности ИН_K188A к ДНК-субстрату (табл. 2). Небольшое снижение количества интегрированной ДНК (рис. 2) является следствием некоторого снижения уровня общей вирусной ДНК, вызванного заменой K188A, что согласуется с данными литературы [6]. Учитывая, что мы не обнаружили влияния замены K188A ни на связывание ИН с обратной транскриптазой, ни на мультимеризацию ИН, объяснить негативное влияние этой замены на обратную транскрипцию можно только некоторым снижением аффинности ИН_K188A к TAR-РНК (табл. 2). Аминогруппа K188 может образовывать солевой мостик с карбоксильной группой D25 из *N*-концевого домена (рис. 7, д). Очевидно, это взаимодействие важно для правильного связывания РНК. Можно предположить, что замена K188A влияет не столько на способность ИН связывать РНК (аффинность падает незначительно), сколько на правильную структуру РНК-белкового комплекса. Соответственно, нарушение структуры этого комплекса изменяет морфологию вирусных частиц, что и вызывает ухудшение обратной транскрипции [6]. Надо, однако, заметить, что это нарушение крайне незначительно и приводит лишь к небольшому снижению уровня вирусной тотальной кДНК.

Наиболее неожиданные результаты были получены при анализе роли I182 в функционировании ИН. В нашей работе, как и в работе Takahata et al. [21], замена I182A существенно снижала инфекционность вируса, но не за счет ухудшения обратной транскрипции, а за счет низкой эффективности интеграции (рис. 2). Анализ свойств рекомбинантного белка ИН_I182A показал, что у него существенно понижена ДНК-свя-

зывающая способность (табл. 2) и каталитическая активность (рис. 3). Это хорошо объясняет низкий уровень интегрированной кДНК (рис. 2, б). Вероятно, это происходит из-за нарушения гидрофобных взаимодействий боковой цепи I182 с Y15, которые важны для формирования правильной структуры ИН. Заметим, однако, что структурные нарушения, вызванные заменой I182A, не столь серьезны, как при замене R187A. Замена I182A не нарушает мультимеризацию ИН (в отличие от R187A) и не влияет на ее связывание с ОТ. Интересно, что замена I182A приводит к 3-кратному снижению аффинности ИН к TAR-РНК (табл. 2), но никак не влияет на эффективность обратной транскрипции. Возможно, ИН_I182A связывает РНК хуже, но структура образующихся комплексов такова, что не нарушает морфологию вирусных частиц, и, соответственно, мы не наблюдаем снижения уровня тотальной вирусной кДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИН ВИЧ-1 – это один из основных ферментов вируса, поэтому ее структура и функции являются предметом исследований на протяжении многих лет. В результате появляются все новые данные, доказывающие многообразие функций этого фермента. Однако некаталитические функции ИН ВИЧ-1 все еще остаются недостаточно изученными. Предполагалось, что замены исследуемых нами аминокислот I182, R187 и K188, находящихся на стыке каталитического и *N*-концевого доменов двух разных субъединиц ИН, влияют именно на ее некаталитические функции, т.е. относятся к так называемому II классу мутаций ИН, в отличие от мутаций I класса, влияющих на каталитические функции. Однако мы можем сделать вывод, что не всегда можно провести четкую границу и отнести мутации к тому или иному классу. Мы установили, что аминокислота R187 важна для репликации вируса как на стадии обратной транскрипции, так и интеграции, т.е. как для некаталитической, так и для каталитической функции ИН. Аминокислота K188 оказалась важна для успешного протекания обратной транскрипции, т.е. замену K188A можно отнести к мутациям II класса. Для I182 ранее было показано, что она важна для стадии обратной транскрипции, но в нашем исследовании оказалось, что ее замена снижает эффективность интеграции. Следовательно, замена I182A, скорее, относится к мутациям I класса.

Вклад авторов. М.Б. Готтих, Ю.Ю. Агапкина – концепция и руководство работой; Т.Ф. Кихай, Т.А. Приказчикова, С.П. Королев, М.В. Вдовина, С.П. Шехтман, С.В. Фомичева – проведение экспе-

риментов и обсуждения результатов исследования; Т.Ф. Кихай, Ю.Ю. Агапкина, М.Б. Готтих – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00073).

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. Wiskerchen, M., and Muesing, M. A. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells, *J. Virol.*, **69**, 376-386, <https://doi.org/10.1128/JVI.69.1.376-386.1995>.
2. Engelman, A. N., and Kvaratskhelia, M. (2022) Multimodal functionalities of HIV-1 integrase, *Viruses*, **14**, 926, <https://doi.org/10.3390/v14050926>.
3. Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hehl, E., Kalpana, G. V., Prasad, V., and Kappes, J. C. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex, *J. Virol.*, **73**, 2126-2135, <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2126-2135.1999>.
4. Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J. M., Martin, M. A., and Craigie, R. (1995) Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication, *J. Virol.*, **69**, 2729-2736, <https://doi.org/10.1128/JVI.69.5.2729-2736.1995>.
5. Leavitt, A. D., Robles, G., Alesandro, N., and Varmus, H. E. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain *in vitro* integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection, *J. Virol.*, **70**, 721-728, <https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.721-728.1996>.
6. Elliott, J., Eschbach, J. E., Koneru, P. C., Li, W., Puray-Chavez, M., Townsend, D., Lawson, D. Q., Engelman, A. N., Kvaratskhelia, M., and Kutluay, S. B. (2020) Integrase-RNA interactions underscore the critical role of integrase in HIV-1 virion morphogenesis, *Elife*, **9**, e54311, <https://doi.org/10.7554/eLife.54311>.
7. Kessl, J. J., Kutluay, S. B., Townsend, D., Rebensburg, S., Slaughter, A., Larue, R. C., Shkriabai, N., Bakouche, N., Fuchs, J. R., Bieniasz, P. D., and Kvaratskhelia, M. (2016) HIV-1 integrase binds the viral RNA genome and is essential during virion morphogenesis, *Cell*, **166**, 1257-1268.e12, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.044>.
8. Briones, M. S., Dobard, C. W., and Chow, S. A. (2010) Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core, *J. Virol.*, **84**, 5181-5190, <https://doi.org/10.1128/jvi.02382-09>.
9. Rozina, A., Anisenko, A., Kikhai, T., Silkina, M., and Gottikh, M. (2022) Complex relationships between HIV-1 integrase and its cellular partners, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12341, <https://doi.org/10.3390/ijms232012341>.
10. Knyazhanskaya, E., Anisenko, A., Shadrina, O., Kalinina, A., Zatsepin, T., Zalevsky, A., Mazurov, D., and Gottikh, M. (2019) NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase, *Retrovirology*, **16**, 30, <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0492-z>.
11. Агапкина Ю., Приказчикова Т., Смолов М., Готтих М. (2005) Структура и функции интегразы ВИЧ-1, *Успехи биологической химии*, **45**, 87-112.
12. Hare, S., Di Nunzio, F., Labeja, A., Wang, J., Engelman, A., and Cherepanov, P. (2009) Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase, *PLoS Pathog.*, **5**, e1000515, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000515>.
13. Passos, D. O., Li, M., Yang, R., Rebensburg, S. V., Ghirlando, R., Jeon, Y., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Craigie, R., and Lyumkis, D. (2017) Cryo-EM structures and atomic model of the HIV-1 strand transfer complex intasome, *Science*, **355**, 89-92, <https://doi.org/10.1126/science.aah5163>.
14. Ballandras-Colas, A., Maskell, D. P., Serrao, E., Locke, J., Swuec, P., Jónsson, S. R., Kotecha, A., Cook, N. J., Pye, V. E., Taylor, I. A., Andrésdóttir, V., Engelman, A. N., Costa, A., and Cherepanov, P. (2017) A supramolecular assembly mediates lentiviral DNA integration, *Science*, **355**, 93-95, <https://doi.org/10.1126/science.aah7002>.
15. Berthoux, L., Sebastian, S., Muesing, M. A., and Luban, J. (2007) The role of lysine 186 in HIV-1 integrase multimodification, *Virology*, **364**, 227-236, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.029>.
16. Knyazhanskaya, E. S., Smolov, M. A., Kondrashina, O. V., and Gottikh, M. B. (2009) Relative comparison of catalytic characteristics of human foamy virus and HIV-1 integrases, *Acta Naturae*, **1**, 78-80, <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-2-78-80>.
17. Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010) Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors, *PLoS Pathog.*, **6**, e1000788, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000788>.

18. Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M. B., DaFonseca, S., Bakeman, W., McNulty, A., Ramgopal, M., Michael, N., Kim, J. H., Ananworanich, J., and Chomont, N. (2014) Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies, *J. Virol.*, **88**, 12385-12396, <https://doi.org/10.1128/jvi.00609-14>.
19. McKee, C. J., Kessler, J. J., Shkriabai, N., Dar, M. J., Engelman, A., and Kvaratskhelia, M. (2008) Dynamic modulation of HIV-1 integrase structure and function by cellular lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) protein, *J. Biol. Chem.*, **283**, 31802-31812, <https://doi.org/10.1074/jbc.M805843200>.
20. Shadrina, O. A., Zatsypin, T. S., Agapkina, Yu. Yu., Isagulians, M. G., and Gottikh, M. B. (2015) Influence of drug resistance mutations on the activity of HIV-1 subtypes A and B integrases: a comparative study, *Acta Naturae*, **7**, 78-86, <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-1-78-86>.
21. Takahata, T., Takeda, E., Tobiume, M., Tokunaga, K., Yokoyama, M., Huang, Y.-L., Hasegawa, A., Shioda, T., Sato, H., Kannagi, M., and Masuda, T. (2017) Critical contribution of Tyr15 in the HIV-1 integrase (IN) in facilitating IN assembly and nonenzymatic function through the IN precursor form with reverse transcriptase, *J. Virol.*, <https://doi.org/10.1128/jvi.02003-16>.
22. Lu, R., Limón, A., Devroe, E., Silver, P. A., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2004) Class II integrase mutants with changes in putative nuclear localization signals are primarily blocked at a postnuclear entry step of human immunodeficiency virus type 1 replication, *J. Virol.*, **78**, 12735-12746, <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.12735-12746.2004>.
23. Elliott, J. L., and Kutluay, S. B. (2020) Going beyond integration: the emerging role of HIV-1 integrase in virion morphogenesis, *Viruses*, **12**, 1005, <https://doi.org/10.3390/v12091005>.
24. Galloway, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997) HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway (nuclear import human immunodeficiency virus), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9825-9830, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9825>.
25. Tsurutani, N., Kubo, M., Maeda, Y., Ohashi, T., Yamamoto, N., Kannagi, M., and Masuda, T. (2000) Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells the multiple effects of in mutations suggest that, *J. Virol.*, **74**, 4795-4806, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4795-4806.2000>.
26. De Houwer, S., Demeulemeester, J., Thys, W., Taltynov, O., Zmajkovicova, K., Christ, F., and Debysse, Z. (2012) Identification of residues in the C-terminal domain of HIV-1 integrase that mediate binding to the transportin-SR2 protein, *J. Biol. Chem.*, **287**, 34059-34068, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387944>.
27. Liat Shimoni, H., and Glusker, J. P. (1995) Hydrogen bonding motifs of protein side chains: descriptions of binding of arginine and amide groups, *Protein Sci.*, **4**, 65-74, <https://doi.org/10.1002/pro.5560040109>.

ROLE OF I182, R187 AND K188 AMINO ACIDS OF THE CATALYTIC DOMAIN OF HIV-1 INTEGRASE IN THE PROCESSES OF REVERSE TRANSCRIPTION AND INTEGRATION

T. F. Kikhai^{1#*}, Yu. Yu. Agapkina^{1,2#}, T. A. Prikazchikova¹, M. V. Vdovina¹, S. P. Shekhtman¹, S. V. Fomicheva³, S. P. Korolev^{1,2}, and M. B. Gottikh^{1,2*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: kih.t1996@yandex.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

³ Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia

The structural organization of HIV-1 integrase is based on a tetramer formed by two protein dimers. Within this tetramer, the catalytic domain of one subunit of the first dimer interacts with the N-terminal domain of a subunit of the second dimer. It is the tetrameric structure that allows both ends of viral DNA to be correctly positioned relative to cellular DNA and to implement the catalytic functions of integrase, namely 3'-processing and strand transfer. However, during the HIV-1 replicative cycle, integrase is responsible not only for the integration stage, it is also involved in reverse transcription and is necessary at the stage of capsid formation of newly formed virions. HIV-1 integrase is proposed to be a structurally dynamic protein and its biological functions depend on its structure. Accordingly, studying the interactions between the domains of integrase that provide its tetrameric structure is important

for understanding its multiple functions. In this work, we investigated the role of three amino acids of the catalytic domain I182, R187 and K188, located in the contact region of two integrase dimers in the tetramer structure, in reverse transcription and integration. It has been shown that the R187 residue is extremely important for the formation of the correct integrase structure, which is necessary at all stages of its functional activity. The I182 residue is necessary for successful integration and is not important for reverse transcription, while the K188 residue, on the contrary, is involved in the formation of the integrase structure, which is important for effective reverse transcription.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1, integrase, integration, reverse transcription

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ КИНАЗЫ ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ И ВИНКУЛИНА НА ПАРАМЕТРЫ МИГРАЦИИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ

© 2024 Е.С. Соломатина^{1,2}, А.В. Ковалева^{1,2}, А.В. Творогова^{1,3},
И.А. Воробьев¹, А.А. Саидова^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: aleena.saidova@gmail.com

² Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.11.2023

После доработки 11.01.2024

Принята к публикации 17.01.2024

Фокальные контакты (ФК) – это механосенсорные структуры, которые способны преобразовывать физические стимулы в химические сигналы, управляющие миграцией клеток. Существует корреляция между параметрами ФК и показателями клеточной подвижности для отдельных мигрирующих клеток. Однако какие именно параметры ФК являются критическими для движения эпителиальных клеток в составе монослоя, остаётся неизвестным. Мы использовали прижизненную съёмку клеток для описания взаимосвязи между параметрами ФК и миграцией иммортализованных эпителиальных кератиноцитов (HaCaT) и клеток карциномы лёгкого (A549) в условиях ингибирования или подавления транскрипции белков ФК винкулина и киназы фокальной адгезии (FAK). Чтобы оценить взаимосвязь между морфологией ФК и миграцией клеток, мы использовали субстраты разной эластичности в модели застывания экспериментальной раны. ФК с максимальной площадью и максимальная скорость миграции в рану, а также высокий уровень экспрессии мРНК FAK и винкулина были показаны для клеток на фибронектине, тогда как минимальная площадь ФК и замедление скорости миграции в рану были характерны для клеток на стекле. Как в нормальных, так и в опухолевых клетках подавление экспрессии винкулина приводило к уменьшению размера ФК и интенсивности их флуоресценции, однако не влияло на скорость миграции клеток внутрь раны. Подавление экспрессии или ингибирование активности FAK не влияло на размер ФК, однако снижало время жизни ФК и значительно замедляло скорость миграции клеток внутрь раны как в клетках HaCaT, так и в A549. Наши данные показывают, что определяющим параметром для миграции эпителиальных клеток в составе монослоя является время жизни ФК. Показанное влияние киназы FAK на скорость миграции клеток в составе монослоя делает FAK многообещающей мишенью для противоопухолевой терапии аденокарциномы лёгких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фокальные контакты, винкулин, FAK, аденокарцинома лёгкого, экспериментальная рана, миграция.

DOI: 10.31857/S0320972524030052 EDN: WKRGOU

ВВЕДЕНИЕ

Фокальные контакты (ФК) представляют собой крупные мультибелковые комплексы, которые преобразуют физические сигналы из внеклеточного матрикса (ВКМ) в химические сигналы внут-

ри клетки и таким образом регулируют подвижность клеток. Так как ФК играют ключевую роль в передаче сигнала и генерации тянущего усилия в клетках, их формирование важно для различных типов клеточной миграции, включая 2D миграцию по субстрату [1].

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ФК – фокальные контакты; A549 – линия клеток карциномы лёгкого человека; FAK – киназа фокальной адгезии (Focal Adhesion Kinase); HaCaT – иммортализованные эпителиальные кератиноциты человека.

* Адресат для корреспонденции.

Структура ФК универсальна для клеток различных типов тканей и включает три слоя: нижний сигнальный слой из интегринов, слой, отвечающий за механотрансдукцию, и слой с регуляторными актин-связывающими белками [2–4]. Киназа фокальной адгезии (FAK, Focal Adhesion Kinase) расположена в среднем слое и служит одним из ключевых сигнальных белков ФК благодаря как своей киназной активности, так и структурирующим свойствам [5]. После мобилизации и активации паксиллина в состав ФК киназа FAK взаимодействует с ним и связывает талин [6, 7], далее эти белки начинают работать как платформа для сборки зрелого ФК [8]. В опухолевых клетках FAK играет важную роль в образовании метастазов, способствуя миграции и инвазии клеток. Повышенная экспрессия FAK и её функциональная активация положительно коррелируют с частотой метастазирования, плохим прогнозом и худшей выживаемостью онкобольных [9–11]. Многочисленные работы указывают на то, что FAK способствует выживаемости и пролиферации опухолевых клеток и регулирует их метаболизм, стимулируя не только миграцию и инвазию клеток, но и другие процессы, способствующие развитию опухоли [12–15].

Важную роль в динамике ФК также играет жёсткость субстрата, по которому мигрируют клетки, и его состав. Клетки на жёстких субстратах формируют более крупные ФК, при этом повышается экспрессия ключевых регуляторных и структурных белков ФК, таких как паксиллин, винкулин или зиксин [16–19]. На эластичных 2D-субстратах и в мягких 3D-гелях у клеток обычно формируются ФК меньших размеров [20, 21]. В некоторых исследованиях описана корреляция между размером ФК и подвижностью клеток разных типов, например, одиночных фибробластов или миобластов [22, 23]. Тем не менее остаётся неизученным вопрос о том, как изменение параметров ФК, происходящее в ответ на сигналы от ВКМ или изменение экспрессии белков ФК, влияет на миграцию клеток в составе монослоя. В своей работе мы использовали цейтраферную микроскопию для описания функциональной взаимосвязи между параметрами ФК и параметрами миграции клеток при изменении экспрессии белков ФК или эластичности субстрата в иммортализованных эпителиальных кератиноцитах человека (HaCaT) и клетках аденокарциномы лёгкого (A549). В нашей работе впервые показано, что подавление экспрессии FAK-киназы в нормальных и опухолевых эпителиальных клетках, мигрирующих в составе монослоя, приводит к статистически значимому уменьшению времени жизни ФК и замедляет направленное движение нормальных и опухолевых клеток в модели экспериментальной раны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточных линий. Клетки линий A549 (клетки аденокарциномы базального эпителия лёгких), HaCaT (спонтанно иммортализованные кератиноциты человека) и HEK293T (эпителий из эмбриональной почки человека) были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC, США) и культивировались в смеси сред DMEM и F12 («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 1 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко») и гентамицина (0,8 мг/мл) при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂.

Подготовка поверхности культивирования и миграции клеток. Лунки планшета покрывались фибронектином, витронектином или поли-D-лизинном из расчёта концентрации 5 мкг/см² («Sigma-Aldrich», США), лунки покрывали 150 мкл раствора и оставляли на час при 37 °C, после этого планшет оставляли на воздухе до полного высыхания в стерильных условиях.

Модель экспериментальной раны. Клетки сажали на 6-луночные планшеты и культивировали до полной конfluence. Клеточный слой процарапывали концом носика стерильной пипетки на 10 мкл (ширина ≈350 мкм). Клеточный дебрис удаляли путём двукратного промывания средой DMEM без сыворотки. Клетки, мигрирующие в рану, снимали в режиме цейтраферной съёмки в течение 600 мин с интервалом в 10 мин между кадрами. Прижизненную съёмку проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Zeiss AxioObserver под управлением программного обеспечения Zen 3.1 Blue Edition, с объективом ×20/1,6 (фазовый контраст) при 36,5–37 °C в CO₂-независимой среде («Gibco», США) с использованием камеры Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V2 («Hamamatsu Photonics», Япония). В каждой лунке было по 6 процарапанных ран, эксперимент повторили трижды. Каждое измерение проводилось в соответствии с методом, описанным Kauanova et al. [24].

РНК-Интерференция. Клетки карциномы лёгкого A549 трансфицировали миРНК к FAK и винкулину, а также контрольной миРНК (к GFP) с использованием трансфицирующего агента TurboFect («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с инструкциями производителя. Коротко, в 35-мм чашках Петри клетки культивировали до 65% конfluence монослоя, после чего добавляли 100 пмоль миРНК на лунку (объёмное соотношение трансфицирующего агента к миРНК составляло 3 : 1), через 12 ч инкубации среду с трансфекционными комплексами заменяли на свежую. Все миРНК были написаны с помощью программного обеспечения BLOCK-IT (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress>) и син-

тезированы в компании «ДНК-Синтез» (Россия). Последовательности миРНК приведены в табл. S1 Приложения.

Выделение РНК и обратная транскрипция.

Для выделения тотальной РНК использовали коммерческий набор RNeasy Mini Kit («Qiagen», США), следуя рекомендациям производителя. Определенные концентрации выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoPhotometer («Implen», Германия). Чистоту выделенной РНК контролировали по A260/A230 и A260/A280-показателям спектров поглощения. кДНК получали с помощью набора iScript Advanced cDNA synthesis kit («Bio-Rad Laboratories», США) в соответствии с протоколом производителя, используя по 500 нг тотальной РНК на реакцию.

ПЦР в реальном времени. ПЦР-Анализ в реальном времени проводили на приборе CFX96 («Bio-Rad Laboratories») с использованием смеси iTaq Universal SYBR Green Supermix («Bio-Rad Laboratories») согласно инструкциям производителя. Протокол реакции включал денатурацию (95 °C, 10 мин), за которой следовали 39 циклов амплификации (95 °C, 15 с; X °C (точная температура отжига для каждой пары праймеров приведена в табл. S2 Приложения), 30 с; и 72 °C, 60 с). Все образцы были поставлены в трипликате. Один из образцов кДНК вводился в каждый цикл количественной ПЦР (кПЦР) для калибровки и возможности дальнейшего объединения данных в один эксперимент. Последовательности праймеров приведены в табл. S2 Приложения. Праймеры были синтезированы в компании «ДНК-Синтез». Специфичность праймеров была подтверждена анализом кривых плавления. Значения *St* были определены для кривых кПЦР в реальном времени путём установки порогового значения на уровне 5 SD (стандартных отклонений) для каждого эксперимента. Данные кПЦР были нормализованы в соответствии с методикой, предложенной Vandesompele et al. [25], с использованием генов *UBC* и *HPRT1* в качестве референтных.

Характеристика стабильных линий HaCaT и A549. Для получения клеточных линий HaCaT и A549 со стабильной экспрессией винкулина, меченного RFP, мы клонировали кДНК винкулина в лентивирусный вектор pSLIK, содержащий RFP в качестве репортера и пурамицин в качестве маркера селекции (ООО «Евроген», Россия). Лентивирусный вектор был котрансфицирован во вспомогательные клетки HEK293 (ATCC #CRL-11268) при помощи трансфицирующего агента X-TremeGENE HP DNA («Sigma-Aldrich») в соответствии с протоколом производителя. Выделенные в среду вирусные частицы собирали через 24 и 48 ч после трансфекции, а затем использовали для трансдукции клеток A549 и HaCaT. Титр вирусов определяли в

экспериментах по серийному разведению вирусных частиц, добавленных к 6×10^5 клеток HEK293T, посаженных на 12-луночный планшет за 24 ч до трансдукции. Полибрен («Sigma-Aldrich») добавляли в среду в конечной концентрации 8 мкг/мл. Клетки анализировали методом проточной цитометрии через 48 ч после трансдукции, и процент клеток, экспрессирующих RFP, использовали для расчёта количества трансдуцирующих единиц (TU) на мл. Для заражения клеток A549 и HaCaT к 5×10^6 клеток в 2 мл культуральной среды добавляли по 1 мл вирусных частиц с концентрацией не менее 10^7 TU/мл, через сутки среду заменяли на свежую. Инфицированные клетки культивировали в среде с 0,1% пурамицина («Gibco») по объёму и через 5 дней сортировали по интенсивности флуоресценции в канале RFP (возбуждение 561 нм, излучение 585/15 нм BP) с помощью клеточного сортера FACS Aria SORP («BD Biosciences», США) с установленной 85-мкм форсункой и соответствующими параметрами давления. После получения клеточных линий со стабильной экспрессией винкулина-RFP мы отсортировали клетки HaCaT-RFP или A549-RFP со средним уровнем флуоресценции в канале RFP-PE (27% событий со средней интенсивностью флуоресценции MFI = 1,68), исключив клетки с высокой флуоресценцией RFP (15,5% событий с MFI = 18,77). Мы также сравнили уровень экспрессии мРНК винкулина в клетках со стабильной экспрессией винкулина-RFP и нетрансфицированных клетках и не обнаружили статистически значимых различий, что подтверждает физиологическую экспрессию винкулина в стабильных линиях (рис. S1 Приложения).

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки со стабильной экспрессией винкулина A549-vin-RFP или HaCaT-vin-RFP фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (ПФА) в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и пермеабелизовали раствором 0,01%-ного Triton-X100 («Amresco», США) и 0,01%-ного Tween-20 («Amresco») в ФСБ («ПанЭко») в течение часа при комнатной температуре. После этого блокировали неспецифическое связывание антител с помощью инкубации клеток в течение 1 ч в 5%-ном БСА («Sigma-Aldrich»), далее их инкубировали с первичными кроличьими антителами к паксиллину (клон Y113, «Abcam», Великобритания) в конечном разведении 1 : 200 при 37 °C в течение 60 мин и вторичными антителами против кролика, конъюгированными с Alexa-633 («Abcam»), в конечном разведении 1 : 200, а также DAPI («Sigma-Aldrich») для визуализации ядер. Изображения были получены с помощью микроскопа Zeiss AxioObserver со светодиодным источником света Colibry 7 и объективом PlanApochromat 63×1,46 Oil.

Использовался следующий куб светофильтров: GFP (фильтр возбуждения 450–490 нм, светоделитель 495 нм, излучение 500–550 нм) и mKate (фильтр возбуждения 540–580 нм, светоделитель 585 нм, излучение 593–668 нм). Данные были получены с помощью программного обеспечения Zeiss Zen Blue 3.1.

Ингибиторный анализ. Для подавления активности FAK клетки линий A549-vin-RFP или HaCaT-vin-RFP инкубировали в среде с селективным ингибитором FAK PF-573228 («Selleck», США) в концентрации 1 мкМ на протяжении 2 ч до начала анализа, клетки не отмывали от ингибитора перед началом съёмки.

Анализ и обработка изображений. Данные микроскопии анализировали с помощью программы ImageJ [26]. Площадь, соотношение осей и время жизни ФК были измерены, как описано в работе Gladkikh et al. [27], от 200 до 500 ФК были посчитаны для каждой экспериментальной точки. Параметр средней интенсивности флуоресценции (СИФ) использовали как непрямой показатель количества целевого белка в ФК. Флуоресцентные изображения были обработаны с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop («Adobe Systems», США).

Статистический анализ данных. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 («GraphPad Software», США). Для сравнения различий между двумя независимыми группами использовался критерий Манна–Уитни, статистически значимым было принято $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы с разбросом для параметров ФК или в виде среднего \pm SD при оценке экспрессии мРНК и анализе застания экспериментальной раны.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Размер ФК зависит от типа субстрата и коррелирует со скоростью застания раны. В контрольных клетках HaCaT и A549, высаженных на химически чистое стекло и находящихся на краю монослоя, ФК были локализованы преимущественно на краю клеток для обеих модельных линий (рис. 1, а). ФК в клетках линии A549 имеют медианное значение площади 1,17 мкм² (разброс 0,11–5,33, $n = 500$) и обычно умеренно вытянуты (среднее соотношение длин осей составляет 1,73, разброс 1,0–5,54). ФК в клетках HaCaT имеют сопоставимую площадь 0,98 мкм² (разброс 0,12–8,36, $n = 500$), но значительно более вытянуты (среднее соотношение длин осей составляет 2,46, разброс 1,02–7,09, $n = 500$).

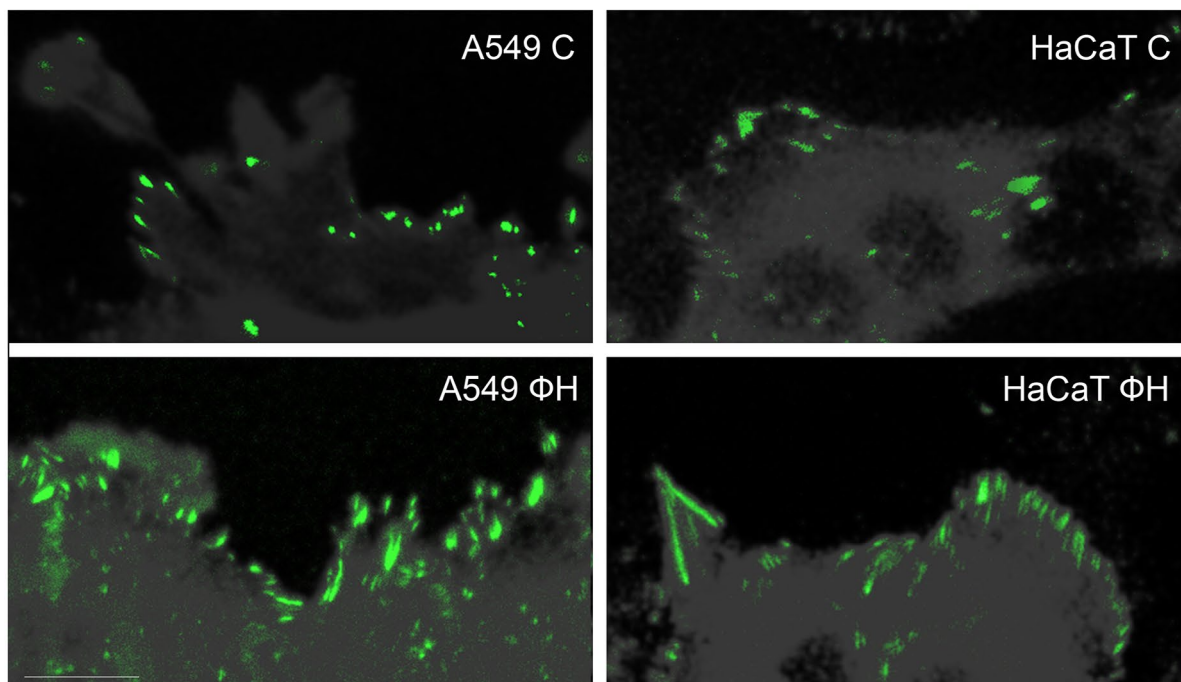
Чтобы оценить взаимосвязь между параметрами ФК и подвижностью клеток, мы использо-

вали модель застания экспериментальной раны как золотой стандарт для анализа миграции эпителиальных клеток. Для получения ФК разного размера мы использовали субстраты различной эластичности (чистое стекло, стекло, покрытое поли-D-лизинном, витронектином или фибронектином). В обеих клеточных линиях на фибронектине ФК достигали наибольшей по медиане площади: 2,44 мкм² для A549 (разброс 0,29–6,05) и 1,32 мкм² для HaCaT (разброс 0,11–7,37) (рис. 1, б, рис. S2 Приложения). Наименьшая медианная площадь ФК была у клеток, выращенных на чистом стекле: медианная площадь 1,22 мкм² для A549, 0,99 мкм² для HaCaT ($p < 0,0001$ для A549, $p = 0,0002$ для HaCaT, непараметрический критерий Манна–Уитни).

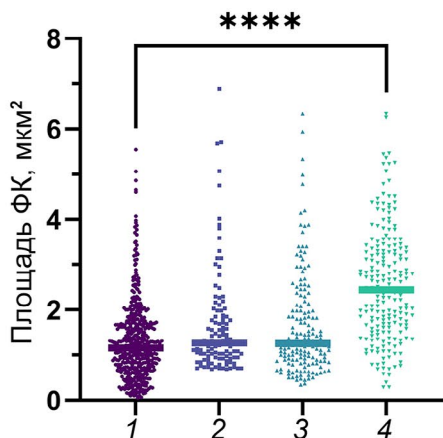
Скорость застания экспериментальной раны также зависела от типа субстрата. Для обеих клеточных линий самая высокая скорость миграции наблюдалась для фибронектина, где ФК имели наибольший размер. Мы получили 100 \pm 11,75% закрытия раны в течение 600 мин для клеток A549 и 61,74 \pm 16,88% для клеток HaCaT на фибронектине. Клетки на стекле имели самую низкую скорость миграции (81,70 \pm 15,54% закрытия раны для клеток A549 и 43,95 \pm 13,31% для клеток HaCaT), клетки на витронектине и поли-D-лизине имели промежуточные скорости миграции (рис. 1, в, рис. S3 Приложения).

Далее мы оценили, за счёт каких компонентов ФК происходит их увеличение при смене субстрата. Для этого мы измерили общую экспрессию мРНК винкулина (как структурного белка) и FAK (как регуляторного белка) в клетках на разных субстратах и обнаружили тенденцию к повышению количества мРНК для обоих маркеров в клетках, посаженных на фибронектин, по сравнению с клетками, посаженными на стекло. Спустя 72 ч с момента посадки относительное количество мРНК винкулина для клеток A549 составило 1,14 \pm 0,19 на фибронектине по сравнению с 0,60 \pm 0,10 на стекле, для клеток HaCaT оно составило 0,83 \pm 0,01 на фибронектине против 0,62 \pm 0,01 на стекле (рис. 2, а, в). Экспрессия мРНК FAK также повышалась в клетках, высаженных на фибронектин (относительное среднее количество мРНК 1,18 \pm 0,03 против 0,77 \pm 0,05 для клеток A549 и 1,23 \pm 0,21 против 0,95 \pm 0,15 для клеток HaCaT), по сравнению с клетками, посаженными на стекло (рис. 2, б, г) (различия были статистически значимыми только для клеток A549, $p = 0,03$, непараметрический критерий Манна–Уитни). Поскольку повышенная экспрессия этих белков на фибронектине коррелирует с повышенной подвижностью клеток, мы задали вопрос: может ли направленное изменение экспрессии этих белков повлиять на параметры подвижности клеток?

а



б



в

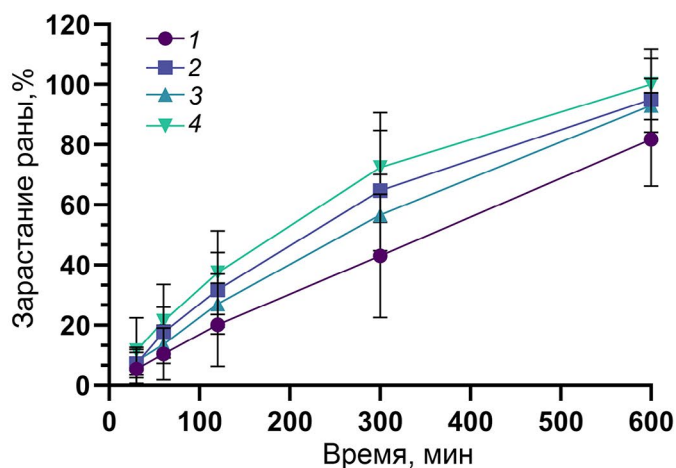


Рис. 1. Морфология ФК коррелирует со скоростью зарастания раны на субстратах различной жёсткости. *а* – Морфология ФК в клетках A549 и HaCaT со стабильной экспрессией винкулина-RFP, размерный отрезок 10 мкм, С – стекло, ФН – фибронектин, приведены фотографии краевых клеток в составе монослоя. *б* – Медианная площадь ФК в клетках A549 на субстратах различной жёсткости, центральная горизонтальная линия – медиана. **** Достоверное отличие от контроля, $p < 0,001$. *в* – Степень зарастания экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток A549 на стекле (1), поли-D-лизине (2), витронектине (3) и фибронектине (4)

Подавление экспрессии винкулина приводит к уменьшению размера ФК, но не влияет на параметры миграции клеток. Чтобы изучить влияние уровня экспрессии винкулина на миграцию клеток, мы подавляли экспрессию мРНК винкулина методом миРНК-интерференции. При этом в клетках линии A549 уровень экспрессии винкулина снижался в 4–10 раз, в клетках линии HaCaT экспрессия мРНК винкулина снижалась в 10–60 раз (рис. 2, *а, в*). Тем не менее уровень экс-

прессии винкулина после его подавления в клетках оставался в пределах физиологического диапазона: клетки сохраняли способность мигрировать по субстрату и преодолевать значимые расстояния (более 10 диаметров ядра), сохраняя при этом нормальную морфологию (рис. 3, *а*; рис. 4, *а*).

Подавление экспрессии винкулина в клетках A549, посаженных на стекло, привело к уменьшению площади ФК в 2,6 раза (медиана площади ФК – 0,45 мкм² по сравнению с 1,17 мкм² в контроле),

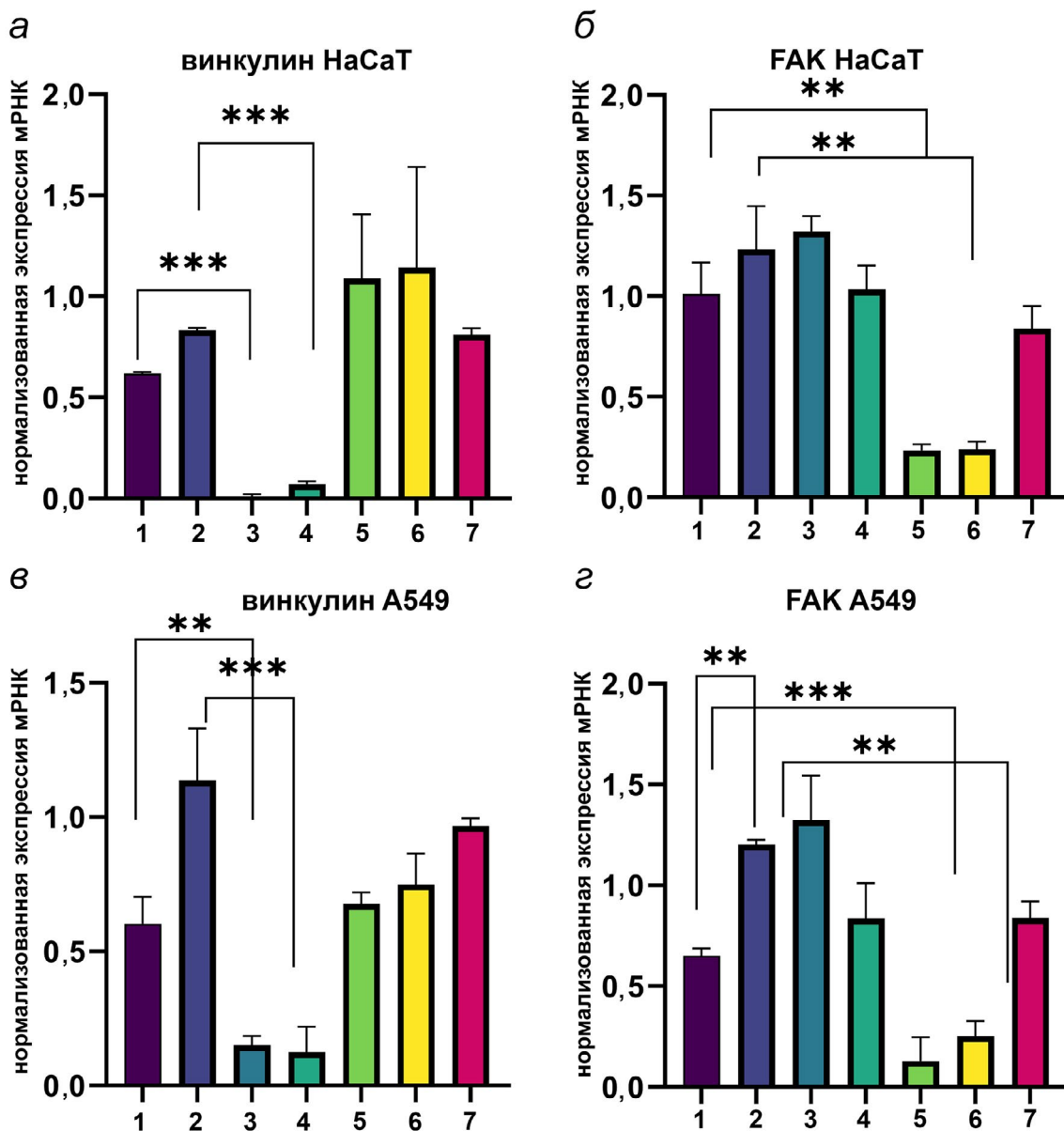


Рис. 2. Нормализованная экспрессия мРНК винкулина (а, в) и FAK (б, д) в клетках A549 и HaCaT в контроле и после подавления в клетках экспрессии мРНК винкулина или FAK. Все измерения проводили в трипликате, данные нормализовали по генам *UBC* и *HPRT1*. Обозначения: (1) контрольные клетки на стекле, (2) контрольные клетки на фибронектине, (3) клетки с миРНК к винкулину на стекле, (4) клетки с миРНК к винкулину на фибронектине, (5) клетки с миРНК к FAK на стекле, (6) клетки с миРНК к FAK на фибронектине, (7) клетки с миРНК к GFP. ** Достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$; *** достоверное отличие от контроля, $p < 0,001$

а также к снижению средней интенсивности флуоресценции белка в составе ФК в 4,8 раза (с 417 у.е. в контроле до 87 у.е. в клетках после подавления винкулина), форма ФК при этом не изменялась (медиана соотношения длин осей составила 1,79 по сравнению с 1,73 в контроле). Уменьшение площади ФК после подавления винкулина было статистически значимым как для клеток A549, так и для клеток HaCaT ($p < 0,0001$, непараметрический критерий Манна–Уитни, рис. S4 Приложения). Подавление активности винкулина в клетках HaCaT, посаженных на стекло, также при-

вело к двукратному уменьшению площади ФК (медиана площади ФК уменьшилась с 0,98 $\mu\text{м}^2$ до 0,55 $\mu\text{м}^2$), медиана интенсивности флуоресценции также снизилась с 372 у.е. в контроле до 205 у.е. в клетках после подавления винкулина. Чтобы подтвердить достоверность уменьшения площади ФК, мы окрасили клетки с миРНК к винкулину антителами к паксиллину в качестве альтернативного белка-репортера ФК (рис. 3, б; рис. 4, б). При подавлении экспрессии мРНК винкулина время жизни ФК не изменилось (рис. 3, в; рис. 4, в).

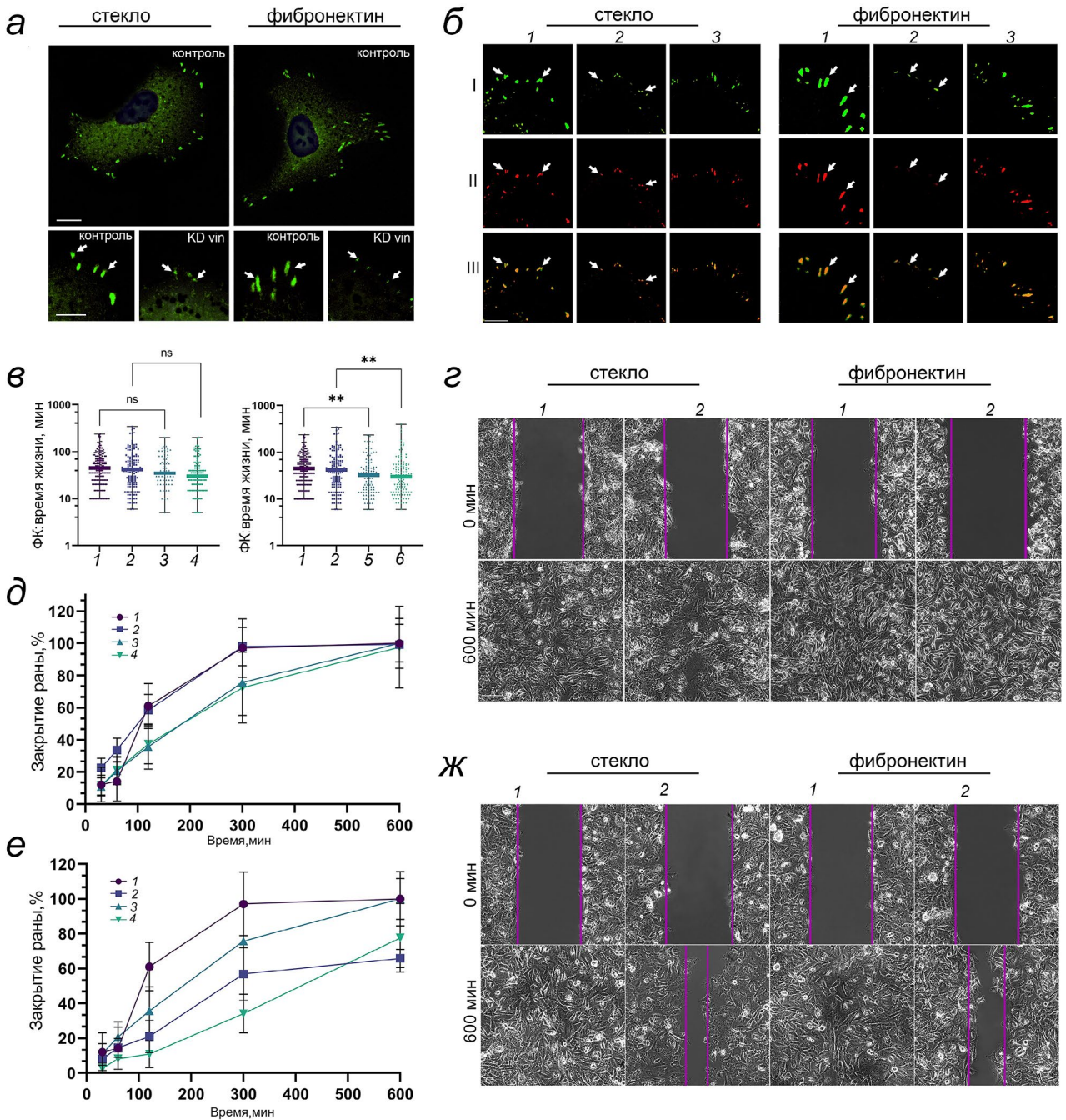


Рис. 3. Параметры ФК и скорость заращения раны клетками линии A549 после подавления экспрессии мРНК FAK или винкулина. *а* – Морфология ФК на стекле и фибронектине в контроле и после нокдауна винкулина (KD vin), размерный отрезок 10 мкм. *б* – Окрашивание фиксированных клеток A549 со стабильной экспрессией винкулина-RFP антителами к паксиллину. Обозначения: 1 – контроль, 2 – клетки с миРНК к винкулину, 3 – клетки с миРНК к FAK, I – окраска антителами к паксиллину, II – окраска антителами к винкулину, III – наложение. *в* – Время жизни ФК в клетках A549, жирные горизонтальные линии представляют собой медианы. Обозначения: 1 – контрольные клетки на фибронектине, 2 – контрольные клетки на стекле, 3 – клетки с миРНК к винкулину на фибронектине, 4 – клетки с миРНК к винкулину на стекле, 5 – клетки с миРНК к FAK на фибронектине, 6 – клетки с миРНК к FAK на стекле. ** Достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$. *г* – Морфология заращения экспериментальной раны клетками A549 на фибронектине и на стекле в контроле (1) и после нокдауна винкулина (2). *д* – Степень заращения экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток A549 на фибронектине в контроле (1), на фибронектине в клетках с миРНК к винкулину (2), на стекле в контроле (3) и на стекле в клетках с миРНК к винкулину (4). *е* – Степень заращения экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток A549 на фибронектине в контроле (1), на фибронектине в клетках с миРНК к FAK(2), на стекле в контроле (3) и на стекле в клетках с миРНК к FAK (4). *ж* – Морфология заращения экспериментальной раны клетками A549 на фибронектине и на стекле в контроле (1) и после нокдауна FAK (2). Количество экспериментов для каждого анализа заращения раны приведено в табл. S3 Приложения

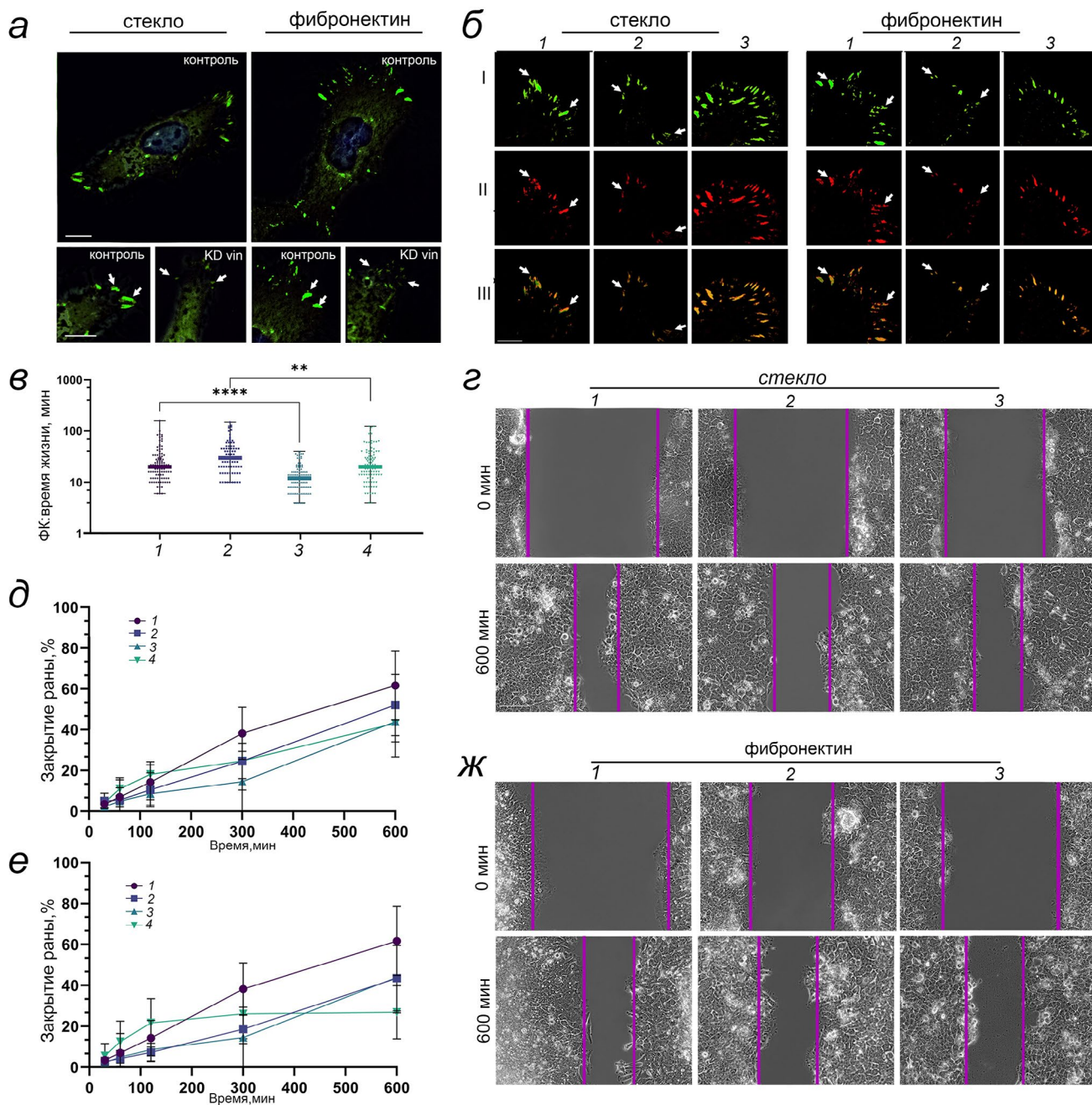


Рис. 4. Параметры ФК и скорость заращения раны клетками линии NaCaT после подавления экспрессии мРНК ФАК или винкулина. *а* – Морфология ФК на стекле и фибронектине в контроле и после нокдауна винкулина (KD vin), размерный отрезок 10 мкм. *б* – Окрашивание фиксированных клеток NaCaT со стабильной экспрессией винкулина RFP антителами к паксиллину, 1 – контроль, 2 – клетки с миРНК к винкулину, 3 – клетки с миРНК к ФАК, I – окраска антителами к винкулину, II – окраска антителами к паксиллину, III – наложение. *в* – Время жизни ФК в клетках NaCaT, жирные горизонтальные линии представляют собой медианы. Обозначения: (1) контрольные клетки на фибронектине, (2) контрольные клетки на стекле, (3) клетки с миРНК к ФАК на фибронектине, (4) клетки с миРНК к ФАК на стекле. ** Достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$; **** достоверное отличие от контроля, $p < 0,0001$. *з* – Морфология заращения экспериментальной раны клетками NaCaT на стекле в контроле (1), после нокдауна винкулина (2) и после нокдауна ФАК (3). *д* – Степень заращения экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток A549 на фибронектине в контроле (1), на фибронектине в клетках с миРНК к винкулину (2), на стекле в контроле (3) и на стекле в клетках с миРНК к винкулину (4). *е* – Степень заращения экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток A549 на фибронектине в контроле (1), на фибронектине в клетках с миРНК к ФАК (2), на стекле в контроле (3) и на стекле в клетках с миРНК к ФАК (4). *ж* – Морфология заращения экспериментальной раны клетками A549 на фибронектине и на стекле в контроле (1), после нокдауна винкулина (2) и после нокдауна ФАК (3). Количество экспериментов для каждого анализа заращения раны приведено в табл. S3 Приложения

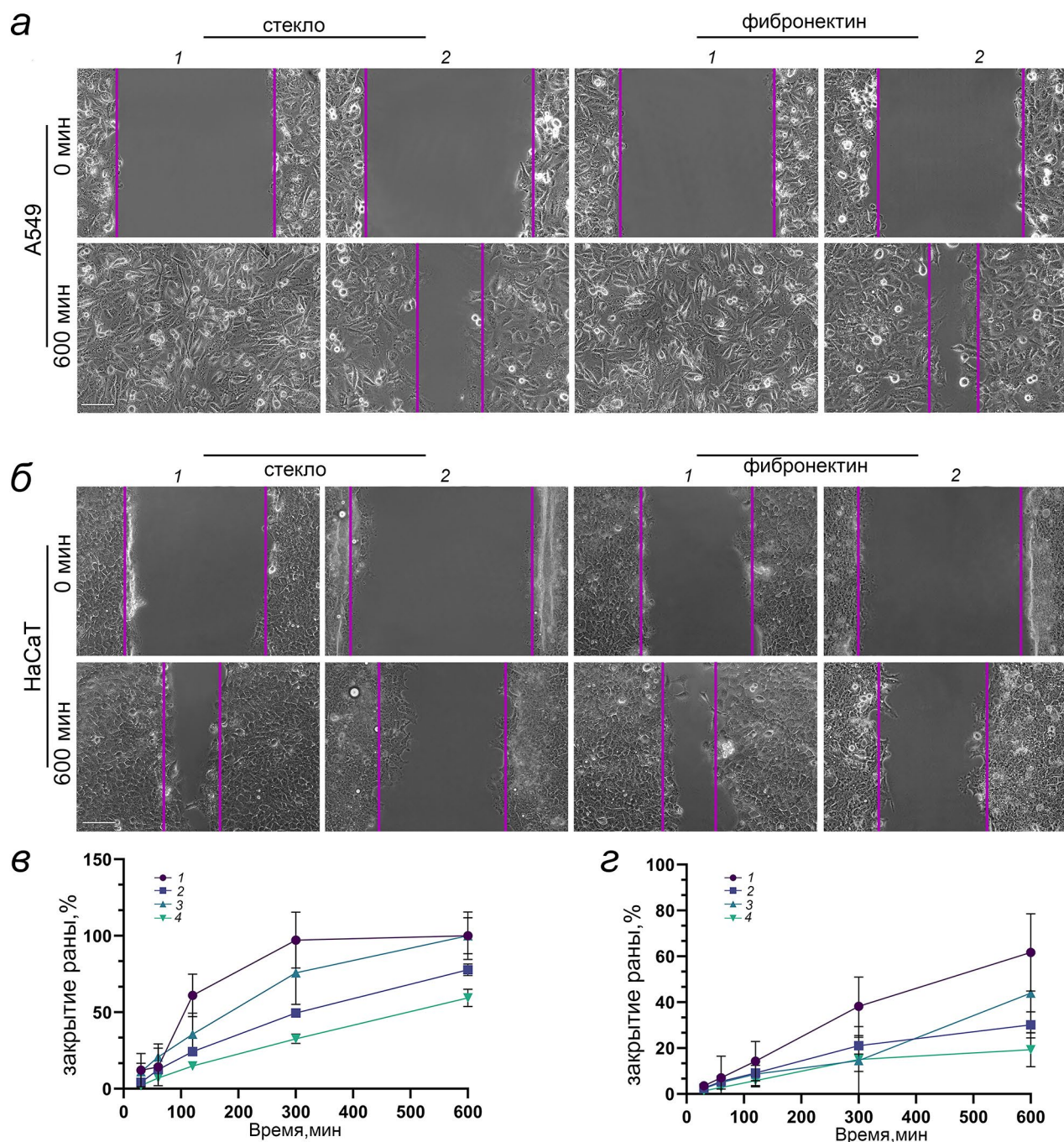


Рис. 5. Заращение экспериментальной раны на фибронектине и стекле. *а* – Заращение экспериментальной раны клетками A549 на фибронектине и на стекле в контроле (1) и после инкубации с 1 мкМ PF-573228 (2). *б* – Заращение модельной раны клетками HaCaT на фибронектине и на стекле в контроле (1) и после инкубации с 1 мкМ PF-573228 (2). *в* – Степень заращения экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток A549 на фибронектине в контроле (1), на фибронектине в клетках после инкубации с 1 мкМ PF-573228 (2), на стекле в контроле (3) и на стекле в клетках после инкубации с 1 мкМ PF-573228 (4). *з* – Степень заращения экспериментальной раны в % от площади на первом кадре съёмки для клеток HaCaT на фибронектине в контроле (1), на фибронектине в клетках после инкубации с 1 мкМ PF-573228 (2), на стекле в контроле (3) и на стекле в клетках после инкубации с 1 мкМ PF-573228 (4)

Для оценки влияния экспрессии винкулина на миграцию клеток мы использовали модель заращения экспериментальной раны. Снижение уровня экспрессии винкулина в клетках HaCaT и A549 существенно не влияло на скорость зара-

щения ран ни на стекле, ни на фибронектине (рис. 3, з; рис. 4, з). Для клеток A549 после подавления экспрессии мРНК винкулина степень заращения раны через 600 мин составила $99,29 \pm 2,45\%$ на фибронектине и $97,70 \pm 25,34\%$ на стекле, что сопо-

ставимо с контрольными значениями (рис. 3, д). Для клеток HaCaT степень застания раны через 600 мин составила $52,16 \pm 15,0\%$ на фибронектине и $43,19 \pm 9,18\%$ на стекле, что также сопоставимо с контролем (рис. 4, д). В контроле как на стекле, так и на фибронектине фронт (передний край) клеток был прямым. Через 3 ч некоторые клетки отделились от монослоя и начали мигрировать в рану. Направление миграции отдельных клеток соответствовало направлению миграции фронта клеток. После подавления экспрессии винкулина уже на ранних этапах застания раны (в течение первых 3 ч) передняя часть края раны становилась неровной, клетки внутри фронта располагались разреженно. Движение клеток в слое становилось нескоординированным. Через 3 ч клетки утрачивали связь друг с другом и покидали монослой, продолжая хаотично перемещаться вдоль края раны (латеральная миграция) (рис. S5 Приложения).

Подавление экспрессии или ингибирование FAK подавляет миграцию нормальных и опухолевых эпителиальных клеток в модели экспериментальной раны. Чтобы оценить влияние экспрессии FAK в клетках на параметры ФК и на подвижность клеток, мы также использовали метод мРНК-интерференции. При подавлении экспрессии FAK происходило 4–6-кратное снижение уровня мРНК FAK в клетках A549 и 3–4-кратное – в HaCaT (рис. 2, б, г). Подавление экспрессии мРНК FAK в клетках A549 не влияло ни на площадь, ни на форму ФК (медиана площади ФК составляла $1,11 \text{ мкм}^2$, медиана соотношения осей – 1,84) (рис. S4 Приложения), подавление FAK в клетках HaCaT также не повлияло на морфологию ФК (медиана площади ФК – 0,98, медиана соотношения осей – 1,84) (рис. 4, а). Чтобы подтвердить отсутствие изменений в морфологии ФК в ответ на снижение уровня FAK, мы окрасили ФК антителами к паксиллину, используя его в качестве альтернативного репортерного белка (рис. 3, б; рис. 4, б). Скорость застания раны при подавлении экспрессии FAK резко снизилась. На фибронектине клетки A549 после подавления FAK закрывали $65,84 \pm 5,25\%$ раны за 600 мин (по сравнению со $100 \pm 11,75\%$ в контроле) (рис. 3, е). Такой же эффект наблюдался для клеток HaCaT на фибронектине: закрытие раны составило всего $43,52 \pm 16,06\%$ по сравнению с $61,74 \pm 16,88\%$ в контроле (рис. 4, е). Когда клетки после подавления FAK высаживали на стекло, закрытие раны составляло $77,65 \pm 19,68\%$ за 600 мин для A549 и $26,88 \pm 13,04\%$ для HaCaT. Существенные различия в морфологии клеток в контроле и при подавлении FAK отсутствовали, общий фронт раны оставался ровным в течение всей съёмки (рис. 3, ж; рис. 4, ж). Примечательно, что мы обнаружили

статистически значимое уменьшение продолжительности времени жизни ФК для клеток с пониженным уровнем FAK для обеих клеточных линий. Для клеток A549 медианное время жизни ФК уменьшилось с 45 до 32 мин на фибронектине и с 42 до 30 мин на стекле (рис. 3, в). Для клеток HaCaT медианное время жизни ФК уменьшилось с 20 до 12 мин на фибронектине и с 30 до 20 мин на стекле (рис. 4, в).

Чтобы подтвердить эти наблюдения, мы использовали селективный ингибитор FAK-киназы PF-573228 и оценили влияние ингибирования FAK на параметры ФК и скорость застания экспериментальной раны. Инкубация с 1 мкМ PF-573228 не влияла на среднюю площадь ФК в клетках HaCaT и A549, а также на соотношение сторон и интенсивность флуоресценции ФК (данные не показаны), но значительно снижала скорость закрытия раны. Закрытие раны на стекле для клеток A549 при ингибировании FAK составило всего $59,42 \pm 5,69\%$ и только $19,26 \pm 7,48\%$ для клеток HaCaT. Закрытие раны на фибронектине при ингибировании FAK составило всего $77,87 \pm 3,77\%$ для клеток A549 и $30,15 \pm 5,86\%$ для клеток HaCaT (рис. 5, а–г).

Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение экспрессии или активности регуляторной киназы FAK замедляет скорость миграции монослоя как нормальных, так и опухолевых эпителиоцитов, что делает FAK многообещающей мишенью для замедления миграции клеток карциномы лёгких.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Киназа FAK, исходно относившаяся к ряду ключевых регуляторных молекул сигнального пути от интегринов, играет важную роль в миграции и инвазии клеток [28, 29]; на сегодняшний день показано её участие в стимуляции выживаемости клеток, ангиогенезе и тонкой регуляции микроокружения опухолей [30–32]. Ввиду важности сигнальных каскадов с участием FAK в опухолевой трансформации эта молекула является одной из наиболее многообещающих мишеней для противоопухолевой терапии.

Большинство ингибиторов FAK являются конкурентными или аллостерическими молекулами, которые блокируют киназную каталитическую активность FAK [33–35]. Ингибирование сигнального пути FAK снижало как объём первичной опухоли, так и количество метастазов на мышинных моделях рака молочной железы [36], снижало подвижность клеток аденокарциномы поджелудочной железы [37], а также подавляло пролиферацию или индуцировало старение в клеточных линиях рака лёгких [37].

Основные механизмы, посредством которых FAK регулирует подвижность опухолевых клеток и их способность к формированию метастазов, связаны с формированием динамичных ФК и ремоделированием актинового цитоскелета [38, 39]. Ключевые этапы ремоделирования цитоскелета посредством передачи сигналов от FAK-киназы включают перекрестную активацию киназ Src [40], привлечение талина и паксиллина к сайтам ФК [7, 41] и активацию сигнального пути малых GTPаз, что в конечном итоге приводит к реорганизации актинового цитоскелета и изменению типа миграции клеток [42, 43]. FAK также выступает в качестве важного участника сигнального каскада механотрансдукции, активируя процесс реагирования клетки на изменение жёсткости ВКМ [44, 45]. Как повышенная жёсткость ВКМ, так и высокая концентрация лигандов интегринов способствуют передаче сигнала от $\beta 1$ -интегрина к FAK, что, в свою очередь, активирует сигнальный путь RhoA и перестройку актинового цитоскелета, способствуя миграции клеток. Таким образом, состав ВКМ следует рассматривать как дополнительный фактор риска FAK-зависимой прогрессии опухоли [46, 47]. Взаимосвязь состава ВКМ, активации FAK и изменений миграционного потенциала опухолевых клеток стала предметом активных исследований в течение последних десяти лет [48, 49]. Долгое время размер ФК считался ключевым показателем реакции на любой внеклеточный или внутриклеточный стимул (например, на эластичность субстрата или перестройки цитоскелета), который способен регулировать скорость движения клеток. В нескольких исследованиях была описана корреляция между размером ФК и параметрами миграции одиночных клеток [22, 23, 50], однако вопрос о динамике ФК клеток, движущихся направленно в составе монослоя, до сих пор остаётся малоизученным.

Полученные нами результаты показывают, что подавление экспрессии винкулина приводит к уменьшению размера ФК и при этом существенно не влияет на скорость миграции эпителиальных клеток в составе монослоя, хотя в ране появляется множество хаотично мигрирующих неполяризованных клеток (рис. S5 Приложения). Это согласуется с предыдущими наблюдениями о том, что винкулин играет важную роль в поляризации и направленном движении клеток, а его подавление приводит к частой перемене направления миграции [51]. На модели субконфлюэнтного монослоя клеток MDCK было показано, что транслокация винкулина между межклеточными и фокальными контактами служит регулятором для переключения между коллективной и одиночной миграцией [52], что согласуется с нашими данными о том, что подавление экспрессии винкулина приводит

к его исчезновению прежде всего из межклеточных контактов, в результате чего нарушается механизм коллективной миграции и появляются отдельные мигрирующие клетки.

В отличие от винкулина, подавление экспрессии FAK не влияет на размер ФК, однако значительно замедляет миграцию слоя как нормальных, так и опухолевых клеток эпителиального происхождения, что согласуется с другими исследованиями, показывающими, что инактивация FAK значительно снижает скорость движения клеток [8, 53]. Интересно, что влияние нокдауна FAK на скорость миграции гораздо менее выражено в модели случайного блуждания [54, 55], что может отражать существенное различие между направленной миграцией клеток в составе монослоя и случайной миграцией отдельных клеток.

Важно отметить, что в настоящей работе показано статистически значимое снижение продолжительности жизни ФК в клетках после подавления экспрессии FAK. Согласно литературе, FAK-киназа облегчает цикл обмена ФК [56, 57] за счёт тонкой регуляции динамики других регуляторных белков [40, 58]. Из литературы известно, что клетки с инактивированной или выключенной FAK имеют уменьшенное время разборки и значительно более продолжительное время жизни ФК [35, 50]. Также известно, что в клетках со сниженной экспрессией FAK-киназы снижается количество стресс-фибрилл, сеть актиновых филаментов становится более гомогенной, что приводит к замедлению процесса распластывания [59]. Однако большинство из описанных наблюдений было получено для модели случайного блуждания одиночных клеток в 2D или 3D, тогда как модель коллективной миграции не может быть упрощена до миграции группы изолированных клеток, направление и скорость перемещения которых случайно совпали [60]. Модель экспериментальной раны основана на скоординированном взаимодействии клеток внутри группы, так что скорость и направление движения каждой отдельной клетки напрямую зависят от движения её соседей [61]. Для клеточной линии нормальных кератиноцитов HaCaT и для опухолевых клеток аденокарциномы A549 мы показали, что нокдаун FAK в клетках в составе монослоя приводит к значительному снижению времени жизни ФК как для клеток, посаженных на стекло, так и для случая, в котором в качестве субстрата выступает фибронектин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные показывают, что для генерации максимальной скорости миграции клеток в составе монослоя ключевым параметром является

не площадь ФК, а время их жизни. По-видимому, короткоживущие ФК не успевают прочно закрепиться на субстрате и не создают достаточного натяжения внутри клетки, необходимого для продвижения всего слоя вперёд, однако этот вывод требует дополнительных экспериментов с прямым измерением тянущих усилий, развиваемых при коллективной миграции клеток монослойных адгезивных клеточных культур по специальным деформирующимся субстратам.

Вклад авторов. И.А. Воробьев, А.А. Саидова – концепция и руководство работой; Е.С. Соломатина, А.В. Ковалева, А.А. Саидова – проведение экспериментов; Е.С. Соломатина, А.В. Ковалева, А.В. Творогова – анализ данных и подготовка изображений; Е.С. Соломатина, А.А. Саидова – написание текста;

А.А. Саидова, И.А. Воробьев – редактирование текста статьи.

Благодарности. В работе использовали оборудование Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова (клеточный сортер FACSaria SORP).

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00714).

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. Winograd-Katz, S. E., Fässler, R., Geiger, B., and Legate, K. R. (2014) The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 273-288, <https://doi.org/10.1038/nrm3769>.
2. Chastney, M. R., Lawless, C., Humphries, J. D., Warwood, S., Jones, M. C., Knight, D., Jorgensen, C., and Humphries, M. J. (2020) Topological features of integrin adhesion complexes revealed by multiplexed proximity biotinylation, *J. Cell. Biol.*, **219**, e202003038, <https://doi.org/10.1083/jcb.202003038>.
3. Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rubashkin, M. G., Davidson, M. W., Thorn, K. S., Liphardt, J. T., and Weaver, V. M. (2012) Scanning angle interference microscopy reveals cell dynamics at the nanoscale, *Nat. Methods*, **9**, 825-827, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2077>.
4. Stubb, A., Guzmán, C., Närvä, E., Aaron, J., Chew, T.-L., Saari, M., Miihkinen, M., Jacquemet, G., and Ivaska, J. (2019) Superresolution architecture of cornerstone focal adhesions in human pluripotent stem cells, *Nat. Commun.*, **10**, 4756, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12611-w>.
5. Kleinschmidt, E. G., and Schlaepfer, D. D. (2017) Focal adhesion kinase signaling in unexpected places, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **45**, 24-30, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.003>.
6. Schaller, M. D., and Parsons, J. T. (1995) pp125^{FAK}-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2635-2645, <https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2635>.
7. López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., and López, E. (2017) Paxillin: a crossroad in pathological cell migration, *J. Hematol. Oncol.*, **10**, 50, <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0418-y>.
8. Richardson, A., Malik, R. K., Hildebrand, J. D., and Parsons, J. T. (1997) Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6906-6914, <https://doi.org/10.1128/MCB.17.12.6906>.
9. Fan, T., Chen, J., Zhang, L., Gao, P., Hui, Y., Xu, P., Zhang, X., and Liu, H. (2016) Bit1 knockdown contributes to growth suppression as well as the decreases of migration and invasion abilities in esophageal squamous cell carcinoma via suppressing FAK-paxillin pathway, *Mol. Cancer*, **15**, 23, <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0507-5>.
10. Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K., and Ilic, D. (2004) Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1692**, 77-102, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.008>.
11. Wang, S., Hwang, E. E., Guha, R., O'Neill, A. F., Melong, N., Veinotte, C. J., Conway Saur, A., Wuerthele, K., Shen, M., McKnight, C., Alexe, G., Lemieux, M. E., Wang, A., Hughes, E., Xu, X., Boxer, M. B., Hall, M. D., Kung, A., Berman, J. N., Davis, M. I., Stegmaier, K., and Crompton, B. D. (2019) High-throughput chemical screening identifies focal adhesion kinase and Aurora kinase B inhibition as a synergistic treatment combination in Ewing sarcoma, *Clin. Cancer Res.*, **25**, 4552-4566, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0375>.
12. Demircioglu, F., Wang, J., Candido, J., Costa, A. S. H., Casado, P., De Luxan Delgado, B., Reynolds, L. E., Gomez-Escudero, J., Newport, E., Rajeeve, V., Baker, A.-M., Roy-Luzarraga, M., Graham, T. A., Foster, J., Wang, Y., Campbell, J. J., Singh, R., Zhang, P., Schall, T. J., Balkwill, F. R., Sosabowski, J., Cutillas, P. R., Frezza, C., Sancho, P., and Hodivala-Dilke, K. (2020) Cancer associated fibroblast FAK regulates malignant cell metabolism, *Nat. Commun.*, **11**, 1290, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15104-3>.

13. Serrels, A., Lund, T., Serrels, B., Byron, A., McPherson, R. C., von Kriegsheim, A., Gómez-Cuadrado, L., Canel, M., Muir, M., Ring, J. E., Maniati, E., Sims, A. H., Pachter, J. A., Brunton, V. G., Gilbert, N., Anderton, S. M., Nibbs, R. J. B., and Frame, M. C. (2015) Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity, *Cell*, **163**, 160-173, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.001>.
14. Tavora, B., Reynolds, L. E., Batista, S., Demircioglu, F., Fernandez, I., Lechertier, T., Lees, D. M., Wong, P.-P., Alexopoulou, A., Elia, G., Clear, A., Ledoux, A., Hunter, J., Perkins, N., Gribben, J. G., and Hodivala-Dilke, K. M. (2014) Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy, *Nature*, **514**, 112-116, <https://doi.org/10.1038/nature13541>.
15. You, D., Xin, J., Volk, A., Wei, W., Schmidt, R., Scurti, G., Nand, S., Breuer, E.-K., Kuo, P. C., Breslin, P., Kini, A. R., Nishimura, M. I., Zeleznik-Le, N. J., and Zhang, J. (2015) FAK mediates a compensatory survival signal parallel to PI3K-AKT in PTEN-Null T-all cells, *Cell Rep.*, **10**, 2055-2068, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.056>.
16. Adutler-Lieber, S., Zaretsky, I., Platzman, I., Deeg, J., Friedman, N., Spatz, J. P., and Geiger, B. (2014) Engineering of synthetic cellular microenvironments: implications for immunity, *J. Autoimmun.*, **54**, 100-111, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.05.003>.
17. Cavalcanti-Adam, E. A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B., and Spatz, J. P. (2007) Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands, *Biophys. J.*, **92**, 2964-2974, <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.089730>.
18. Chiu, C.-L., Aguilar, J. S., Tsai, C. Y., Wu, G., Gratton, E., and Digman, M. A. (2014) Nanoimaging of focal adhesion dynamics in 3D, *PLoS One*, **9**, e99896, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099896>.
19. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell*, **126**, 677-689, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
20. Doyle, A. D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K., and Yamada, K. M. (2015) Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions, *Nat. Commun.*, **6**, 8720, <https://doi.org/10.1038/ncomms9720>.
21. Yue, J., Zhang, Y., Liang, W. G., Gou, X., Lee, P., Liu, H., Lyu, W., Tang, W.-J., Chen, S.-Y., Yang, F., Liang, H., and Wu, X. (2016) In vivo epidermal migration requires focal adhesion targeting of ACF7, *Nat. Commun.*, **7**, 11692, <https://doi.org/10.1038/ncomms11692>.
22. Kim, D., and Wirtz, D. (2013) Focal adhesion size uniquely predicts cell migration, *FASEB J.*, **27**, 1351-1361, <https://doi.org/10.1096/fj.12-220160>.
23. Thompson, O., Moore, C. J., Hussain, S.-A., Kleino, I., Peckham, M., Hohenester, E., Ayscough, K. R., Saksela, K., and Winder, S. J. (2010) Modulation of cell spreading and cell-substrate adhesion dynamics by dystroglycan, *J. Cell. Sci.*, **123**, 118-127, <https://doi.org/10.1242/jcs.047902>.
24. Kauanova, S., Urazbayev, A., and Vorobjev, I. (2021) The frequent sampling of Wound scratch assay reveals the “opportunity” window for quantitative evaluation of cell motility-impeding drugs, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 640972, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640972>.
25. Vandesompele, J., Preter, K. D., Roy, N. V., and Paeppe, A. D. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, research0034.1, <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
26. Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., and Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ, *Biophotonics Int.*, **11**, 36-42.
27. Gladkikh, A., Kovaleva, A., Tvorogova, A., and Vorobjev, I. A. (2018) Heterogeneity of focal adhesions and focal contacts in motile fibroblasts, *Methods Mol. Biol.*, **1745**, 205-218, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7680-5_12.
28. Guan, J. L., Trevithick, J. E., and Hynes, R. O. (1991) Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein, *Cell. Regul.*, **2**, 951-964, <https://doi.org/10.1091/mbc.2.11.951>.
29. Kornberg, L., Earp, H. S., Parsons, J. T., Schaller, M., and Juliano, R. L. (1992) Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 23439-23442, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35853-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35853-8).
30. Chuang, H.-H., Zhen, Y.-Y., Tsai, Y.-C., Chuang, C.-H., Hsiao, M., Huang, M.-S., and Yang, C.-J. (2022) FAK in cancer: from mechanisms to therapeutic strategies, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1726, <https://doi.org/10.3390/ijms23031726>.
31. Golubovskaya, V. (2014) Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials, *Front. Biosci.*, **19**, 687, <https://doi.org/10.2741/4236>.
32. Rigracciolo, D. C., Cirillo, F., Talia, M., Muglia, L., Gutkind, J. S., Maggolini, M., and Lappano, R. (2021) Focal adhesion kinase fine tunes multifaced signals toward breast cancer progression, *Cancers*, **13**, 645, <https://doi.org/10.3390/cancers13040645>.
33. Hirt, U. A., Waizenegger, I. C., Schweifer, N., Haslinger, C., Gerlach, D., Braunger, J., Weyer-Czernilofsky, U., Stadtmüller, H., Sapountzis, I., Bader, G., Zoepfel, A., Bister, B., Baum, A., Quant, J., et al. (2018) Efficacy of the highly selective focal adhesion kinase inhibitor BI 853520 in adenocarcinoma xenograft models is linked to a mesenchymal tumor phenotype, *Oncogenesis*, **7**, 21, <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0032-z>.

34. Kanteti, R., Mirzapioazova, T., Riehm, J. J., Dhanasingh, I., Mambetsariev, B., Wang, J., Kulkarni, P., Kaushik, G., Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M. P., Kindler, H. L., Nasser, M. W., Batra, S. K., and Salgia, R. (2018) Focal adhesion kinase a potential therapeutic target for pancreatic cancer and malignant pleural mesothelioma, *Cancer Biol. Ther.*, **19**, 316-327, <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1416937>.
35. Slack-Davis, J. K., Martin, K. H., Tilghman, R. W., Iwanicki, M., Ung, E. J., Autry, C., Luzzio, M. J., Cooper, B., Kath, J. C., Roberts, W. G., and Parsons, J. T. (2007) Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **282**, 14845-14852, <https://doi.org/10.1074/jbc.M606695200>.
36. Tiede, S., Meyer-Schaller, N., Kalathur, R. K. R., Ivanek, R., Fagiani, E., Schmassmann, P., Stillhard, P., Häfliger, S., Kraut, N., Schweifer, N., Waizenegger, I. C., Bill, R., and Christofori, G. (2018) The FAK inhibitor BI 853520 exerts anti-tumor effects in breast cancer, *Oncogenesis*, **7**, 73, <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0083-1>.
37. Zhang, J., He, D.-H., Zajac-Kaye, M., and Hochwald, S. N. (2014) A small molecule FAK kinase inhibitor, GSK2256098, inhibits growth and survival of pancreatic ductal adenocarcinoma cells, *Cell Cycle*, **13**, 3143-3149, <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949550>.
38. Katoh, K. (2020) FAK-dependent cell motility and cell elongation, *Cells*, **9**, 192, <https://doi.org/10.3390/cells9010192>.
39. Murphy, J. M., Rodriguez, Y. A. R., Jeong, K., Ahn, E.-Y. E., and Lim, S.-T. S. (2020) Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment, *Exp. Mol. Med.*, **52**, 877-886, <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0447-4>.
40. Horton, E. R., Humphries, J. D., Stutchbury, B., Jacquemet, G., Ballestrem, C., Barry, S. T., and Humphries, M. J. (2016) Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition, *J. Cell. Biol.*, **212**, 349-364, <https://doi.org/10.1083/jcb.201508080>.
41. Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X. L., Calderwood, D. A., and Schlaepfer, D. D. (2012) FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility, *J. Cell. Biol.*, **196**, 223-232, <https://doi.org/10.1083/jcb.201108078>.
42. Huvneers, S., and Danen, E. H. J. (2009) Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho, *J. Cell. Sci.*, **122**, 1059-1069, <https://doi.org/10.1242/jcs.039446>.
43. Kallergi, G., Agelaki, S., Markomanolaki, H., Georgoulas, V., and Stournaras, C. (2007) Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells, *Cell. Physiol. Biochem.*, **20**, 977-986, <https://doi.org/10.1159/000110458>.
44. Bell, S., and Terentjev, E. M. (2017) Focal adhesion kinase: the reversible molecular mechanosensor, *Biophys. J.*, **112**, 2439-2450, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.048>.
45. Zhou, D. W., Lee, T. T., Weng, S., Fu, J., and García, A. J. (2017) Effects of substrate stiffness and actomyosin contractility on coupling between force transmission and vinculin-paxillin recruitment at single focal adhesions, *Mol. Biol. Cell*, **28**, 1901-1911, <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-02-0116>.
46. Boyd, N. F., Li, Q., Melnichouk, O., Huszti, E., Martin, L. J., Gunasekara, A., Mawdsley, G., Yaffe, M. J., and Minkin, S. (2014) Evidence that breast tissue stiffness is associated with risk of breast cancer, *PLoS One*, **9**, e100937, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100937>.
47. Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F. T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L., and Weaver, V. M. (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling, *Cell*, **139**, 891-906, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.
48. Hamidi, H., and Ivaska, J. (2018) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 533-548, <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>.
49. Su, C., Li, J., Zhang, L., Wang, H., Wang, F., Tao, Y., Wang, Y., Guo, Q., Li, J., Liu, Y., Yan, Y., and Zhang, J. (2020) The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers, *Front. Pharmacol.*, **11**, 579068, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.579068>.
50. Llić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T., and Aizawa, S. (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice, *Nature*, **377**, 539-544, <https://doi.org/10.1038/377539a0>.
51. Rahman, A., Carey, S. P., Kraning-Rush, C. M., Goldblatt, Z. E., Bordeleau, F., Lampi, M. C., Lin, D. Y., García, A. J., and Reinhart-King, C. A. (2016) Vinculin regulates directionality and cell polarity in 2D, 3D matrix and 3D microtrack migration, *Mol. Biol. Cell*, **27**, 1431-1441, <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0432>.
52. Bejar-Padilla, V., Cabe, J. I., Lopez, S., Narayanan, V., Mezher, M., Maruthamuthu, V., and Conway, D. E. (2022) α -Catenin-dependent vinculin recruitment to adherens junctions is antagonistic to focal adhesions, *Mol. Biol. Cell*, **33**, ar93, <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-02-0071>.
53. Iwanicki, M. P., Vomastek, T., Tilghman, R. W., Martin, K. H., Banerjee, J., Wedegaertner, P. B., and Parsons, J. T. (2008) FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts, *J. Cell. Sci.*, **121**, 895-905, <https://doi.org/10.1242/jcs.020941>.
54. Xiao, W., Jiang, M., Li, H., Li, C., Su, R., and Huang, K. (2013) Knockdown of FAK inhibits the invasion and metastasis of Tca-8113 cells *in vitro*, *Mol. Med. Rep.*, **8**, 703-707, <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1555>.

55. Fraley, S. I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D.-H., Celedon, A., Longmore, G. D., and Wirtz, D. (2010) A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility, *Nat. Cell. Biol.*, **12**, 598-604, <https://doi.org/10.1038/ncb2062>.
56. Giannone, G., Rondé, P., Gaire, M., Beaudouin, J., Haiech, J., Ellenberg, J., and Takeda, K. (2004) Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions, *J. Biol. Chem.*, **279**, 28715-28723, <https://doi.org/10.1074/jbc.M404054200>.
57. Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T., and Horwitz, A. F. (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly, *Nat. Cell. Biol.*, **6**, 154-161, <https://doi.org/10.1038/ncb1094>.
58. Von Wichert, G. (2003) Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2, *EMBO J.*, **22**, 5023-5035, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg492>.
59. Horikiri, Y., Shimo, T., Kurio, N., Okui, T., Matsumoto, K., Iwamoto, M., and Sasaki, A. (2013) Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing, *PLoS One*, **8**, e76785, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076785>.
60. Mayor, R., and Etienne-Manneville, S. (2016) The front and rear of collective cell migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 97-109, <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>.
61. Szabó, B., Szöllösi, G. J., Gönci, B., Jurányi, Zs., Selmeczi, D., and Vicsek, T. (2006) Phase transition in the collective migration of tissue cells: experiment and model, *Phys. Rev. E*, **74**, 061908, <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.061908>.

SUPPRESSION OF FAK KINASE EXPRESSION DECREASES THE LIFETIME OF FOCAL ADHESIONS AND INHIBITS MIGRATION OF NORMAL AND TUMOR EPITHELIOCYTES IN A WOUND HEALING ASSAY

E. Solomatina^{1,2}, A. Kovaleva^{1,2}, A. Tvorogova^{1,3}, I. Vorobjev¹, and A. Saidova^{1,2*}

¹ *Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: aleena.saidova@gmail.com*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

³ *Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

Focal adhesions (FAs) are mechanosensory structures that can convert physical stimuli into chemical signals guiding cell migration. There is a postulated correlation between FA features and cell motility parameters for individual migrating cells. However, which FA properties are essential for the movement of epithelial cells within a monolayer remains poorly elucidated. We used real-time cell visualization to describe the relationship between FA parameters and migration of immortalized epithelial keratinocytes (HaCaT) and lung carcinoma cells (A549) under inhibition or depletion of the FA proteins vinculin and FAK. To evaluate the relationship between FA morphology and cell migration, we used substrates of different elasticity in a wound healing assay. High FAK and vinculin mRNA expression, as well as largest FAs and maximal migration rate were described for cells on fibronectin, whereas cells plated on glass had minimal FA area and decelerated speed of migration into the wound. Both for normal and tumor cells, suppression of vinculin expression resulted in decreased FA size and fluorescence intensity, but had no effect on cell migration into the wound. Suppression of FAK expression or inhibition of FAK activity had no effect on FA size, but decreased FA lifetime and significantly slowed the rate of wound healing both for HaCaT and A549 cells. Our data indicates that FA lifetime, but not FA area is essential for epithelial cell migration within a monolayer. The effect of FAK kinase on the rate of cell migration within the monolayer makes FAK a promising target for antitumor therapy of lung adenocarcinoma.

Keywords: focal contacts, vinculin, FAK, lung adenocarcinoma, experimental wound, migration

СЫВОРОТКА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРЕПЯТСТВУЕТ ДЕЙСТВИЮ EGFR/HER2-ТАРГЕТНОГО ПРЕПАРАТА ЛАПАТИНИБА НА РОСТ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КЛЕТОК ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ SK-BR-3

© 2024 Н.А. Шабан^{1,2,3}, М.М. Раевский⁴, Г.С. Захарова⁴, В.О. Шипунова^{1,2}, С.М. Деев^{2,5}, М.В. Сунцова^{3,6}, М.И. Сорокин^{1,6,7}, А.А. Буздин^{1,2,3,4}, Д.Э. Камашев^{2,3,6*}

¹ Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 Москва, Россия; электронная почта: dkatashev@gmail.com

³ ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, 117036 Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский центр мирового класса «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

⁵ Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», 420008 Казань, Россия

⁶ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

⁷ PathoBiology Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), 1200 Brussels, Belgium

Поступила в редакцию 10.11.2023

После доработки 17.01.2024

Принята к публикации 20.02.2024

EGFR- и HER2-таргетные препараты широко используются для терапии пациентов с HER2-положительным раком молочной железы, однако не все пациенты отвечают на эту терапию. Лапатиниб – это таргетный препарат, блокирующий активацию как HER2, так и EGFR (рецептора эпидермального фактора роста). Наши эксперименты показывают, что действие лапатиниба значительно ослабляется в присутствии сыворотки крови человека. Мы продемонстрировали, что действие лапатиниба на скорость роста HER2-экспрессирующих клеток SK-BR-3 снижается в присутствии сыворотки крови для всех 14 образцов, взятых у здоровых доноров (полученных по отдельности или объединённых). Этот антагонизм между лапатинибом и сывороткой крови человека связан с отсутствием индуцированной препаратом остановки перехода G1/S клеточного цикла. Секвенирование РНК выявило 308 дифференциально экспрессируемых под действием лапатиниба генов. При совместном действии лапатиниба и сыворотки крови человека как скорость роста клеток, так и экспрессия 96,1% генов, для которых она была изменена под действием лапатиниба, восстанавливаются до контрольного уровня (без препаратов). Совместное действие EGF (эпидермального фактора роста) и лапатиниба также восстанавливает рост клеток и отменяет изменение экспрессии 95,8% генов, дифференциально экспрессируемых под действием лапатиниба. Анализ дифференциальной экспрессии генов также показал, что в присутствии сыворотки крови человека или EGF лапатиниб неспособен ингибировать сигнальный путь Toll-подобного рецептора и изменять экспрессию генов, связанных с термином Focal adhesion из базы данных Gene Ontology.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: EGFR, ErbB2, HER-таргетная терапия рака, сыворотка крови человека, лапатиниб, EGF, плоскоклеточная карцинома, клетки SK-BR-3, лекарственная устойчивость, транскриптомное профилирование.

DOI: 10.31857/S0320972524030068 EDN: WKFKVA

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство рецепторов ERBB/HER (HER – человеческий рецептор эпидермального фактора роста, Human Epidermal growth factor Receptor) включает в себя четыре структурно родственные тирозинкиназы. У человека они называются HER1–4: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), HER2 (neu), ErbB3 и ErbB4 [1–5]. Несколько факторов роста, названные лигандами рецепторов HER, обладают способностью связывать эти рецепторы и инициировать их активацию [6–8]. В своей апо-форме HER-рецепторы существуют в равновесии между мономерным и преддимеризованным состояниями, находясь в конформации, не допускающей образования активных димеров. После связывания лиганда с внеклеточными доменами (эктодоменами) EGFR, HER3 или HER4 голорецепторы гомо- или гетеродимеризуются и становятся функционально активными за счёт трансфосфорилирования специфических остатков тирозина [9, 10]. Фосфорилированные рецепторы являются сайтами связывания для ряда белков, которые активируют нижележащие сигнальные пути, регулируют рост, выживание и дифференцировку клеток [11–13]. Среди HER-рецепторов HER2 является рецептором, не имеющим известного лиганда. Внеклеточный домен HER2 всегда находится в открытой конформации и готов к димеризации. Поэтому HER2 является предпочтительным гетеродимерным партнёром для других активированных HER-рецепторов [14], а также легко образует гомодимеры [15].

Сверхэкспрессия и нарушение внутриклеточной сигнализации через рецепторы семейства HER играет ключевую роль в канцерогенезе, а сверхэкспрессия HER2 служит прогностическим биомаркером при многих видах рака [5]. 15–20% всех случаев рака молочной железы (PMЖ) характеризуется сверхэкспрессией HER2 (HER2+ PMЖ) [16]. В настоящее время разработан терапевтический подход, направленный на блокирование активности рецептора HER2. Для терапии HER2+ PMЖ в качестве стандарта лечения одобрено гуманизированное моноклональное антитело трастузумаб, которое воздействует на внеклеточные домены HER2. Кроме того, клиническую эффективность в отношении HER2+ PMЖ доказал лапатиниб – обратимый синтетический ингибитор тирозинкиназы, предотвращающий фосфорилирование и активацию как HER2, так и EGFR [17–19, 20].

Однако не все пациенты с опухолями, экспрессирующими HER2 на высоком уровне, отвечают на HER2-таргетную терапию [21–23], и часто в опухолях развивается резистентность к такому лечению [24, 25], обусловленная как исходно существующими, так и приобретёнными факторами [26]. Так, например, только у 39% больных HER2+ PMЖ наблюдался ответ опухоли на лапатиниб [27].

В настоящее время продолжают работы по выявлению и валидации эффективных и клинически применимых факторов, связанных с лекарственной устойчивостью, с целью дальнейшего повышения эффективности лечения. Внутриклеточные факторы характерны для самой опухоли и определяются мутациями или аномальной экспрессией генов. Некоторые больные PMЖ с мутациями HER2 (*L755S*, *V842I*, *K753I* или *D769Y*) не получают пользы от трастузумаба [28]. В литературе обсуждается несколько групп предполагаемых факторов, влияющих на эффективность терапии, среди них экспрессия генов в опухоли, которая коррелирует с ответом на терапию (биомаркеров) [29], и данные об активности внутриклеточных молекулярных путей в опухолевых тканях, полученные на основе транскриптомного профилирования [30–32].

Внеклеточные факторы лекарственной устойчивости связаны с межклеточной коммуникацией или факторами, присутствующими в организме пациента. Для выявления таких факторов было проведено сравнение протеомных спектров образцов сыворотки крови пациентов, отвечающих и не отвечающих на терапию [33, 34]. По некоторым данным, HER и его лиганды (эпидермальный фактор роста (EGF), амфирегулин, HB-EGF, TGF- α) могут быть использованы в качестве серологических биомаркеров для прогноза и предсказания ответа на HER-таргетную терапию при раке лёгкого [35], яичников [36] и колоректальном раке [37]. В исследованиях на клеточных культурах было продемонстрировано значительное влияние лигандов HER, препятствующее действию HER-таргетных препаратов (EGF, нейрегулин (NRG)) на клетки [38–41]. Например, ингибитор HER2 лапатиниб парадоксальным образом способен стимулировать пролиферативное поведение HER2+ клеток PMЖ в присутствии лиганда рецептора HER3 – NRG [39]. Таким образом, на опухолевый ответ может влиять целый ряд внеклеточных факторов, присутствующих в периферической крови человека. Концентрация эндогенного EGF и других лигандов HER может

Принятые сокращения: ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены; PMЖ – рак молочной железы; EGF – эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor); EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor); FBS – эмбриональная телячья сыворотка; HER – человеческий рецептор эпидермального фактора роста (Human Epidermal growth factor Receptor); PAL – уровень активации пути (Pathway Activation Level).

варьировать в организме пациента и, следовательно, влиять на эффективность лечения за счёт потенциального спасения раковых клеток при проведении HER-таргетной терапии [42]. Тем не менее взаимодействие между сывороткой крови человека и таргетными препаратами при их сочетанном действии на клетки опухоли ещё недостаточно изучено.

Недавно мы обнаружили, что периферическая кровь человека модулирует активность HER-специфических препаратов цетуксимаба, эрлотиниба и трастузумаба [41, 42]. В этой работе мы показываем, что сыворотка крови человека подавляет ингибирующее влияние лапатиниба на скорость роста SK-BR-3, HER2+ клеток аденокарциномы молочной железы человека. Используя образцы сыворотки крови 14 женщин-доноров (протестированные по отдельности или объединённые), мы обнаружили, что сыворотка крови человека резко уменьшает ингибирующее действие лапатиниба на рост клеточной линии плоскоклеточной карциномы молочной железы SK-BR-3. Этот антагонизм между лапатинибом и сывороткой крови человека был связан с отменой лапатиниб-индуцированной остановки клеток в фазе G0/G1 клеточного цикла.

Секвенирование РНК выявило 308 дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в присутствии лапатиниба. Примечательно, что в сочетании с лапатинибом сыворотка крови человека оказалась способной восстанавливать скорость роста клеток, а также экспрессию 96,1% тех генов, для которых она изменялась при воздействии лапатиниба.

Совместное воздействие лапатиниба и EGF также восстанавливает рост клеток и отменяет изменение экспрессии 95,8% тех генов, для которых она изменялась при воздействии лапатиниба. Дифференциальный анализ экспрессии генов также показал, что в присутствии сыворотки крови человека или EGF лапатиниб неспособен ингибировать сигнальный путь Toll-подобного рецептора и изменять экспрессию генов, связанных с термином Focal adhesion из базы данных Gene Ontology.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клеточная линия плоскоклеточной карциномы SK-BR-3 (ATCC HTB-30) была получена из коллекции Института цитологии (Санкт-Петербург, Россия). Клетки SK-BR-3 культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), дополненной 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) («Biosera», Франция) и 2 мМ L-глутамина, 4,5 г/л глюкозы и 1%-ной смесью пенициллина со стрептомицином («ПанЭко»).

Измерение скорости роста клеток. Клетки высевали на 24-луночные культуральные планшеты, ~5500 клеток на лунку. Планшеты с равным количеством высеянных клеток инкубировали в течение 24 ч перед обработкой препаратом – EGF, лапатинибом или сывороткой крови человека. В день добавления препаратов проводился контрольный подсчёт для определения фонового значения числа клеток. Через 7 дней после добавления препаратов среду удаляли, обработанные клетки промывали и трипсинизировали в течение 10 мин. После ресуспендирования клетки подсчитывали с помощью камеры для подсчёта клеток Neubauer Improved. Рост клеток (%) рассчитывали как отношение числа клеток в лунке, содержащей препарат, к числу клеток в контрольной лунке, содержащей только стандартную среду роста (одна контрольная лунка на пять лунок, содержащих препарат). Все эксперименты проводились не менее чем в трёх независимых повторностях.

Анализ клеточного цикла. Клетки высевали в шестилуночные культуральные планшеты с плотностью 50 000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 16 ч, после чего добавляли препараты. Через 3–4 дня клетки отделяли от подложки трипсином. Затем клетки дважды промывали PBS и центрифугировали при 100 g. Клетки фиксировали этанолом (70%) при –20 °C в течение 30 мин. Клетки центрифугировали при 3800 об./мин (1000 g) в течение 10 мин; промывали PBS и ресуспендировали в 0,2 мл PBS, содержащем 10 мкг/мл РНКазы А II и 2 мкг/мл пропидия йодида. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в тёмном месте. Образцы анализировали методом проточной цитометрии (FACS BD Accuri C6 Plus). Все эксперименты проводились не менее чем в трёх независимых повторностях.

Обработка клеток для РНК-секвенирования. Клеточную суспензию разводили до 27 000 клеток в мл и аликвоты клеточной суспензии объёмом 5 мл вносили в культуральные флаконы площадью 25 см². Для измерения скорости роста из той же суспензии клеток в лунки 24-луночных планшетов вносили аликвоты по 0,5 мл на лунку. Клетки инкубировали в течение 16 ч, после чего добавляли препараты. Например: лапатиниб, свежеразведённый раствор в среде роста без FBS на флакон до конечной концентрации 200 нМ; EGF, свежеразведённый раствор в среде роста на флакон до конечной концентрации 2 нг/мл; 300 мкл сыворотки крови человека на флакон до конечной концентрации 5,5%. Клетки обрабатывали препаратами во флаконах за 48 ч перед сбором образцов для секвенирования РНК и за 7 дней до подсчёта клеток. Для секвенирования РНК клетки отделяли трипсином, промывали PBS, а образцы клеток до анализа хранили при –70 °C в растворе RNAlater.

Сыворотка человека, использованная для профилирования РНК, представляла собой пул сывороток, полученных от десяти доноров (sm1, sd12, sd18–23, sd26, sd27) и смешанных в равных объёмных концентрациях.

EGFR-Таргетные препараты, EGF, образцы сыворотки крови человека. Лапатиниб (сухой порошок) был приобретён у компании «Sigma-Aldrich» (США) и хранился при -20°C в виде 10 мМ раствора в ДМСО или в сухом виде. rhEGF (сухой порошок) был приобретён в компании «SCI store» (Москва, Россия) и хранился при -20°C . Образцы периферической крови от неродственных здоровых доноров 23–64 лет собирали в две пробирки Vacuette объёмом 8 мл, содержащие прокоагулянт и гель («Greiner», Австрия), сыворотку готовили в течение 3–12 ч после взятия крови: пробирки центрифугировали при 2500 об./мин в течение 15 мин, сыворотки аликвотировали и хранили при -75°C . Для всех исследуемых биоматериалов человека от соответствующих доноров было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании и передачу результатов в виде научного отчёта. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией; процедура получения согласия и дизайн исследования были одобрены этическим комитетом Медицинского центра «Витамед», Москва; дата одобрения: 6 октября 2021 г.

Подготовка библиотек и РНК-секвенирование. Библиотеки РНК были созданы и секвенированы в соответствии с методом Suntsova et al. [43]. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Micro Kit («Qiagen», Нидерланды). Концентрацию РНК определяли с помощью набора Qubit RNA Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США), измеряя флуоресценцию с помощью флуориметра Qubit 4. Для измерения числа целостности РНК (RIN, RNA Integrity Number) использовали биоанализатор TapeStation 4150 с набором ScreenTapes and Reagents («Agilent», США). Удаление рибосомальной РНК проводили с помощью набора KAPA RNA HyperPrep Kit с RiboErase (HMR) («Roche», Швейцария). Уникальные праймеры KAPA с двойной индексацией («Roche») использовались для мультиплексирования образцов в одном цикле секвенирования. Концентрацию библиотек измеряли с помощью наборов Qubit 4 и Qubit dsDNA HS Assay («Thermo Fisher Scientific»). Распределение длины фрагментов определяли с помощью прибора TapeStation 4150 с набором D1000 ScreenTapes and Reagents («Agilent»). Секвенирование РНК проводили в лаборатории клинической и геномной биоинформатики Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, на оборудовании Illumina NextSeq 550 для одноконцевого секвениро-

вания, длина считывания 75 п.н., приблизительно 20 млн прочтений на образец. Проверка качества данных проводилась с помощью программы Illumina SAV. Де-мультиплексирование проводили с помощью программного обеспечения Illumina Bcl2fastq2 v. 2.17.

Обработка данных РНК-секвенирования. Первоначальная обработка профилей экспрессии генов проводилась в соответствии с методом Suntsova et al. [43]. Дифференциальный анализ экспрессии проводили с помощью программы DESeq2 [44]. Гены, которые считались дифференциально экспрессированными, должны были преодолеть пороговое значение коэффициента ложного обнаружения Бенджамини–Хохберга (FDR) с поправкой на p -значения $< 0,05$. Графики вулканов визуализировали с помощью пакета R EnhancedVolcano (v. 1.16.0).

Анализ GO-обогащения проводили с помощью пакетов R clusterProfile (v.4.2.1) и org.Hs.eg.db (v.3.8.2). Для фильтрации путей и GO-терминов мы использовали p -значения $< 0,05$ с поправкой на FDR в качестве отсекающего значения. Анализ по методу главных компонент (PCA) и визуализацию проводили для \log_{10} -трансформированных количеств всех генов с помощью программ pca2d R (v.3.6.2) и prcomp. Анализ генно-регуляторных сетей проводили, как описано в работе Jung et al. [45]. Уровни активации путей (Pathway activation levels, PAL) рассчитывали и визуализировали с помощью биоинформационной платформы Oncobox [46]. Молекулярная функция компонентов сигнальных путей была алгоритмически аннотирована в соответствии с методом Sorokin et al. [47]. Проверка значимости пересечений проводилась согласно работе Raevskiy et al. [48]. Сигнальные пути визуализировали с помощью программного обеспечения Oncobox [49].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software Inc.), статистически значимыми считали значения $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm SD не менее чем трёх экспериментов, проведённых в разные дни.

Для расчёта IC50 – среднеэффективной дозы, которая ингибирует исследуемую систему на 50% – мы использовали следующее уравнение:

$$\text{IC50} = D/(100/(y - 1))^{1/m},$$

где D – концентрация препарата; y – количество клеток (% по отношению к уровню без препарата); m – коэффициент, характеризующий форму зависимости «доза-эффект».

Значимость PAL определяли с помощью метода анализа путей Oncobox [49] для 1611 молекулярных путей, содержащих 10 и более генных продуктов,

извлечённых из публичных баз данных [47] с использованием оригинального программного обеспечения [46]. Для расчётов PAL профиль экспрессии каждого образца был нормализован по среднегеометрическим уровням экспрессии генов для всех образцов в исследуемом наборе данных.

Для фильтрации и отбора ДЭГ, путей и GO-терминов мы использовали p -значения $< 0,05$ с поправкой на FDR Бенджамини–Хохберга.

Чтобы проверить, является ли значимым заданное количество дифференциальных генов или путей, являющихся общими для двух из трёх пересекающихся наборов данных, было проведено 1000 случайных пересечений в соответствии с методом Raevskiy et al. [48]. В каждом случае брались две/три случайные выборки из двух/трёх соответствующих наборов генов из соответствующих наборов данных. Затем эти случайные выборки пересекались на каждой итерации, и было получено 1000 случайных общих генов. p -Значение значимости пересечения вычислялось как доля случайных чисел, равных или превышающих экспериментально наблюдаемое количество общих генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для изучения взаимодействия сыворотки крови человека с таргетным препаратом лапатинибом и оценки различия во влиянии сыворотки между донорами мы измерили скорость роста HER2+ клеток SK-BR-3 в присутствии сыворотки крови человека, взятой от 14 здоровых доноров. Для изучения молекулярных механизмов мы оценили распределение по фазам клеточного цикла и профилировали экспрессию генов в клетках SK-BR-3 под воздействием лапатиниба, EGF и сыворотки крови человека.

Сыворотка крови человека снижает влияние лапатиниба на рост клеток SK-BR-3. На эффективность терапевтических препаратов в подавлении роста опухоли могут влиять различные молекулярные факторы, присутствующие в организме пациента. В этой работе мы измерили влияние индивидуальных образцов сыворотки периферической крови человека на скорость роста клеток, полученных из аденокарциномы молочной железы, SK-BR-3, в присутствии лапатиниба, ингибитора тирозинкиназ, который предотвращает фосфорилирование и активацию HER2 и EGFR [19].

В соответствии с литературными данными, в наших экспериментах лапатиниб эффективно ингибировал рост клеток SK-BR-3 в стандартной среде, содержащей 9% FBS (рис. 1, а); концентрация лапатиниба, необходимая для 50%-ного ингибирования скорости роста (IC50), составляла ~45 нМ.

SK-BR-3 – хорошо известная клеточная линия РМЖ со сверхэкспрессией HER2, использовавшаяся в многочисленных исследованиях активности HER2-таргетных препаратов *in vitro*, в том числе лапатиниба [50, 51]. Известно, что клетки SK-BR-3 сверхэкспрессируют HER2 (примерно $1-2 \times 10^6$ молекул белка HER2 на клетку против $0,4 \times 10^5$ и $0,2 \times 10^5$ в HER2-негативных клеточных линиях MDA-MB-231 [52] и A431 [53] соответственно). Клетки SK-BR-3 высокочувствительны к HER2-таргетным препаратам [54, 55], IC50 лапатиниба в наших тестах составляет ~45 нМ. В свою очередь, значения IC50 лапатиниба для клеток MDA-MB-231 и A431 на два-три порядка выше: 27 мкМ и 10 мкМ соответственно [56, 57].

Мы использовали образцы сыворотки периферической крови человека, полученные от 14 здоровых женщин-доноров. Сначала мы изучили влияние сыворотки крови доноров на скорость роста клеток SK-BR-3 в отсутствие препаратов (рис. 2). Для всех исследуемых образцов исходная среда роста содержала инактивированную нагреванием (56°C , 30 мин) FBS. Поэтому мы оценивали скорость роста клеток в среде, содержащей 5% FBS и дополненной 4% сыворотки отдельных женщин-доноров или 4% дополнительной FBS в качестве контроля.

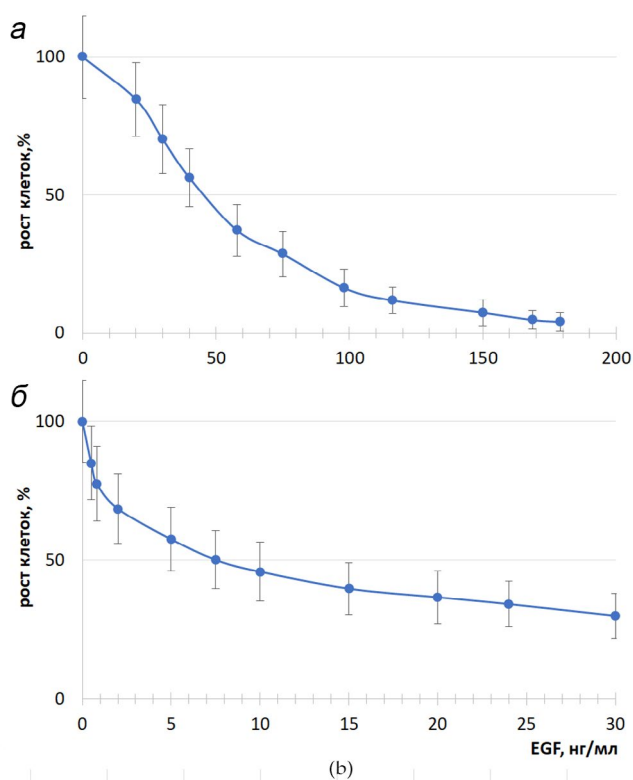


Рис. 1. Рост клеток SK-BR-3 после 7 дней инкубации в среде, содержащей FBS (9%) и: а – лапатиниб (в нМ); б – EGF (в нг/мл). Кривые показывают среднее количество клеток, рассчитанное по трём повторностям и нормализованное к условиям без добавления препаратов

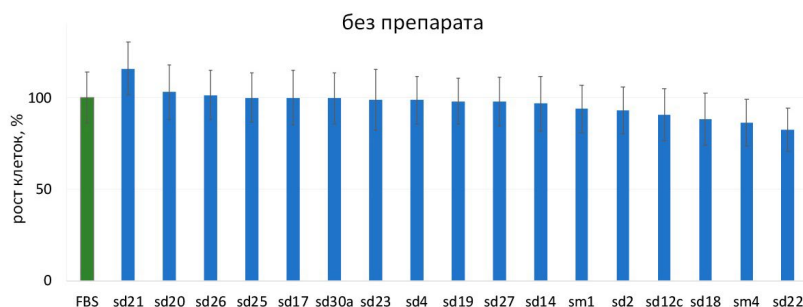


Рис. 2. Скорость роста клеток SK-BR-3 в среде, содержащей 5% FBS и 4% сыворотки крови человека, полученной от различных доноров. Скорость роста нормализована по отношению к среде, содержащей только FBS (9% FBS; столбец «FBS»)

Для реализации этого плана исследования мы сначала измерили скорость роста клеток SK-BR-3 при различных концентрациях FBS (от 5 до 22%) в среде роста. Мы обнаружили, что скорость роста клеток мало зависит от концентрации FBS в этом диапазоне концентраций (рис. S1 Приложения 1). Таким образом, в одном и том же эксперименте можно сравнить рост клеток в диапазоне концентраций FBS от 5 до 13%.

Мы обнаружили, что в присутствии 4% сыворотки крови человека скорость роста SK-BR-3 существенно не отличалась от контроля, содержащего только FBS, и составляла в среднем ~97% от

контрольного уровня. Скорость роста варьирует от 83 до 116% по сравнению с контролем, содержащим только FBS (рис. 2).

Затем мы определили влияние одновременного добавления сыворотки крови человека и лапатиниба. Мы обнаружили, что добавление каждого из 14 протестированных образцов сыворотки крови человека статистически значимо снижало ингибирование роста клеток лапатинибом (рис. 3). При концентрации 75 нМ лапатиниб в среде, содержащей только FBS, вызывал сильное снижение скорости роста до ~29% от уровня без препарата. Напротив, в среде, допол-

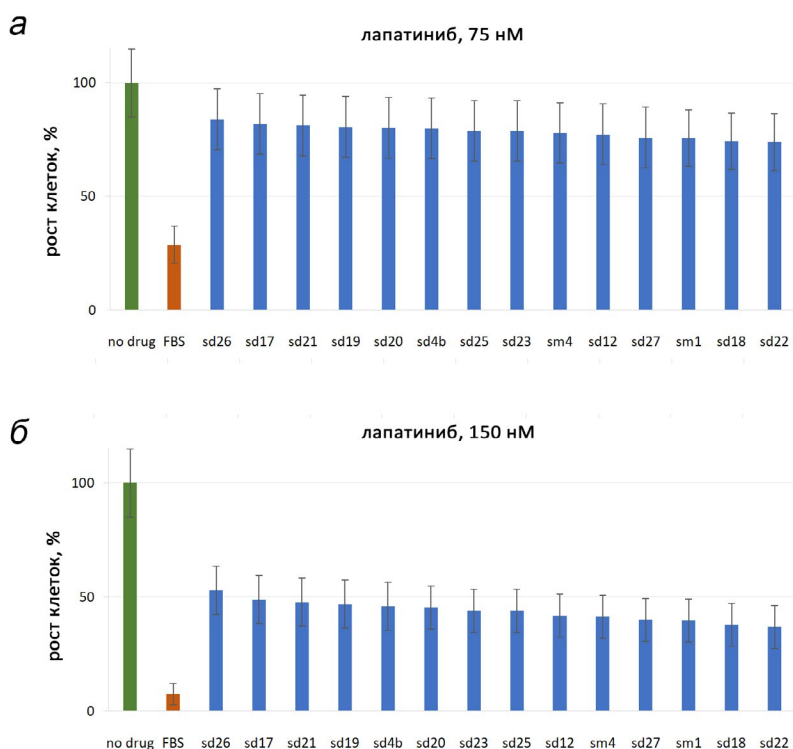


Рис. 3. Скорость роста клеток SK-BR-3 в присутствии лапатиниба в концентрации 75 нМ (а) или 150 нМ (б) и сыворотки крови человека. Среда роста содержала 5% FBS и 4% сыворотки крови человека или 9% FBS (столбцы «FBS»). Столбцы представляют среднюю скорость роста клеток для каждого донорского образца, рассчитанную из трёх повторностей, нормализованную к условиям без лапатиниба и сыворотки крови человека («no drug»). Для всех образцов донорской сыворотки человека различия между образцами «FBS + лапатиниб» и «сыворотка крови человека + лапатиниб» были статистически значимыми ($p < 0,05$)

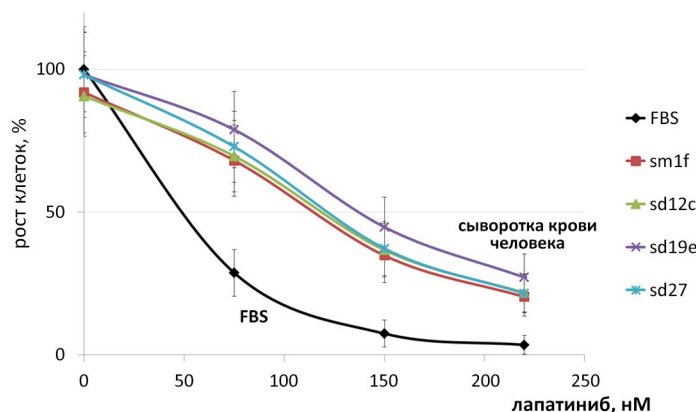


Рис. 4. Скорость роста клеток SK-BR-3 с возрастающими концентрациями лапатиниба (0–220 нМ) в среде роста, содержащей 5% FBS и 4% сыворотки человека из четырёх образцов крови (sm1, sd12, sd19 и sd27) или 9% FBS (FBS). Кривые зависимости скорости роста клеток от концентрации препарата для каждого донорского образца рассчитывали по трём повторностям, нормированным по отношению к условиям без лапатиниба и без сыворотки крови человека

ненной 4% сыворотки крови человека и 5% FBS, добавление лапатиниба вызывало очень слабое снижение скорости роста клеток, до 74–84% от уровня без препарата, что примерно в 2,7 раза превышает скорость роста клеток по сравнению с таковой в среде, содержащей только лапатиниб. Эти эффекты были ещё более выражены при концентрации лапатиниба 150 нМ: средняя скорость роста составляла ~7,5% при добавлении только лапатиниба и ~44% (примерно в 6 раз больше) при добавлении лапатиниба и сыворотки крови человека.

Таким образом, мы обнаружили, что в наших экспериментальных условиях сыворотка крови человека препятствует ингибированию роста клеток лапатинибом. В присутствии 4% сыворотки крови человека IC50 лапатиниба увеличивалась в ~3 раза по сравнению со значением в присутствии только FBS (рис. 4). Параметр индекса комбинации (*combination index*) для лапатиниба и сыворотки крови человека рассчитывали согласно методу Chou et al. [58], где взаимодействие считается антагонистическим, если индекс комбинации превышает 1,5. В наших экспериментах он варьировал от 1,9 до 3,3 во всех исследованных образцах донорской крови, что свидетельствует о сильном антагонизме между лапатинибом и сывороткой крови человека в экспериментах по исследованию скорости роста клеток SK-BR-3.

Влияние EGF на рост клеток SK-BR-3 и лекарственная устойчивость к лапатинибу. Лиганды EGFR могут положительно влиять на жизнеспособность HER-положительных клеток, обработанных HER-таргетными препаратами. Например, EGF и другой лиганд рецепторов HER, NRG1, могут препятствовать действию лапатиниба и цетуксимаба на культивируемые клетки [38–41]. Поэтому в данной работе мы определили влияние рекомбинант-

ного человеческого EGF на рост клеток SK-BR-3 в присутствии лапатиниба.

Сначала мы измерили влияние EGF на рост SK-BR-3 в диапазоне концентраций от 0,5 до 30 нг/мл (рис. 1, б). Мы обнаружили, что EGF может снизить скорость роста клеток примерно до трети от контрольного уровня с IC50 ~7,6 нг/мл. Отметим, что эта концентрация значительно выше физиологической концентрации EGF в крови человека (~0,3–1,7 нг/мл [41, 59]).

Ранее мы показали, что одновременная обработка клеток A431 ингибиторами EGFR и EGF восстанавливает их рост, а EGF уменьшает ингибирующее действие трастузумаба на клетки BT474 [42]. Это явление может быть связано со взаимным влиянием механизмов ингибирования и активации EGFR [60, 61]. В данном исследовании мы оценили влияние различных концентраций лапатиниба (от 0 до 100 нМ) на скорость роста клеток SK-BR-3 при фиксированных концентрациях EGF (0, 82, 5 и 20 нг/мл; рис. 5). Мы обнаружили, что даже при концентрации лапатиниба 100 нМ скорость роста клеток восстанавливалась практически до контрольного уровня (без препаратов), когда EGF присутствовал в концентрациях 0,82–20 нг/мл, тогда как IC50 лапатиниба в условиях добавления только этого препарата составляла почти 45 нМ.

Индекс комбинации (*combination index*), рассчитанный в соответствии с методом Chou et al. [58], составил 7,1, что указывает на очень сильное антагонистическое взаимодействие между EGF и лапатинибом. Таким образом, наши данные подтвердили, что хотя лапатиниб и EGF по отдельности могут ингибировать рост клеток SK-BR-3, их совместное присутствие может уравновешивать действие друг друга и, наоборот, способствовать пролиферации.

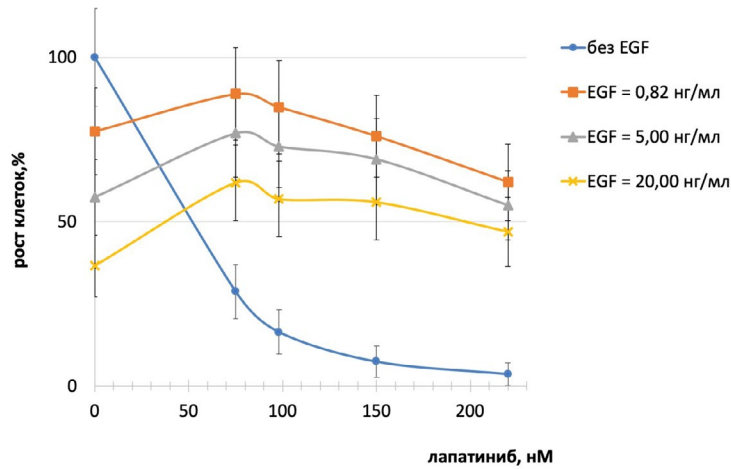


Рис. 5. Скорость роста клеток SK-BR-3 при добавлении лапатиниба в присутствии EGF в указанных концентрациях. Кривые зависимости скорости роста клеток от концентрации препарата рассчитывали с использованием не менее трёх биологических повторностей каждого эксперимента, нормированных по отношению к условиям без лапатиниба и EGF (точка кривой «без EGF», при 0 нМ лапатиниба)

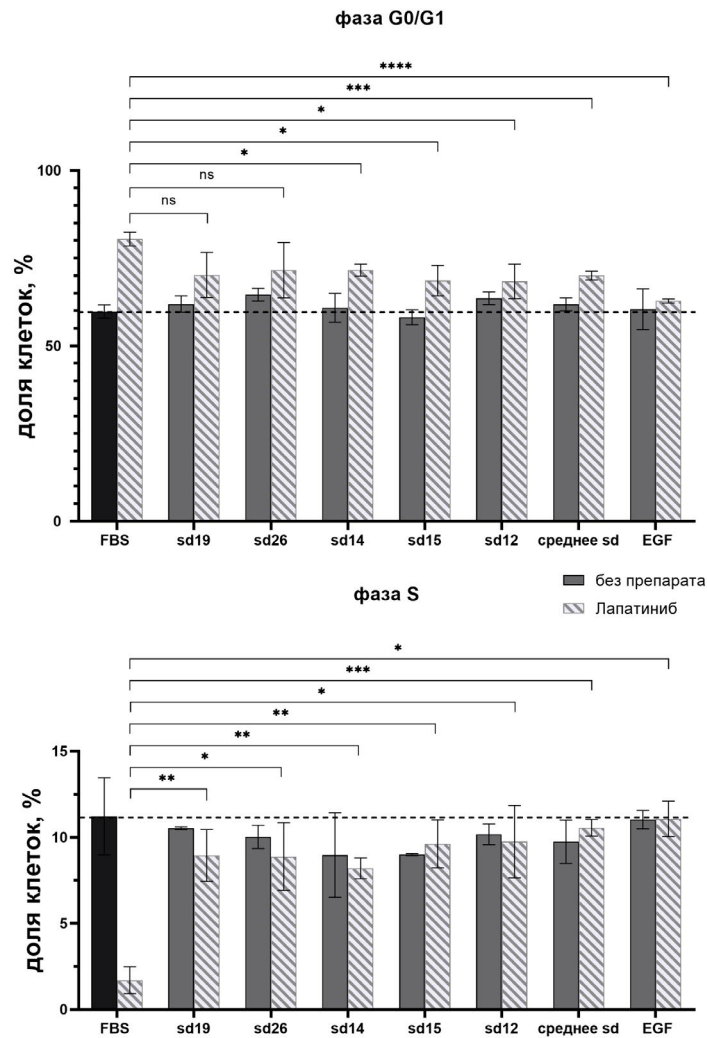


Рис. 6. Распределение клеток SK-BR-3 по фазам клеточного цикла после обработки лапатинибом (200 нМ) в присутствии EGF (3 нг/мл) или 4% сыворотки крови человека по сравнению с необработанными клетками («FBS» – чёрный столбец). Показана доля клеток в фазе G0/G1 и в фазе S. Звёздочками отмечены статистически значимые различия между образцами: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Анализ распределения клеток по стадиям клеточного цикла проводили методом FACS после окрашивания клеток пропидий йодидом. Каждый столбик представляет собой среднее \pm стандартное отклонение в трёх независимых экспериментах

Индукцированная лапатинибом остановка клеточного цикла в фазе G0/G1 в клетках SK-BR-3 снижается в присутствии сыворотки крови человека и прекращается в присутствии EGF. Лапатиниб, как и другие препараты, направленные на EGFR и/или HER2, ингибирует прогрессию клеточного цикла, вызывая остановку фазового перехода G0/G1. Чтобы изучить влияние лапатиниба на распределение фаз клеточного цикла, мы использовали сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) для измерения доли клеток SK-BR-3 в различных фазах клеточного цикла. Мы проводили эти эксперименты в среде, содержащей FBS и EGF, и образцы сыворотки крови человека. В клетках, обработанных одним только лапатинибом в концентрации 200 нМ, мы наблюдали резкое повышение доли клеток в фазе G0/G1 на ~20% (79% против 59%) по сравнению с уровнем без препарата (рис. 6). Обработка клеток такой концентрацией лапатиниба также привела к ингибированию их роста до 3% (рис. 1, а). В свою очередь, доля клеток в фазе S значительно сократилась и составила примерно 1,7% против 11% в условиях отсутствия препарата (рис. 6).

Когда EGF добавляли одновременно с лапатинибом, скорость роста клеток в значительной степени восстанавливалась и составляла около 70% от контрольного показателя без препарата. Анализ клеточного цикла FACS показал, что это сопровождалось значительным сдвигом доли клеток в фазе G0/G1 к уровню без препарата. Одновременное присутствие EGF и лапатиниба приводило к аналогичному эффекту и для доли клеток в S-фазе, близкой к контролю без препарата. Добавление только EGF к клеткам не изменяло долю клеток в G0/G1- и S-фазах клеточного цикла (рис. 6).

Мы измерили распределение клеток SK-BR-3 по фазам клеточного цикла в среде, дополненной сыворотками пяти доноров. Во всех пяти исследуемых образцах доля клеток в G0/G1- и S-фазе не претерпела значительных изменений по сравнению с контролем, содержащим только FBS в среде роста (табл. S1 Приложения 1, рис. 6). В присутствии сыворотки крови человека и лапатиниба (среднее значение для четырёх доноров) скорость роста клеток SK-BR-3 составляла ~50% от уровня без препарата вместо всего лишь 2%, когда к среде был добавлен только лапатиниб (рис. 4). Это хорошо согласуется с нашими данными о том, что лапатиниб совместно с сывороткой крови человека вызывает сдвиг доли клеток в фазе G0/G1 на 10%, в то время как обработка только лапатинибом приводит к сдвигу примерно на 20% от уровня без препарата (рис. 6). Насколько нам известно, о влиянии образцов сыворотки крови человека на ингибирование роста клеток лапатинибом на уровне анализа клеточного цикла ранее не сообщалось.

Эти результаты могут дать ключ к пониманию механизма взаимодействия EGFR/HER2-таргетных препаратов с сывороткой крови человека.

Изменения транскриптомных профилей, связанные с взаимодействием сыворотки крови человека, EGF и лапатиниба в клетках SK-BR-3. Для оценки молекулярных механизмов, лежащих в основе опосредованного сывороткой человека и/или EGF предотвращения остановки клеточного роста SK-BR-3, обработанных лапатинибом, мы провели транскриптомный анализ методом секвенирования РНК. Использовали смешанный образец сыворотки крови человека, полученный путём объединения сывороток десяти доноров. Для каждого функционального состояния эксперименты по секвенированию проводили в трёх повторностях. Значения Fold change ДЭГ по сравнению с контрольным уровнем без препарата (с критериями FDR-adjusted p-value (*p*-значение с поправкой на FDR) < 0,05; fold change > 2) приведены в табл. S2 Приложения 2; полные данные секвенирования депонированы в NCBI (nih.gov, BioProject) с ID PRJNA1029741.

Мы обнаружили, что 48-часовая обработка клеток SK-BR-3 150 нМ лапатиниба, снижающая скорость их роста до 7% от уровня без препарата, вызвала дифференциальную экспрессию 308 генов, из которых у 198 экспрессия была понижена, а у 110 – повышена (рис. 7 и рис. 8, а). Когда лапатиниб был добавлен в сочетании с сывороткой крови человека, эти изменения в экспрессии генов резко снизились: из первоначальных 308 ДЭГ экспрессия только 8 и 4 генов оставалась пониженной и повышенной соответственно (рис. 8). С точки зрения восстановления роста клеток это соответствует ~62% от контрольного уровня без препарата.

При добавлении EGF в сочетании с лапатинибом получается аналогичная картина: экспрессия только 12 и 1 гена остаётся пониженной и повышенной соответственно (рис. 8), что соответствует ~73% восстановления роста клеток.

Таким образом, мы определили набор из 295 лапатиниб-специфичных ДЭГ, экспрессия которых не изменялась при добавлении лапатиниба к EGF или сыворотке крови человека, в качестве ключевых генов лапатиниба (*lapatinib core genes*).

Молекулярные пути, связанные с взаимодействием лапатиниба, EGF и сыворотки крови человека. Мы использовали анализ на основе базы данных Gene Ontology (GO) для выявления GO-терминов, содержащих наибольшее число ДЭГ (Gene Ontology enrichment, далее – обогащённые термины) и, следовательно, биологических процессов, связанных с активностью лапатиниба (рис. 9). Большинство GO-терминов, обогащённых для ДЭГ, негативно регулируемых только при лечении лапатинибом, были связаны с мембранными компонентами или активностью мембранных

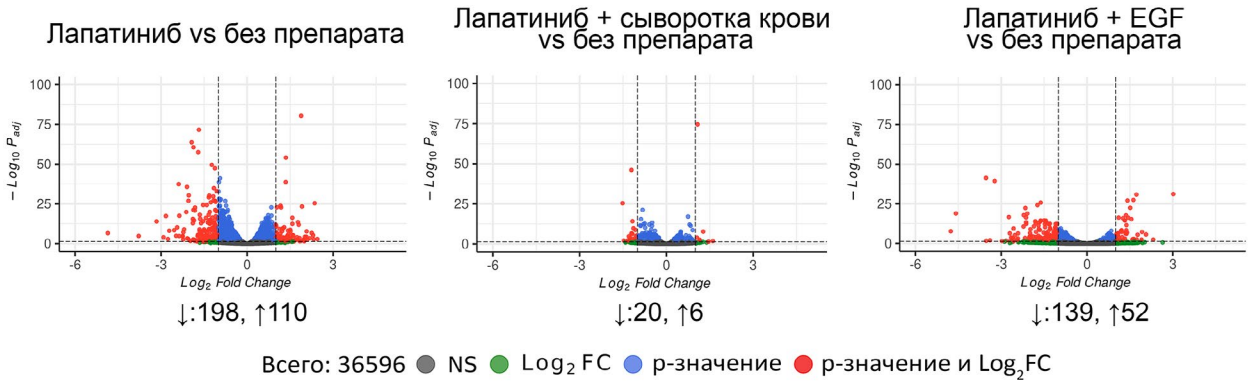


Рис. 7. Дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ) в серии сравнений с образцом клеток без воздействия препаратов для: лапатиниба; лапатиниба и сыворотки крови человека; лапатиниба и EGF. ДЭГ показаны красным цветом ($\log_2FC > 1$ или $\log_2FC < -1$, скорректированное p -значение $< 0,05$)

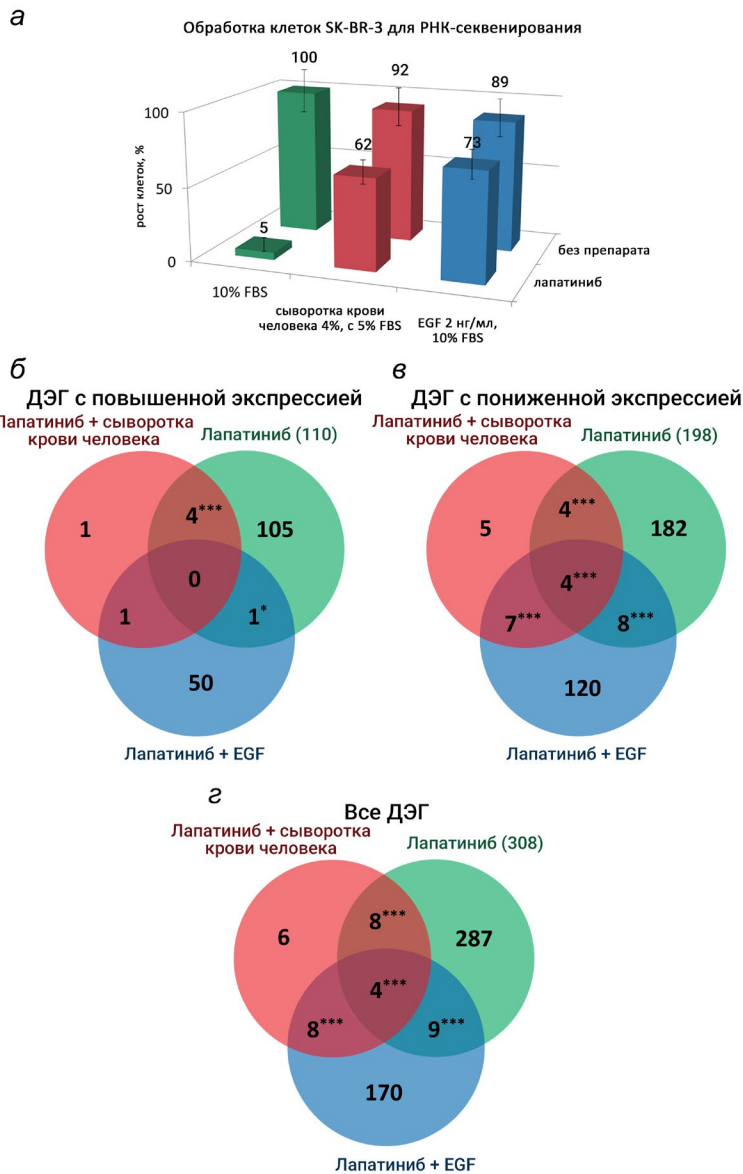


Рис. 8. РНК-Секвенирование клеток SK-BR-3. Рост клеток в условиях обработки, использованной для сбора образцов для РНК-секвенирования (а). Диаграммы Венна, показывающие перекрытие генов с повышенной (б) и пониженной (в) экспрессией, а также, вместе, генов с повышенной и пониженной экспрессией (з) в присутствии: только лапатиниба, лапатиниба и сыворотки крови человека или лапатиниба и EGF. Звёздочками отмечена статистическая значимость совпадений: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

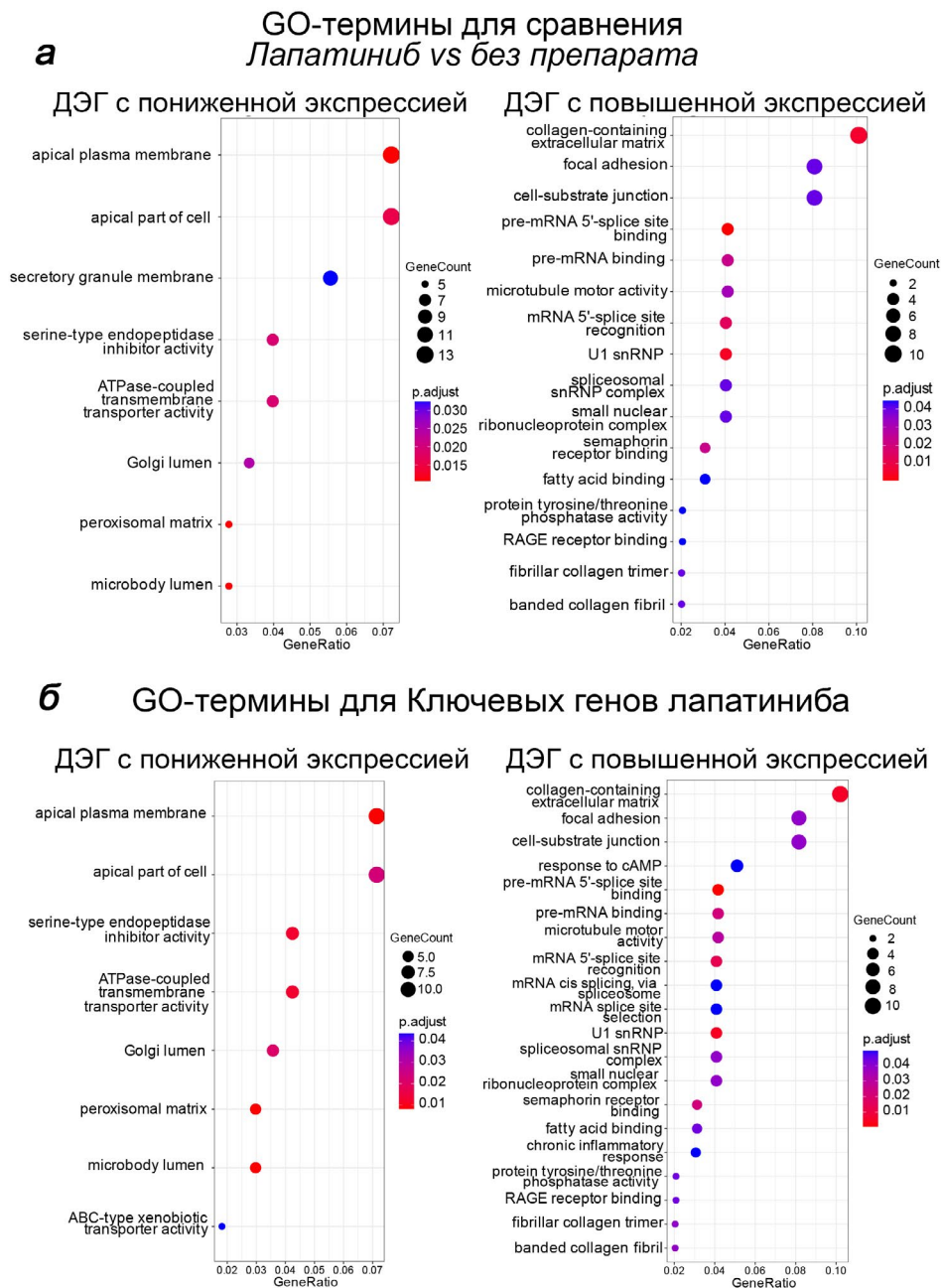


Рис. 9. Термины базы данных Gene Ontology (GO), наиболее обогащённые для генов из множества ДЭГ с повышенной и пониженной экспрессией, вызванной обработкой лапатинибом (а) и набором ключевых генов лапатиниба (*lapatinib core*) (б). Визуализировано с помощью пакета R *enrichplot* (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/enrichplot.html>). Обогащение указанных терминов GO статистически значимо (p -значение, скорректированное по критерию Бенджамини–Хохберга, меньше 0,05)

транспортёров. Из восьми GO-терминов, идентифицированных таким образом, семь были также обогащены для негативно регулируемых генов набора ключевых генов лапатиниба (*lapatinib core*).

Мы обнаружили 20 GO-терминов, обогащённых для генов, регулируемых лапатинибом. Два из них, «клеточно-субстратное соединение» (“cell-substrate junction”) и его дочерний термин «фокальные контакты» (“focal adhesion”), тесно связаны между собой. Эти термины GO описывают

опосредованные адгезией сигнальные процессы, влияющие на пролиферацию, дифференцировку, якорно-зависимое выживание и миграцию. Активный цитоскелет изменяется при эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП), что приводит к усилению подвижности клеток [62]. Другие GO-термины, обогащённые для генов, регулируемых лапатинибом, включают связывание рецептора RAGE, активность трансмембранного транспортёра жирных кислот, связывание и сплайсинг

PAL для ключевых генов лапатиниба

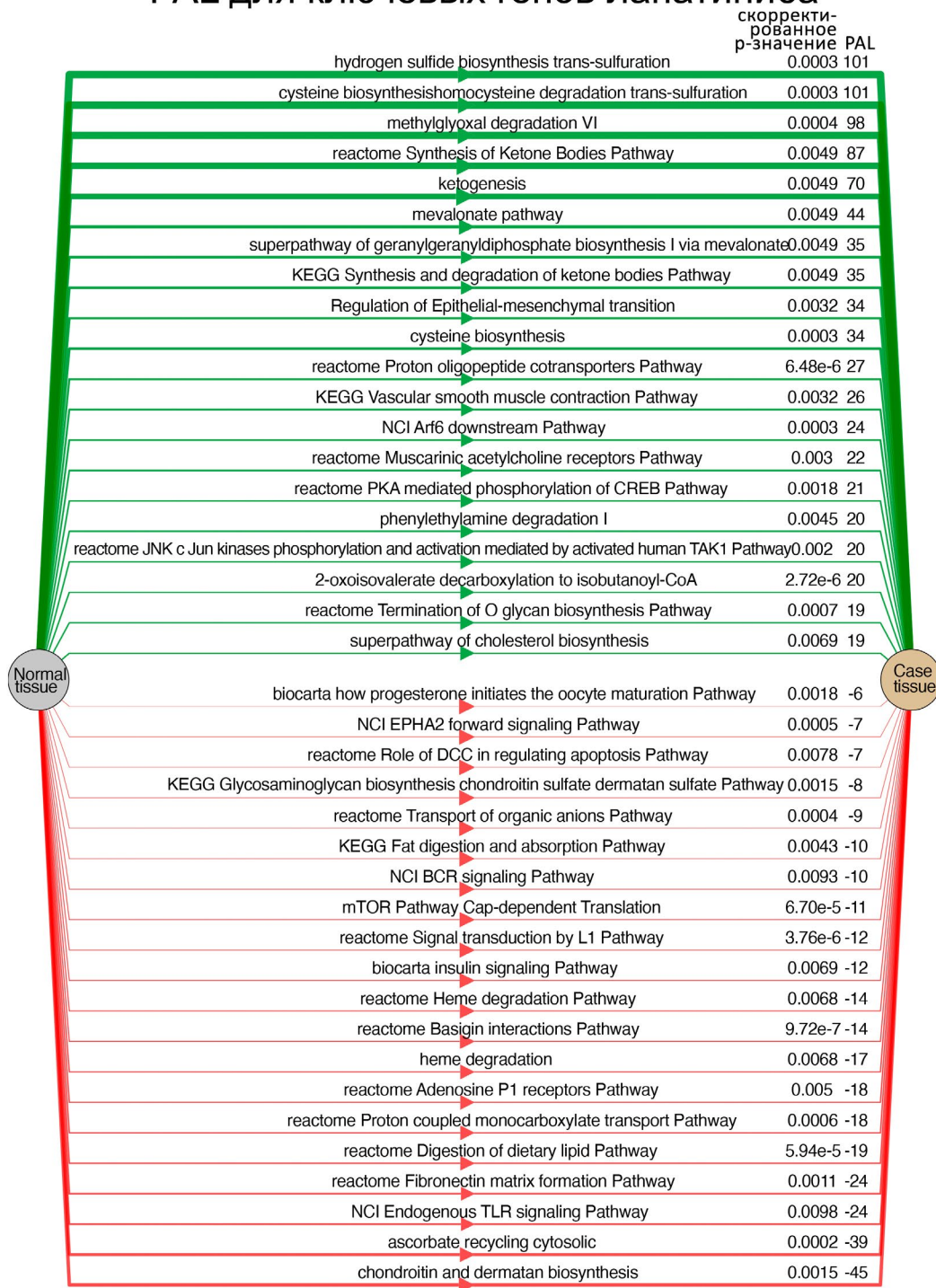


Рис. 10. 20 наиболее сильно активированных и ингибированных молекулярных путей, рассчитанных для набора ключевых генов лапатиниба (*lapatinib core*) в клетках SK-BR-3. Показаны значение PAL и скорректированное *p*-значение

мРНК, семафорин и активность тирозин/треониновой фосфатазы. Все они также были обогащены для положительно регулируемых генов из набора ключевых генов лапатиниба (рис. 9, б).

Затем мы рассчитали уровни активации путей (PAL) 3044 внутриклеточных молекулярных

путей человека и визуализировали результаты с помощью онлайн-инструмента OncoBoxPD [46]. Этот анализ выявил 663 пути, дифференциально регулируемых ($p < 0,01$) при обработке лапатинибом (идентифицированных с помощью 295 ДЭГ из набора ключевых генов лапатиниба), 20 путей

Сигнальный путь эндогенного TLR

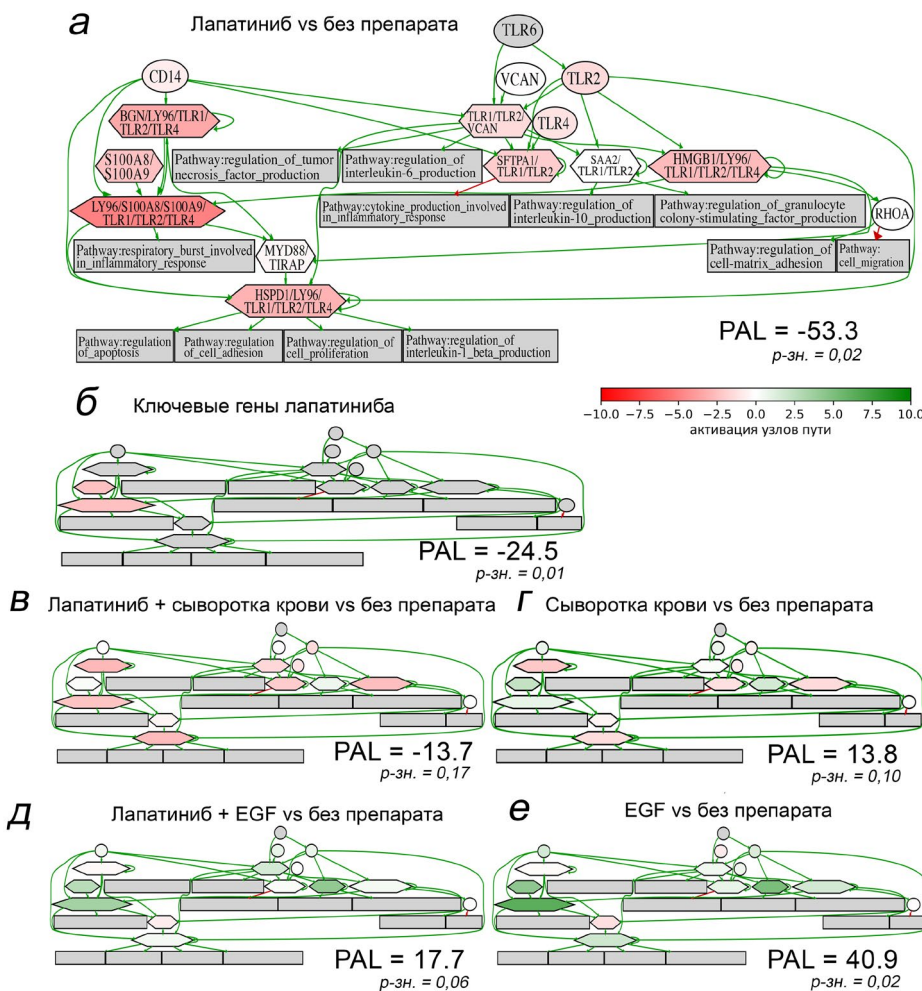


Рис. 11. Диаграмма активации сигнального пути *NCI Endogenous TLR signaling*, представленная в виде взаимодействующей сети. Активность компонентов пути по сравнению с образцом без препарата показана для: клеток, обработанных только лапатинибом (а); группы ключевых генов лапатиниба (*Lapatinib core genes*) (б); обработки только сывороткой крови человека (в), обработки сывороткой крови человека в комбинации с лапатинибом (г), обработки только EGF (д), обработки EGF в комбинации с лапатинибом (е). Уровень активации пути (PAL) указан для каждой группы ДЭГ по сравнению с условиями без препаратов. Зелёные/красные стрелки указывают на взаимодействия активации/ингибирования соответственно; интенсивность цвета транскрипционных узлов отражает степень активации узла (натуральный логарифм изменения экспрессии по генам для каждого узла, референсным значением считали среднее геометрическое между уровнями экспрессии во всех образцах в соответствующих группах). Зелёный цвет означает активацию, красный – ингибирование, белый – недифференциальную экспрессию, серый – отсутствие молекулярных данных

с наиболее значительно изменённой активностью показаны на рис. 10. Среди них наиболее сильно активируются пути, связанные с клеточным метаболизмом и регуляцией ЭМП. В условиях «лапатиниб + EGF» путь ЭМП, напротив, ингибировался и не изменялся при анализе ДЭГ в условиях «лапатиниб + сыворотка крови человека» (табл. S3 Приложения 3). Процесс ЭМП включает в себя нарушение межклеточной адгезии и клеточной полярности, глубокую перестройку цитоскелета и значительные изменения в адгезии клеток на матриксе [56, 63]. Следует отметить, что большинство GO-терминов, обогащённых для ДЭГ, негативно регулируются лапатинибом, были связаны с мем-

бранными компонентами или активностью мембранных транспортеров, в то время как GO-термины для позитивно регулируемых генов были в основном связаны с клеточной адгезией.

Ещё один путь – путь PKA-опосредованного фосфорилирования CREB (*PKA mediated phosphorylation of CREB*, база данных Reactome) – активирован только при обработке клеток лапатинибом (рис. 10, рис. S2 Приложения 1). Активность этого пути существенно не изменилась при анализе ДЭГ при обработке «лапатиниб + EGF» (p-значение 0,09) и была подавлена при анализе ДЭГ при обработке «лапатиниб + сыворотка крови человека». Циклический AMP (сAMP) регулирует транскрипцию

множества генов-мишеней в основном через механизм, опосредованный протеинкиназой A (PKA) и её нижележащими эффекторами, такими как белок, связывающий сAMP-реактивный элемент (CREB) [64, 65]. Путь сAMP-PKA-CREB также играет важную роль в развитии РМЖ и связан с резистентностью к трастузумабу при HER-2+ РМЖ [65].

Два наиболее сильно ингибированных лапатинибом пути относятся к клеточному метаболизму, тогда как третий ингибированный путь связан с TLR-сигнализацией. Напротив, при анализе ДЭГ в условиях «лапатиниб + EGF» этот путь имел умеренно повышенную активность. В условиях добавления лапатиниба и сыворотки крови человека активация этого пути не изменялась по сравнению с условиями без препарата. Toll-Подобные рецепторы (TLR) в основном экспрессируются в эпителиальных и иммунных клетках человека. Активация TLR, экспрессируемых в опухолевых клетках, может усиливать рост опухоли за счёт повышения про- и антиапоптотических сигналов, цитокинов, способствующих развитию опухоли, ангиогенеза и инвазивности [66, 67]. Нокаун гена TLR4 приводил к увеличению гибели клеток РМЖ [68], что согласуется с нашими наблюдениями.

Мы также обнаружили следующие пути, которые сильно ингибировались лапатинибом: *mTOR Pathway Cap-dependent Translation*, *DCC in regulating apoptosis Pathway* (DCC означает «deleted in colorectal cancer») и *EPHA2 forward signaling Pathway* (рис. S3, табл. S3 Приложения 1).

Добавление лапатиниба приводило к резкому снижению активации сигнального пути TLR (рис. 11, а). Однако это снижение сильно ослабевало при добавлении препарата в комбинации с сывороткой крови человека или с EGF (рис. 11, в, г). Анализ группы ключевых генов лапатиниба показал, что ингибирование узла TLR6 этого пути не связано с ингибированием роста клеток, в то время как ингибирование узла CD14, скорее всего, с ним связано. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что клетки, обработанные EGF или сывороткой крови человека, можно считать частично устойчивыми к обработке лапатинибом. В этих клетках узлы S100A8/S100A9 и LY96/S100A8/S100A9/TLR1/TLR2/TLR4 оказались активированы по сравнению с уровнем без препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прогнозирование ответа на лекарственную терапию – одна из важнейших задач в онкологии. Она требует углублённого изучения генетических, эпигенетических или транскриптомных маркеров, информативных для конкретной опухоли [69–74]. Кроме того, значение могут иметь не только внут-

ренние молекулярные свойства опухолей. В ряде исследований оценивалось разнообразие влияния компонентов сыворотки крови, что указывает на их важность для предварительного отбора пациентов, которые могли бы ответить на таргетную терапию [33, 75]. Однако такое влияние сыворотки крови человека ещё недостаточно изучено. Выяснение основных механизмов требует проведения комбинированных исследований с использованием моделей клеточных культур [38–40], образцов донорской крови человека и анализа молекулярных путей [49, 76–78].

В этом исследовании на примере HER2+ клеточной линии аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 мы продемонстрировали значительное влияние сыворотки крови человека на ингибирование роста клеток EGFR/HER2-таргетным препаратом лапатинибом. Для всех 14 образцов сыворотки крови, взятых у здоровых доноров, мы обнаружили сильное увеличение IC50 лапатиниба в 2,6–3,7 раза. Для EGFR-положительной клеточной линии A431 мы недавно показали, что эффективные концентрации EGFR-таргетных препаратов цетуксимаба и эрлотиниба увеличиваются в 5–25 раз при добавлении различных образцов сыворотки крови человека [42]. Таким образом, присутствие сыворотки крови человека может существенно изменить эффективность HER-таргетных препаратов, потенциально вызывая многократное изменение их IC50. Таким образом, при оценке противоопухолевой активности экспериментальных препаратов в ходе доклинических испытаний важно учитывать потенциальное влияние периферической крови человека на ингибирующую способность препарата.

Мы обнаружили, что добавленные по отдельности лапатиниб и EGF подавляют рост клеток SK-BR-3. Однако при их совместном добавлении ингибирование роста клеток исчезает из-за сильного антагонистического взаимодействия между EGF и лапатинибом. Этот вывод хорошо согласуется с нашими предыдущими результатами, где аналогичное антагонистическое взаимодействие было обнаружено для EGF в комбинации с одним из EGFR-таргетных препаратов, цетуксимабом и эрлотинибом, в EGFR+ клетках A431 [41, 61].

Концентрация EGF в сыворотке крови человека составляет ~0,3–1,7 нг/мл [59]. Для исследованных образцов мы получили схожие значения концентрации EGF (0,6–1,2 нг/мл) [41]. Для анализа скорости роста клеток мы использовали 5% сыворотки, поэтому концентрация эндогенного EGF в опытах не превышала 0,06 нг/мл. Эта концентрация намного меньше, чем 0,8–3 нг/мл рекомбинантного EGF, использованного в экспериментах. Мы пришли к выводу, что влияние сывороток на воздействие лапатиниба не может быть объяснено наличием эндогенного EGF в образцах сывороток крови человека.

В настоящем исследовании показано, что лапатиниб обычно ингибирует прогрессию клеточного цикла и вызывает остановку фазы G0/G1 в восприимчивых клетках, а также снижает долю клеток в S-фазе до незначительных значений (рис. 6).

Этот вывод согласуется с результатами предыдущего исследования, в котором было показано, что лапатиниб индуцирует арест G1-фазы в клеточных линиях SK-BR-3 и MDA-MB-453, сверхэкспрессирующих HER2, и что это сопровождается снижением доли клеток в S-фазе [79]. Кроме того, мы обнаружили, что сам по себе EGF не оказывает влияния на распределение клеток по фазам клеточного цикла, однако при добавлении лапатиниба доля клеток в G0/G1- и S-фазе смещалась обратно к уровню без препарата. Это также соответствует продолжению роста клеток в случае обработки «EGF + лапатиниб». Аналогично добавление сыворотки крови человека само по себе не оказывало влияния на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Однако в сочетании с лапатинибом сыворотка отменяла индуцированный им сдвиг доли клеток в фазе G0/G1 и восстанавливала долю клеток в S-фазе практически до уровня без препарата, что сопровождалось частичным восстановлением максимальной скорости роста клеток.

Секвенирование РНК выявило 308 ДЭГ в присутствии лапатиниба по сравнению с контролем. Примечательно, что 96% этих генов переставали быть дифференциально экспрессированными, когда к лапатинибу добавляли сыворотку крови человека. Таким образом, сыворотка крови человека не только восстанавливает скорость роста клеток при добавлении лапатиниба, но и восстанавливает экспрессию 96% (296) лапатиниб-специфичных ДЭГ. Аналогичная картина наблюдалась при добавлении EGF вместе с лапатинибом: только 4,2% (13) лапатиниб-специфичных ДЭГ оставались дифференциально регулируемы. Для 89% из них статус ДЭГ был утрачен, а для оставшихся 21 ДЭГ экспрессия изменилась в противоположном направлении.

Полученный набор ДЭГ, названных в данном исследовании ключевыми генами лапатиниба (*lapatinib core genes*), хорошо согласуется с результатами предыдущего исследования [80], в котором изучались изменения фосфорилирования белков и транскрипционной регуляции в клетках SK-BR-3 в ответ на лапатиниб. Среди 173 общих ДЭГ из этих двух исследований экспрессия 170 была изменена (показала повышение или понижение) в одном направлении, и только 3 – в противоположном. Недавно мы провели анализ РНК-секвенирования для EGFR-положительных клеток A431, обработанных EGFR-таргетным препаратом цетуксимабом в сочетании с сывороткой крови человека, и выявили ключевые ДЭГ цетуксимаба [61]. Сравнение этих двух исследований показывает,

что среди 45 ДЭГ, общих для обоих наборов, экспрессия 37 генов изменяется в одном направлении в наборах ключевых генов лапатиниба (SK-BR-3) и ключевых генов цетуксимаба (A431), а экспрессия 8 генов изменяется в противоположных направлениях. Аналогичным образом сравнение ключевых генов лапатиниба, рассматриваемых в данном исследовании, и выявленных ранее ключевых генов эрлотиниба [61] показало, что среди 52 ДЭГ, общих для обоих исследований, экспрессия 40 генов изменена в одном направлении, в то время как для 12 генов она изменена в противоположных направлениях. Эти сравнения демонстрируют соответствие между ДЭГ, специфичными для EGFR/HER2-таргетного препарата лапатиниба, выявленными в HER2-положительных клетках SK-BR-3, и ДЭГ, специфичными для EGFR-таргетных препаратов цетуксимаба и эрлотиниба, выявленными в EGFR-положительных клетках A431.

Можно отметить несколько возможных связей набора ключевых лекарственных-чувствительных генов с их молекулярными функциями. Среди ключевых генов лапатиниба, экспрессия которых повышается под действием лапатиниба и не повышается при обработке «EGF + лапатиниб» или «сыворотка крови человека + лапатиниб», отметим следующие.

Белки S100 участвуют в регуляции ряда клеточных процессов, таких как прогрессия клеточного цикла и дифференцировка. Продукты генов S100A8/A9 образуют гетеродимер, который запускает множество сигнальных путей, влияющих на состав микротрубочек, а также сложные процессы роста, метастазирования и лекарственной устойчивости рака. Он связан с такими рецепторами, как рецептор для передовых продуктов гликирования (RAGEs) и Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), и исследования клеточных культур показывают, что ингибирование S100A8 и S100A9 подавляло миграцию и инвазию [81, 82].

Продукт гена CDK18 может взаимодействовать с циклином A2 и циклином E, и белок CDK18 был предложен в качестве потенциальной мишени для противораковых препаратов [83]. Продукт гена SEMA3B (семафорин-3B) известен как ингибитор ангиогенеза и клеточной пролиферации, а также как супрессор опухолевого роста [84]. FABP5 кодирует один из представителей белков, связывающих жирные кислоты (FABPs). Сверхэкспрессия FABP5 наблюдается во многих типах опухолей и ассоциируется с плохим прогнозом в ряде таких типов [85]. Мы обнаружили, что в клетках, обработанных лапатинибом, повышается активность нескольких путей, связанных с метаболизмом кетонов. Белок PHLDB2 (Pleckstrin Homology Like Domain Family B Member 2), кодируемый геном PHLDB2, может функционировать как опухолевый

супрессор в РМЖ. Вклад PHLDB2 в метастазирование согласуется с его молекулярной функцией, заключающейся в содействии прикреплению микротрубочек к точкам фокальной адгезии, необходимым для клеточной подвижности [86].

Гены, дифференциальная экспрессия которых была понижена при обработке клеток только лапатинибом (что приводило к ингибированию роста клеток до 5% от уровня без препарата), но не снижалась при добавлении EGF или сыворотки крови человека в среду роста вместе с лапатинибом (что приводило к восстановлению роста клеток до 73 и 62% от уровня без препарата соответственно, рис. 8, а), могут быть связаны с изменением скорости роста клеток под действием препарата.

Мета-анализ показал, что высокий уровень мРНК гистоновой деацетилазы 9 (HDAC9) в РМЖ человека ассоциируется со снижением общей выживаемости у пациенток, получающих лечение тамоксифеном [87]. *CYP4B1* кодирует одну из изоформ цитохрома P450 (*CYP*). Сообщалось о связи между экспрессией *CYP* и риском развития рака, его прогрессированием, метастазированием и прогнозом [88]. *Gab2* принадлежит к семейству докинг-белков Grb-associated binder (*Gab*). *Gab2* необходим для сигнальных путей эпидермального фактора роста (EGF) и пролиферации клеток РМЖ. Коэкспрессия *GAB2* с *HER2* приводит к инвазивному фенотипу [89, 90]. Нокдаун *GAB2* снижает активность нисходящих путей *HER2* и уменьшает пролиферацию клеток *in vitro* [91].

Продукт гена *MUC1* – широко распространённый маркер рака, названный CA 15-3. Как и ожидалось, его экспрессия снижается (в 4,1 раза) при обработке лапатинибом и восстанавливается до уровня без лекарств, когда лапатиниб вводят вместе с сывороткой крови человека или с EGF. Аналогично экспрессия гена *CEA*, который кодирует онкологический маркер CEA Cell Adhesion Molecule 6, снижается (в 5,2 раза) при обработке лапатинибом. Оба гена относятся к GO-термину «апикальная плазматическая мембрана», обогащённому для ДЭГ, экспрессию которых снижает лапатиниб (рис. 9).

ABCC12 (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 12) – член суперсемейства транспортеров АТФ-связывающих кассет (ABC). Ген *ABCC12* имеет повышенную экспрессию в РМЖ [92]. Молекула адгезии клеток активированных лейкоцитов, кодируемая *ALCAM*, является членом суперсемейства иммуноглобулинов на клеточной поверхности. *ALCAM* имеет решающее значение для выживания клеток РМЖ. Нарушение экспрессии *ALCAM* связано с индукцией двух типов запрограммированной клеточной смерти – апоптоза и аутофагии – в клетках РМЖ [93]. При многофакторном анализе выживаемости без повторного заболевания высокая экспрессия цитоплазматического *ALCAM* и

узловая форма опухоли в карциномах молочной железы были достоверно связаны с более ранним прогрессированием заболевания [94].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что измерения эффективности противораковых препаратов на основе модельных клеточных культур могут давать ошибки, если препараты тестируются в среде роста, в отсутствие сыворотки крови человека. Более того, изменения в профилях экспрессии генов, вызванные обработкой препаратами, могут значительно отличаться в присутствии сыворотки крови человека. Таким образом, важно учитывать влияние сыворотки крови человека на эффективность лекарств в доклинических исследованиях, особенно если речь идёт о белках семейства HER.

Вклад авторов. Концептуализация – В.С., С.Д., А.Б., Д.К.; методология – Г.З., В.С., С.Д., М.С. (Мария Сунцова), М.С. (Максим Сорокин), А.Б., Д.К.; программное обеспечение – М.С. (Максим Сорокин) и А.Б.; валидация – Н.Ш. и Д.К.; формальный анализ – Н.Ш., М.Р., М.С. (Максим Сорокин), А.Б., Д.К.; исследование – Н.Ш., Д.К.; ресурсы – Г.З., В.С., С.Д.; курирование данных – Н.Ш., М.С. (Мария Сунцова), М.С. (Максим Сорокин), А.Б., Д.К.; написание: подготовка первоначального проекта рукописи – Н.Ш., А.Б., Д.К.; написание: рецензирование и редактирование – А.Б., Д.К.; визуализация – Н.Ш., М.Р.; наблюдение – А.Б., Д.К.; администрирование проекта – Н.Ш., А.Б.; получение финансирования – Г.З., М.С. (Мария Сунцова) и А.Б. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование. Вклад Марии Сунцовой и Антона Буздина был профинансирован Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» (грант № 075-15-2022-304). Финансирующие организации не принимали участия в разработке дизайна исследования, сборе, анализе и интерпретации данных, написании рукописи и принятии решения о публикации результатов.

Исследования клеточных культур были поддержаны грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-310 от 20 апреля 2022 г.).

Секвенирование РНК выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-75-10071.

Доступность данных. Данные РНК-секвенирования доступны по ссылке <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>, ID PRJNA1029741 (доступ получен 20/10/2023). Другие данные включены в рукопись и электронные дополнительные материалы.

Соблюдение этических норм. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской

декларацией и было одобрено Комитетом по этике клиники «Витамед» (Москва); дата одобрения: 19 января 2022 года. От всех пациентов, участвовавших в исследовании, было получено информированное согласие.

Конфликт интересов. М.С. (Максим Сорокин) и А.Б. имеют финансовые отношения с ООО «Онко-бокс», 121205 Москва, Россия. Работодатели не при-

нимали участия в разработке дизайна исследования, сборе, анализе и интерпретации данных, написании рукописи и принятии решения о публикации результатов. Остальные авторы не заявляют о конфликте интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *EMBO J.*, **19**, 3159-3167, <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3159>.
2. Holbro, T., and Hynes, N. E. (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 195-217, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440>.
3. Roskoski, R., Jr. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, *Pharmacol. Res.*, **79**, 34-74, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>.
4. Arienti, C., Pignatta, S., and Tessei, A. (2019) Epidermal growth factor receptor family and its role in gastric cancer, *Front. Oncol.*, **9**, 1308, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01308>.
5. Iqbal, N., and Iqbal, N. (2014) Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications, *Mol. Biol. Int.*, **2014**, 852748, <https://doi.org/10.1155/2014/852748>.
6. Komurasaki, T., Toyoda, H., Uchida, D., and Nemoto, N. (2002) Mechanism of growth promoting activity of epiregulin in primary cultures of rat hepatocytes, *Growth Factors*, **20**, 61-69, <https://doi.org/10.1080/08977190290024192>.
7. Yamaoka, T., Kusumoto, S., Ando, K., Ohba, M., and Ohmori, T. (2018) Receptor tyrosine kinase-targeted cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3491, <https://doi.org/10.3390/ijms19113491>.
8. Miricescu, D., Totan, A., Stanescu, S., II, Badoiu, S. C., Stefani, C., and Greabu, M. (2020) PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 173, <https://doi.org/10.3390/ijms22010173>.
9. Bragin, P. E., Mineev, K. S., Bocharova, O. V., Volynsky, P. E., Bocharov, E. V., and Arseniev, A. S. (2016) HER2 transmembrane domain dimerization coupled with self-association of membrane-embedded cytoplasmic juxtamembrane regions, *J. Mol. Biol.*, **428**, 52-61, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.007>.
10. Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities, *Eur. J. Cancer*, **37**, S3-S8, [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00230-1).
11. Shaban, N., Kamashev, D., Emelianova, A., and Buzdin, A. (2023) Targeted inhibitors of EGFR: structure, biology, biomarkers, and clinical applications, *Cells*, **13**, 47, <https://doi.org/10.3390/cells13010047>.
12. Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2001) The role of overexpressed HER2 in transformation, *Ann. Oncol.*, **12**, S9-S13, https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_1.s9.
13. Cai, X., Zhang, L., and Chen, S. (2022) Editorial: cancer treatment and early detection targeting HER receptors, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 940055, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.940055>.
14. Maadi, H., Nami, B., Tong, J., Li, G., and Wang, Z. (2018) The effects of trastuzumab on HER2-mediated cell signaling in CHO cells expressing human HER2, *BMC Cancer*, **18**, 238, <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4143-x>.
15. Peckys, D. B., Korf, U., and de Jonge, N. (2015) Local variations of HER2 dimerization in breast cancer cells discovered by correlative fluorescence and liquid electron microscopy, *Sci Adv*, **1**, e1500165, <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500165>.
16. Owens, M. A., Horten, B. C., and Da Silva, M. M. (2004) HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues, *Clin. Breast Cancer*, **5**, 63-69, <https://doi.org/10.3816/cbc.2004.n.011>.
17. Yuan, Y., Liu, X., Cai, Y., and Li, W. (2022) Lapatinib and lapatinib plus trastuzumab therapy versus trastuzumab therapy for HER2 positive breast cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis, *Syst. Rev.*, **11**, 264, <https://doi.org/10.1186/s13643-022-02134-9>.
18. Kim, H. P., Yoon, Y. K., Kim, J. W., Han, S. W., Hur, H. S., Park, J., Lee, J. H., Oh, D. Y., Im, S. A., Bang, Y. J., and Kim, T. Y. (2009) Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2, *PLoS One*, **4**, e5933, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005933>.
19. Gril, B., Palmieri, D., Bronder, J. L., Herring, J. M., Vega-Valle, E., Feigenbaum, L., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., Merino, M. J., Rubin, S. D., and Steeg, P. S. (2008) Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain, *J. Natl. Cancer Inst.*, **100**, 1092-1103, <https://doi.org/10.1093/jnci/djn216>.

20. Bilancia, D., Rosati, G., Dinota, A., Germano, D., Romano, R., and Manzione, L. (2007) Lapatinib in breast cancer, *Ann. Oncol.*, **18**, vi26-vi30, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm220>.
21. Figueroa-Magalhaes, M. C., Jelovac, D., Connolly, R., and Wolff, A. C. (2014) Treatment of HER2-positive breast cancer, *Breast*, **23**, 128-136, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011>.
22. Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C. S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I., Nitz, U., et al. (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1659-1672, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052306>.
23. Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M. C., Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendahmane, B., Tabah-Fisch, I., et al. (2011) Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer, *N. Engl. J. Med.*, **365**, 1273-1283, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910383>.
24. Vu, T., and Claret, F. X. (2012) Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer, *Front. Oncol.*, **2**, 62, <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00062>.
25. Wang, Z. H., Zheng, Z. Q., Jia, S. C., Liu, S. N., Xiao, X. F., Chen, G. Y., Liang, W. Q., and Lu, X. F. (2022) Trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer: mechanisms, emerging biomarkers and targeting agents, *Front. Oncol.*, **12**, 1006429, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1006429>.
26. Amir, E., Ocana, A., Seruga, B., Freedman, O., and Clemons, M. (2010) Lapatinib and HER2 status: results of a meta-analysis of randomized phase III trials in metastatic breast cancer, *Cancer Treat. Rev.*, **36**, 410-415, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.12.012>.
27. Kaufman, B., Trudeau, M., Awada, A., Blackwell, K., Bachelot, T., Salazar, V., DeSilvio, M., Westlund, R., Zaks, T., Spector, N., and Johnston, S. (2009) Lapatinib monotherapy in patients with HER2-overexpressing relapsed or refractory inflammatory breast cancer: final results and survival of the expanded HER2+ cohort in EGF103009, a phase II study, *Lancet Oncol.*, **10**, 581-588, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70087-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70087-7).
28. Gaibar, M., Beltran, L., Romero-Lorca, A., Fernandez-Santander, A., and Novillo, A. (2020) Somatic mutations in HER2 and implications for current treatment paradigms in HER2-positive breast cancer, *J. Oncol.*, **2020**, 6375956, <https://doi.org/10.1155/2020/6375956>.
29. Bao, S., Chen, Y., Yang, F., Sun, C., Yang, M., Li, W., Huang, X., Li, J., Wu, H., and Yin, Y. (2020) Screening and identification of key biomarkers in acquired lapatinib-resistant breast cancer, *Front. Pharmacol.*, **11**, 577150, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.577150>.
30. Havaleshko, D. M., Smith, S. C., Cho, H., Cheon, S., Owens, C. R., Lee, J. K., Liotta, L. A., Espina, V., Wulfkuhle, J. D., Petricoin, E. F., and Theodorescu, D. (2009) Comparison of global versus epidermal growth factor receptor pathway profiling for prediction of lapatinib sensitivity in bladder cancer, *Neoplasia*, **11**, 1185-1193, <https://doi.org/10.1593/neo.09898>.
31. Von der Heyde, S., Wagner, S., Czerny, A., Nietert, M., Ludewig, F., Salinas-Riester, G., Arlt, D., and Beissbarth, T. (2015) mRNA profiling reveals determinants of trastuzumab efficiency in HER2-positive breast cancer, *PLoS One*, **10**, e0117818, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117818>.
32. Triulzi, T., De Cecco, L., Sandri, M., Prat, A., Giussani, M., Paolini, B., Carcangiu, M. L., Canevari, S., Bottini, A., Balsari, A., Menard, S., Generali, D., Campiglio, M., Di Cosimo, S., and Tagliabue, E. (2015) Whole-transcriptome analysis links trastuzumab sensitivity of breast tumors to both HER2 dependence and immune cell infiltration, *Oncotarget*, **6**, 28173-28182, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4405>.
33. Taguchi, F., Solomon, B., Gregorc, V., Roder, H., Gray, R., Kasahara, K., Nishio, M., Brahmer, J., Spreafico, A., Ludovini, V., Massion, P. P., Dziadziuszko, R., Schiller, J., Grigorieva, J., Tsyypin, M., Hunsucker, S. W., Caprioli, R., Duncan, M. W., Hirsch, F. R., Bunn, P. A., Jr., and Carbone, D. P. (2007) Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study, *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**, 838-846, <https://doi.org/10.1093/jnci/djk195>.
34. Yang, T., Fu, Z., Zhang, Y., Wang, M., Mao, C., and Ge, W. (2020) Serum proteomics analysis of candidate predictive biomarker panel for the diagnosis of trastuzumab-based therapy resistant breast cancer, *Biomed. Pharmacother.*, **129**, 110465, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110465>.
35. Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., Murakami, H., Takeshima, Y., Inai, K., Nishimura, H., Tsuchiya, E., Kohno, N., and Nakamura, Y. (2005) Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers, *Cancer Res.*, **65**, 9176-9184, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1556>.
36. Tas, F., Karabulut, S., Serilmez, M., Ciftci, R., and Duranyildiz, D. (2014) Increased serum level of epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with poor progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **73**, 631-637, <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2396-x>.

37. Loupakis, F., Cremolini, C., Fioravanti, A., Orlandi, P., Salvatore, L., Masi, G., Schirripa, M., Di Desidero, T., Antonioti, C., Canu, B., Faviana, P., Sensi, E., Lupi, C., Fontanini, G., Basolo, F., Di Paolo, A., Danesi, R., Falcone, A., and Bocci, G. (2014) EGFR ligands as pharmacodynamic biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab and irinotecan, *Target Oncol.*, **9**, 205-214, <https://doi.org/10.1007/s11523-013-0284-7>.
38. Wilson, T. R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., Ribas, A., Li, J., Moffat, J., Sutherland, D. P., Koeppen, H., Merchant, M., Neve, R., and Settleman, J. (2012) Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors, *Nature*, **487**, 505-509, <https://doi.org/10.1038/nature11249>.
39. Claus, J., Patel, G., Autore, F., Colomba, A., Weitsman, G., Soliman, T. N., Roberts, S., Zanetti-Domingues, L. C., Hirsch, M., Collu, F., George, R., Ortiz-Zapater, E., Barber, P. R., Vojnovic, B., Yarden, Y., Martin-Fernandez, M. L., Cameron, A., Fraternali, F., Ng, T., and Parker, P. J. (2018) Inhibitor-induced HER2-HER3 heterodimerisation promotes proliferation through a novel dimer interface, *Elife*, **7**, e32271, <https://doi.org/10.7554/eLife.32271>.
40. Wang, X., Wong, J., Sevinsky, C. J., Kokabee, L., Khan, F., Sun, Y., and Conklin, D. S. (2016) Bruton's tyrosine kinase inhibitors prevent therapeutic escape in breast cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, **15**, 2198-2208, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0813>.
41. Kamashev, D., Sorokin, M., Kochergina, I., Drobyshev, A., Vladimirova, U., Zolotovskaia, M., Vorotnikov, I., Shaban, N., Raevskiy, M., Kuzmin, D., and Buzdin, A. (2021) Human blood serum can donor-specifically antagonize effects of EGFR-targeted drugs on squamous carcinoma cell growth, *Heliyon*, **7**, e06394, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06394>.
42. Kamashev, D., Shaban, N., Suntsova, M., Raevskiy, M., Efimov, V., Moisseev, A., Sorokin, M., and Buzdin, A. (2022) Human blood serum inhibits ductal carcinoma cells BT474 growth and modulates effect of HER2 inhibition, *Biomedicines*, **10**, 1914, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081914>.
43. Suntsova, M., Gaifullin, N., Allina, D., Reshetun, A., Li, X., Mendeleeva, L., Surin, V., Sergeeva, A., Spirin, P., Prasolov, V., Morgan, A., Garazha, A., Sorokin, M., and Buzdin, A. (2019) Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues, *Sci. Data*, **6**, 36, <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0043-4>.
44. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
45. Jung, S., Appleton, E., Ali, M., Church, G. M., and Del Sol, A. (2021) A computer-guided design tool to increase the efficiency of cellular conversions, *Nat. Commun.*, **12**, 1659, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21801-4>.
46. Zolotovskaia, M. A., Tkachev, V. S., Guryanova, A. A., Simonov, A. M., Raevskiy, M. M., Efimov, V. V., Wang, Y., Sekacheva, M. I., Garazha, A. V., Borisov, N. M., Kuzmin, D. V., Sorokin, M. I., and Buzdin, A. A. (2022) OncoboxPD: human 51 672 molecular pathways database with tools for activity calculating and visualization, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **20**, 2280-2291, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.05.006>.
47. Sorokin, M., Borisov, N., Kuzmin, D., Gudkov, A., Zolotovskaia, M., Garazha, A., and Buzdin, A. (2021) Algorithmic Annotation of functional roles for components of 3,044 human molecular pathways, *Front. Genet.*, **12**, 617059, <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.617059>.
48. Raevskiy, M., Sorokin, M., Zakharova, G., Tkachev, V., Borisov, N., Kuzmin, D., Kremenchutckaya, K., Gudkov, A., Kamashev, D., and Buzdin, A. (2022) Better agreement of human transcriptomic and proteomic cancer expression data at the molecular pathway activation level, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 2611, <https://doi.org/10.3390/ijms23052611>.
49. Borisov, N., Sorokin, M., Garazha, A., and Buzdin, A. (2020) Quantitation of molecular pathway activation using RNA sequencing data, *Methods Mol. Biol.*, **2063**, 189-206, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0138-9_15.
50. Henjes, F., Bender, C., von der Heyde, S., Braun, L., Mannsperger, H. A., Schmidt, C., Wiemann, S., Hasmann, M., Aulmann, S., Beissbarth, T., and Korf, U. (2012) Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs, *Oncogenesis*, **1**, e16, <https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.16>.
51. Conlon, N. T., Kooijman, J. J., van Gerwen, S. J. C., Mulder, W. R., Zaman, G. J. R., Diala, I., Eli, L. D., Lalani, A. S., Crown, J., and Collins, D. M. (2021) Comparative analysis of drug response and gene profiling of HER2-targeted tyrosine kinase inhibitors, *Br. J. Cancer*, **124**, 1249-1259, <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01257-x>.
52. Costantini, D. L., Bateman, K., McLarty, K., Vallis, K. A., and Reilly, R. M. (2008) Trastuzumab-resistant breast cancer cells remain sensitive to the auger electron-emitting radiotherapeutic agent ¹¹¹In-NLS-trastuzumab and are radiosensitized by methotrexate, *J. Nucl. Med.*, **49**, 1498-1505, <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.051771>.
53. Larson, J. S., Goodman, L. J., Tan, Y., Defazio-Eli, L., Paquet, A. C., Cook, J. W., Rivera, A., Frankson, K., Bose, J., Chen, L., Cheung, J., Shi, Y., Irwin, S., Kiss, L. D., Huang, W., Utter, S., Sherwood, T., Bates, M., Weidler, J., Parry, G., et al. (2010) Analytical validation of a highly quantitative, sensitive, accurate, and reproducible assay (HERmark) for the measurement of HER2 total protein and HER2 homodimers in FFPE breast cancer tumor specimens, *Patholog. Res. Int.*, **2010**, 814176, <https://doi.org/10.4061/2010/814176>.

54. Sims, J. D., Taguiam, J. M., Alonso-Valenteen, F., Markman, J., Agadjanian, H., Chu, D., Lubow, J., Abrol, R., Srinivas, D., Jain, A., Han, B., Qu, Y., Mirzadehgan, P., Hwang, J. Y., Rentsendorj, A., Chung, A., Lester, J., Karlan, B. Y., Gray, H. B., Gross, Z., et al. (2018) Resistance to receptor-blocking therapies primes tumors as targets for HER3-homing nanobiologics, *J. Control Release*, **271**, 127-138, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.024>.
55. Chang, Y., Park, K. H., Lee, J. E., and Han, K. C. (2018) Phosphoproteomic analysis reveals PAK2 as a therapeutic target for lapatinib resistance in HER2-positive breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **505**, 187-193, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.086>.
56. Yao, M., Shang, Y. Y., Zhou, Z. W., Yang, Y. X., Wu, Y. S., Guan, L. F., Wang, X. Y., Zhou, S. F., and Wei, X. (2017) The research on lapatinib in autophagy, cell cycle arrest and epithelial to mesenchymal transition via Wnt/ErK/PI3K-AKT signaling pathway in human cutaneous squamous cell carcinoma, *J. Cancer*, **8**, 220-226, <https://doi.org/10.7150/jca.16850>.
57. Abo-Zeid, M. A. M., Abo-Elfadl, M. T., and Gamal-Eldeen, A. M. (2019) Evaluation of lapatinib cytotoxicity and genotoxicity on MDA-MB-231 breast cancer cell line, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **71**, 103207, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103207>.
58. Chou, T. C. (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacol. Rev.*, **58**, 621-681, <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.
59. Lemos-Gonzalez, Y., Rodriguez-Berrocal, F. J., Cordero, O. J., Gomez, C., and Paez de la Cadena, M. (2007) Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma, *Br. J. Cancer*, **96**, 1569-1578, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603770>.
60. Fan, Z., Shang, B. Y., Lu, Y., Chou, J. L., and Mendelsohn, J. (1997) Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors, *Clin. Cancer Res.*, **3**, 1943-1948.
61. Kamashev, D., Shaban, N., Lebedev, T., Prassolov, V., Suntsova, M., Raevskiy, M., Gaifullin, N., Sekacheva, M., Garazha, A., Poddubskaya, E., Sorokin, M., and Buzdin, A. (2023) Human blood serum can diminish EGFR-targeted inhibition of squamous carcinoma cell growth through reactivation of MAPK and EGFR pathways, *Cells*, **12**, 2022, <https://doi.org/10.3390/cells12162022>.
62. Duhamel, S., Goyette, M. A., Thibault, M. P., Fillion, D., Gaboury, L., and Cote, J. F. (2018) The E3 ubiquitin ligase HectD1 suppresses EMT and metastasis by targeting the +TIP ACF7 for degradation, *Cell Rep.*, **22**, 1016-1030, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.096>.
63. Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2019) Non-redundant functions of EMT transcription factors, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 102-112, <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0196-y>.
64. Delghandi, M. P., Johannessen, M., and Moens, U. (2005) The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells, *Cell Signal.*, **17**, 1343-1351, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.02.003>.
65. Zhang, H., Kong, Q., Wang, J., Jiang, Y., and Hua, H. (2020) Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer, *Exp. Hematol. Oncol.*, **9**, 32, <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00191-1>.
66. Shcheblyakov, D. V., Logunov, D. Y., Tukhvatulin, A. I., Shmarov, M. M., Naroditsky, B. S., and Gintsburg, A. L. (2010) Toll-like receptors (TLRs): the role in tumor progression, *Acta Naturae*, **2**, 21-29, <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-3-21-29>.
67. Urban-Wojciuk, Z., Khan, M. M., Oyler, B. L., Fahraeus, R., Marek-Trzonkowska, N., Nita-Lazar, A., Hupp, T. R., and Goodlett, D. R. (2019) The role of TLRs in anti-cancer immunity and tumor rejection, *Front. Immunol.*, **10**, 2388, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02388>.
68. Yusuf, N. (2014) Toll-like receptor mediated regulation of breast cancer: a case of mixed blessings, *Front. Immunol.*, **5**, 224, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00224>.
69. Ganjoo, K. N., and Wakelee, H. (2007) Review of erlotinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer, *Biologics*, **1**, 335-346.
70. Hsu, H. C., Thiam, T. K., Lu, Y. J., Yeh, C. Y., Tsai, W. S., You, J. F., Hung, H. Y., Tsai, C. N., Hsu, A., Chen, H. C., Chen, S. J., and Yang, T. S. (2016) Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients, *Oncotarget*, **7**, 22257-22270, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8076>.
71. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Glusker, A., Aleshin, A., Poddubskaya, E., Sekacheva, M., Kim, E., Gaifullin, N., Giese, A., Seryakov, A., Rumiantsev, P., Moshkovskii, S., and Moiseev, A. (2020) RNA sequencing for research and diagnostics in clinical oncology, *Semin. Cancer Biol.*, **60**, 311-323, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.010>.
72. Kim, E. L., Sorokin, M., Kantelhardt, S. R., Kalasauskas, D., Sprang, B., Fauss, J., Ringel, F., Garazha, A., Albert, E., Gaifullin, N., Hartmann, C., Naumann, N., Bikar, S. E., Giese, A., and Buzdin, A. (2020) Intratumoral heterogeneity and longitudinal changes in gene expression predict differential drug sensitivity in newly diagnosed and recurrent glioblastoma, *Cancers (Basel)*, **12**, 520, <https://doi.org/10.3390/cancers12020520>.
73. Sorokin, M., Gorelyshev, A., Efimov, V., Zotova, E., Zolotovskaia, M., Rabushko, E., Kuzmin, D., Seryakov, A., Kamashev, D., Li, X., Poddubskaya, E., Suntsova, M., and Buzdin, A. (2021) RNA sequencing data for FFPE tumor blocks

- can be used for robust estimation of tumor mutation burden in individual biosamples, *Front. Oncol.*, **11**, 732644, <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.732644>.
74. Sorokin, M., Ignatev, K., Poddubskaya, E., Vladimirova, U., Gaifullin, N., Lantsov, D., Garazha, A., Allina, D., Suntsova, M., Barbara, V., and Buzdin, A. (2020) RNA sequencing in comparison to immunohistochemistry for measuring cancer biomarkers in breast cancer and lung cancer specimens, *Biomedicines*, **8**, 114, <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050114>.
 75. Yonesaka, K., Takegawa, N., Satoh, T., Ueda, H., Yoshida, T., Takeda, M., Shimizu, T., Chiba, Y., Okamoto, I., Nishio, K., Tamura, T., and Nakagawa, K. (2015) Combined analysis of plasma amphiregulin and heregulin predicts response to cetuximab in metastatic colorectal cancer, *PLoS One*, **10**, e0143132, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143132>.
 76. Zolotovskaia, M. A., Tkachev, V. S., Seryakov, A. P., Kuzmin, D. V., Kamashev, D. E., Sorokin, M. I., Roumiantsev, S. A., and Buzdin, A. A. (2020) Mutation enrichment and transcriptomic activation signatures of 419 molecular pathways in cancer, *Cancers (Basel)*, **12**, 271, <https://doi.org/10.3390/cancers12020271>.
 77. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Sekacheva, M., Kim, E., Zhukov, N., Wang, Y., Li, X., Kar, S., Hartmann, C., Samii, A., Giese, A., and Borisov, N. (2018) Molecular pathway activation - New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs, *Semin. Cancer Biol.*, **53**, 110-124, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.06.003>.
 78. Vladimirova, U., Rumiantsev, P., Zolotovskaia, M., Albert, E., Abrosimov, A., Slashchuk, K., Nikiforovich, P., Chukhacheva, O., Gaifullin, N., Suntsova, M., Zakharova, G., Glusker, A., Nikitin, D., Garazha, A., Li, X., Kamashev, D., Drobyshev, A., Kochergina-Nikitskaya, I., Sorokin, M., and Buzdin, A. (2021) DNA repair pathway activation features in follicular and papillary thyroid tumors, interrogated using 95 experimental RNA sequencing profiles, *Heliyon*, **7**, e06408, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06408>.
 79. Tang, L., Wang, Y., Strom, A., Gustafsson, J. A., and Guan, X. (2013) Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G(1) arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms, *Cell Cycle*, **12**, 2665-2674, <https://doi.org/10.4161/cc.25728>.
 80. Stuhlmiller, T. J., Miller, S. M., Zawistowski, J. S., Nakamura, K., Beltran, A. S., Duncan, J. S., Angus, S. P., Collins, K. A., Granger, D. A., Reuther, R. A., Graves, L. M., Gomez, S. M., Kuan, P. F., Parker, J. S., Chen, X., Sciaky, N., Carey, L. A., Earp, H. S., Jin, J., and Johnson, G. L. (2015) Inhibition of lapatinib-induced kinome reprogramming in ERBB2-positive breast cancer by targeting BET family bromodomains, *Cell Rep.*, **11**, 390-404, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.037>.
 81. Zhou, H., Zhao, C., Shao, R., Xu, Y., and Zhao, W. (2023) The functions and regulatory pathways of S100A8/A9 and its receptors in cancers, *Front. Pharmacol.*, **14**, 1187741, <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1187741>.
 82. Tanigawa, K., Tsukamoto, S., Koma, Y. I., Kitamura, Y., Urakami, S., Shimizu, M., Fujikawa, M., Kodama, T., Nishio, M., Shigeoka, M., Kakeji, Y., and Yokozaki, H. (2022) S100A8/A9 induced by interaction with macrophages in esophageal squamous cell carcinoma promotes the migration and invasion of cancer cells via Akt and p38 MAPK pathways, *Am. J. Pathol.*, **192**, 536-552, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.12.002>.
 83. Braams, E., and D'Angiolella, V. (2018) Keeping CDK18 in balance to prevent DNA replication stress in breast cancer, *Oncotarget*, **9**, 37610-37611, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26517>.
 84. Dziobek, K., Oplawski, M., Grabarek, B., Zmarzly, N., Januszyk, P., Adwent, I., Dabrus, D., Lesniak, E., Kielbasinski, R., Kieszkowski, P., and Boron, D. (2019) Expression of semaphorin 3B (SEMA3B) in various grades of endometrial cancer, *Med. Sci. Monit.*, **25**, 4569-4574, <https://doi.org/10.12659/MSM.916762>.
 85. Wang, J., Zhao, S., Sun, J., Wang, X., Guan, M., Yin, J., and Tang, B. (2023) Oncogenic role and potential regulatory mechanism of fatty acid binding protein 5 based on a pan-cancer analysis, *Sci. Rep.*, **13**, 4060, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30695-9>.
 86. Fuselier, T. T., and Lu, H. (2020) PHLD class proteins: a family of new players in the p53 network, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3543, <https://doi.org/10.3390/ijms21103543>.
 87. Linares, A., Assou, S., Lapierre, M., Thouennon, E., Duraffourd, C., Fromaget, C., Boulahtouf, A., Tian, G., Ji, J., Sahin, O., Badia, E., Boule, N., and Cavailles, V. (2019) Increased expression of the HDAC9 gene is associated with antiestrogen resistance of breast cancers, *Mol. Oncol.*, **13**, 1534-1547, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12505>.
 88. Luo, B., Yan, D., Yan, H., and Yuan, J. (2021) Cytochrome P450: Implications for human breast cancer, *Oncol. Lett.*, **22**, 548, <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12809>.
 89. Ding, C. B., Yu, W. N., Feng, J. H., and Luo, J. M. (2015) Structure and function of Gab2 and its role in cancer (review), *Mol. Med. Rep.*, **12**, 4007-4014, <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3951>.
 90. Bentires-Alj, M., Gil, S. G., Chan, R., Wang, Z. C., Wang, Y., Imanaka, N., Harris, L. N., Richardson, A., Neel, B. G., and Gu, H. (2006) A role for the scaffolding adapter GAB2 in breast cancer, *Nat. Med.*, **12**, 114-121, <https://doi.org/10.1038/nm1341>.
 91. Zhang, P., Chen, Y., Gong, M., Zhuang, Z., Wang, Y., Mu, L., Wang, T., Pan, J., Liu, Y., Xu, J., Liang, R., and Yuan, Y. (2018) Gab2 ablation reverses the stemness of HER2-overexpressing breast cancer cells, *Cell Physiol. Biochem.*, **50**, 52-65, <https://doi.org/10.1159/000493957>.

92. Bera, T. K., Iavarone, C., Kumar, V., Lee, S., Lee, B., and Pastan, I. (2002) MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6997-7002, <https://doi.org/10.1073/pnas.102187299>.
93. Jezierska, A., Matysiak, W., and Motyl, T. (2006) ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy, *Med. Sci. Monit.*, **12**, BR263-BR273.
94. Burkhardt, M., Mayordomo, E., Winzer, K. J., Fritzsche, F., Gansukh, T., Pahl, S., Weichert, W., Denkert, C., Guski, H., Diemel, M., and Kristiansen, G. (2006) Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer, *J. Clin. Pathol.*, **59**, 403-409, <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.028209>.

HUMAN BLOOD SERUM ANTAGONIZES EFFECTS OF EGFR/HER2-TARGETED DRUG LAPATINIB ON SQUAMOUS CARCINOMA SK-BR-3 CELL GROWTH AND GENE EXPRESSION

N. Shaban^{1,2,3}, M. Raevskiy⁴, G. Zakharova⁴, V. Shipunova^{1,2}, S. Deyev^{2,5},
M. Suntsova^{3,6}, M. Sorokin^{1,6,7}, A. Buzdin^{1,2,3,4}, and D. Kamashev^{2,3,6*}

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Russia*

² *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia; e-mail: dkamashev@gmail.com*

³ *The National Medical Research Center for Endocrinology, 117036 Moscow, Russia*

⁴ *World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *“Biomarker” Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia*

⁶ *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

⁷ *PathoBiology Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), 1200 Brussels, Belgium*

Lapatinib is a targeted therapeutic inhibiting HER2 and EGFR proteins. It is used for the therapy of HER2-positive breast cancer, although not all the patients respond on it. Using human blood serum samples from 14 female donors (separately taken or combined), we found that human blood serum dramatically abolishes lapatinib inhibition of growth of human breast squamous carcinoma SK-BR-3 cell line. This antagonism between lapatinib and human serum was connected with cancel of drug induced G1/S cell cycle transition arrest. RNA sequencing revealed 308 differentially expressed genes in the presence of lapatinib. Remarkably, when combined with lapatinib, human blood serum showed the capacity of restoring both the rate of cell growth, and the expression of 96.1% of genes that were altered by lapatinib treatment alone. EGF co-administration with lapatinib also restores the cell growth and cancels alteration of 95.8% of genes specific to lapatinib treatment of SK-BR-3 cells. Differential gene expression analysis also showed that in the presence of human serum or EGF, lapatinib was unable to inhibit Toll Like Receptor signaling pathway and alter expression of genes linked with Gene Ontology term of Focal adhesion.

Keywords: EGFR, Erbb2, HER-targeted cancer therapy, human blood serum, lapatinib, EGF, squamous cell carcinoma, SK-BR-3 cells, drug resistance, transcriptome profiling

СТРУКТУРНО- И КАТИОН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИЦИКЛИЧЕСКИХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ С NMDA-РЕЦЕПТОРОМ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2024 Д.А. Белинская*, Н.Н. Шестакова

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: d_belinskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023

После доработки 14.02.2024

Принята к публикации 15.02.2024

Известно, что некоторые трициклические антидепрессанты (ТЦА), включая амитриптилин (ATL), кломипрамин (CLO) и дезипрамин (DES), эффективны для купирования нейропатической боли. Ранее было установлено, что ATL, CLO и DES способны потенциал-зависимо блокировать трансмембранные глутаматные NMDA-рецепторы (NMDAR), играющие ключевую роль в патогенезе нейропатической боли. Несмотря на схожую структуру, ATL, CLO и DES взаимодействуют с NMDAR с разной эффективностью. Цель представленного исследования – методами компьютерного моделирования изучить связывание ATL, CLO и DES с NMDAR и выявить структурные особенности препаратов, определяющие их ингибиторную активность по отношению к NMDAR. Был проведен молекулярный докинг исследуемых ТЦА в канал NMDAR, методом молекулярной динамики (МД) рассчитаны конформационные изменения полученных комплексов в липидном бислое. Внутри канала NMDAR выявлен один сайт для связывания третичных аминов ATL и CLO (верхний) и два сайта для вторичного амина DES (верхний и нижний), расположенных вдоль оси канала на разном расстоянии от внеклеточной стороны мембраны. Методом МД установлено, что положение DES в нижнем сайте стабилизируется только в присутствии катиона натрия внутри канала NMDAR. За счет одновременного взаимодействия двух атомов водорода своей катионной группы с аминокислотными остатками аспарагина в ионной поре DES прочнее связывается с NMDAR, по сравнению с ATL и CLO, чем могут быть обусловлены его более сильные побочные эффекты. Выдвинуто предположение, что ATL менее эффективно связывается с NMDAR, по сравнению с DES и CLO, из-за меньшей конформационной подвижности. Выявленные особенности структурно- и катион-зависимого механизма взаимодействия ТЦА с NMDAR помогут дальнейшей разработке эффективной и безопасной противоболевой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трициклические антидепрессанты, нейропатическая боль, NMDA-рецептор, молекулярный докинг, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0320972524030073 EDN: WKAEPJ

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что некоторые трициклические антидепрессанты (ТЦА) эффективны для управления синдромом нейропатической боли, и их назначают в качестве первой линии противобо-

вой терапии [1, 2]. ТЦА могут взаимодействовать с несколькими молекулярными мишенями в центральной и периферической нервных системах: натриевыми [3], кальциевыми [4, 5], калиевыми каналами [6], адренорецепторами [7, 8], опиоидными [9, 10] и серотониновыми рецепторами [11].

Принятые сокращения: ЛПП – лекарственные психотропные препараты; МД – молекулярная динамика; МК-801 – дизоцилин; ТЦА – трициклические антидепрессанты; ATL – амитриптилин; CLO – кломипрамин; DES – дезипрамин; E_{LJ-SR} и $E_{COUL-SR}$ – энергии ван-дер-ваальсовых сил и кулоновских взаимодействий, рассчитанных для близких контактов между атомами; NCX – натрий-кальциевый обменник; NMDAR – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат; RMSD – среднеквадратичные отклонения атомов от их начального положения.

* Адресат для корреспонденции.

Благодаря этой особенности они обладают плейотропным действием, но при этом и широким спектром побочных эффектов [12]. Весомый вклад в фармакологический профиль ТЦА вносит их способность ингибировать глутаматные NMDA-рецепторы (NMDAR) [13–15], играющие ключевую роль в патогенезе нейропатического болевого синдрома. Ранее методом локальной фиксации потенциала нашей научной группой было показано, что ТЦА амитриптилин (ATL), кломипрамин (CLO) и дезипрамин (DES) способны магни- и потенциал-зависимо блокировать NMDAR [16, 17]. Согласно клиническим данным, эти препараты эффективны для управления синдромом хронической нейропатической боли [18]. Несмотря на схожую структуру, ATL, CLO и DES взаимодействуют с NMDAR с разной эффективностью [16, 17], а также различаются по своей противоболевой эффективности и силе побочных эффектов. Цель представленного исследования – методами компьютерного моделирования изучить связывание ATL, CLO и DES с NMDAR, определить вклад различных взаимодействий в этот процесс, сопоставить результат вычислительных экспериментов с известными экспериментальными данными и выявить структурные особенности препаратов, определяющих их антиглутаматергическую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка трехмерных моделей. Трехмерные модели исследованных ТЦА строили и оптимизировали методом минимизации энергии в вакууме с помощью программного пакета Avogadro v1.2.0 [19]. Ациклические атомы азота препаратов принимали протонированными. NMDAR расположен в плазматической мембране и представляет собой тетрамер, в состав которого входят две субъединицы GluN1 и две субъединицы GluN2 (2A, 2B или 2C) [20]. Каждая субъединица состоит из трех доменов: внеклеточный терминальный домен (amino terminal domain, ATD), внеклеточный лиганд-связывающий домен (ligand binding domain, LBD) и трансмембранный домен (transmembrane domain, TBD). На момент написания представленной статьи в базе данных белковых структур (protein databank, PDB) были доступны несколько трехмерных структур тетрамеров NMDAR различных организмов (человек, крыса, африканская лягушка *Xenopus laevis*). При выборе структуры для вычислительных экспериментов мы руководствовались следующими принципами. Во-первых, желательно, чтобы тетрамер NMDAR состоял из субъединиц GluN1 и GluN2B, поскольку именно такой субъединичный состав соответствует экспериментам *in vitro* на первичной культуре

кортикальных нейронов крыс [17, 21]. Во-вторых, в качестве возможных моделей рецептора для вычислительного эксперимента мы отбирали комплексы NMDAR с канальными блокаторами, близкими по структуре к исследуемым ТЦА. Так, наибольший интерес с этой точки зрения представляли комплекс NMDAR африканской лягушки *X. laevis* с блокатором ионного канала дизоципином (МК-801), код 5UN1 [22], и комплекс NMDAR крысы с блокатором мемантином, код 7SAD [23]. Из этих двух структур мы выбрали первую, поскольку, во-первых, она была получена с лучшим разрешением (3,6 Å против 3,96 Å), а, во-вторых, МК-801 содержит в своей структуре такую же трициклическую группу, что и исследуемые ТЦА. Таким образом, в качестве трехмерной модели NMDAR мы использовали структуру 5UN1, полученную методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [22], цепи A, B, C и D. В состав этой структуры входят две субъединицы GluN1 (цепи A и C) и две субъединицы GluN2B (цепи B и D) без терминального домена. Здесь и далее нумерация аминокислот соответствует первичной последовательности рецептора, представленной в базе данных UniProt [24]: код A0A1L8F5J9 – для субъединицы GluN1; код A7XY94 – для субъединицы GluN2B. Для моделирования оставили только фрагменты субъединиц рецептора, образующих пору канала: аминокислоты 600–655 субъединиц GluN1 и аминокислоты 598–653 субъединиц GluN2B. С помощью онлайн-сервиса Clustal Omega [25] было проведено выравнивание первичных последовательностей этих фрагментов NMDAR африканской лягушки, крысы и человека, которое показало, что они полностью идентичны (рис. П1, а в Приложении). Поэтому данные, полученные в представленной работе на NMDAR *X. laevis* можно экстраполировать на крысу и человека. Графическое изображение фрагмента NMDAR, используемого для вычислений, представлено на рис. П1, б в Приложении. Недостающие атомы, не «увиденные» методом РСА, добавили с помощью программного пакета VMD v1.9.4a53 [26], затем модель оптимизировали методом минимизации энергии в вакууме с использованием программы NAMD v2.13 [27].

Молекулярный докинг. Подготовленные 3D-модели NMDAR и лигандов использовали для процедуры молекулярного докинга ATL, DES и CLO в пору канала рецептора. Молекулярный докинг проводили с помощью онлайн-версии программы Rosetta [28], алгоритм которой позволяет варьировать конформацию лиганда и конформации аминокислот сайта связывания (гибкий докинг). Для того чтобы охватить все пространство поры канала и не упустить возможные конформации лиганда на границе областей поиска, для каждого лиганда процедуру докинга проводили трижды.

В первом запуске центром области поиска задавали координаты атома азота молекулы МК-801 в структуре 5UN1, во втором запуске – точку, расположенную на 7 Å глубже в поре канала NMDAR (на 7 Å ближе к внутриклеточной стороне мембраны), в третьем запуске – точку, расположенную на 14 Å глубже в поре канала NMDAR (на 14 Å ближе к внутриклеточной стороне мембраны). Радиус области поиска задавали равным 7 Å, для остальных параметров использовали значения по умолчанию. Для каждого запуска процедуры молекулярного докинга число генерируемых возможных конформаций комплекса рецептор–лиганд принимали равным 200. Сгенерированные конформации ранжировали по величине энергии взаимодействия. Для дальнейшего исследования комплексов методом молекулярной динамики (МД) выбирали самые энергетически выгодные конформации.

Молекулярная динамика в липидном бислое. Полученные методом молекулярного докинга комплексы ТЦА с NMDAR с помощью онлайн-сервиса CHARMM-GUI Membrane Builder [29] виртуально встраивали в липидный бислой размером 80 × 80 Å, состоящий из молекул 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC). Общее количество молекул POPC составило 156 (83 – в верхнем липидном слое и 73 – в нижнем). Затем к системе виртуально добавили растворитель (воду), толщину слоя воды над и под мембраной задавали равной 15 Å. На заключительном этапе для нейтрализации заряда к системе добавили ионы натрия и хлора, концентрацию NaCl задавали равной 0,15 М. Полученная система на примере комплекса ATL–NMDAR графически изображена на рис. П1, в Приложении. Конформационные изменения комплексов NMDAR с лигандами рассчитывали методом МД с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. Использовали программный пакет GROMACS 2019.4 [30] и силовое поле CHARMM36m [31]. Систему, сконструированную с помощью CHARMM-GUI Membrane Builder, оптимизировали методом минимизации энергии и подвергали поэтапной релаксации с постепенным ослаблением ограничений, наложенных на движение атомов. Общая длительность релаксации составила 39 нс. Затем конформационные изменения системы моделировали методом МД без ограничений, длина каждой симуляции составила 100 нс с шагом интегрирования 0,002 пс. В расчетном эксперименте поддерживали постоянную температуру 303 К и постоянное давления 1 бар с помощью термостата V-rescale [32] и баростата Паринелло–Рамана [33]. При межатомном расстоянии больше 1,2 нм кулоновскими взаимодействиями и ван-дер-ваальсовыми силами ме-

жду атомами пренебрегали. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [34]. Длины связей в молекулах NMDAR и лигандов поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [35].

Расчет энергетических характеристик взаимодействия между ТЦА и NMDAR. По траекториям МД была рассчитана зависимость от времени параметров E_{LJ-SR} и $E_{COUL-SR}$. Эти характеристики представляют собой энергии ван-дер-ваальсовых сил (потенциал Леннарда-Джонса, LJ) и кулоновских (Coulomb) взаимодействий соответственно, рассчитанных для близких контактов (Short-Range) между атомами ТЦА и NMDAR, а именно для тех пар атомов белка и лиганда, расстояние между которыми не превышает 1,2 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярный докинг ТЦА в ионную пору NMDAR. На первом этапе был проведен молекулярный докинг ATL, DES и CLO (рис. 1, а) в ионную пору канала NMDAR.

В случае ATL и CLO процедура молекулярного докинга выявила только одно возможное место связывания этих препаратов внутри NMDAR (рис. 1, б и в). В этом сайте трициклические группы препаратов связываются в окружении аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и аминокислот Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B, а атом водорода катионной группы ATL и CLO образует водородную связь с атомом кислорода бокового радикала (Oδ1) аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B.

Согласно полученным данным, DES может связываться внутри NMDAR в двух сайтах, расположенных на оси канала рецептора на разном расстоянии от внеклеточной и внутриклеточной сторон плазматической мембраны (рис. 1, г и д). Первый (верхний) сайт соответствует сайту связывания ATL и CLO. В верхнем сайте трициклическая группа DES связывается в окружении аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и аминокислот Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 1, г). Один из атомов водорода катионной группы DES образует водородную связь (отмечена пунктирной линией) с атомом кислорода Oδ1 бокового радикала аспарагина Asn612 субъединицы GluN2B (рис. 1, г). Во втором (нижнем) сайте (рис. 1, д) азот трициклической группы DES расположен на том же уровне, на котором расположена катионная группа в верхнем положении, а именно в окружении боковых радикалов аспарагинов Asn612 субъединиц GluN2B. В нижнем сайте трициклическая группа DES взаимодействует с Val642 и Leu640, но не с треонинами Thr646

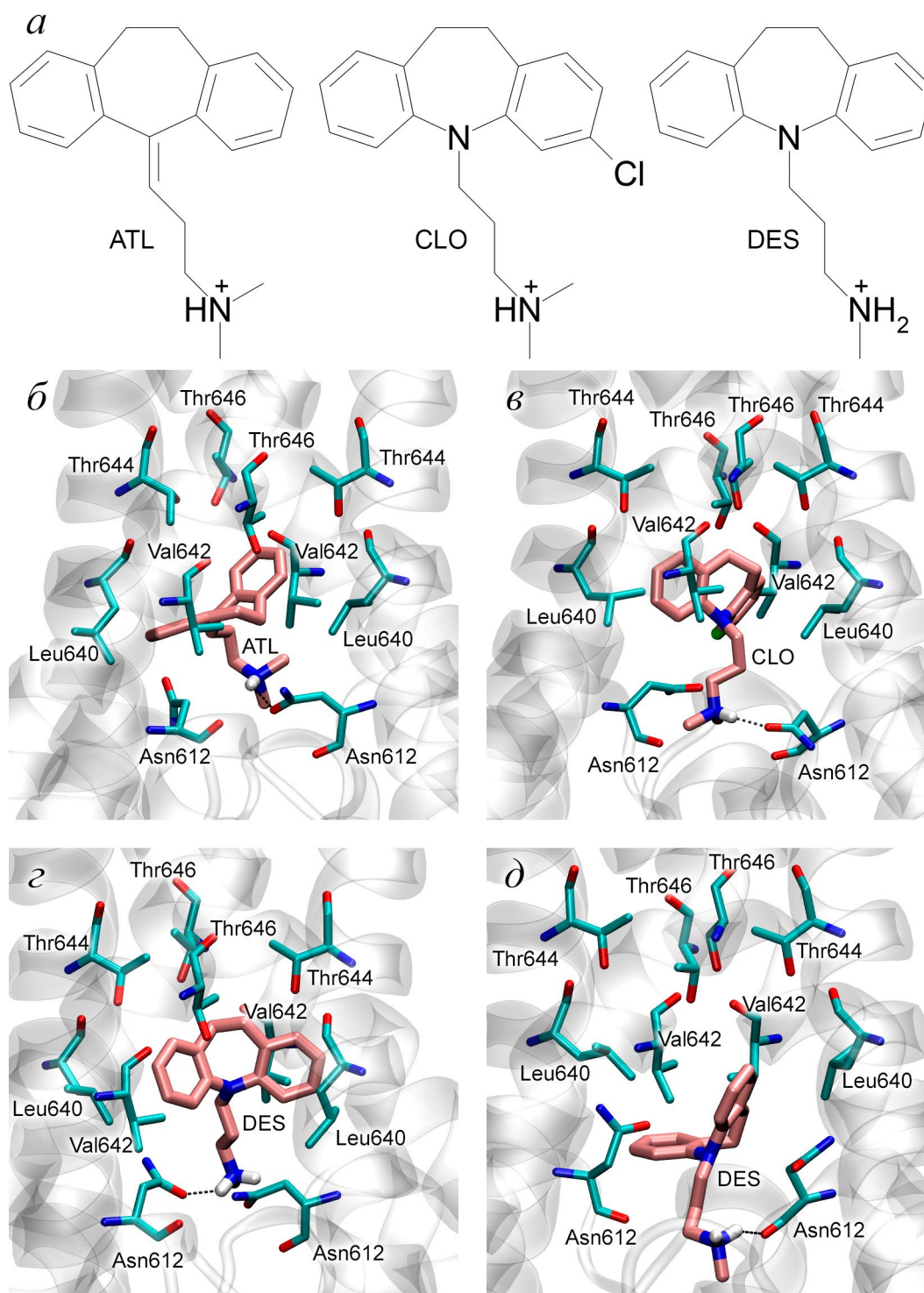


Рис. 1. Сaitы связывания ТЦА с NMDAR (по данным молекулярного докинга). *a* – Структуры исследуемых веществ; *b* – единственный (верхний) сайт связывания ATL; *c* – единственный (верхний) сайт связывания CLO; *z* – верхний сайт связывания DES; *д* – нижний сайт связывания DES. Ключевые взаимодействия отмечены пунктирными линиями. Неполарные водороды не показаны для четкости рисунка

и Thr644; один из водородов катионной группы DES образует водородную связь (отмечена пунктирной линией) с атомом кислорода остова Asn612 субъединицы GluN2B.

Таким образом, методом молекулярного докинга мы выявили сaitы связывания ТЦА

в ионной поре NMDAR и установили, что DES (и только DES) может связываться в сaйте, расположенном глубже в ионной поре, ближе к внутриклеточной стороне плазматической мембраны.

Молекулярная динамика комплексов NMDAR с ТЦА. Конформационные изменения полученных

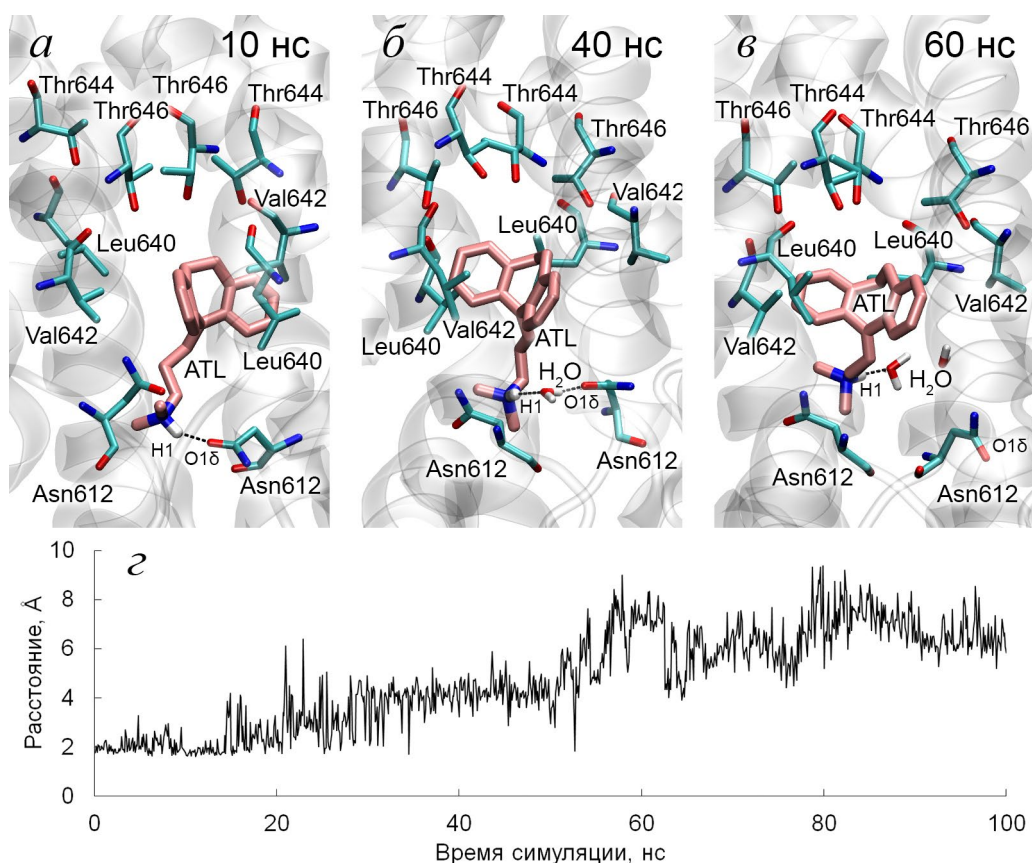


Рис. 2. Взаимодействие амитриптилина (ATL) с NMDAR (по данным МД). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. *a* – Положение молекулы ATL в сайте после 10 нс симуляции; *б* – положение молекулы ATL в сайте после 40 нс симуляции; *в* – положение молекулы ATL в сайте после 60 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H1 катионной группы ATL и атомом кислорода O18 бокового радикала Asn612 одной из субъединиц GluN2B (distH1–O18)

комплексов NMDAR с ТЦА были изучены методом МД в липидном бислое. Подготовка системы рецептор/лиганд/мембрана/растворитель подробно описана в разделе «Материалы и методы». Конформационные изменения сайта связывания и движение молекул ТЦА внутри NMDAR были проинспектированы визуально. Дополнительно, по полученным траекториям была рассчитана зависимость от времени среднеквадратичных отклонений (root mean square deviation, RMSD) атомов молекулы ТЦА и α -атомов молекулы NMDAR от их начального положения. Также для конформационного анализа по полученным траекториям была рассчитана зависимость от времени расстояний между функционально значимыми атомами.

Амитриптилин. Визуальная инспекция конформационных изменений комплекса показала, что в течение симуляции молекула ATL меняет свое положение внутри ионной поры. Значение RMSD ATL в течение симуляции возрастает до 1,5 Å (рис. П2 в Приложении), что подтверждает заметное изменение положения молекулы лиганда в сайте связывания. Значение RMSD α -атомов NMDAR увеличивается в течение первых 5 нс

симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 2–3 Å (рис. П2 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса ATL с NMDAR представлен на рис. 2.

Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1, а также Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 2, *a–в*). На протяжении первых 20 нс симуляции атом водорода катионной группы ATL образует стабильную водородную связь с атомом кислорода O18 бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 2, *a*), расстояние между атомами составляет около 2 Å (рис. 2, *г*). В период 20–50 нс ATL взаимодействует с Asn612 через молекулу воды (рис. 2, *б*), расстояние между атомами составляет примерно 4 Å (рис. 2, *г*). Затем атомы отдаляются друг от друга (рис. 2, *в* и *г*), ATL и Asn612 теряют связь и не взаимодействуют даже через воду.

В нашей предыдущей работе мы моделировали взаимодействие ATL–NMDAR с помощью других

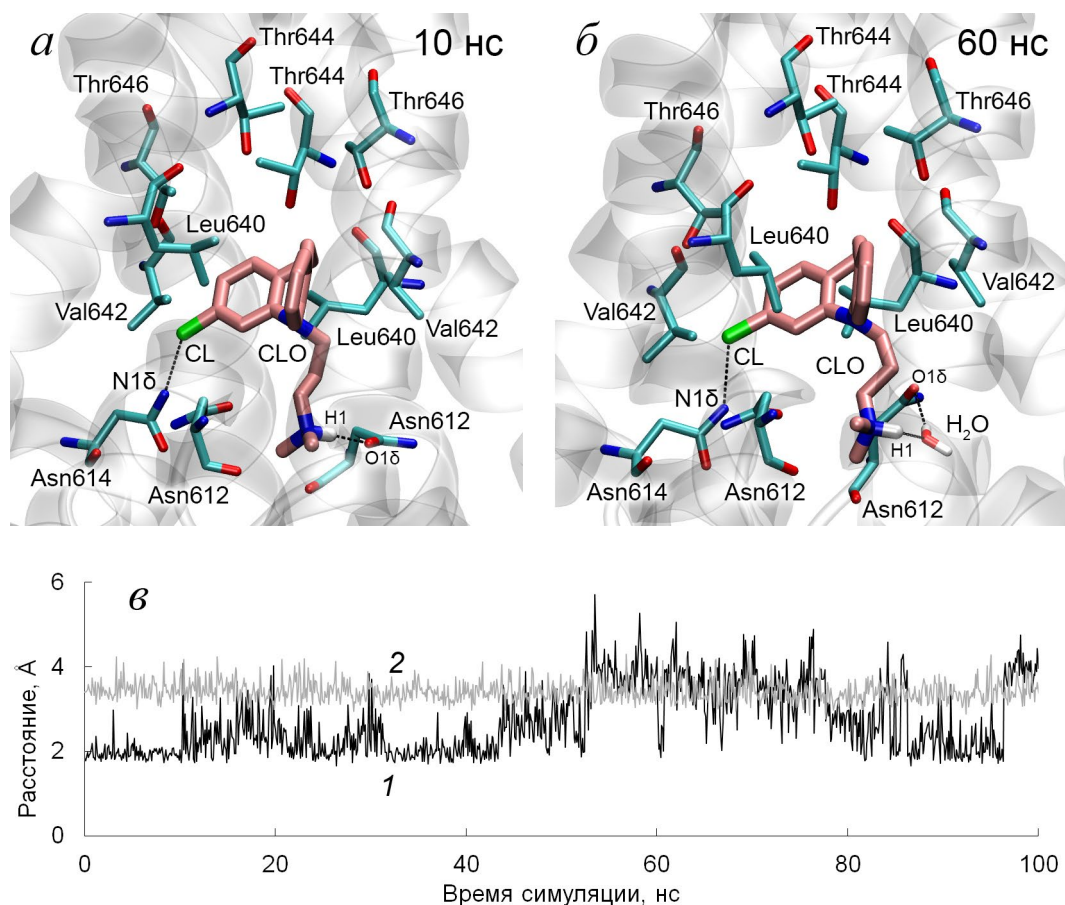


Рис. 3. Взаимодействие CLO с NMDAR (по данным МД). *а* – Положение молекулы CLO в сайте после 10 нс симуляции; *б* – положение молекулы CLO в сайте после 60 нс симуляции; *в* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H1 катионной группы CLO и атомом кислорода O18 бокового радикала Asn612 одной из субъединиц GluN2B (distH1–O18, отмечено цифрой 1) и расстояния между атомом хлора лиганда и атомом азота N18 бокового радикала Asn614 одной из субъединиц GluN1 (distCL–N18, отмечено цифрой 2). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

программ для молекулярного докинга и молекулярной динамики (Autodock Vina 1.1.2 и NAMD) и получили схожий результат [21]. В работе 2019 года мы проверили стабильность комплекса NMDAR–ATL с помощью короткой симуляции (длительной 2 нс) методом МД и выявили, что катионная группа ATL взаимодействует с боковым радикалом аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B. В представленном исследовании мы моделировали конформационное поведение ATL в ионной поре NMDAR в течение 100 нс, что позволило более детально изучить конформационную подвижность ATL внутри NMDAR.

Кломипрамин. Согласно визуальной инспекции, положение молекулы CLO внутри канала NMDAR стабильно на протяжении 100 нс. Значение RMSD CLO также возрастает в течение первых 5 нс симуляции, затем выходит на плато и колеблется в диапазоне 0,3–0,5 Å (рис. ПЗ в Приложении), что также указывает на стабильное положение молекулы CLO в сайте связывания. Значение RMSD α -атомов NMDAR увеличивается в течение

первых 5 нс симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 2–2,5 Å (рис. ПЗ в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса CLO с NMDAR представлен на рис. 3. Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1, а также Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 3, *а* и *б*). На протяжении симуляции атом водорода H1 катионной группы CLO либо образует стабильную водородную связь с атомом кислорода O18 бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 3, *а*; периоды симуляции 0–50 и 80–95 нс на рис. 3, *в*), либо взаимодействует с Asn612 через молекулу воды (рис. 3, *б*; периоды симуляции 50–80 и 95–100 нс на рис. 3, *в*). Атом хлора на протяжении всей симуляции держится вблизи атома азота N18 бокового радикала Asn614 одной из субъединиц GluN1 (рис. 3, *а–в*), среднее расстояние между

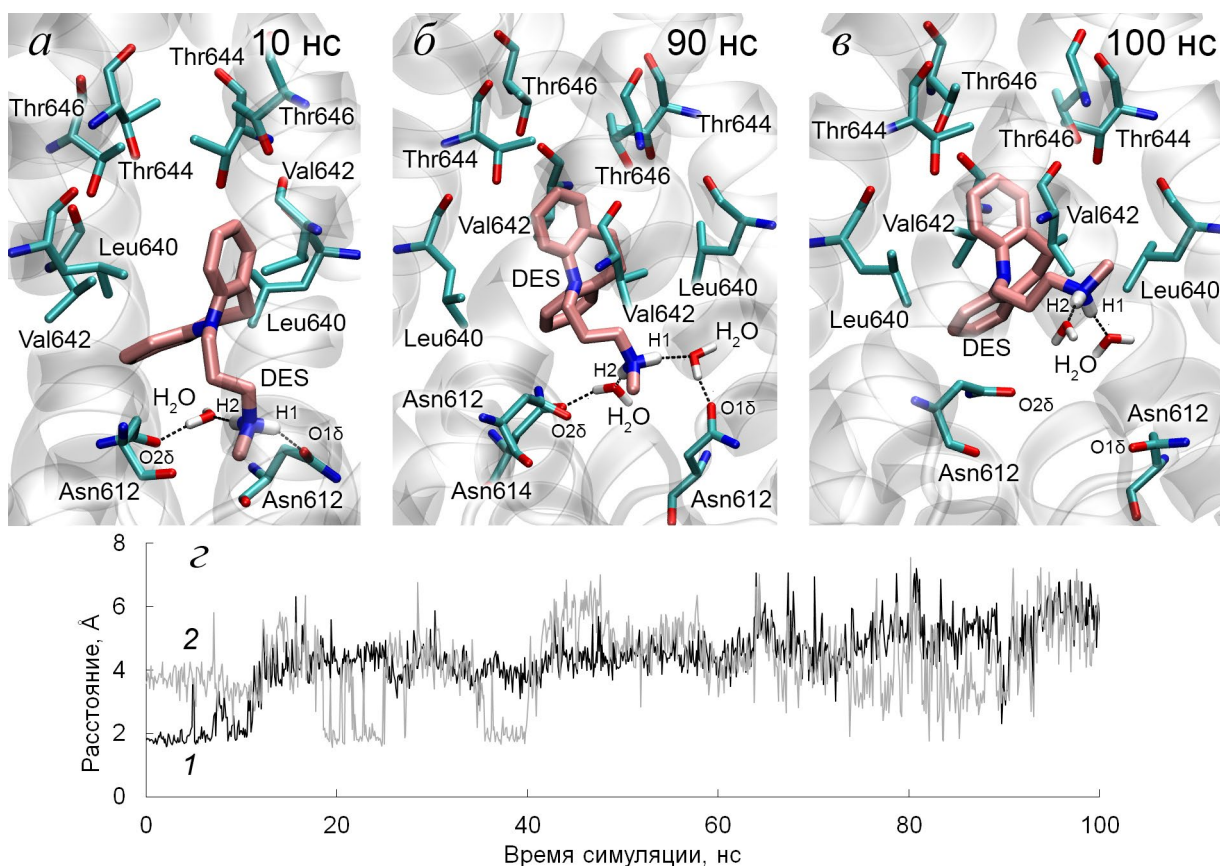


Рис. 4. Взаимодействие DES с верхним сайтом NMDAR (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в сайте после 10 нс симуляции; *б* – положение молекулы DES в сайте после 90 нс симуляции; *в* – положение молекулы DES в сайте после 100 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомами водорода H1 и H2 катионной группы DES и атомами кислорода O18 и O28 боковых радикалов Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O18 и distH2–O28, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

этим атомами составляет 3,4 Å. По всей видимости, в данном случае между хлором и азотом образуется галогенная связь, максимальное расстояние для ее образования составляет 3,6 Å [36]. Интересно отметить, что атом азота трициклической группы не образует никаких близких контактов ни с окружающими аминокислотами, ни с молекулами воды.

Дезипрамин в верхнем сайте. Визуальная инспекция конформационных изменений комплекса показала, что положение молекулы DES в верхнем лиганд-связывающем сайте NMDAR менее стабильно по сравнению с CLO. Значение RMSD DES в течение симуляции возрастает до 1,5 Å (рис. П4 в Приложении), что указывает на изменение положения молекулы лиганда в процессе симуляции. Значение RMSD Ca-атомов NMDAR увеличивается в течение первых 10 нс симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 2–2,5 Å (рис. П4 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса DES с верхним сайтом NMDAR представлен на рис. 4.

Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 и Thr646 субъединиц GluN1 и Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 4, *а–в*). В промежутках 0–10, 20–25 и 35–40 нс один из атомов водорода (H1) катионной группы DES образует стабильную водородную связь с атомом кислорода O18 бокового радикала аспарагина Asn612 одной из субъединиц GluN2B, одновременно с этим второй атом водорода (H2) катионной группы связан с атомом кислорода O28 бокового радикала аспарагина Asn612 второй субъединицы GluN2B (рис. 4, *а* и *г*). В остальное время оба атома водорода катионной группы DES взаимодействуют с окружающими аминокислотами через одну молекулу воды (рис. 4, *б* и *г*). И лишь после 90 нс симуляции катионная группа теряет связь с аспарагинами ионной поры и не взаимодействует с ними даже через воду (рис. 4, *в* и *г*).

Дезипрамин в нижнем сайте. Положение молекулы DES в нижнем сайте NMDAR также нестабильно. Значение RMSD DES в течение симуляции

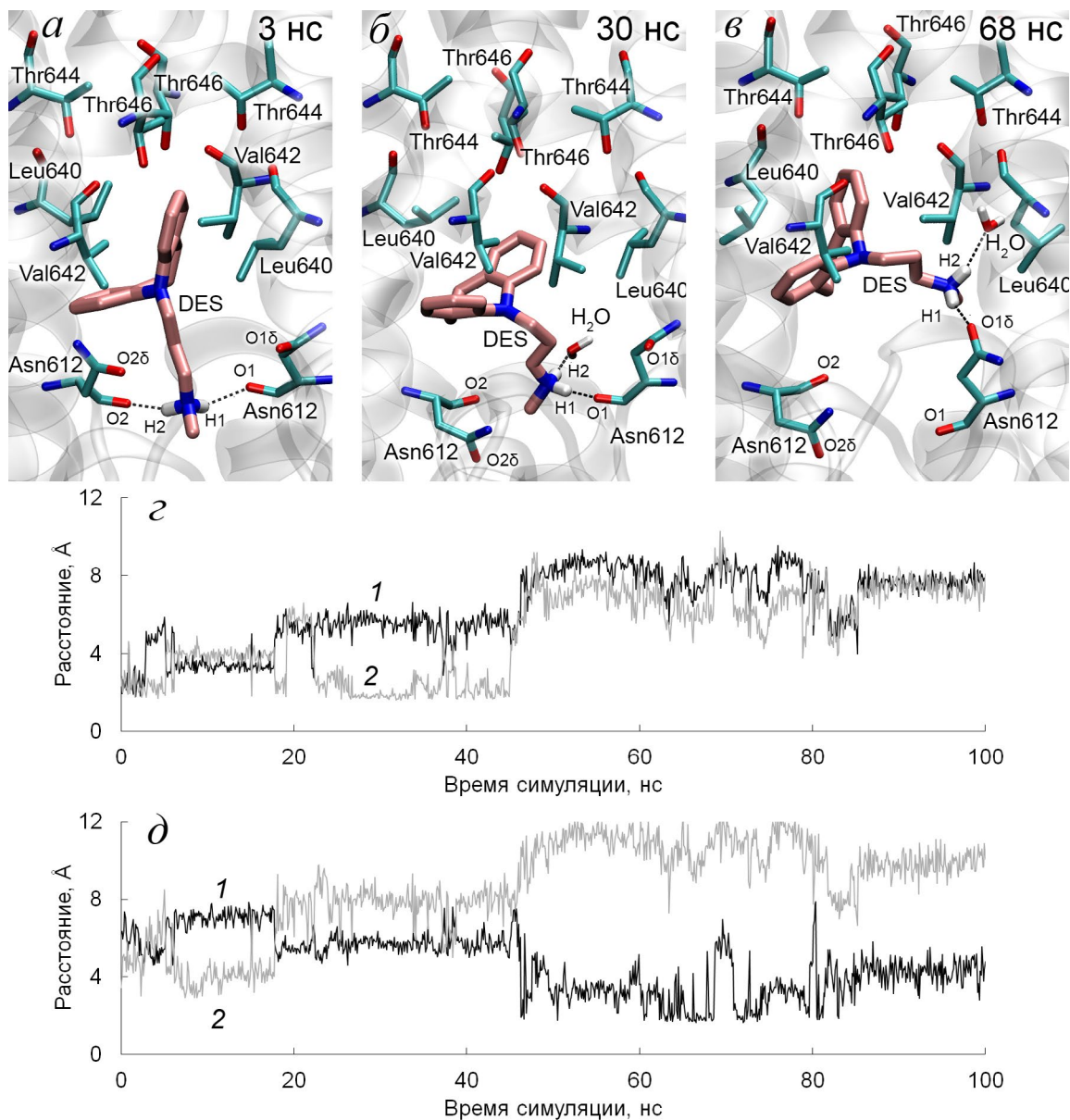


Рис. 5. Взаимодействие DES с нижним сайтом NMDAR (по данным МД). *a* – Положение молекулы DES в сайте после 3 нс симуляции; *б* – положение молекулы DES в сайте после 30 нс симуляции; *в* – положение молекулы DES в сайте после 68 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомами водорода H1 и H2 катионной группы DES и атомами кислорода O1 и O2 остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O1 и distH2–O2, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно); *д* – зависимость от времени расстояния между атомами водорода H1 и H2 катионной группы DES и атомами кислорода O18 и O28 боковых радикалов аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O18 и distH2–O28, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

возрастает до 1,5 Å (рис. П5 в Приложении), что указывает на изменение положения молекулы лиганда в сайте связывания. Значение RMSD Ca-атомов NMDAR увеличивается в течение первых 10 нс симуляции, затем выходит на плато и варьируется в диапазоне 1,5–2,0 Å (рис. П5 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса DES с NMDAR представлен на рис. 5. Трици-

клическая группа препарата в течение симуляции взаимодействует с алифатическими аминокислотами Val642 и Thr646 субъединиц GluN1, а также аминокислотами Leu640 и Thr644 субъединиц GluN2B (рис. 5, *a–в*). В промежутке 0–3 нс оба атома водорода катионной группы DES образуют водородные связи с атомами кислорода остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (рис. 5, *a* и *г*). Затем после переходного периода (3–21 нс, катионная группа находится на

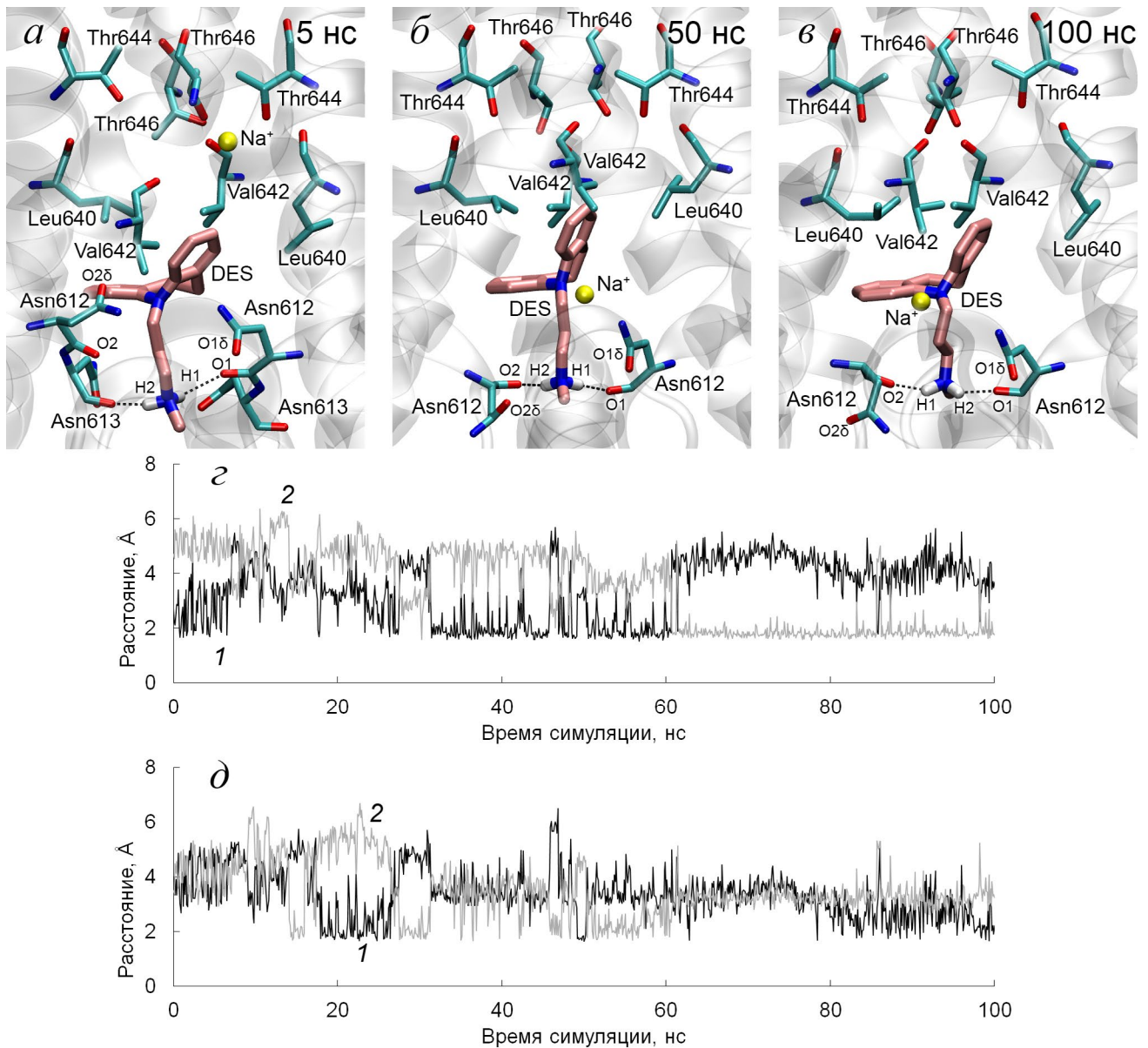


Рис. 6. Взаимодействие DES с нижним сайтом NMDAR в присутствии катиона натрия в ионной поре (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в сайте после 5 нс симуляции; *б* – положение молекулы DES в сайте после 50 нс симуляции; *в* – положение молекулы DES в сайте после 100 нс симуляции; *г* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H1 катионной группы DES и атомами кислорода O1 и O2 остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH1–O1 и distH1–O2, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно); *д* – зависимость от времени расстояния между атомом водорода H2 катионной группы DES и атомами кислорода O1 и O2 остова аминокислотных остатков Asn612 субъединиц GluN2B (distH2–O1 и distH2–O2, отмечены цифрами 1 и 2 соответственно). Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные водороды не показаны для четкости рисунка

уровне кислорода остова Asn612, но водородных связей нет) в промежутке 21–45 нс один из водородов катионной группы DES сохраняет водородную связь с атомом кислорода остова Asn612 одной из субъединиц GluN2B; второй же атом водорода эту связь теряет и взаимодействует только с молекулой воды (рис. 5, б и г). В этом же промежутке молекула DES постепенно продвигается по направлению к верхнему сайту. После 45 нс симуляции молекула DES полностью переходит в

верхний сайт, связь с кислородом остова Asn612 теряется, но один из атомов водорода катионной группы образует водородную связь с кислородом бокового радикала Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 5, в–д). После 80 нс симуляции катионная группа теряет связь с аспарагинами ионной поры (рис. 5, д) и не взаимодействует с ними даже через воду.

Дезипрамин в нижнем сайте в присутствии Na⁺ в ионной поре. Согласно экспериментальным

данным, полученным ранее нашей научной группой методом фиксации потенциала, DES глубже проникает в ионную пору NMDAR по сравнению с CLO и ATL [17]. Методом докинга мы выявили, что один из сайтов DES находится глубже внутри ионной поры, ближе к внутриклеточной стороне мембраны. Однако, согласно данным МД, положение молекулы DES в этом сайте нестабильно. В наших ранних работах мы показали, что трициклическая группа лекарственных психотропных препаратов (ЛПП), обладающих противоболевой активностью, имеет V-образную конформацию [37], и высказали предположение, что такая структура может связывать катион натрия и кальция через пи-катионное взаимодействие. Отсюда логично вытекает гипотеза, что положение молекулы DES в нижнем сайте может быть стабилизировано катионом натрия или кальция. Чтобы проверить эту гипотезу, мы запустили расчет конформационных изменений комплекса DES с нижним сайтом методом МД, предварительно поместив катион натрия в ионную пору NMDAR возле трициклической группы DES.

Согласно полученным расчетным данным, в случае присутствия катиона натрия внутри рецептора положение молекулы DES более стабильно внутри канала NMDAR, чем без него. Значение RMSD DES в первые 60 нс симуляции варьируется в диапазоне 0,4–1,2 Å, затем оставшиеся 40 нс симуляции – незначительно колеблется в районе 0,8 Å (рис. П6 в Приложении), что указывает на стабилизацию положения молекулы лиганда в сайте связывания. Значение RMSD Ca-атомов NMDAR увеличивается в течение первых 20 нс симуляции, затем выходит на плато и незначительно колеблется возле своего среднего значения 2,5 Å (рис. П6 в Приложении), что указывает на стабилизацию полипептидных цепей молекулы NMDAR.

Результат конформационного анализа комплекса DES с нижним сайтом NMDAR в присутствии катиона натрия представлен на рис. 6. Трициклическая группа препарата на протяжении всего периода симуляции остается связанной в окружении алифатических аминокислот Val642 субъединиц GluN1 и Leu640 субъединиц GluN2B (рис. 6, а–в). В течение первых 15 нс симуляции молекула дезипрамина еще глубже погружается в ионную пору, по сравнению с конформацией, полученной методом молекулярного докинга (рис. 1, д): в течение этих 15 нс один из атомов водорода взаимодействует с кислородом остова аспарагина Asn613 одной из субъединиц GluN2B (Asn613 расположен ближе к внутриклеточной стороне мембраны по сравнению с Asn612; рис. 6, а). Затем, на протяжении оставшегося периода симуляции оба атома водорода катионной группы DES (H1 и H2) попеременно

образуют водородные связи с атомами кислорода остова аминокислотных остатков Asn612 (O1 и O2): происходит вращение катионной группы вокруг связи C–N, и отдельно взятый атом водорода взаимодействует то с одной, то с другой субъединицей GluN2B (рис. 6, б–д). На рис. 6, б и в показано положение молекулы DES в сайте с одного и того же ракурса; видно, что в разные моменты симуляции метильный заместитель катионной группы направлен то в одну, то в другую сторону, что указывает на вращение катионной группы вокруг оси ионной поры. На рис. 6, г и д также можно увидеть, что после первых 15 нс симуляции каждый атом водорода катионной группы почти все время взаимодействует с одним из атомов кислорода остова Asn612, за исключением моментов конформационных переходов (поворота катионной группы).

Таким образом, согласно полученным данным, катион натрия в ионной поре стабилизирует связывание дезипрамина с нижним сайтом. Интересно отметить, что вопреки ожиданиям, катион натрия взаимодействует не с трициклической группой DES, а с атомами кислорода Asn614 одной из субъединиц GluN1 и Asn612 одной из субъединиц GluN2B, работая, таким образом, в качестве буфера между отрицательно заряженным азотом трициклической группы препарата и отрицательно заряженными кислородами аспарагинов (выше мы выдвинули предположение, что именно из-за близости азота DES и атомов кислорода аспарагинов дезипрамин не может удерживаться в нижнем сайте).

Дезипрамин в нижнем сайте в присутствии Ca²⁺, Mg²⁺ и Li⁺ в ионной поре. Аналогичный расчет мы провели для катионов кальция, магния и лития. Эти ионы были выбраны по следующим причинам. Катионы кальция, как и катионы натрия, могут проходить через ионную пору NMDAR, катион магния закрывает канал рецептора в неактивном состоянии, а литий известен своим нейропротекторным эффектом против эксайтотоксичности, опосредованной NMDAR. Результат вычислительного эксперимента представлен на рис. 7. Катион кальция выходит из ионной поры еще на стадии оптимизации системы, однако значительную часть времени симуляции остается связанным возле концевых аминокислот модели NMDAR (Leu655 субъединицы GluN1 и Gln653 субъединицы GluN2B) с внешней стороны плазматической мембраны (рис. П7, а в Приложении). В присутствии катиона кальция молекула DES в процессе симуляции переходит из нижнего сайта в верхний, и на протяжении большей части симуляции катионная группа DES взаимодействует с Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 7, а). Катион магния выходит из ионной поры NMDAR

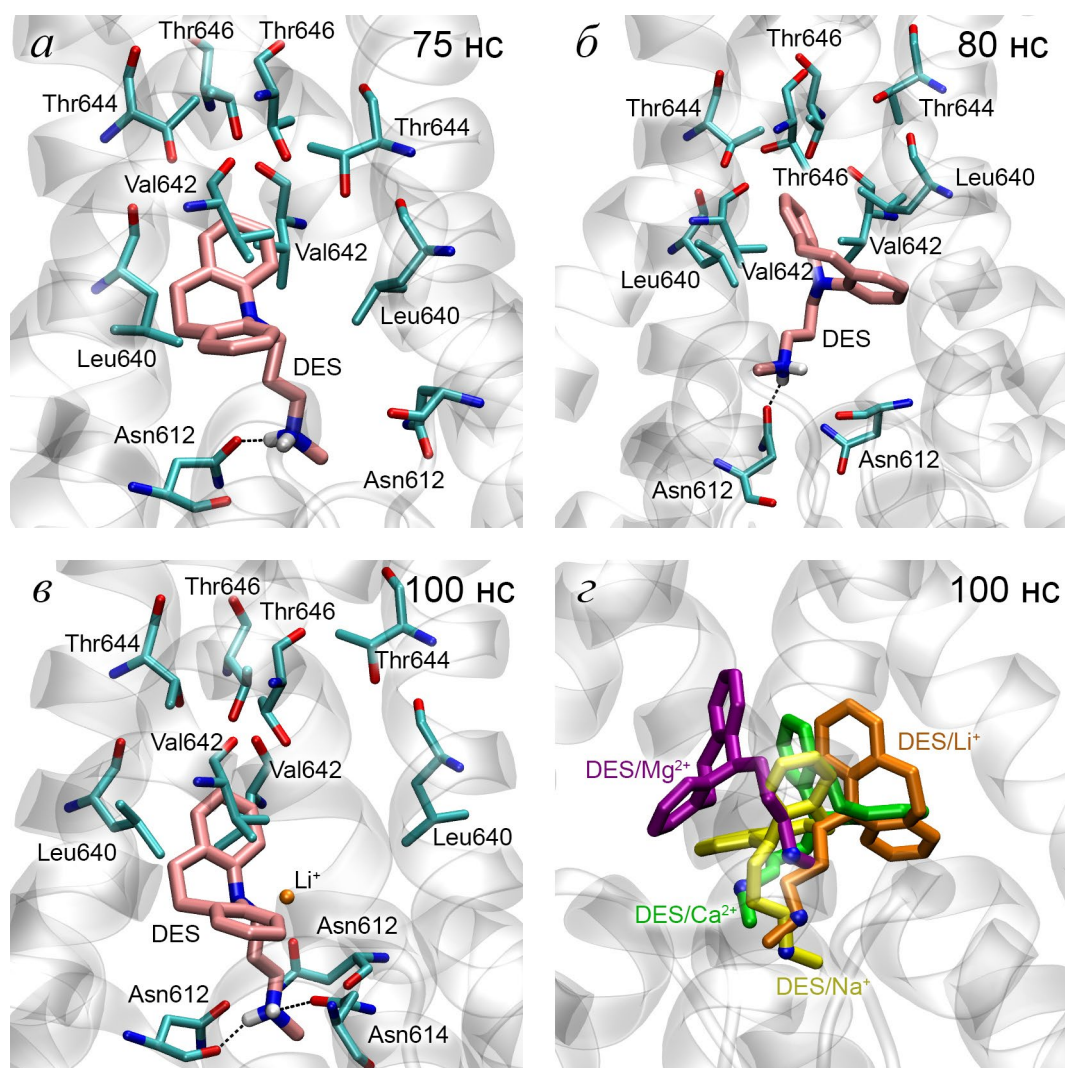


Рис. 7. Взаимодействие дезипрамина (DES) с нижним сайтом NMDAR в присутствии катионов кальция, магния и лития в ионной поре (по данным МД). *а* – Положение молекулы DES в присутствии катиона кальция после 75 нс симуляции (катион кальция выходит из ионной поры в процессе оптимизации системы и не отображен на рисунке); *б* – положение молекулы DES в присутствии катиона магния после 80 нс симуляции (катион магния выходит из ионной поры после 47 нс симуляции и не отображен на рисунке); *в* – положение молекулы DES в присутствии катиона лития после 100 нс симуляции; *г* – выравнивание конечных конформаций DES после 100 нс в присутствии катионов натрия, кальция, магния и лития в ионной поре. Ключевые взаимодействия отмечены пунктирной линией. Второстепенные атомы водородов не отображены для четкости рисунка

после 47 нс симуляции и оставшееся время не взаимодействует с рецептором (рис. П7, б в Приложении). Молекула DES в процессе симуляции также переходит из нижнего сайта в верхний, на протяжении большей части симуляции катионная группа DES взаимодействует с Asn612 одной из субъединиц GluN2B (рис. 7, б). Катион лития в процессе симуляции остается связанным внутри ионной поры (рис. 7, в), молекула DES частично переходит из нижнего сайта в верхний. Один из атомов водорода катионной группы препарата в течение всей симуляции взаимодействует с атомом кислорода остова Asn612 одной из субъединиц GluN2B, другой атом водорода – с боковым радикалом Asn614 одной из субъединиц GluN1 (рис. 7, в).

На рис. 7, г представлено выравнивание конформаций комплексов NMDAR с DES после 100 нс симуляции в присутствии различных ионов. Глубже всего молекула DES связана в ионной поре в присутствии Na⁺, чуть выше – в присутствии Li⁺, еще выше – в присутствии Ca²⁺, и ближе всего к внешней стороне плазматической мембраны препарат находится в присутствии Mg²⁺. Таким образом, однозарядные катионы (Na⁺, Li⁺) в большей степени способствуют удержанию молекулы DES в нижнем сайте, чем двухзарядные (Ca²⁺, Mg²⁺). При этом внутри каждой группы более тяжелый катион прочнее удерживает DES внутри ионной поры (натрий тяжелее лития и кальций тяжелее магния). По всей видимости, такой эффект обусловлен

Усредненные значения энергетических характеристик взаимодействия ТЦА с NMDAR

Препарат	E_{LJ-SR} , ккал/моль	$E_{COUL-SR}$, ккал/моль
ATL (верхний сайт)	-31,6	-12,2
CLO (верхний сайт)	-40,8	-29,1
DES (верхний сайт)	-29,3	-7,0
DES (нижний сайт)	-30,1	-10,9
DES (нижний сайт) + Na ⁺	-29,2	-36,1

Примечание. E_{LJ-SR} и $E_{COUL-SR}$ – энергии ван-дер-ваальсовых сил и кулоновских взаимодействий, рассчитанных для близких контактов между атомами ТЦА и NMDAR.

их гидратацией. Так, изначально катионы металлов были помещены в ионный канал без гидратной оболочки. Однако уже в процессе релаксации системы катионы Na⁺, Li⁺, Ca²⁺ и Mg²⁺ связывали молекулы воды, и к началу симуляции катион натрия был окружен двумя, катион лития – двумя, катион кальция – девятью, катион магния – семью молекулами воды. В процессе симуляции катион натрия удерживал 5–6 молекул H₂O, лития – 4 молекулы, кальция – 7–8 молекул в несвязанном состоянии и 5 молекул – после связывания с концевыми аминокислотами NMDAR, магния – 7–8 молекул воды. Таким образом, из всех рассмотренных катионов магний наиболее прочно удерживает гидратную оболочку, с которой он покидает ионный канал. В некоторых структурах NMDAR, полученных экспериментально, присутствуют двухвалентные металлы. Так, структура 5UN1 [22] содержит катион магния, а структура 5H8N [38] – катион кальция. В обоих случаях катионы взаимодействуют с лиганд-связывающим доменом NMDAR, который в представленной работе был удален для ускорения моделирования. Будут ли ионы кальция и магния, связанные с LBD, оказывать эффект на взаимодействии ТЦА с NMDAR – еще предстоит выяснить в последующих вычислительных экспериментах с усложнением модели.

Оценка энергетических характеристик взаимодействия ТЦА с NMDAR. На заключительном этапе мы оценили энергетические характеристики взаимодействия ТЦА с NMDAR. Зависимость E_{LJ-SR} и $E_{COUL-SR}$ от времени в виде скользящего среднего за период 5 нс представлена на рис. П8 в Приложении. В таблице представлены средние значения E_{LJ-SR} и $E_{COUL-SR}$ за период симуляции 50–100 нс.

Согласно полученным данным, среднее значение энергии ван-дер-ваальсовых сил практически одинаково для всех препаратов (таблица) и слабо меняется в течение симуляции (рис. П8, а в При-

ложении). Исключение составляет лишь CLO, массивный атом хлора которого усиливает эффективность стерических взаимодействий. Энергия электростатических взаимодействий в случае ATL в верхнем сайте, DES в верхнем сайте и DES в нижнем сайте без Na⁺ постепенно возрастает с поэтапной потерей водородных связей между препаратом и аспарагинами ионного канала (рис. П8, б в Приложении). В комплексах NMDAR с CLO в верхнем сайте и с DES в нижнем сайте в присутствии Na⁺ близкий контакт между атомами водородов препаратов и аспарагинами NMDAR сохраняется дольше (в случае CLO молекулу лиганда удерживает галогенная связь, в случае DES – катион натрия), поэтому электростатические взаимодействия сильны на протяжении всей симуляции (рис. П8, б в Приложении). За счет этого среднее значение $E_{COUL-SR}$ для CLO и DES существенно ниже по сравнению с ATL (таблица), что согласуется с экспериментальными данными о том, что ATL – более слабый блокатор NMDAR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На заключительном этапе мы сопоставили известные экспериментальные данные о взаимодействии ATL, CLO и DES с NMDAR с результатами компьютерного моделирования, представленными в данной работе. Ранее методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) нашей научной группой были определены количественные характеристики взаимодействия ATL, CLO и DES с NMDAR. Так, на пирамидальных нейронах крыс, выделенных из поля CA1 гиппокампа, было установлено, что IC₅₀ для ATL и DES составляют соответственно 14,0 и 1,4 мкМ в безмагниевой среде при мембранном потенциале –80 мВ; 570 и 6,8 мкМ – в безмагниевой среде при мембранном потенциале –30 мВ; 110 и 15 мкМ – в присутствии 1 мМ Mg²⁺ при мембранном потенциале –30 мВ [16]. На первичной культуре кортикальных нейронов крыс было установлено, что в бескальциевой среде при мембранном потенциале –70 мВ значения IC₅₀ для ATL, CLO и DES составляют 106, 24 и 8 мкМ соответственно, а при нулевом потенциале – 321, 91 и 60 мкМ соответственно [17, 21]. Таким образом, независимо от условий эксперимента вторичный амин DES эффективнее взаимодействует с NMDAR, по сравнению с третичными аминами ATL и CLO [16, 17], причем разница между DES и CLO менее существенная, чем между DES и ATL.

Оценочные значения энергетических характеристик связывания ATL, CLO и DES с NMDAR, полученные *in silico* (таблица) в целом согласуются с экспериментальными данными. В представленной

работе мы показали, что более высокая аффинность NMDAR к DES по сравнению с другими ТЦА, обусловливается тем, что за счет одновременного взаимодействия двух атомов водорода катионной группы DES с Asn612 субъединиц GluN2B (с атомами кислорода боковых радикалов в верхнем сайте или атомами кислорода остова в нижнем сайте) он прочнее удерживается внутри поры канала NMDA-рецептора. CLO благодаря галогенной связи между атомом хлора препарата и боковым радикалом Asn614 одной из субъединиц GluN1 прочнее связывается с NMDAR по сравнению с ATL.

Проведенные ранее электрофизиологические эксперименты выявили, что CLO и DES, имеющие атом азота в составе трициклической группы, существенно эффективнее взаимодействует с NMDAR по сравнению с ATL [16, 17]. Согласно нашим расчетам, атом азота трициклической группы CLO и DES не образует каких-либо близких контактов внутри ионной поры NMDAR ни с соседними аминокислотами, ни с молекулами воды, таким образом, не оказывая видимого влияния на эффективность взаимодействия. Этому несоответствию экспериментальных и расчетных данных может быть несколько объяснений. Во-первых, отрицательно заряженный атом азота может способствовать более эффективному заякориванию CLO и DES на поверхности рецептора (возле некоторой, пока неустановленной, положительно заряженной группы). Однако это предположение не объясняет тот факт, что эффективность канального блока мепантина, не имеющего в своей структуре отрицательно заряженного атома азота, сопоставима с эффективностью DES [39]. Во-вторых, дополнительный отрицательно заряженный атом в трициклической группе (вместе с положительно заряженной «хвостовой» группой) влияет на величину дипольного момента CLO и DES, позволяя им быстрее продвигаться к сайту связывания. С помощью программы Avogadro v1.2.0 [19] мы рассчитали вектор и величину дипольного момента исследуемых ТЦА. Согласно полученным данным, вектор дипольного момента всех трех соединений направлен (с небольшими отклонениями) вдоль алифатического фрагмента перпендикулярно трициклической группе, тогда как значения дипольного момента составляют 18,431, 23,366 и 23,277 дебаев для ATL, CLO и DES соответственно. Впрочем, это предположение не объясняет, почему в экспериментах patch-clamp CLO и DES эффективнее связываются с NMDAR даже при нулевой разнице потенциалов [17]. И, в-третьих, ATL из-за дополнительной двойной связи обладает меньшей конформационной подвижностью, из-за чего молекуле этого препарата сложнее проникнуть внутрь ионной поры. Это объяснение кажется нам наиболее вероятным. Так, Song et al. [22] смо-

делировали возможное взаимодействие МК-801 с NMDAR. Согласно предложенной модели, при входе препарата в ионный канал плоскость трициклической МК-801 параллельна оси канала (то есть молекула заходит в канал «боком»). Мы полагаем, что жесткая двойная связь в алифатическом фрагменте ATL работает своего рода спицей, усложняющей проникновение препарата в канал. Для проверки этого предположения понадобится усложнить вычислительный эксперимент, добавив к трехмерной структуре NMDAR внеклеточные фрагменты (которые в представленной работе мы не включали в модель рецептора), что является нашей задачей в ближайшем будущем.

И наконец, согласно электрофизиологическим данным, сайт связывания DES расположен ближе к внутренней стороне мембраны (ниже по оси канала) по сравнению с сайтом связывания амитриптилина и кломипрамина [17]. Действительно, методом молекулярного докинга нам удалось показать, что один из сайтов связывания DES расположен ближе к внутренней стороне мембраны. Положение DES в нижнем сайте менее устойчиво, по сравнению с верхним, за счет близкого расстояния между отрицательно заряженным атомом азота трициклической группы и отрицательно заряженными атомами кислорода боковых радикалов Asn612. Однако присутствие катиона натрия (но не кальция, магния или лития) стабилизирует молекулу DES в нижнем сайте. Мы полагаем, что катион натрия может служить буфером между отрицательно заряженным атомом азота трициклической группы и отрицательно заряженными атомами кислорода боковых радикалов Asn612 (катион лития слишком легкий и подвижный, а двухзарядные катионы магния и кальция уходят из ионной поры). Интересно отметить, что среди рассмотренных нами моделей модель с катионом натрия внутри канала NMDAR наиболее близка к реальным условиям, в которых находится рецептор: именно у ионов натрия самая высокая концентрация во внеклеточном пространстве.

Однако высокая аффинность NMDAR к DES имеет и обратный эффект. Более прочное связывание DES с NMDAR приводит к тому, что этот препарат обладает более сильными побочными эффектами по сравнению с ATL [40], поскольку NMDAR вовлечены не только в передачу болевого сигнала, но и во многие другие жизненно важные процессы в организме. Более того, слабое взаимодействие ATL с NMDAR (значения IC_{50} в бескальциевой среде выше терапевтических концентраций) не объясняет высокую противоболевую эффективность этого препарата. Ранее нашей научной группой в эксперименте patch-clamp было показано, что ингибиторная активность ATL по отношению к NMDAR

существенно растет с увеличением концентрации кальция в среде [21]. Это дало основание высказать предположение, что в терапевтически релевантных концентрациях ATL ингибирует NMDAR опосредованно, через натрий-кальциевый обменник (NCX), который отвечает за кальциевую десенситизацию NMDAR [41, 42]. Аналогичный эффект (хоть и менее выраженный) был выявлен и для CLO и DES [17] с той лишь разницей, что в терапевтически релевантных концентрациях эти вещества, в отличие от ATL, могут ингибировать рецептор как опосредованно через NCX, так и прямой блокадой ионного канала NMDAR. Терапия ATL, DES и CLO, как свидетельствуют клинические данные, негативно воздействует на сердечно-сосудистую систему, что ограничивает их клиническое применение. Часто наблюдаются изменения на ЭКГ пациентов, получающих такую терапию: наблюдается расширение комплекса QRS, изменения интервала PQ, интервала ST или зубца T. Важно отметить, что сила этих воздействий коррелирует с аффинностью препаратов к NMDAR: $ATL < CLO < DES$.

Ранее нами было проведено комплексное химио-фармакологическое исследование KB-R7943, являющегося селективным блокатором NCX как препарата для купирования нейропатической боли, вызванной сахарным диабетом 1-го типа, в сравнении с действием ATL на животной модели – самцах крыс породы Wistar с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом 1-го типа [43]. Поведенческими тестами была доказана эффективность KB-R7943 для купирования нейропатической боли при сахарном диабете 1-го типа: препарат оказывает противоболевой эффект, сопоставимый со стандартной терапией ATL, что выражается в снижении интенсивности термической, механической и химической аллодинии. Для выявления возможных негативных воздействий противоболевой терапии KB-R7943 на протяжении многодневной терапии регистрировали ЭКГ животных. По результатам ЭКГ было доказано, что KB-R7943 безопасен: введение KB-R7943 контрольным и диабетическим крысам не оказывает воздействия на работу сердца и не проявляет негативного влияния на локомоторную активность животных [44]. Напротив, в наших экспериментах на животной модели были отмечены негативные изменения при терапии ATL и у контрольных здоровых животных, но особенно у крыс с сахарным диабетом 1-го типа. Таким образом, в ряду ТЦА, эффективных для купирования нейропатической боли, высокая эффективность взаимодействия препарата с NMDAR является отрицательной характеристикой, приводящей к нежелательным побочным эффектам. Преимуществом будут обладать те препараты, которые влия-

ют на работу NMDAR опосредованно, селективно ингибируя NCX, не блокируя при этом ионный канал рецептора.

Следует обговорить и основные ограничения представленной работы, которые связаны с несовершенством методов молекулярного моделирования. В методе классической МД, в отличие от квантово-механического приближения, молекула рассматривается не как совокупность ядер и электронов, а как система атомов, законы взаимодействия между которыми описываются эмпирически установленными функциями. Поэтому с помощью классической МД невозможно смоделировать образование и разрыв ковалентных связей, таутомеризацию молекул, изменение состояния протонирования лигандов и аминокислот сайта связывания в процессе симуляции, а также смоделировать разность потенциалов между внешней и внутренней стороной плазматической мембраны. Из ограничений представленной работы можно также отметить тот факт, что в качестве модели NMDAR мы использовали только фрагменты субъединиц рецептора, образующих пору канала, исключив массивную внеклеточную часть. Поэтому полученные результаты дают информацию лишь о «конечной» точке взаимодействия препаратов с NMDAR, не учитывая процессы закоривания ТЦА с внеклеточными доменами и их прохождения к сайту связывания. Поэтому только совместное применение расчетных и экспериментальных методик, которые дополняют и уточняют друг друга, может дать полное представление о взаимодействии ТЦА с NMDAR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно систематическому анализу эпидемиологических исследований, распространенность нейропатической боли среди населения составляет 7–10% [45–47]. Хроническая нейропатическая боль снижает качество жизни и трудоспособность пациентов, увеличивает риск смерти больных [47, 48]. Совершенствование противоболевой терапии, увеличение ее эффективности и безопасности по-прежнему является актуальной задачей. В представленном исследовании методами молекулярного моделирования мы изучили механизм взаимодействия ТЦА, обладающих противоболевым эффектом, с NMDAR и показали, как на молекулярном уровне структурные особенности препаратов и катионное окружение влияют на эффективность этого взаимодействия. Сопоставление полученных результатов с известными экспериментальными и клиническими данными дает основание утверждать, что при поиске эффективных и, что не менее важно, безопасных противоболе-

вых препаратов среди ингибиторов NMDAR следует руководствоваться не столько силой их прямого ингибирующего эффекта, сколько их способностью влиять на работу NMDAR опосредованно, не участвуя при этом в прямой блокаде рецептора. Среди же веществ, влияющих на NMDAR опосредованно (например, ингибиторов NCX), следует отбирать те, которые обладают минимальной эффективностью прямой каналоблокады, как бы парадоксально это ни звучало. Выявленные нами в представленной работе особенности взаимодействия ТЦА с NMDAR помогут проводить отбор эффективных и безопасных анальгетиков среди клинически одобренных лекарственных средств вместо многолетнего поиска и внедрения новых препаратов.

Вклад авторов. Н.Н. Шестакова – концепция и руководство работой; Д.А. Белинская и Н.Н. Шестакова – проведение экспериментов, обсужде-

ние результатов исследования, написание текста; Н.Н. Шестакова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ИЭФБ РАН в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

Благодарности. Результаты работы получены с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (<https://scc.spbstu.ru/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Obata, H. (2017) Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2483, <https://doi.org/10.3390/ijms18112483>.
2. Fornasari, D. (2017) Pharmacotherapy for neuropathic pain: a review, *Pain Ther.*, **6 (Suppl 1)**, 25-33, <https://doi.org/10.1007/s40122-017-0091-4>.
3. Lenkey, N., Karoly, R., Kiss, J. P., Szasz, B. K., Vizi, E. S., and Mike, A. (2006) The mechanism of activity-dependent sodium channel inhibition by the antidepressants fluoxetine and desipramine, *Mol. Pharmacol.*, **70**, 2052-2063, <https://doi.org/10.1124/mol.106.026419>.
4. Wu, W., Ye, Q., Wang, W., Yan, L., Wang, Q., Xiao, H., and Wan, Q. (2012) Amitriptyline modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in mouse trigeminal ganglion neurons, *Neurosci. Lett.*, **506**, 307-311, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.031>.
5. Cardoso, F. C., Schmit, M., Kuiper, M. J., Lewis, R. J., Tuck, K. L., and Duggan, P. J. (2021) Inhibition of N-type calcium ion channels by tricyclic antidepressants – experimental and theoretical justification for their use for neuropathic pain, *RSC Med. Chem.*, **13**, 183-195, <https://doi.org/10.1039/d1md00331c>.
6. Punke, M. A., and Friederich, P. (2007) Amitriptyline is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3 channels, *Anesth. Analg.*, **104**, 1256-1264, <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000260310.63117.a2>.
7. Cottingham, C., Percival, S., Birky, T., and Wang, Q. (2014) Tricyclic antidepressants exhibit variable pharmacological profiles at the alpha(2A) adrenergic receptor, *BBRC*, **451**, 461-466, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.024>.
8. Proudman, R. G. W., Pupo, A. S., and Baker, J. G. (2020) The affinity and selectivity of α -adrenoceptor antagonists, antidepressants, and antipsychotics for the human α 1A, α 1B, and α 1D-adrenoceptors, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **8**, 00602, <https://doi.org/10.1002/prp2.602>.
9. Onali, P., Dedoni, S., and Olanas, M. C. (2010) Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **332**, 255-265, <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159939>.
10. Jeong, B., Song, Y. P., Chung, J. Y., Park, K. C., Kim, J., So, I., and Hong, C. (2023) Low concentrations of tricyclic antidepressants stimulate TRPC4 channel activity by acting as an opioid receptor ligand, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **324**, C1295-C1306, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00535.2022>.
11. Lin, H., Heo, B. H., Kim, W. M., Kim, Y. C., and Yoon, M. H. (2015) Antiallodynic effect of tianeptine via modulation of the 5-HT7 receptor of GABAergic interneurons in the spinal cord of neuropathic rats, *Neurosci. Lett.*, **598**, 91-95, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.013>.
12. Moraczewski, J., Awosika, A. O., and Aedma, K. K. (2003) Tricyclic Antidepressants, in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, Treasure Island, F.L.
13. Tohda, M., Urushihara, H., and Nomura, Y. (1995) Inhibitory effects of antidepressants on NMDA-induced currents in *Xenopus* oocytes injected with rat brain RNA, *Neurochem. Int.*, **26**, 53-58, [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)00101-Y](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)00101-Y).

14. Szasz, B. K., Mike, A., Karoly, R., Gerevich, Z., Illes, P., Vizi, E. S., and Kiss, J. P. (2007) Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system, *Biol. Psychiatry*, **62**, 1303-1309, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.014>.
15. Kohno, T., Kimura, M., Sasaki, M., Obata, H., Amaya, F., and Saito, S. (2012) Milnacipran inhibits glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor activity in spinal dorsal horn neurons, *Mol. Pain*, **8**, 45, <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-45>.
16. Barygin, O. I., Nagaeva, E. I., Tikhonov, D. B., Belinskaya, D. A., Vanchakova, N. P., and Shestakova, N. N. (2017) Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics, *Brain Res.*, **1660**, 58-66, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.028>.
17. Stepanenko, Y. D., Sibarov, D. A., Shestakova, N. N., and Antonov, S. M. (2022) Tricyclic antidepressant structure-related alterations in calcium-dependent inhibition and open-channel block of NMDA receptors, *Front. Pharmacol.*, **12**, 815368, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.815368>.
18. Belinskaia, D. A., Belinskaia, M. A., Barygin, O. I., Vanchakova, N. P., and Shestakova, N. N. (2019) Psychotropic drugs for the management of chronic pain and itch, *Pharmaceuticals (Basel)*, **12**, 99, <https://doi.org/10.3390/ph12020099>.
19. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., and Hutchison, G. R. (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform.*, **4**, 17, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
20. Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., and Traynelis, S. F. (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors, *J. Gen. Physiol.*, **150**, 1081-1105, <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>.
21. Stepanenko, Y. D., Boikov, S. I., Sibarov, D. A., Abushik, P. A., Vanchakova, N. P., Belinskaia, D., Shestakova, N. N., and Antonov, S. M. (2019) Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block, *Sci. Rep.*, **9**, 19454, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z>.
22. Song, X., Jensen, M. Ø., Jogini, V., Stein, R. A., Lee, C. H., Mchaourab, H. S., Shaw, D. E., and Gouaux, E. (2018) Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine, *Nature*, **556**, 515-519, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0039-9>.
23. Chou, T. H., Epstein, M., Michalski, K., Fine, E., Biggin, P. C., and Furukawa, H. (2022) Structural insights into binding of therapeutic channel blockers in NMDA receptors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 507-518, <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00772-0>.
24. UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D523-D531, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
25. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
26. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
27. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1781-1802, <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
28. Lyskov, S., Chou, F. C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B. D., Renfrew, P. D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J. J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J. J., and Das, R. (2013) Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE), *PLoS One*, **8**, 63906, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906>.
29. Wu, E. L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K. C., Dávila-Contreras, E. M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R. M., Klauda, J. B., and Im, W. (2014) CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations, *J. Comput. Chem.*, **35**, 1997-2004, <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>.
30. 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, <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
31. Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., Grubmüller, H., and MacKerell, A. D., Jr. (2017) CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins, *Nat. Methods*, **14**, 71-73, <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>.
32. Bussi, G., Zykova-Timan, T., and Parrinello, M. (2009) Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **130**, 074101, <https://doi.org/10.1063/1.3073889>.
33. Parrinello, M., and Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.*, **52**, 7182-7190, <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
34. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **3**, 10089-10092, <https://doi.org/10.1063/1.464397>.

35. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINC: A linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comp. Chem.*, **18**, 1463-1473, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H).
36. Kortagere, S., Ekins, S., and Welsh, W. J. (2008) Halogenated ligands and their interactions with amino acids: implications for structure-activity and structure-toxicity relationships, *J. Mol. Graph. Model.*, **27**, 170-177, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2008.04.001>.
37. Shestakova, N. N., and Vanchakova, N. P. (2006) Theoretical conformational analysis of antidepressant as a way for evaluation of their efficiency for pain and itch syndrome management in patients with end-stage renal disease under chronic hemodialysis, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **409**, 203-205, <https://doi.org/10.1134/s160767290604003x>.
38. Hackos, D. H., Lupardus, P. J., Grand, T., Chen, Y., Wang, T. M., Reynen, P., Gustafson, A., Wallweber, H. J., Volgraf, M., Sellers, B. D., Schwarz, J. B., Paoletti, P., Sheng, M., Zhou, Q., and Hanson, J. E. (2016) Positive allosteric modulators of GluN2A-containing NMDARs with distinct modes of action and impacts on circuit function, *Neuron*, **89**, 983-999, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.016>.
39. Parsons, C. G., Panchenko, V. A., Pinchenko, V. O., Tsyndrenko, A. Y., and Krishtal, O. A. (1996) Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine, *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 446-454, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01228.x>.
40. Riediger, C., Schuster, T., Barlind, K., Maier, S., Weitz, J., and Siepmann, T. (2017) Adverse effects of antidepressants for chronic pain: a systematic review and meta-analysis, *Front. Neurol.*, **8**, 307, <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00307>.
41. Sibarov, D. A., Abushik, P. A., Poguzhelskaya, E. E., Bolshakov, K. V., and Antonov, S. M. (2015) Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent N-methyl-d-aspartate receptor inactivation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **355**, 484-495, <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227173>.
42. Sibarov, D. A., Poguzhelskaya, E. E., and Antonov, S. M. (2018) Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: a role of membrane cholesterol, *BMC Neurosci.*, **19**, 73, <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0475-3>.
43. Шестакова Н. Н., Сухов И. Б., Андреева-Гатева П. (2023) Доклиническое исследование противоболевой терапии при диабетической нейропатии на животной модели, *Вестн. БГМУ*, **2**, 19-21.
44. Сухов И. Б., Чистякова О. В., Баюнова Л. В., Шестакова Н. Н. (2023) Оценка побочных эффектов применения ингибитора Na-Ca обменника KB-R7943 как противоболевого препарата при диабетической нейропатии у крыс, *Интегр. физиол.*, **4**, 69-78, <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-78>.
45. Van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H., and Torrance, N. (2014) Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies, *Pain*, **155**, 654-662, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>.
46. Bouhassira, D. (2019) Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology, *Rev. Neurol. (Paris)*, **175**, 16-25, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>.
47. Smith, B. H., Hébert, H. L., and Veluchamy, A. (2020) Neuropathic pain in the community: prevalence, impact, and risk factors, *Pain*, **161**, S127-S137, <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001824>.
48. Smith, B. H., and Torrance, N. (2012) Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life, *Curr. Pain Headache Rep.*, **16**, 191-198, <https://doi.org/10.1007/s11916-012-0256-0>.

STRUCTURE- AND CATION-DEPENDENT MECHANISM OF THE INTERACTION OF TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS WITH NMDA RECEPTOR ACCORDING TO MOLECULAR MODELING DATA

D. A. Belinskaia* and N. N. Shestakova

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia; e-mail: d_belinskaya@mail.ru*

Some tricyclic antidepressants (TCA), including amitriptyline (ATL), clomipramine (CLO), and desipramine (DES), are known to be effective for the management of neuropathic pain. It was previously determined that ATL, CLO and DES are capable of voltage-dependent blocking of NMDA receptors of glutamate

(NMDAR), which play a key role in the pathogenesis of neuropathic pain. Despite the similar structure of ATL, CLO and DES, efficacy of their interaction with NMDAR varies significantly. In the study presented here, we applied the molecular modeling methods to investigate the mechanism of binding of ATL, CLO and DES to NMDAR and to identify the structural features of the drugs that determine their inhibitory activity against NMDAR. Molecular docking of the studied TCA into the NMDAR channel was performed. The conformational behavior of the obtained complexes in lipid bilayer was simulated by the method of molecular dynamics (MD). A single binding site (upper) for the tertiary amines ATL and CLO and two binding sites (upper and lower) for the secondary amine DES were identified inside the NMDAR channel. The upper and lower binding sites are located along the channel axis at different distances from the extracellular side of the plasmatic membrane (PM). MD simulation revealed that the position of DES in the lower site is stabilized only in the presence of sodium cation inside the NMDAR channel. DES binds more strongly to NMDAR compared to ATL and CLO due to the simultaneous interaction of two hydrogen atoms of its cationic group with the asparagine residues of the ion pore of the receptor. This feature may be responsible for stronger side effects of DES. It has been hypothesized that ATL binds to NMDAR less efficiently compared to DES and CLO due to its lower conformational mobility. The identified features of the structure- and cation-dependent mechanism of interaction between TCA and NMDAR will help in the further development of effective and safe analgesic therapy.

Keywords: tricyclic antidepressants, neuropathic pain, NMDA receptor, molecular docking, molecular dynamics

РОЛЬ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА И АМИЛОИДОВ БАКТЕРИЙ В РАЗВИТИИ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ

Обзор

© 2024 Н.П. Трубицина¹, А.Б. Мативв¹, Т.М. Рогоза^{1,2}, А.А. Зудилова¹,
М.Д. Безгина¹, Г.А. Журавлева^{1,3}, С.А. Бондарев^{1,3*}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
кафедра генетики и биотехнологии, 199034 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: s.bondarev@spbu.ru, stanislavspbgu@gmail.com

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова,
198504 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет,
научная лаборатория биологии амилоидов, 199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 18.09.2023

После доработки 16.01.2024

Принята к публикации 23.01.2024

Менее 10 лет назад начали накапливаться данные об ассоциации между изменением состава микробиоты кишечника и развитием синуклеинопатий у человека, в частности спорадической формы болезни Паркинсона (БП). Мы собрали данные из более чем 130 экспериментальных работ, в которых были представлены подобные результаты, и обобщили частоты обнаружения различных групп бактерий в этих работах. Важно отметить, что крайне редко у пациентов с БП детектировали однонаправленное изменение численности той или иной группы микроорганизмов (только увеличение или только снижение). Тем не менее нам удалось выявить несколько групп бактерий, которые были сверхпредставлены у пациентов с БП в проанализированных исследованиях. Существуют различные предположения о молекулярных механизмах, объясняющих подобные взаимосвязи. Чаще всего агрегацию α -синуклеина (α Syn) связывают с развитием воспалительных процессов, которые происходят в ответ на изменения микробиома. Однако накапливаются экспериментальные свидетельства о влиянии бактериальных белков, в том числе амилоидов (curli), а также различных метаболитов на агрегацию α Syn. В обзоре мы представили актуальные сведения о подобных примерах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоиды, альфа-синуклеин, болезнь Паркинсона, микробиом, дисбиоз, нейродегенеративные заболевания, бактериальные амилоиды, curli.

DOI: 10.31857/S0320972524030089 EDN: WJXEUC

ВВЕДЕНИЕ. БЕЛОК α Syn И СИНУКЛЕИНОПАТИИ

Интерес к белкам синуклеинам (Syn) значительно вырос после того, как была обнаружена генетическая и нейропатологическая связь между α Syn (кодируется геном *SNCA*) [1] и болезнью Пар-

кинсона (БП). Белок α Syn является основным компонентом патологических белковых образований внутри нейронов – телец Леви. Наличие таких скоплений является одним из диагностических признаков БП [2]. К настоящему времени идентифицированы также β - и γ -синуклеины [3, 4]. Как и α Syn, они представляют собой небольшие

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БАС – боковой амиотрофический склероз; БП – болезнь Паркинсона; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты; ЛПС – липополисахариды; НС – нервная система; ПНС – периферическая нервная система; сБП – спорадическая форма болезни Паркинсона; ЦНС – центральная нервная система; ЭНС – энтеральная нервная система; А β – β -амилоид; α Syn – α -синуклеин.

* Адресат для корреспонденции.

растворимые белки, присутствующие в основном в клетках нервной ткани и в некоторых опухолях у позвоночных [3]. Белок aSyn состоит из 140 а.о. [5, 6]. В его составе выделяют три домена: N-концевую область (1–60 а.о.), которая связывается с клеточной мембраной; гидрофобный участок NAC (неамилоидный компонент; 61–95 а.о.) и C-концевую гидрофильную область (96–140 а.о.) [6–8]. Известно, что aSyn способствует снижению апоптоза в дофаминергических нейронах [9], предотвращает окисление ненасыщенных жирных кислот [10], регулирует транспорт синаптических везикул на пресинаптических терминалях [11], участвует в формировании комплекса SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment receptor; растворимый рецептор прикрепления NSF (N-этилмалеимид-чувствительный фактор)) [12] и клатрин-зависимом эндоцитозе [13]. Тем не менее все функции белка aSyn пока еще не изучены.

Агрегация белка aSyn. Несмотря на многочисленные исследования, структура aSyn в физиологических условиях до конца не установлена. Считается, что он встречается в цитозоле преимущественно в виде естественно развернутого мономера [14]. Белок aSyn имеет склонность к агрегации, в результате чего он может формировать как олигомеры, так и фибриллы [15]. Эти комплексы могут иметь характерную кросс- β -структуру и обладать другими свойствами амилоидов [16, 17].

На процесс агрегации aSyn могут влиять различные факторы, среди них: кислотность [18], температура [19], «молекулярный краудинг» (crowding) – эффект сокращения свободного объема цитоплазмы клетки и увеличения концентрации молекул [20], ионы металлов (таких как алюминий, медь, железо, кобальт и марганец) [19], органические растворители [21], пестициды [19], aSyn-связывающие белки [22–24], липиды экзосом [25] и др. Кроме того, на нейротоксичность aSyn и его агрегацию могут влиять посттрансляционные модификации, например фосфорилирование [26, 27], убиквитинирование [28], нитрование [29], сумоилирование [30], протеолиз [31] и N-концевое ацетилирование [32]. Среди агрегатов aSyn, обнаруженных в тельцах Леви, около 90% белка фосфорилировано по остатку S129 [33]. Однако пока неясно стимулирует ли фосфорилирование aSyn его агрегацию или же оно ей препятствует, а также влияет ли оно на нейротоксичность aSyn [34]. Роль гликирования в развитии синуклеинопатий также кажется спорной. С одной стороны, белок с этой модификацией идентифицируют в лобной коре пациентов с БП [35, 36], и при этом его уровень повышен в крови таких людей [37]. С другой стороны, гликированный мономерный или олигомерный aSyn не образует фибриллы сам по себе,

препятствует агрегации немодифицированного белка [38, 39], а также хуже включается в фибриллы aSyn [40].

Различные шапероны, в том числе бактерий, также оказывают влияние на агрегацию aSyn. Белки CsgC и DnaK *Escherichia coli* ингибируют этот процесс [41, 42], а SlyD и DnaJ, наоборот, стимулирует агрегацию [42, 43]. Шаперон FKBP12 человека, относящийся к тому же семейству белков, что и SlyD, также ускоряет образование амилоидных агрегатов aSyn [43].

Результаты экспериментов на животных моделях и культурах клеток, включая культуры нейронов, указывают на патогенную роль агрегации aSyn, которая приводит к нарушению синаптической передачи, работы митохондрий и эндоплазматического ретикулума, вызывает дефектную аутофагию, нейровоспаление и окислительный стресс [44, 45]. Также было высказано предположение, что агрегация aSyn в пресинаптических терминалях влияет на сборку комплексов SNARE, снижая таким образом эффективность высвобождения дофамина [46]. Более того, некоторые синаптические белки и рецепторы нейротрансмиттеров, например, рецепторы к N-метил-D-аспарагиновой кислоте (NMDA) были идентифицированы как предполагаемые партнеры взаимодействия aSyn [47]. Так, было показано, что aSyn коагрегирует с адаптерным белком нейрональной синтазы оксида азота 1 (NOS1AP или CAPON; nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein), опосредованно взаимодействующим с NMDA-рецепторами [24].

Прионоподобные свойства белка aSyn. Прионы у млекопитающих в узком смысле представляют собой инфекционные агенты, в которых белок PrP^{Sc} с измененной конформацией рекрутирует и преобразует свой нормальный аналог PrP^C, создавая таким образом самораспространяющиеся белковые частицы с неправильной укладкой, которые могут передаваться от клетки к клетке [48, 49]. Было выдвинуто предположение, что некоторые амилоидные белки, по-видимому, имеют аналогичный прионоподобный механизм распространения. Помимо aSyn, наличие прионных свойств предполагают и для других известных амилоидов: для β -амилоида (A β) [50], Tau [51] и хантинтина [52].

Впервые прионный механизм развития нейродегенерации при БП был предложен в работах Braak et al. [53, 54] на основе распределения патологических изменений, связанных с агрегацией aSyn, в головном мозге пациентов с БП. Позднее доказательства, подтверждающие прионоподобное распространение aSyn, были получены в результате наблюдения за агрегацией этого белка в трансплантированных тканях через несколько лет после операции, а именно была обнаружена

передача патологии Леви от хозяина к трансплантату [55, 56]. С тех пор в различных исследованиях было показано, что фибриллы α Syn, полученные из рекомбинантного белка или лизатов, выделенных из пораженного болезнью мозга, могут распространяться в прионоподобной манере в культурах различных типов клеток человека [57–59] и в мозге грызунов [60–63]. В ответ на вопрос, каким образом происходит перенос α Syn между клетками, было предложено несколько механизмов распространения α Syn. Например, есть свидетельства того, что мономеры, олигомеры и фибриллы α Syn могут транспортироваться с помощью везикул из клетки-донора путем экзоцитоза с последующим высвобождением во внеклеточное пространство и поглощением клетками-акцепторами [64, 65].

Синуклеинопатии – это группа нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся наличием включений в нейронах и/или глиальных оболочках, состоящих из агрегированного α Syn [66]. Патоморфологически синуклеинопатии можно разделить на две основные группы заболеваний: множественную системную атрофию (МСА) и болезни с формированием телец Леви [67, 68].

МСА можно разбить на два основных подтипа: оливопонтocerebellарную атрофию и стриатонигральную дегенерацию. МСА является двигательным расстройством, характеризующимся вариабельным сочетанием вегетативной недостаточности, паркинсонизма, мозжечковой атаксии, пирамидных знаков и немоторных симптомов [69].

Патологии с тельцами Леви подразделяют на три основных клинико-патологических подтипа: БП, деменция при БП и деменция с тельцами Леви. Однако тельца Леви и агрегаты α Syn обнаруживают и при ряде нейрометаболических заболеваний, таких как нейродегенерация, связанная с PLA2G6, нейродегенерация, связанная с POLG, болезнь Ниманна–Пика типа С и болезнь Краббе [70], а также у пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) [71]. Кроме того, амилоидные агрегаты α Syn отмечают в аксональных сфероидках при нейроаксональных дистрофиях [72]. Симптоматика БП будет рассмотрена далее, но стоит отметить, что у большинства пациентов (около 83%) на поздних стадиях она развивается в деменцию при БП [73]. Признаками деменции с тельцами Леви являются: деменция, нейрокогнитивные изменения, паркинсонизм, зрительные галлюцинации и расстройство поведения в фазе сна с быстрыми движениями глаз [74].

БП можно разделить на две формы: спорадическую (сБП) с неизвестной этиологией и семейную с известной генетической этиологией [75]. В последнем случае выявлены замены в аминокислотной последовательности α Syn (например, A53T, A30P, E46K, A53E), которые связаны с аутосомно-доминантными формами БП [76–79]. Кроме того, семей-

ную БП вызывают дупликации и трипликации гена *SNCA* [80, 81]. В качестве факторов риска развития БП также рассматриваются различные мутации в других генах. Среди таких генов наиболее часто выявляют ген *LRRK2* (кодирует обогащенную лейциновыми повторами киназу 2; LRRK2), экспрессия которого увеличивается при воспалении в тканях толстой кишки у пациентов с БП и болезнью Крона, а также в клетках периферической иммунной системы [82]. Другими генами, мутации в которых ассоциируются с БП, являются *PINK1* (кодирует индуцированную фосфатазой и гомологом тензина киназу 1; PINK1) и *PRKN* (кодирует убиквитинлигазу паркин; parkin), которые играют ключевую роль в адаптивном иммунитете, репрессирова презентацию митохондриальных антигенов, т.е. являются репрессором аутоиммунных механизмов. Мутации в этих генах приводят к дисфункции митохондрий в некоторых формах БП [83].

БП сопровождается рядом симптомов, которые разделяют на двигательные (моторные) и немоторные. К моторным относятся тремор и ригидность конечностей, замедление движения (брадикинезия) и нарушение походки. Немоторные симптомы проявляются в виде нейропсихических нарушений, проблем со сном, депрессии, физической и умственной усталости, а также сенсорных расстройств: зрительной дисфункции, связанной с быстрым движением глазных яблок, гипосмии – снижении способности ощущать и различать запахи [84–86]. В большинстве случаев немоторные симптомы проявляются задолго до двигательных, что поднимает вопрос о том, где именно начинается развитие синуклеинопатий: в периферической (ПНС) или центральной нервной системе (ЦНС) [87].

В контексте обзора необходимо отдельно отметить, что у пациентов с БП (в частности, с сБП) наблюдаются желудочно-кишечные расстройства: избыточное слюноотделение, дисфагия, затруднение опорожнения желудка, запоры и ухудшение дефекации [84]. При этом нередко наблюдаются изменения в микробиоме кишечника (дисбиоз) [88–90]. Далее, мы более подробно обсудим примеры ассоциации между дисбиозом и развитием синуклеинопатий. При этом мы будем использовать термин «дисбиоз» в широком смысле в тех случаях, если речь идет как об увеличении, так и о снижении количества тех или иных групп микроорганизмов. В противном случае будет упомянут конкретный эффект. Термином «микробиом» мы будем обозначать характерное микробное сообщество (микробиоту), которое занимает некую среду обитания, обладающую определенными физико-химическими свойствами. Стоит отметить, что это понятие включает не только живые объекты, но и продукты их жизнедеятельности [91].

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОМА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ

Кишечный микробиом человека. Для того чтобы разобраться, какие изменения происходят в микробиоме желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у пациентов с БП, рассмотрим сначала состав кишечной микробиоты в норме. Человеческая микробиота в понимании современных исследователей представляет собой набор всех микроорганизмов, населяющих тело человека [92]. Она включает в себя бактерий, архей, одноклеточных эукариот (грибы и простейшие) и вирусов и непосредственно вовлечена в обеспечение здорового функционирования организма, что позволяет воспринимать ее как «скрытый орган» человека [93].

Для исследования микробиома человека в настоящее время активно используется два метода. Первый – ампликонное секвенирование переменного участка V3–V4 16S рибосомной РНК (рРНК), которое позволяет охарактеризовать состав бактерий и архей на таксономическом уровне и обнаружить структурные изменения в микробных сообществах. Однако таким способом нельзя определить штаммовые различия. Метагеномное секвенирование методом дробовика (shotgun sequencing) позволяет более конкретно оценить все геномное содержимое микробиома и добиться точной таксономической классификации, а также определить функции бактерий [94]. Различные стратегии, используемые для анализа наборов метагеномных данных, опираются на справочные базы данных, поэтому существует потребность в обширных и хорошо охарактеризованных коллекциях референсных микробных геномов. В настоящее время опубликовано множество масштабных исследований, посвященных расшифровке состава микробиоты кишечника человека [94–98].

Микробиоту можно подразделить на оральную, кожную, кишечную и респираторную, при этом считается, что микробиота кишечника является наиболее важной в контексте поддержания здоровья всего организма и самой богатой по видовому составу [93, 97]. Нынешнее понимание микробного сообщества кишечника человека в основном ограничивается таксономическими особенностями на уровне рода [97]. Тем не менее, по разным оценкам, кишечная микробиота человека включает от 200 до более 1000 видов бактерий [99–101]. Показано, что у здоровых людей кишечную микробиоту в основном формируют представители следующих бактериальных отделов: Bacillota (Firmicutes), Bacteroidota (Bacteroidetes), Actinomycetota (Actinobacteria), Pseudomonadota (Proteobacteria), Fusobacteriota (Fusobacteria) и Verrucomicrobiota (Verrucomicrobia) [102], среди

которых преобладают Bacillota и Bacteroidota [99, 102, 103] или, по другим работам, Bacillota и Actinomycetota [104]. В состав микробиома кишечника человека также входят грибы родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia* и *Cladosporium* [105] и археи (в основном метаногенные), среди которых преобладает вид *Methanobrevibacter smithii* [100, 106, 107].

Несмотря на многочисленные работы по изучению «здорового микробиома» человека, точного определения этого понятия нет [108]. Считается, что в норме микробиом характеризуется разнообразием микроорганизмов и устойчивым преобладанием двух ключевых отделов: Bacillota и Bacteroidota [109]. В ряде случаев при описании «здорового» микробиома с помощью секвенирования обращают внимание также на разнообразие генов, вовлеченных в поддержание симбиоза с хозяином [93, 110]. Следует отметить, что относительное распределение микроорганизмов уникально между людьми и может претерпевать изменения внутри одного и того же индивидуума под влиянием различных факторов. На микробиом человека при отсутствии патологий могут влиять следующие факторы: пол, возраст, диета, антибиотики, состояние окружающей среды, этническая принадлежность и многое другое [93, 110, 111]. Понимание состава здоровой микробиоты человека позволит разрабатывать эффективные стратегии манипулирования микробиомом в лечебных целях. В настоящее время уже используются несколько методов, среди которых наиболее распространены трансплантация кишечной микробиоты и прием пребиотиков, пробиотиков или синбиотиков [92].

Микробиота кишечника участвует в ряде биологических процессов. В первую очередь она позволяет эффективно извлекать энергию и питательные вещества из пищи за счет присутствия универсальных «метаболических» генов, продукты которых участвуют в различных ферментативных реакциях и биохимических путях [112]. Микробиота кишечника способна метаболизировать полисахариды и белки в короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), большинство из которых представляют собой ацетаты, бутираты или пропионаты. Они служат источником энергии для кишечного эпителия и печени [93, 113, 114]. За счет непосредственного участия кишечной микробиоты обеспечивается синтез биоактивных молекул, таких как витамины, аминокислоты и липиды [93].

Микробиота кишечника выполняет защитную роль в организме человека. Она не только защищает от внешних патогенов, производя противомикробные вещества, но и служит важным компонентом в развитии слизистой оболочки

кишечника и иммунной системы [93]. В контексте обзора важно отметить, что микробиота кишечника также опосредованно участвует в иммуномодуляции, в частности, в регуляции воспалительных процессов. Например, она опосредует миграцию нейтрофилов, что в дальнейшем оказывает влияние на дифференцировку Т-лимфоцитов в разные типы регуляторных и хелперных Т-клеток [115]. Дисбаланс кишечной микрофлоры может вести к развитию аутоиммунных заболеваний [116]. В дополнение к этому сами микроорганизмы способны продуцировать ряд молекул, например, дефензины, способствующие усилению воспалительного процесса [117]. Также есть данные, указывающие на роль микробиоты в поддержании функций CD8⁺ Т-лимфоцитов [118].

Не менее важная роль микробиоты кишечника состоит в поддержании постоянства внутренней среды путем взаимодействия с мозгом. Это взаимодействие носит название ось «кишечник–мозг» и является двунаправленной системой сигнальных путей, затрагивающих блуждающий нерв (*vagus*), иммунную систему и бактериальные метаболиты [119]. Продуцируемые кишечной микробиотой КЦЖК способны влиять на высвобождение нейротрансмиттеров слизистой оболочки [120], модулирование нейротрансмиттеров [121] и функционирование парасимпатической нервной системы (НС) [122]. В дополнение к этому, микробиота кишечника может влиять на работу афферентных сенсорных нервов, например, повышая их возбудимость посредством ингибирования кальций-зависимых каналов, как это происходит в случае *Lactobacillus reuteri* [123].

Микробиота и нейродегенеративные заболевания. Известен целый ряд разных примеров ассоциации изменения микробиома с различными заболеваниями, в том числе нейродегенеративными. Примеры включают болезнь Крона [124], синдром раздраженного кишечника [125], рак толстой кишки [126], болезнь Альцгеймера [127], диабет [128], ожирение [129] и ревматоидный артрит [130]. Далее, мы приведем несколько свидетельств взаимосвязи микробиома и развития нейродегенеративных заболеваний.

БА представляет собой нейродегенеративное заболевание, ведущее к прогрессирующей когнитивной дисфункции [131]. В микробиоме больных БА показано увеличение количества бактерий родов *Escherichia* и *Shigella*, которые вызывают провоспалительное состояние, а также снижение концентрации *Eubacterium rectale*, проявляющих противовоспалительную активность [132]. Также известно, что липополисахариды (ЛПС) бактерий могут индуцировать образование фибрилл Аβ [133, 134]. Эти и другие данные позволили высказать предположение, что некоторые

бактерии могут секретировать большое количество ЛПС и амилоидных белков, которые способны преодолевать ослабевающие при старении или заболевании кишечный или гематоэнцефалический барьеры, а также косвенно влиять на прохождение через эти защитные физиологические барьеры провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию БА [131, 135].

Дисбиоз кишечника считается важным фактором, влияющим на патогенез рассеянного склероза, который представляет собой иммуноопосредованное хроническое неврологическое заболевание, связанное с демиелинизацией, повреждением аксонов и нейродегенерацией [136]. У пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим рассеянным склерозом описано снижение количества бактерий, связанных с противовоспалительным ответом, а также увеличение числа бактерий, ответственных за провоспалительные реакции [137].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, связанное с гибелью нейронов головного и спинного мозга, а также двигательных нейронов. В кишечнике больных БАС, а также трансгенных мышей, используемых для моделирования этого расстройства, показано снижение уровня различных бактерий, продуцирующих бутират (например, *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Oscillibacter*, *Anaerostipes*) [138–140]. Кроме того, показано, что добавление бутирата в питьевую воду трансгенным мышам, используемым в качестве модели для изучения БАС, замедляет развитие заболевания [141].

Таким образом, известно уже немало примеров, демонстрирующих роль микробиома либо его метаболитов в развитии нейродегенеративных заболеваний. Существуют разнообразные гипотезы о возможных молекулярных механизмах, лежащих в основе этих явлений. В следующих разделах мы более подробно остановимся на роли микробиома в развитии синуклеинопатий и гипотезах, объясняющих эту взаимосвязь.

Ассоциация между микробиомом кишечника и синуклеинопатиями. Впервые в литературе связь между изменением микробиома кишечника и БП была показана в 2015 г. [142]. В этом исследовании в кишечном микробиоме у пациентов с БП было установлено пониженное содержание бактерий семейства Prevotellaceae и сделан вывод, что микробиом кишечника изменяется при БП, а это приводит к моторной дисфункции. Чуть позднее были опубликованы еще две работы: в одной авторы продемонстрировали у пациентов с БП снижение количества «противовоспалительных» бактерий, производящих бутираты, из родов *Blautia*, *Coprococcus* и *Roseburia* [143]. В другой работе найдена ассоциация БП с другими группами

бактерий, в частности количество бактерий рода *Lactobacillus* было выше, в то время как общее количество анализируемых бактерий *Clostridium coccoides* и *Bacteroides fragilis* было ниже контрольных. Также у пациентов с БП на основе анализа уровней ЛПС-связывающего белка и диаминооксидазы в сыворотке крови была спрогнозирована повышенная проницаемость кишечника. Предположительно, она может способствовать развитию дисбиоза и прогрессированию БП либо же быть результатом дисбиоза [144]. Эти исследования положили начало становлению гипотезы, что дисбиоз может быть причиной нейровоспаления, которое приводит к неправильному сворачиванию aSyn и развитию БП. После этого в течение неполных 10 лет интерес к этой тематике активно рос: вышло большое количество научных публикаций с метагеномными исследованиями ЖКТ пациентов с БП и прочими синуклеинопатиями. Только на тему БП в базе данных PubMed находится уже более 130 экспериментальных статей (дата обращения: 04.12.2022).

Судя по всему, количество исследований будет продолжать увеличиваться, особенно если учитывать тот факт, что среди результатов нередко встречаются противоречия. Например, существует разница в показателях разнообразия микробиома внутри одной группы – БП или контроль (так называемое α -разнообразие): одни работы показывают снижение разнообразия у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой здоровых людей [145, 146]; в других, наоборот, продемонстрировано повышение [147] либо же отсутствие различия [148]. При этом на уровне β -разнообразия (различия в составе микробиоты между образцами или группами) в большинстве работ микробиом пациентов с БП характеризуется значимым изменением состава по сравнению с контролем. Для того чтобы суммировать текущие результаты по данной тематике, мы провели анализ литературы и представили все найденные ассоциации изменений в составе микробиома с БП в виде филогенетического дерева (рис. 1). Несмотря на то что между проанализированными работами по изучению изменения состава микробиома кишечника при БП прослеживаются значительные различия, такие как дизайн исследования, соотношение полов, возраст, продолжительность заболевания и прочее, в нашем анализе мы не заостряли внимание на перечисленных различиях в исследовательских статьях и брали в анализ все статистически достоверные ассоциации. По этим данным представители отделов Bacillota и Bacteroidota наиболее часто ассоциированы с БП, причем в обоих случаях взаимосвязи показаны как для снижения, так и для увеличения числа этих микроорганизмов. В целом, это ожидаемо, поскольку

исследуемые группы образуют основу микробиома человека.

Мы также проанализировали ассоциации на уровне семейств бактерий для того, чтобы подробнее рассмотреть потенциальные причины дисбиоза при БП (рис. 1). Характерно, что для многих семейств, как и более крупных таксономических групп, показаны разнонаправленные ассоциации. А именно с развитием БП связано как сокращение, так и увеличение численности конкретной группы. Наиболее часто среди семейств, изменение численности которых (увеличение либо снижение) описано у людей с БП, встречаются следующие: Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Desulfovibrionaceae, Akkermansiaceae, Rikenellaceae, Verrucomicrobiaceae, Porphyromonadaceae, Tannerellaceae и Enterobacteriaceae. Сниженная численность в составе микробиома характерна для представителей семейств Oscillospiraceae, Lachnospiraceae, Clostridiaceae и Prevotellaceae. При этом важно отметить, что крайне редко у пациентов с БП наблюдали однонаправленное изменение численности (только увеличение или только снижение) той или иной группы. Исключением из этой тенденции являются семейства: Eggerthellaceae, Desulfovibrionaceae, Porphyromonadaceae, Rikenellaceae, Akkermansiaceae и Verrucomicrobiaceae (приведены только семейства, представители которых были найдены в большом количестве независимых работ).

По литературным данным, для БП в целом показано сокращение бактериальных таксонов, которые связаны с противовоспалительными/нейропротекторными эффектами, особенно в семействе Lachnospiraceae и ключевых членах, таких как *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Coprococcus* и *Blautia* [150]. Изменение в представленности семейства Lachnospiraceae коррелирует с измененной скоростью метаболизма при БП [150]. Несколько членов семейства Lachnospiraceae привлекают внимание из-за своей способности производить КЦЖК [151].

Обобщение доступной информации по изменению состава микробиома при БП позволило нам увидеть общую картину, а именно выделить ключевые таксоны, которые, предположительно, главным образом вносят вклад в развитие кишечных симптомов. При этом есть много видов бактерий, для которых ассоциации с БП показаны только в некоторых работах, поэтому требуются дальнейшие исследования кишечного метагенома человека, особенно с применением секвенирования методом дробовика, который позволяет выявлять состав микробного сообщества вплоть до штаммов. Это позволит раскрыть механизмы развития дисбиоза при БП и разработать методы его лечения.

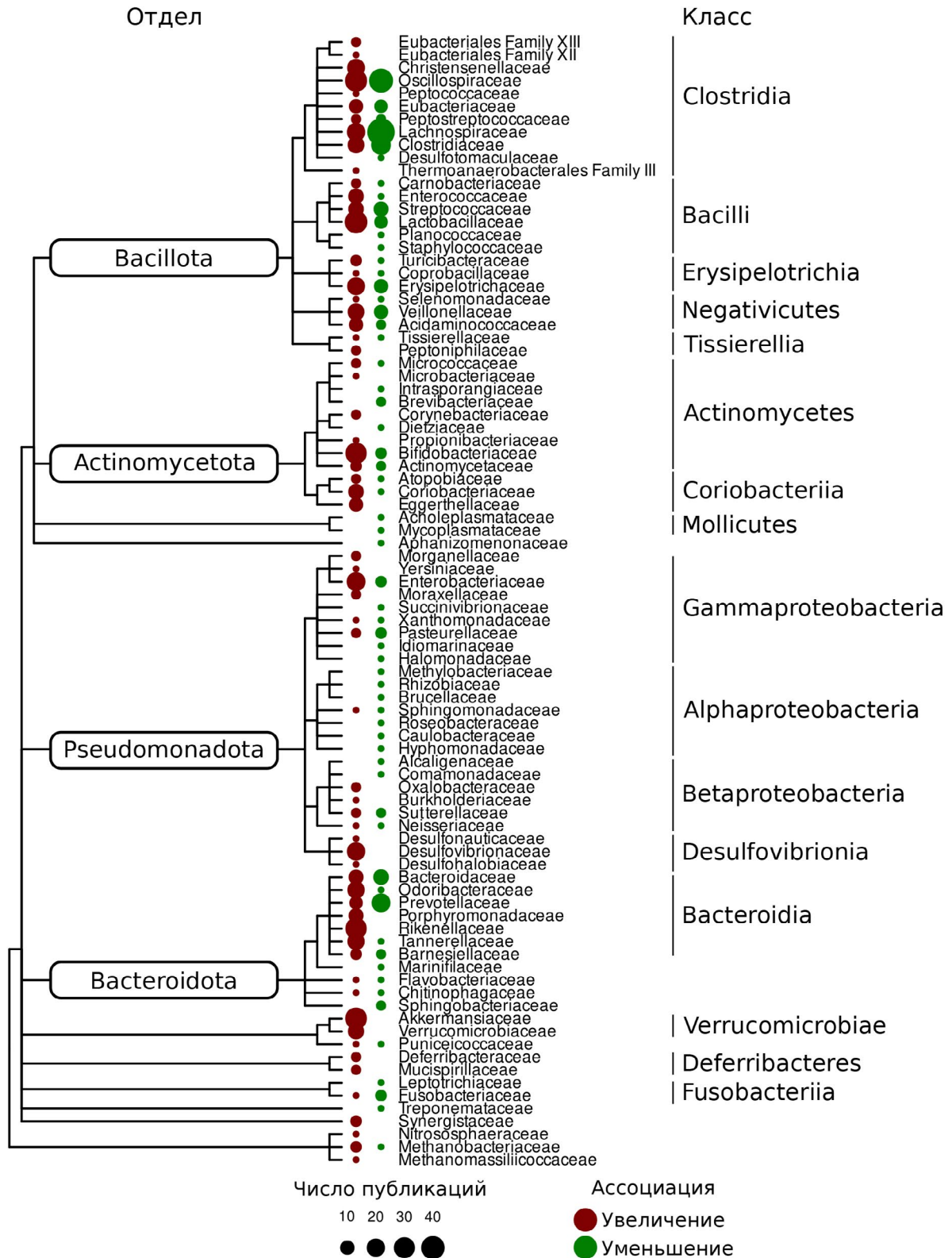


Рис. 1. Известные ассоциации между изменением микробиома и развитием БП. Таксономическое дерево семейств бактерий микробиома человека (по базе данных NCBI Taxonomy) с отмеченными количествами случаев описания ассоциаций (публикаций) представителей соответствующего семейства с БП. Отдельно рассмотрены случаи, когда у больных наблюдается увеличение либо уменьшение численности конкретных групп бактерий. Поиск статей был проведен по базе данных PubMed (дата обращения – 04.12.2022; поисковый запрос был аналогичен работе Toh et al., 2022 г.: «(«Microbiota» OR «Microbiome» OR «Microflora» OR «Dysbiosis») AND («Parkinson» OR «Parkinsonism»)» [149]. В анализ были включены 138 экспериментальных статей из общего списка, включающего 1061 публикацию. Указаны классы с двумя и более выявленными семействами, а также наиболее представленные отделы бактерий

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ, СВЯЗАННЫХ С ДИСБИОЗОМ

Гипотеза Браака о неправильной укладке aSyn в кишечнике. Агрегаты aSyn встречаются не только в ЦНС, их также обнаруживают в ПНС, например, в части, иннервирующей кишечник. Впервые гипотеза о развитии сБП в результате агрегации aSyn в нейронах кишечника и последующего распространения патологии в ЦНС была выдвинута Braak et al. [53, 54]. В своей работе они изучили локализацию скоплений aSyn в различных частях НС пациентов с сБП. В частности, были проанализированы препараты энтеральной нервной системы (ЭНС), дорзальных моторных ядер блуждающего нерва, черной субстанции, височного мезокортекса (промежуточная кора) и неокортекса. Важным наблюдением стало то, что во всех случаях скопления aSyn были найдены в ЭНС и блуждающем нерве, а для остальных зон наблюдалась корреляция между наличием агрегатов этого белка и стадией заболевания. Агрегаты aSyn в неокортексе были найдены только у пациентов, находящихся на самой поздней стадии развития болезни [54]. Эта гипотеза хорошо согласуется с рядом других работ. Тельца Леви обнаруживают в ауэрбаховых и мейсснеровых скоплениях в кишечнике у пациентов с БП [152, 153]. Наличие aSyn в нейронах *vagus*, иннервирующих кишечник, также было продемонстрировано экспериментально [154]. Например, скопления aSyn обнаруживают в образцах биопсии кишечника у больных БП, в том числе на ранних стадиях, а также до развития симптомов болезни [155–157]. Также существуют данные, что ваготомия снижает риск развития БП [158]. Экспериментальные подтверждения передачи агрегатов aSyn из кишечника в мозг были получены на крысах. Животных подвергали инъекциям в стенку кишечника либо белковых лизатов больных БП, либо агрегатов рекомбинантного aSyn человека. После этого через разные промежутки времени анализировали наличие этого белка в различных участках блуждающего нерва [159]. В экспериментах с мышами удалось добиться агрегации aSyn в кишечнике за счет введения ротенона (изофлавоноид, используемый в качестве инсектицида и пестицида широкого спектра действия), а также показать, что с течением времени после начала эксперимента агрегаты обнаруживают в спинном и головном мозге [160]. В качестве фактора, запускающего агрегацию aSyn в кишечнике, авторы гипотезы рассматривали различные варианты, в том числе присутствие патогенов или вирусов [161]. Прионоподобные свойства aSyn, подробно описанные в подразделе «Прионоподобные свойства белка aSyn», также свидетельствуют в пользу того, что

синуклеинопатии могут начинаться в ПНС, а затем передаваться в ЦНС.

Существуют данные, противоречащие гипотезе Браака. В частности, при исследовании пациентов с патологией Леви не были обнаружены случаи, при которых была затронута только ПНС (место начала развития патологии, согласно гипотезе Браака), т.е. скопления aSyn всегда обнаруживали в ЭНС и в ЦНС [162]. С другой стороны, существует точка зрения, что подобные наблюдения могут быть ложноотрицательными из-за недостаточного объема выборки [87].

Немногим позже гипотезы Браака было выдвинуто предположение, что первые этапы развития синуклеинопатий также могут затрагивать обонятельную систему и начинаться в ней – в частности, в обонятельных луковицах. Это стало развитием концепции Браака, получившим и в литературе название «двухударная» (dual-hit) гипотеза [161]. На сегодняшний день нет единого мнения о том, где и как начинается агрегация aSyn, при этом гипотеза Браака остается наиболее цитируемой [87].

Взаимосвязь между aSyn и симптомами ЖКТ. За последние 20 лет с момента выдвижения гипотезы Браака были предложены различные молекулярные механизмы, которые объясняют развитие синуклеинопатии в ЭНС или появление соответствующих симптомов. Одна из них связана с предполагаемой ролью aSyn в качестве иммуномодулятора. Несколько работ показывают, что этот белок может стимулировать клетки микроглии или моноцитов продуцировать воспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β) [163, 164]. Мономерный и олигомерный aSyn стимулирует привлечение нейтрофилов и моноцитов, а также созревание дендритных клеток. Также была выявлена положительная корреляция между кишечным воспалением и экспрессией aSyn. При этом было выдвинуто предположение, что секреция aSyn является стимулом к запуску воспалительных процессов [165]. Увеличение экспрессии aSyn является фактором, провоцирующим развитие БП, что ранее было показано у пациентов с несколькими копиями локуса *SNCA* [80, 81], – это может объяснить развитие синуклеинопатии. С другой стороны, сверхэкспрессия aSyn может ингибировать высвобождение нейротрансмиттеров и нейромедиаторов (дофамина, ацетилхолина, норадреналина и т.д.) и за счет этого оказывать влияние на работу кишечника [166].

Белок aSyn может повышать экспрессию генов Toll-подобных рецепторов (TLR) и провоспалительных цитокинов в клетках микроглии. TLR, участвующие во врожденном иммунном ответе, распознают наиболее распространенные ЛПС бактерий. Активация TLR-сигналинга может привести к апоптозу дофаминергических нейронов.

Кроме этого, активация микроглии, в свою очередь, увеличивает продукцию оксида азота (NO), и в дальнейшем развитие синуклеинопатии может происходить за счет нитрования aSyn в соседних нейронах и их апоптоза [167]. Эта модификация также потенциально стимулирует формирование олигомеров aSyn, а белок с такой модификацией обнаруживают в тельцах Леви у пациентов с БП [168]. Повышение количества NO-синтазы было продемонстрировано у модельных мышей с индуцированным воспалением и, как результат, повышенной агрегацией aSyn [169].

Различные вещества, попадающие в ЖКТ, могут провоцировать развитие БП: среди примеров можно отметить ксенобиотики (гербициды и пестициды) [170, 171]. На мышинной модели показано, что эти вещества могут приводить к гибели дофаминергических нейронов и развитию БП [172]. Косвенным подтверждением этой гипотезы также является активация пути деградации ксенобиотиков в кишечнике пациентов с БП [173]. Предположительно, некоторые антибиотики оказывают влияние на патогенез БП, содействуя бактериям, продуцирующим curli. Антибиотики в целом снижают микробное разнообразие кишечной микробиоты, модулируют соотношение Bacillota/Bacteroidota и приводят к чрезмерному росту оппортунистических патогенов [174]. Провоцировать развитие БП также могут и некоторые бактериальные метаболиты, в частности β -N-метиламино-L-аланин [175]. КЦЖК, продуцируемые бактериями, также могут вызывать симптомы БП. Это было показано на трансгенных мышях, сверхпродуцирующих aSyn и лишенных собственной микробиоты. При получении в пищу этих веществ у животных наблюдали активацию микроглии, агрегацию aSyn, а также развитие моторных симптомов, характерных для БП. Авторы предполагают, что именно активация микроглии в данном случае является ключевым элементом каскада, приводящего к развитию заболевания [176]. С этим согласуются более ранние данные, что воспалительные процессы, вызванные инъекцией ЛПС, стимулируют агрегацию aSyn у трансгенных мышей, продуцирующих aSyn человека с заменой A53T [169].

Гематоэнцефалический барьер, частью которого является слизистая оболочка кишечника, лежащая над эпителиальным слоем, служит важным фактором защиты от развития БП. Нормальная микрофлора кишечника и ее метаболиты также являются частью барьера, поэтому дисбиоз может приводить к тому, что патогенные бактерии проникают через плотные контакты в пейеровы бляшки. В результате возникает воспаление кишечника, которое может способствовать воспалительному процессу в ПНС и появлению симптомов БП [177]. С другой стороны, как было отмечено

выше, воспаление может вызывать и сверхпродукцию aSyn.

Агрегация aSyn в присутствии амилоидов. Выше мы рассмотрели гипотезу развития синуклеинопатии через ЖКТ. Однако остается вопрос, каким именно образом возникают агрегаты aSyn в нейронах кишечника. Причина этого, вероятно, кроется в возможности индукции агрегации aSyn с помощью других амилоидных агрегатов, которые могут находиться на поверхности бактерий, населяющих просвет кишечника, как это было уже упомянуто выше.

Феномен коагрегации белков в составе амилоидных агрегатов насчитывает массу примеров, и их число продолжает увеличиваться [178]. Примером функциональной коагрегации белков в составе амилоидов является пара белков Rip1 и Rip3. Их агрегация является одним из сигналов для запуска процессов некролиза [179], и даже получена 3D-структура гетерофибрилл этих белков [180]. Ключевую роль в этом процессе играют аминокислотные мотивы RHIM (receptor-interacting protein kinase homotypic interaction motif; мотив гомотипического взаимодействия с рецептор-взаимодействующей протеинкиназой (RIP)), которые также обнаружены у белка нейроспоры Het-s (*Podospora anserina*), способного формировать амилоидные агрегаты [181]. Помимо этого, известны также многочисленные примеры коагрегации белков, связанных с различными амилоидозами человека, в частности, показана коагрегация следующих белков: A β и Tau [182]; A β и амилина [183]; A β и PrP [184, 185].

В литературе есть ряд свидетельств коагрегации aSyn с различными белками человека. Его агрегация может быть индуцирована *in vitro* фибриллами A β (1–40 и 1–42) [186], IAPP [187], лизоцима, а также GroES [188]. У пациентов с БП и БА aSyn и A β физически взаимодействуют [189]. Также недавно было продемонстрировано, что aSyn коагрегирует с белком NOS1AP [190].

В настоящее время активно накапливаются данные о том, что белки других организмов могут стимулировать агрегацию aSyn. Пептиды белка PSMas, который формирует амилоидоподобные агрегаты у *Staphylococcus aureus*, способны ускорять агрегацию aSyn *in vitro* [191]. Аналогичным эффектом обладает N-белок SARS-CoV-2 [192], но о его амилоидных свойствах ничего не известно. Наиболее изученным примером взаимодействия амилоидов разных организмов является пара CsgA и aSyn. CsgA – это основной компонент внеклеточных фибрилл, называемых curli, у *E. coli* и других бактерий [24, 193]. В двух недавних работах на модельных животных были получены результаты, свидетельствующие о том, что curli стимулируют агрегацию aSyn и развитие синук-

леинопатий [194, 195]. Исследования были проведены на крысах, склонных к развитию синуклеинопатии [194], либо мышах, лишенных собственной микробиоты и с увеличенной продукцией α Syn [195]. В ходе экспериментов животных перорально заражали штаммами *E. coli*, содержащими *curli*, что приводило к развитию синуклеинопатии, чего не наблюдалось у контрольной группы, которую заражали бактериями без агрегатов. У крыс наблюдали увеличение количества бляшек α Syn в ганглиозных клетках кишечника (ауэрбахово сплетение и подслизистая оболочка), а также нейронах гиппокампа и стриатума. Авторы также детектировали развитие реакций врожденного иммунного ответа в головном мозге. При этом опытная группа животных не отличалась от контрольной по весу, а также уровню клеточных воспалительных процессов в тканях ротовой полости, почек, глаз или желудка [194]. В экспериментах с мышами было показано, что только введение бактерий, содержащих *curli*, вызывает нарушение двигательных функций, увеличение количества агрегированного и фосфорилированного α Syn (S129) в разных участках головного мозга, а также развитие воспалительных процессов в ЖКТ и НС. В экспериментах *in vitro* CsgA *E. coli* и его ортологи из других организмов ускоряют агрегацию α Syn [195, 196]. При этом вопрос о роли амилоидных агрегатов CsgA в этом процессе, скорее, остается открытым. Бактерии, продуцирующие неамилоидогенный вариант CsgA, названный «SlowGo», вызывают описанные симптомы реже [195]. Инъекция амилоидогенных пептидов CsgA в кишечную стенку модельных мышей приводит к нарушению моторных функций, а также ускоряет агрегацию α Syn. В экспериментах с неамилоидными пептидами CsgA подобных эффектов обнаружено не было [195]. С другой стороны, есть свидетельства, что замедление агрегации CsgA приводит к ускорению агрегации α Syn, т.е. именно мономерный CsgA играет ключевую роль [196].

Ускоренную агрегацию α Syn, слитого с желтым флуоресцентным белком (YFP), наблюдали у трансгенных нематод *Caenorhabditis elegans*, которые получали в пищу бактерии, содержащие *curli* [194, 197]. При этом агрегация α Syn в нематодах коррелировала с количеством *curli*, и наблюдалась колокализация α Syn и CsgA в мышцах и нейронах [198]. Наконец, гены *csgA* и *csgB* были выявлены в скрининге, направленном на идентификацию бактериальных генов, отвечающих за нейродегенерацию у *C. elegans*, продуцирующих α Syn (A53T), склонный к агрегации. У таких нематод наблюдались дегенерация моторных нейронов и характерные нарушения поведения при получении в пищу бактерий *E. coli* K-12, в норме продуцирующих *curli*. В ходе скрининга были проана-

лизированы производные этого бактериального штамма с делециями генов, которые не являются жизненно важными. Оказалось, что отсутствие в клетках бактерий именно CsgA и CsgB способствовало снижению патогенеза у нематод. Всего в этом скрининге были идентифицированы 38 генов с аналогичными эффектами [198].

О потенциальной роли CsgA в развитии БП у человека свидетельствуют недавние клинические данные. В крови пациентов с БП присутствуют белки, которые дают реакцию с антителами к пептиду CsgA. Причем сигнал от этих антител выше в группе больных по сравнению со здоровыми индивидуумами [199]. Кроме этого, недавно было продемонстрировано, что энтероэндокринные клетки, которые являются компонентом кишечного эпителия, т.е. находятся в непосредственном контакте с микробиотой, продуцируют α Syn [200, 201].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно наиболее распространенной теории, развитие БП начинается в кишечном тракте под воздействием внешних факторов [54, 202]. Тем не менее, что именно способствует агрегации α Syn в ЭНС и какой молекулярный механизм лежит в основе этих процессов, остается неясным.

На сегодняшний день описана масса ассоциаций между дисбалансом микрофлоры кишечника и развитием БП и других синуклеинопатий. В представленном обзоре мы постарались обобщить наиболее значимую и актуальную информацию по этому вопросу. Существуют разные гипотезы о том, как именно бактерии могут вызывать развитие синуклеинопатий (рис. 2). Одной из наиболее популярных является гипотеза, связанная с развитием воспаления, которое влечет за собой агрегацию α Syn. К подтверждению этой гипотезы можно отнести положительную корреляцию между степенью воспаления, вызванного вирусной инфекцией, и количеством α Syn в аксонах нейронов кишечника [165]. Правда, и в данном случае эта связь может объясняться разными молекулярными механизмами. Среди наиболее вероятных – это сверхпродукция α Syn при воспалении, а также его нитрование [29, 165, 167]. С другой стороны, существует ряд предположений о роли бактериальных белков или метаболитов в развитии синуклеинопатий. Одними из самых новых кандидатов на роль триггера агрегации α Syn являются амилоидные белки бактерий (рис. 2). Целый ряд работ, рассмотренных выше, поддерживает эту идею и свидетельствует об индукции агрегации α Syn фибриллами CsgA [194–196, 198]. К аналогичному эффекту могут приводить некоторые шапероны бактерий [42, 43]. Наконец, развитию БП могут

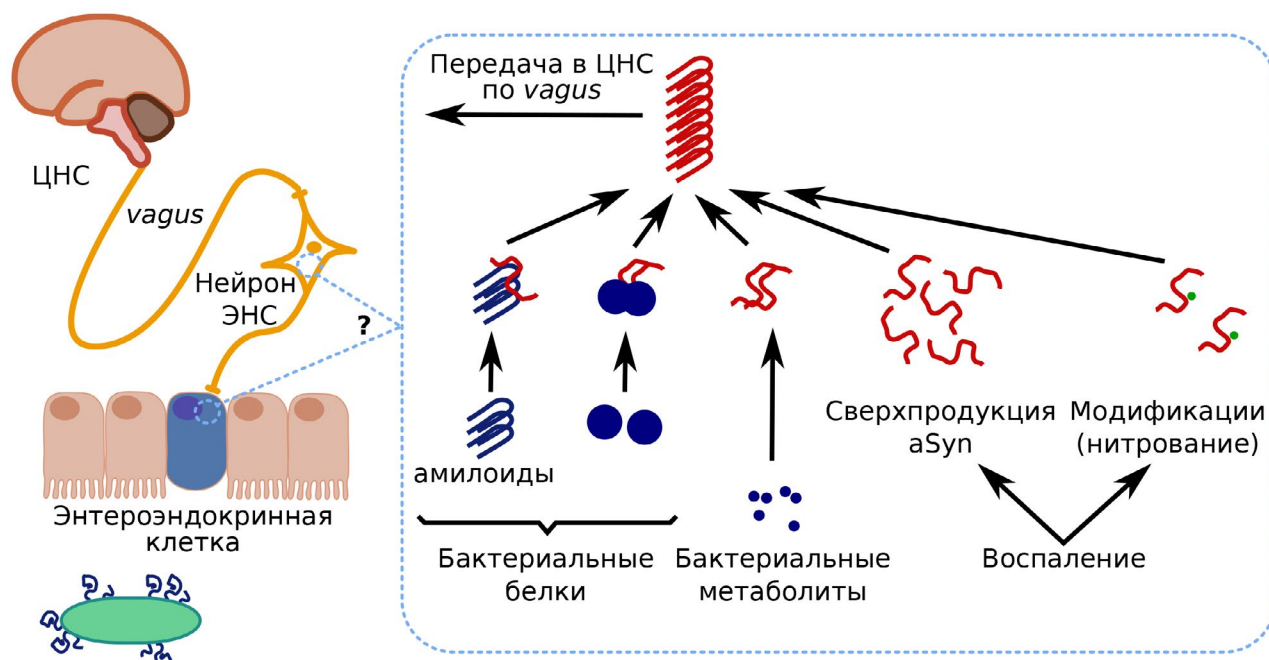


Рис. 2. Возможные механизмы агрегации aSyn в кишечнике. Знак вопроса на схеме отражает тот факт, что нет точных данных, в каких именно клетках происходят процессы, представленные в выноске

способствовать метаболиты бактерий (например, КЦЖК) (рис. 2), однако, в отличие от предыдущих примеров, пока не ясны конкретные молекулярные механизмы этого процесса. Одним из контраргументов против гипотезы индукции агрегации aSyn за счет факторов бактериального происхождения является наличие барьерной функции у эпителия кишечника. Однако ее эффективность значительно снижается с возрастом, и проницаемость барьера для крупных молекул увеличивается [154, 203, 204].

Вклад авторов. Трубицина Н.П. – написание подраздела «Ассоциация между микробиомом кишечника и синуклеинопатиями», оформление окончательной версии публикации, редактирование статьи; Матив А.Б. – написание раздела «Белок aSyn и синуклеинопатии» и подраздела «Микробиота и нейродегенеративные заболевания», редактирование статьи; Рогоза Т.М. – написа-

ние подраздела «Взаимосвязь между aSyn и симптомами ЖКТ», редактирование статьи; Зудилова А.А. и Безгина М.Д. – написание подраздела «Кишечный микробиом человека»; Журавлева Г.А. – редактирование статьи; Бондарев С.А. – написание раздела «Возможные механизмы развития синуклеинопатий, связанных с дисбиозом», подготовка иллюстраций, редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-10042).

Благодарности. Статья посвящается 300-летию СПбГУ. Авторы благодарят Ольгу Михайловну Землянко за критическое прочтение рукописи.

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. Stefanis, L. (2012) α -Synuclein in Parkinson's disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**, a009399, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
2. Rochet, J. C., and Lansbury, P. T. (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 60-68, [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00049-4](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00049-4).
3. George, J. M. (2002) The synucleins, *Genome Biol.*, **3**, reviews3002.1, <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002>.
4. Lavedan, C. (1998) The synuclein family, *Genome Res.*, **8**, 871-880, <https://doi.org/10.1101/gr.8.9.871>.
5. Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Südhof, T. C. (2003) A broken α -helix in folded α -synuclein, *J. Biol. Chem.*, **278**, 15313-15318, <https://doi.org/10.1074/jbc.M213128200>.

6. Tarutani, A., and Hasegawa, M. (2019) Prion-like propagation of α -synuclein in neurodegenerative diseases, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **168**, 323-348, <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.07.005>.
7. Jan, A., Gonçalves, N. P., Vaegter, C. B., Jensen, P. H., and Ferreira, N. (2021) The prion-like spreading of alpha-synuclein in Parkinson's disease: update on models and hypotheses, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8338, <https://doi.org/10.3390/ijms22158338>.
8. Yoshimoto, M., Iwai, A., Kang, D., Otero, D. A., Xia, Y., and Saitoh, T. (1995) NACP, the precursor protein of the non-amyloid β /A4 protein ($A\beta$) component of Alzheimer disease amyloid, binds $A\beta$ and stimulates $A\beta$ aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9141-9145, <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9141>.
9. Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Yang, Y., Anantharam, V., and Kanthasamy, A. G. (2011) α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity, *J. Neurosci.*, **31**, 2035-2051, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5634-10.2011>.
10. Hashimoto, M., Hsu, L. J., Rockenstein, E., Takenouchi, T., Mallory, M., and Masliah, E. (2002) α -Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells, *J. Biol. Chem.*, **277**, 11465-11472, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111428200>.
11. Sulzer, D., and Edwards, R. H. (2019) The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **150**, 475-486, <https://doi.org/10.1111/jnc.14810>.
12. Rizo, J., and Südhof, T. C. (2012) The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices-guilty as charged? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 279-308, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155818>.
13. Vargas, K. J., Makani, S., Davis, T., Westphal, C. H., Castillo, P. E., and Chandra, S. S. (2014) Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis, *J. Neurosci.*, **34**, 9364-9376, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4787-13.2014>.
14. Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A. T., and Südhof, T. C. (2013) Properties of native brain α -synuclein, *Nature*, **498**, E4-E6, <https://doi.org/10.1038/nature12125>.
15. Alam, P., Bousset, L., Melki, R., and Otzen, D. E. (2019) α -Synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities, *J. Neurochem.*, **150**, 522-534, <https://doi.org/10.1111/jnc.14808>.
16. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., and Radford, S. E. (2018) A new era for understanding amyloid structures and diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 755-773, <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>.
17. Матиив А. Б., Трубицина Н. П., Матвеевко А. Г., Барбитов Ю. А., Журавлева Г. А., Бондарев С. А. (2020) Амиллоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина, *Биохимия*, **85**, 1213-1239, <https://doi.org/10.31857/S0320972520090043>.
18. Wu, K.-P., Weinstock, D. S., Narayanan, C., Levy, R. M., and Baum, J. (2009) Structural reorganization of α -synuclein at low pH observed by NMR and REMD simulations, *J. Mol. Biol.*, **391**, 784-796, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.063>.
19. Uversky, V. N., Li, J., and Fink, A. L. (2001) Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation, *J. Biol. Chem.*, **276**, 10737-10744, <https://doi.org/10.1074/jbc.M010907200>.
20. Shtilerman, M. D., Ding, T. T., and Lansbury, P. T. (2002) Molecular crowding accelerates fibrillization of α -synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry*, **41**, 3855-3860, <https://doi.org/10.1021/bi0120906>.
21. Munishkina, L. A., Phelan, C., Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2003) Conformational behavior and aggregation of α -synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes, *Biochemistry*, **42**, 2720-2730, <https://doi.org/10.1021/bi027166s>.
22. Engelender, S., Kaminsky, Z., Guo, X., Sharp, A. H., Amaravi, R. K., Kleiderlein, J. J., Margolis, R. L., Troncoso, J. C., Lanahan, A. A., Worley, P. F., Dawson, V. L., Dawson, T. M., and Ross, C. A. (1999) Synphilin-1 associates with α -synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions, *Nat. Genet.*, **22**, 110-114, <https://doi.org/10.1038/8820>.
23. Ferreira, N., Gram, H., Sorrentino, Z. A., Gregersen, E., Schmidt, S. I., Reimer, L., Betzer, C., Perez-Gozalbo, C., Beltoja, M., Nagaraj, M., Wang, J., Nowak, J. S., Dong, M., Willén, K., Cholak, E., Bjerregaard-Andersen, K., Mendez, N., Rabadia, P., Shah Nawaz, M., Soto, C., Otzen, D. E., Akbey, Ü., Meyer, M., Giasson, B. I., Romero-Ramos, M., and Jensen, P. H. (2021) Multiple system atrophy-associated oligodendroglial protein p25 α stimulates formation of novel α -synuclein strain with enhanced neurodegenerative potential, *Acta Neuropathol.*, **142**, 87-115, <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02316-0>.
24. Матиив А. Б., Трубицина Н. П., Матвеевко А. Г., Барбитов Ю. А., Журавлева Г. А., Бондарев С. А. (2022) Структура и полиморфизм амилоидных и амилоидоподобных агрегатов, *Биохимия*, **87**, 587-602, <https://doi.org/10.31857/S0320972522050013>.
25. Grey, M., Dunning, C. J., Gaspar, R., Grey, C., Brundin, P., Sparr, E., and Linse, S. (2015) Acceleration of α -synuclein aggregation by exosomes, *J. Biol. Chem.*, **290**, 2969-2982, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585703>.
26. Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S.,

- Gai, W. P., and Chilcote, T. J. (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -synuclein in familial and sporadic Lewy body disease, *J. Biol. Chem.*, **281**, 29739-29752, <https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200>.
27. Paleologou, K. E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C. C., Kim, H.-Y., Lamberto, G. R., Fernandez, C. O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W. P., Chiappe, D., Moniatte, M., Schneider, B. L., Aebischer, P., Eliezer, D., Zweckstetter, M., Masliah, E., and Lashuel, H. A. (2010) Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits α -synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions, *J. Neurosci.*, **30**, 3184-3198, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010>.
 28. Tofaris, G. K., Razaq, A., Ghetti, B., Lilley, K. S., and Spillantini, M. G. (2003) Ubiquitination of α -synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function, *J. Biol. Chem.*, **278**, 44405-44411, <https://doi.org/10.1074/jbc.M308041200>.
 29. Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions, *Science*, **290**, 985-989, <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.985>.
 30. Krumova, P., Meulmeester, E., Garrido, M., Tirard, M., Hsiao, H.-H., Bossis, G., Urlaub, H., Zweckstetter, M., Kügler, S., Melchior, F., Bähr, M., and Weishaupt, J. H. (2011) Sumoylation inhibits α -synuclein aggregation and toxicity, *J. Cell Biol.*, **194**, 49-60, <https://doi.org/10.1083/jcb.201010117>.
 31. Choi, D.-H., Kim, Y.-J., Kim, Y.-G., Joh, T. H., Beal, M. F., and Kim, Y. S. (2011) Role of matrix metalloproteinase 3-mediated α -synuclein cleavage in dopaminergic cell death, *J. Biol. Chem.*, **286**, 14168-14177, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222430>.
 32. Kang, L., Janowska, M. K., Moriarty, G. M., and Baum, J. (2013) Mechanistic insight into the relationship between N-terminal acetylation of α -synuclein and fibril formation rates by NMR and fluorescence, *PLoS One*, **8**, e75018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075018>.
 33. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002) α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions, *Nat. Cell Biol.*, **4**, 160-164, <https://doi.org/10.1038/ncb748>.
 34. Oueslati, A. (2016) Implication of alpha-synuclein phosphorylation at S129 in synucleinopathies: what have we learned in the last decade? *J. Parkinsons. Dis.*, **6**, 39-51, <https://doi.org/10.3233/JPD-160779>.
 35. Dalfó, E., Portero-Otín, M., Ayala, V., Martínez, A., Pamplona, R., and Ferrer, I. (2005) Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 816-830, <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000179050.54522.5a>.
 36. Castellani, R., Smith, M. A., Richey, P. L., and Perry, G. (1996) Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease, *Brain Res.*, **737**, 195-200, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00729-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00729-9).
 37. Vicente Miranda, H., Cássio, R., Correia-Guedes, L., Gomes, M. A., Chegão, A., Miranda, E., Soares, T., Coelho, M., Rosa, M. M., Ferreira, J. J., and Outeiro, T. F. (2017) Posttranslational modifications of blood-derived alpha-synuclein as biochemical markers for Parkinson's disease, *Sci. Rep.*, **7**, 13713, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14175-5>.
 38. Lee, D., Park, C. W., Paik, S. R., and Choi, K. Y. (2009) The modification of α -synuclein by dicarbonyl compounds inhibits its fibril-forming process, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 421-430, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.016>.
 39. Barinova, K., Serebryakova, M., Sheval, E., Schmalhausen, E., and Muronetz, V. (2019) Modification by glyceraldehyde-3-phosphate prevents amyloid transformation of alpha-synuclein, *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteomics*, **1867**, 396-404, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.01.003>.
 40. Farzadfard, A., König, A., Petersen, S. V., Nielsen, J., Vasili, E., Dominguez-Meijide, A., Buell, A. K., Outeiro, T. F., and Otzen, D. E. (2022) Glycation modulates alpha-synuclein fibrillization kinetics: A sweet spot for inhibition, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101848, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101848>.
 41. Chorell, E., Andersson, E., Evans, M. L., Jain, N., Götheson, A., Åden, J., Chapman, M. R., Almqvist, F., and Wittung-Stafshede, P. (2015) Bacterial chaperones CsgE and CsgC differentially modulate human α -synuclein amyloid formation via transient contacts, *PLoS One*, **10**, e0140194, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140194>.
 42. Ahmad, A. (2010) DnaK/DnaJ/GrpE of Hsp70 system have differing effects on α -synuclein fibrillation involved in Parkinson's disease, *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 275-279, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.12.017>.
 43. Gerard, M., Debyser, Z., Desender, L., Kahle, P. J., Baert, J., Baekelandt, V., and Engelborghs, Y. (2006) The aggregation of alpha-synuclein is stimulated by FK506 binding proteins as shown by fluorescence correlation spectroscopy, *FASEB J.*, **20**, 524-526, <https://doi.org/10.1096/fj.05-5126fj>.
 44. Bose, A., and Beal, M. F. (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **139**, 216-231, <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>.
 45. Wong, Y. C., and Krainc, D. (2017) α -Synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies, *Nat. Med.*, **23**, 1-13, <https://doi.org/10.1038/nm.4269>.

46. Garcia-Reitböck, P., Anichtchik, O., Bellucci, A., Iovino, M., Ballini, C., Fineberg, E., Ghetti, B., Della Corte, L., Spano, P., Tofaris, G. K., Goedert, M., and Spillantini, M. G. (2010) SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease, *Brain*, **133**, 2032-2044, <https://doi.org/10.1093/brain/awq132>.
47. Ghiglieri, V., Calabrese, V., and Calabresi, P. (2018) Alpha-synuclein: from early synaptic dysfunction to neurodegeneration, *Front. Neurol.*, **9**, 295, <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00295>.
48. Prusiner, S. B. (1987) Prions and neurodegenerative diseases, *N. Engl. J. Med.*, **317**, 1571-1581, <https://doi.org/10.1056/NEJM198712173172505>.
49. Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis, *Science.*, **278**, 245-251, <https://doi.org/10.1126/science.278.5336.245>.
50. Ruiz-Riquelme, A., Lau, H. H. C., Stuart, E., Goczi, A. N., Wang, Z., Schmitt-Ulms, G., and Watts, J. C. (2018) Prion-like propagation of β -amyloid aggregates in the absence of APP overexpression, *Acta Neuropathol. Commun.*, **6**, 26, <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0529-x>.
51. 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, <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
52. Pearce, M. M. P., and Kopito, R. R. (2018) Prion-like characteristics of polyglutamine-containing proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **8**, a024257, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024257>.
53. Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., and Del Tredici, K. (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen, *J. Neural Transm.*, **110**, 517-536, <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>.
54. Braak, H., de Vos, R. A. I., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006) Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology, *Neurosci. Lett.*, **396**, 67-72, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>.
55. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., and Olanow, C. W. (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease, *Nat. Med.*, **14**, 504-506, <https://doi.org/10.1038/nm1747>.
56. Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., and Brundin, P. (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation, *Nat. Med.*, **14**, 501-503, <https://doi.org/10.1038/nm1746>.
57. Luk, K. C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2009) Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20051-20056, <https://doi.org/10.1073/pnas.0908005106>.
58. Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S. J. (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13010-13015, <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>.
59. Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.-L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T. F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J.-Y., and Brundin, P. (2011) α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells, *J. Clin. Invest.*, **121**, 715-725, <https://doi.org/10.1172/JCI43366>.
60. Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2012) Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice, *Science*, **338**, 949-953, <https://doi.org/10.1126/science.1227157>.
61. Luk, K. C., Kehm, V. M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2012) Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice, *J. Exp. Med.*, **209**, 975-986, <https://doi.org/10.1084/jem.20112457>.
62. Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D. M., and Hasegawa, M. (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain, *Brain*, **136**, 1128-1138, <https://doi.org/10.1093/brain/awt037>.
63. Rey, N. L., Petit, G. H., Bousset, L., Melki, R., and Brundin, P. (2013) Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice, *Acta Neuropathol.*, **126**, 555-573, <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1160-3>.
64. Chistiakov, D. A., and Chistiakov, A. A. (2017) α -Synuclein-carrying extracellular vesicles in Parkinson's disease: deadly transmitters, *Acta Neurol. Belg.*, **117**, 43-51, <https://doi.org/10.1007/s13760-016-0679-1>.
65. Vargas, J. Y., Grudina, C., and Zurzolo, C. (2019) The prion-like spreading of α -synuclein: from *in vitro* to *in vivo* models of Parkinson's disease, *Ageing Res. Rev.*, **50**, 89-101, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.01.012>.
66. Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (1998) Genetic classification of primary neurodegenerative disease, *Science*, **282**, 1075-1079, <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1075>.
67. Goedert, M., and Spillantini, M. G. (1998) Lewy body diseases and multiple system atrophy as α -synucleinopathies, *Mol. Psychiatry*, **3**, 462-465, <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000458>.

68. Dickson, D. W., Lin, W., Liu, W. K., and Yen, S. H. (1999) Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy, *Brain Pathol.*, **9**, 721-732, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00553.x>.
69. Gilman, S., Wenning, G. K., Low, P. A., Brooks, D. J., Mathias, C. J., Trojanowski, J. Q., Wood, N. W., Colosimo, C., Dürr, A., Fowler, C. J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K., and Vidailhet, M. (2008) Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy, *Neurology*, **71**, 670-676, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15>.
70. Erskine, D., and Attems, J. (2021) Insights into Lewy body disease from rare neurometabolic disorders, *J. Neural Transm.*, **128**, 1567-1575, <https://doi.org/10.1007/s00702-021-02355-7>.
71. Goedert, M., Jakes, R., and Spillantini, M. G. (2017) The synucleinopathies: twenty years on, *J. Parkinsons. Dis.*, **7**, S51-S69, <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>.
72. Newell, K. L., Boyer, P., Gomez-Tortosa, E., Hobbs, W., Hedley-Whyte, E. T., Vonsattel, J. P., and Hyman, B. T. (1999) α -Synuclein immunoreactivity is present in axonal swellings in neuroaxonal dystrophy and acute traumatic brain injury, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **58**, 1263-1268, <https://doi.org/10.1097/00005072-199912000-00007>.
73. Szeto, J. Y. Y., Walton, C. C., Rizos, A., Martinez-Martin, P., Halliday, G. M., Naismith, S. L., Chaudhuri, K. R., and Lewis, S. J. G. (2020) Dementia in long-term Parkinson's disease patients: a multicentre retrospective study, *NPJ Park. Dis.*, **6**, 2, <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0106-4>.
74. McKeith, I. G., Boeve, B. F., Dickson, D. W., Halliday, G., Taylor, J.-P., Weintraub, D., Aarsland, D., Galvin, J., Attems, J., Ballard, C. G., Bayston, A., Beach, T. G., Blanc, F., Bohnen, N., Bonanni, L., Bras, J., Brundin, P., Burn, D., Chen-Plotkin, A., Duda, J. E., El-Agnaf, O., Feldman, H., Ferman, T. J., Ffytche, D., Fujishiro, H., Galasko, D., Goldman, J. G., Gomperts, S. N., Graff-Radford, N. R., Honig, L. S., Iranzo, A., Kantarci, K., Kaufer, D., Kukull, W., Lee, V. M. Y., Leverenz, J. B., Lewis, S., Lippa, C., Lunde, A., Masellis, M., Masliah, E., McLean, P., Mollenhauer, B., Montine, T. J., Moreno, E., Mori, E., Murray, M., O'Brien, J. T., Orimo, S., Postuma, R. B., Ramaswamy, S., Ross, O. A., Salmon, D. P., Singleton, A., Taylor, A., Thomas, A., Tiraboschi, P., Toledo, J. B., Trojanowski, J. Q., Tsuang, D., Walker, Z., Yamada, M., and Kosaka, K. (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium, *Neurology*, **89**, 88-100, <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>.
75. Fahn, S. (2003) Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **991**, 1-14, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x>.
76. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., and Nussbaum, R. L. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science*, **276**, 2045-2047, <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.
77. Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P. J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014) Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology, *Neurobiol. Aging*, **35**, 2180.e1-2180.e5, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024>.
78. Zarranz, J. J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, D. G., and de Yebenes, J. G. (2004) The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Ann. Neurol.*, **55**, 164-173, <https://doi.org/10.1002/ana.10795>.
79. Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schöls, L., and Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease, *Nat. Genet.*, **18**, 106-108, <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>.
80. Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., and Destée, A. (2004) α -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Lancet*, **364**, 1167-1169, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1).
81. Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (2003) α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science*, **302**, 841, <https://doi.org/10.1126/science.1090278>.
82. Herrick, M. K., and Tansey, M. G. (2021) Is LRRK2 the missing link between inflammatory bowel disease and Parkinson's disease? *NPJ Park. Dis.*, **7**, 26, <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00170-1>.
83. Herrick, M. K., and Tansey, M. G. (2019) Infection triggers symptoms similar to those of Parkinson's disease in mice lacking PINK1 protein, *Nature*, **571**, 481-482, <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02094-6>.
84. Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., and Jenner, P. (2017) Non-motor features of Parkinson disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 435-450, <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>.

85. Zhang, T.-M., Yu, S.-Y., Guo, P., Du, Y., Hu, Y., Piao, Y.-S., Zuo, L.-J., Lian, T.-H., Wang, R.-D., Yu, Q.-J., Jin, Z., and Zhang, W. (2016) Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study, *Medicine (Baltimore)*, **95**, e5400, <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005400>.
86. Zuo, L.-J., Yu, S.-Y., Hu, Y., Wang, F., Piao, Y.-S., Lian, T.-H., Yu, Q.-J., Wang, R.-D., Li, L.-X., Guo, P., Du, Y., Zhu, R.-Y., Jin, Z., Wang, Y.-J., Wang, X.-M., Chan, P., Chen, S.-D., Wang, Y.-J., and Zhang, W. (2016) Serotonergic dysfunctions and abnormal iron metabolism: relevant to mental fatigue of Parkinson's disease, *Sci. Rep.*, **6**, 19, <https://doi.org/10.1038/s41598-016-0018-z>.
87. Borghammer, P. (2023) The brain-first vs. body-first model of Parkinson's disease with comparison to alternative models, *J. Neural Transm.*, **130**, 737-753, <https://doi.org/10.1007/s00702-023-02633-6>.
88. Tan, A. H., Mahadeva, S., Thalha, A. M., Gibson, P. R., Kiew, C. K., Yeat, C. M., Ng, S. W., Ang, S. P., Chow, S. K., Tan, C. T., Yong, H. S., Marras, C., Fox, S. H., and Lim, S. Y. (2014) Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **20**, 535-540, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.02.019>.
89. Li, D., Ren, T., Li, H., Liao, G., and Zhang, X. (2022) Porphyromonas gingivalis: A key role in Parkinson's disease with cognitive impairment? *Front. Neurol.*, **13**, 945523, <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.945523>.
90. Berthouzoz, E., Lazarevic, V., Zekeridou, A., Castro, M., Debove, I., Aybek, S., Schrenzel, J., Burkhard, P. R., and Fleury, V. (2023) Oral and intestinal dysbiosis in Parkinson's disease, *Rev. Neurol. (Paris)*, **179**, 937-946, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2022.12.010>.
91. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G. S., Selvin, J., Souza, R. S. C., van Overbeek, L., Singh, B. K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., and Schloter, M. (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges, *Microbiome*, **8**, 103, <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.
92. Gilbert, J. A., and Lynch, S. V. (2019) Community ecology as a framework for human microbiome research, *Nat. Med.*, **25**, 884-889, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0464-9>.
93. Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., and Chen, Z. S. (2022) Microbiota in health and diseases, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **7**, 135, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>.
94. Forster, S. C., Kumar, N., Anonye, B. O., Almeida, A., Viciani, E., Stares, M. D., Dunn, M., Mkandawire, T. T., Zhu, A., Shao, Y., Pike, L. J., Louie, T., Browne, H. P., Mitchell, A. L., Neville, B. A., Finn, R. D., and Lawley, T. D. (2019) A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 186-192, <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7>.
95. Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., and Finn, R. D. (2019) A new genomic blueprint of the human gut microbiota, *Nature*, **568**, 499-504, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>.
96. Zou, Y., Xue, W., Luo, G., Deng, Z., Qin, P., Guo, R., Sun, H., Xia, Y., Liang, S., Dai, Y., Wan, D., Jiang, R., Su, L., Feng, Q., Jie, Z., Guo, T., Xia, Z., Liu, C., Yu, J., Lin, Y., Tang, S., Huo, G., Xu, X., Hou, Y., Liu, X., Wang, J., Yang, H., Kristiansen, K., Li, J., Jia, H., and Xiao, L. (2019) 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 179-185, <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0008-8>.
97. Leviatan, S., Shoer, S., Rothschild, D., Gorodetski, M., and Segal, E. (2022) An expanded reference map of the human gut microbiome reveals hundreds of previously unknown species, *Nat. Commun.*, **13**, 3863, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31502-1>.
98. Yang, J., Pu, J., Lu, S., Bai, X., Wu, Y., Jin, D., Cheng, Y., Zhang, G., Zhu, W., Luo, X., Rosselló-Móra, R., and Xu, J. (2020) Species-level analysis of human gut microbiota with metataxonomics, *Front. Microbiol.*, **11**, 2029, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02029>.
99. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S. D., and Wang, J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature*, **464**, 59-65, <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
100. Rajilić-Stojanović, M., and de Vos, W. M. (2014) The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota, *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 996-1047, <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>.
101. Costea, P. I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., Fraser, C. M., Hattori, M., Huttenhower, C., Jeffery, I. B., Knights, D., Lewis, J. D., Ley, R. E., Ochman, H., O'Toole, P. W., Quince, C., Relman, D. A., Shanahan, F., Sunagawa, S., Wang, J., Weinstock, G. M., Wu, G. D., Zeller, G., Zhao, L., Raes, J., Knight, R., and Bork, P. (2017) Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition, *Nat. Microbiol.*, **3**, 8-16, <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>.

102. Laterza, L., Rizzatti, G., Gaetani, E., Chiusolo, P., and Gasbarrini, A. (2016) The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, **8**, e2016025, <https://doi.org/10.4084/mjhid.2016.025>.
103. Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhnman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., and Ley, R. E. (2014) Human genetics shape the gut microbiome, *Cell*, **159**, 789-799, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>.
104. Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A. V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S. A., Joossens, M., Cenit, M. C., Deelen, P., and Swertz, M. A. (2016) Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity, *Science*, **352**, 565-569, <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>.
105. Auchtung, T. A., Fofanova, T. Y., Stewart, C. J., Nash, A. K., Wong, M. C., Gesell, J. R., Auchtung, J. M., Ajami, N. J., and Petrosino, J. F. (2018) Investigating colonization of the healthy adult gastrointestinal tract by fungi, *mSphere*, **3**, e00092-18, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00092-18>.
106. Miller, T. L., Wolin, M. J., Zhao, H. X., and Bryant, M. P. (1986) Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen, *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 201-202, <https://doi.org/10.1128/aem.51.1.201-202.1986>.
107. Dridi, B., Henry, M., El Khéchine, A., Raoult, D., and Drancourt, M. (2009) High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol, *PLoS One*, **4**, e7063, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007063>.
108. Hooks, K. B., and O'Malley, M. A. (2017) Dysbiosis and its discontents, *MBio*, **8**, e01492-17, <https://doi.org/10.1128/mBio.01492-17>.
109. Larsen, O. F. A., and Claassen, E. (2018) The mechanistic link between health and gut microbiota diversity, *Sci. Rep.*, **8**, 2183, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20141-6>.
110. Fan, Y., and Pedersen, O. (2021) Gut microbiota in human metabolic health and disease, *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 55-71, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>.
111. Hasan, N., and Yang, H. (2019) Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation, *PeerJ*, **7**, e7502, <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>.
112. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest, *Nature*, **444**, 1027-1031, <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
113. Nieuwdorp, M., Gijljamse, P. W., Pai, N., and Kaplan, L. M. (2014) Role of the microbiome in energy regulation and metabolism, *Gastroenterology*, **146**, 1525-1533, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.008>.
114. Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., Giustina, A., and Gazzaruso, C. (2018) Microbiota and metabolic diseases, *Endocrine*, **61**, 357-371, <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5>.
115. Owaga, E., Hsieh, R.-H., Mugendi, B., Masuku, S., Shih, C.-K., and Chang, J. S. (2015) Th17 cells as potential probiotic therapeutic targets in inflammatory bowel diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 20841-20858, <https://doi.org/10.3390/ijms160920841>.
116. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., and Finlay, B. B. (2010) Gut microbiota in health and disease, *Physiol. Rev.*, **90**, 859-904, <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
117. Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Bevins, C. L., Williams, C. B., and Bos, N. A. (2010) Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology, *Nat. Immunol.*, **11**, 76-82, <https://doi.org/10.1038/ni.1825>.
118. Helgeland, L., Dissen, E., Dai, K.-Z., Midtvedt, T., Brandtzaeg, P., and Vaage, J. T. (2004) Microbial colonization induces oligoclonal expansions of intraepithelial CD8 T cells in the gut, *Eur. J. Immunol.*, **34**, 3389-3400, <https://doi.org/10.1002/eji.200425122>.
119. Rutsch, A., Kantsjö, J. B., and Ronchi, F. (2020) The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology, *Front. Immunol.*, **11**, 604179, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>.
120. Grider, J. R., and Piland, B. E. (2007) The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF, *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, **292**, G429-G437, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00376.2006>.
121. Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A., Deo, S. K., Daunert, S., and Liu, X. Z. (2017) Neurotransmitters: the critical modulators regulating gut-brain axis, *J. Cell. Physiol.*, **232**, 2359-2372, <https://doi.org/10.1002/jcp.25518>.
122. Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2011) Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8030-8035, <https://doi.org/10.1073/pnas.1016088108>.

123. Kunze, W. A., Mao, Y., Wang, B., Huizinga, J. D., Ma, X., Forsythe, P., and Bienenstock, J. (2009) *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening, *J. Cell. Mol. Med.*, **13**, 2261-2270, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00686.x>.
124. Dubinsky, M. C., Lin, Y.-C., Dutridge, D., Picornell, Y., Landers, C. J., Fariior, S., Wrobel, I., Quiros, A., Vasiliauskas, E. A., Grill, B., Israel, D., Bahar, R., Christie, D., Wahbeh, G., Silber, G., Dallazadeh, S., Shah, P., Thomas, D., Kelts, D., Hershberg, R. M., Elson, C. O., Targan, S. R., Taylor, K. D., Rotter, J. I., and Yang, H. (2006) Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression, *Am. J. Gastroenterol.*, **101**, 360-367, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00456.x>.
125. Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., and Pace, N. R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13780-13785, <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>.
126. O'Keefe, S. J. D., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., and Mawhinney, T. (2009) Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk, *J. Nutr.*, **139**, 2044-2048, <https://doi.org/10.3945/jn.109.104380>.
127. Hu, X., Wang, T., and Jin, F. (2016) Alzheimer's disease and gut microbiota, *Sci. China Life Sci.*, **59**, 1006-1023, <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5083-9>.
128. Komaroff, A. L. (2017) The microbiome and risk for obesity and diabetes, *JAMA*, **317**, 355-356, <https://doi.org/10.1001/jama.2016.20099>.
129. Barlow, G. M., Yu, A., and Mathur, R. (2015) Role of the gut microbiome in obesity and diabetes mellitus, *Nutr. Clin. Pract.*, **30**, 787-797, <https://doi.org/10.1177/0884533615609896>.
130. Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower, C., and Littman, D. R. (2013) Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis, *Elife*, **2**, e01202, <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>.
131. Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., and Zhao, B. (2017) The gut microbiota and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **58**, 1-15, <https://doi.org/10.3233/JAD-161141>.
132. Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prella, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., Bellandi, D., Gentile, S., Belotti, G., Villani, D., Harach, T., Bolmont, T., Padovani, A., Boccardi, M., and Frisoni, G. B. (2017) Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly, *Neurobiol. Aging*, **49**, 60-68, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019>.
133. Pistollato, F., Sumalla Cano, S., Elio, I., Masias Vergara, M., Giampieri, F., and Battino, M. (2016) Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease, *Nutr. Rev.*, **74**, 624-634, <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw023>.
134. Asti, A., and Gioglio, L. (2014) Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? *J. Alzheimer's Dis.*, **39**, 169-179, <https://doi.org/10.3233/JAD-131394>.
135. Mancuso, C., and Santangelo, R. (2018) Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: the long way between preclinical studies and clinical evidence, *Pharmacol. Res.*, **129**, 329-336, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.009>.
136. Mowry, E. M., and Glenn, J. D. (2018) The dynamics of the gut microbiome in multiple sclerosis in relation to disease, *Neurol. Clin.*, **36**, 185-196, <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.08.008>.
137. Shahi, S. K., Freedman, S. N., and Mangalam, A. K. (2017) Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play, *Gut Microbes*, **8**, 607-615, <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1349041>.
138. Fang, X. (2016) Potential role of gut microbiota and tissue barriers in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis, *Int. J. Neurosci.*, **126**, 771-776, <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1096271>.
139. Fang, X., Wang, X., Yang, S., Meng, F., Wang, X., Wie, H., and Chen, T. (2016) Evaluation of the microbial diversity in amyotrophic lateral sclerosis using high-throughput sequencing, *Front. Microbiol.*, **7**, 1479, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01479>.
140. Wu, S., Yi, J., Zhang, Y., Zhou, J., and Sun, J. (2015) Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model, *Physiol. Rep.*, **3**, e12356, <https://doi.org/10.14814/phy2.12356>.
141. Zhang, Y., Wu, S., Yi, J., Xia, Y., Jin, D., Zhou, J., and Sun, J. (2017) Target intestinal microbiota to alleviate disease progression in amyotrophic lateral sclerosis, *Clin. Ther.*, **39**, 322-336, <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.12.014>.
142. Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., and Auvinen, P. (2015) Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype, *Mov. Disord.*, **30**, 350-358, <https://doi.org/10.1002/mds.26069>.
143. Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., Mutlu, E., and Shannon, K. M. (2015) Colonic bacterial composition in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **30**, 1351-1360, <https://doi.org/10.1002/mds.26307>.

144. Hasegawa, S., Goto, S., Tsuji, H., Okuno, T., Asahara, T., Nomoto, K., Shibata, A., Fujisawa, Y., Minato, T., Okamoto, A., Ohno, K., and Hirayama, M. (2015) Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease, *PLoS One*, **10**, e0142164, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142164>.
145. Petrov, V. A., Saltykova, I. V., Zhukova, I. A., Alifirova, V. M., Zhukova, N. G., Dorofeeva, Y. B., Tyakht, A. V., Kovarsky, B. A., Alekseev, D. G., Kostryukova, E. S., Mironova, Y. S., Izboldina, O. P., Nikitina, M. A., Perevozchikova, T. V., Fait, E. A., Babenko, V. V., Vakhitova, M. T., Govorun, V. M., and Sazonov, A. E. (2017) Analysis of gut microbiota in patients with Parkinson's disease, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 734-737, <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3700-7>.
146. Li, C., Cui, L., Yang, Y., Miao, J., Zhao, X., Zhang, J., Cui, G., and Zhang, Y. (2019) Gut microbiota differs between Parkinson's disease patients and healthy controls in Northeast China, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 171, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00171>.
147. Qian, Y., Yang, X., Xu, S., Huang, P., Li, B., Du, J., He, Y., Su, B., Xu, L. M., Wang, L., Huang, R., Chen, S., and Xiao, Q. (2020) Gut metagenomics-derived genes as potential biomarkers of Parkinson's disease, *Brain*, **143**, 2474-2489, <https://doi.org/10.1093/brain/awaa201>.
148. Bedarf, J. R., Hildebrand, F., Coelho, L. P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., Bork, P., and Wüllner, U. (2017) Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients, *Genome Med.*, **9**, 39, <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0428-y>.
149. Toh, T. S., Chong, C. W., Lim, S.-Y., Bowman, J., Cirstea, M., Lin, C. H., Chen, C. C., Appel-Cresswell, S., Finlay, B. B., and Tan, A. H. (2022) Gut microbiome in Parkinson's disease: new insights from meta-analysis, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **94**, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.11.017>.
150. Vascellari, S., Palmas, V., Melis, M., Pisanu, S., Cusano, R., Uva, P., Perra, D., Madau, V., Sarchioto, M., Oppo, V., Simola, N., Morelli, M., Santoru, M. L., Atzori, L., Melis, M., Cossu, G., and Manzin, A. (2020) Gut microbiota and metabolome alterations associated with Parkinson's disease, *mSystems*, **5**, e00561-20, <https://doi.org/10.1128/mSystems.00561-20>.
151. Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., and Louis, P. (2015) Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism, *Proc. Nutr. Soc.*, **74**, 13-22, <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>.
152. Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., and Ikuta, F. (1988) Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses, *Acta Neuropathol.*, **76**, 217-221, <https://doi.org/10.1007/BF00687767>.
153. Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., and Ikuta, F. (1990) Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system, *Acta Neuropathol.*, **79**, 581-583, <https://doi.org/10.1007/BF00294234>.
154. Phillips, R. J., Walter, G. C., Wilder, S. L., Baronowsky, E. A., and Powley, T. L. (2008) Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience*, **153**, 733-750, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.074>.
155. Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N'Guyen, J. M., Chaumette, T., Tassel, M., Paillusson, S., Flamand, M., Galmiche, J. P., Damier, P., and Derkinderen, P. (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms, *PLoS One*, **5**, e12728, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012728>.
156. Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Mutlu, E., Dodiya, H. B., Daian, D., Jaglin, J. A., and Kordower, J. H. (2012) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **27**, 709-715, <https://doi.org/10.1002/mds.23838>.
157. Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Dodiya, H. B., Jakate, S., and Kordower, J. H. (2012) Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases, *Mov. Disord.*, **27**, 716-719, <https://doi.org/10.1002/mds.25020>.
158. Svensson, E., Horváth-Puhó, E., Thomsen, R. W., Djurhuus, J. C., Pedersen, L., Borghammer, P., and Sørensen, H. T. (2015) Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease, *Ann. Neurol.*, **78**, 522-529, <https://doi.org/10.1002/ana.24448>.
159. Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Björklund, T., Wang, Z. Y., Roybon, L., Melki, R., and Li, J. Y. (2014) Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats, *Acta Neuropathol.*, **128**, 805-820, <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1343-6>.
160. Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M. G., Reichmann, H., and Funk, R. H. (2010) Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice, *PLoS One*, **5**, e8762, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008762>.
161. Hawkes, C. H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **33**, 599-614, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x>.
162. Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Shill, H. A., Driver-Dunckley, E., Mehta, S. H., Intorcica, A. J., Glass, M. J., Walker, J. E., Arce, R., Nelson, C. M., and Serrano, G. E. (2021) Vagus nerve and stomach synucleinopathy in Parkinson's

- disease, incidental Lewy body disease, and normal elderly subjects: evidence against the “body-first” hypothesis, *J. Parkinsons. Dis.*, **11**, 1833-1843, <https://doi.org/10.3233/JPD-212733>.
163. Lee, E.-J., Woo, M.-S., Moon, P.-G., Baek, M.-C., Choi, I.-Y., Kim, W.-K., Junn, E., and Kim, H.-S. (2010) α -Synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1, *J. Immunol.*, **185**, 615-623, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903480>.
 164. Couch, Y., Alvarez-Erviti, L., Sison, N. R., Wood, M. J. A., and Anthony, D. C. (2011) The acute inflammatory response to intranigral α -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation, *J. Neuroinflammation*, **8**, 166, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-166>.
 165. Stolzenberg, E., Berry, D., Yang, D., Lee, E. Y., Kroemer, A., Kaufman, S., Wong, G. C. L., Oppenheim, J. J., Sen, S., Fishbein, T., Bax, A., Harris, B., Barbut, D., and Zasloff, M. A. (2017) A Role for neuronal alpha-synuclein in gastrointestinal immunity, *J. Innate Immun.*, **9**, 456-463, <https://doi.org/10.1159/000477990>.
 166. Bendor, J. T., Logan, T. P., and Edwards, R. H. (2013) The function of α -synuclein, *Neuron*, **79**, 1044-1066, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>.
 167. Béraud, D., Twomey, M., Bloom, B., Mittereder, A., Ton, V., Neitzke, K., Chasovskikh, S., Mhyre, T. R., and Maguire-Zeiss, K. A. (2011) α -Synuclein alters Toll-like receptor expression, *Front. Neurosci.*, **5**, 80, <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00080>.
 168. Olivares, D., Huang, X., Branden, L., Greig, N. H., and Rogers, J. T. (2009) Physiological and pathological role of alpha-synuclein in Parkinson's disease through iron mediated oxidative stress; the role of a putative iron-responsive element, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 1226-1260, <https://doi.org/10.3390/ijms10031226>.
 169. Gao, H.-M., Zhang, F., Zhou, H., Kam, W., Wilson, B., and Hong, J. S. (2011) Neuroinflammation and α -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease, *Environ. Health Perspect.*, **119**, 807-814, <https://doi.org/10.1289/ehp.1003013>.
 170. Gatto, N. M., Cockburn, M., Bronstein, J., Manthripragada, A. D., and Ritz, B. (2009) Well-water consumption and Parkinson's disease in rural California, *Environ. Health Perspect.*, **117**, 1912-1918, <https://doi.org/10.1289/ehp.0900852>.
 171. Freire, C., and Koifman, S. (2012) Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association, *Neurotoxicology*, **33**, 947-971, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.05.011>.
 172. Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, 845618, <https://doi.org/10.1155/2012/845618>.
 173. Hill-Burns, E. M., Debelius, J. W., Morton, J. T., Wissemann, W. T., Lewis, M. R., Wallen, Z. D., Peddada, S. D., Factor, S. A., Molho, E., Zabetian, C. P., Knight, R., and Payami, H. (2017) Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome, *Mov. Disord.*, **32**, 739-749, <https://doi.org/10.1002/mds.26942>.
 174. Ternák, G., Kuti, D., and Kovács, K. J. (2020) Dysbiosis in Parkinson's disease might be triggered by certain antibiotics, *Med. Hypotheses*, **137**, 109564, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109564>.
 175. Nunes-Costa, D., Magalhães, J. D., G-Fernandes, M., Cardoso, S. M., and Empadinhas, N. (2020) Microbial BMAA and the pathway for Parkinson's disease neurodegeneration, *Front. Aging Neurosci.*, **12**, 26, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00026>.
 176. Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M. F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., and Mazmanian, S. K. (2016) Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease, *Cell*, **167**, 1469-1480, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>.
 177. Sun, M.-F., and Shen, Y.-Q. (2018) Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's disease, *Ageing Res. Rev.*, **45**, 53-61, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.04.004>.
 178. Bondarev, S. A., Antonets, K. S., Kajava, A. V., Nizhnikov, A. A., and Zhouravleva, G. A. (2018) Protein co-aggregation related to amyloids: methods of investigation, diversity, and classification, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2292, <https://doi.org/10.3390/ijms19082292>.
 179. Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y. S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F. K., and Wu, H. (2012) The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis, *Cell*, **150**, 339-350, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.019>.
 180. Mompeán, M., Li, W., Li, J., Laage, S., Siemer, A. B., Bozkurt, G., Wu, H., and McDermott, A. E. (2018) The structure of the necrosome RIPK1-RIPK3 core, a human hetero-amyloid signaling complex, *Cell*, **173**, 1244-1253, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.032>.
 181. Kajava, A. V., Klopffleisch, K., Chen, S., and Hofmann, K. (2014) Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prion-forming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s, *Sci. Rep.*, **4**, 7436, <https://doi.org/10.1038/srep07436>.
 182. Spires-Jones, T. L., Attems, J., and Thal, D. R. (2017) Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases, *Acta Neuropathol.*, **134**, 187-205, <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1709-7>.

183. Hu, R., Zhang, M., Chen, H., Jiang, B., and Zheng, J. (2015) Cross-seeding interaction between β -Amyloid and human islet amyloid polypeptide, *ACS Chem. Neurosci.*, **6**, 1759-1768, <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.5b00192>.
184. Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers, *Nature*, **457**, 1128-1132, <https://doi.org/10.1038/nature07761>.
185. Rubel, A. A., Ryzhova, T. A., Antonets, K. S., Chernoff, Y. O., and Galkin, A. (2013) Identification of PrP sequences essential for the interaction between the PrP polymers and A β peptide in a yeast-based assay, *Prion*, **7**, 469-476, <https://doi.org/10.4161/pri.26867>.
186. Ono, K., Takahashi, R., Ikeda, T., and Yamada, M. (2012) Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein, *J. Neurochem.*, **122**, 883-890, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07847.x>.
187. Horvath, I., Rocha, S., and Wittung-Stafshede, P. (2018) *In vitro* analysis of α -synuclein amyloid formation and cross-reactivity, *Methods Mol. Biol.*, **1779**, 73-83, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8_6.
188. Werner, T., Horvath, I., and Wittung-Stafshede, P. (2020) Crosstalk between alpha-synuclein and other human and non-human amyloidogenic proteins: Consequences for amyloid formation in Parkinson's disease, *J. Parkinsons. Dis.*, **10**, 819-830, <https://doi.org/10.3233/JPD-202085>.
189. Tsigelny, I. F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G. M., Sharikov, Y., Mizuno, H., Spencer, B., Rockenstein, E., Trejo, M., Platoshyn, O., Yuan, J. X., and Masliah, E. (2008) Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases, *PLoS One*, **3**, e3135, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003135>.
190. Matiiv, A. B., Moskalenko, S. E., Sergeeva, O. S., Zhouravleva, G. A., and Bondarev, S. A. (2022) NOS1AP interacts with α -synuclein and aggregates in yeast and mammalian cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9102, <https://doi.org/10.3390/ijms23169102>.
191. Haikal, C., Ortigosa-Pascual, L., Najarzadeh, Z., Bernfur, K., Svanbergsson, A., Otzen, D. E., Linse, S., and Li, J. Y. (2021) The bacterial amyloids phenol soluble modulins from *Staphylococcus aureus* catalyze alpha-synuclein aggregation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11594, <https://doi.org/10.3390/ijms222111594>.
192. Semerdzhiev, S. A., Fakhree, M. A. A., Segers-Nolten, I., Blum, C., and Claessens, M. M. A. E. (2022) Interactions between SARS-CoV-2 N-protein and α -synuclein accelerate amyloid formation, *ACS Chem. Neurosci.*, **13**, 143-150, <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.1c00666>.
193. Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P., and Chapman, M. R. (2012) Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids, *Trends Microbiol.*, **20**, 66-73, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.005>.
194. Chen, S. G., Stribinskis, V., Rane, M. J., Demuth, D. R., Gozal, E., Roberts, A. M., Jagadapillai, R., Liu, R., Choe, K., Shivakumar, B., Son, F., Jin, S., Kerber, R., Adame, A., Masliah, E., and Friedland, R. P. (2016) Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged fischer 344 rats and *Caenorhabditis elegans*, *Sci. Rep.*, **6**, 34477, <https://doi.org/10.1038/srep34477>.
195. Sampson, T. R., Challis, C., Jain, N., Moiseyenko, A., Ladinsky, M. S., Shastri, G. G., Thron, T., Needham, B. D., Horvath, I., Debelius, J. W., Janssen, S., Knight, R., Wittung-Stafshede, P., Gradinaru, V., Chapman, M., and Mazmanian, S. K. (2020) A gut bacterial amyloid promotes α -synuclein aggregation and motor impairment in mice, *Elife*, **9**, e53111, <https://doi.org/10.7554/eLife.53111>.
196. Bhoite, S. S., Han, Y., Ruotolo, B. T., and Chapman, M. R. (2022) Mechanistic insights into accelerated α -synuclein aggregation mediated by human microbiome-associated functional amyloids, *J. Biol. Chem.*, **298**, 102088, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102088>.
197. Wang, C., and Zheng, C. (2022) Using *Caenorhabditis elegans* to model therapeutic interventions of neurodegenerative diseases targeting microbe-host interactions, *Front. Pharmacol.*, **13**, 875349, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.875349>.
198. Wang, C., Lau, C. Y., Ma, F., and Zheng, C. (2021) Genome-wide screen identifies curli amyloid fibril as a bacterial component promoting host neurodegeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2106504118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2106504118>.
199. Jasemi, S., Paulus, K., Noli, M., Simula, E. R., Ruberto, S., and Sechi, L. A. (2022) Antibodies against HSV-1 and curli show the highest correlation in Parkinson's disease patients in comparison to healthy controls, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14816, <https://doi.org/10.3390/ijms232314816>.
200. Chandra, R., Hiniker, A., Kuo, Y.-M., Nussbaum, R. L., and Liddle, R. A. (2017) α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease, *JCI Insight*, **2**, e92295, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92295>.
201. Hill, A. E., Wade-Martins, R., and Burnet, P. W. J. (2021) What is our understanding of the influence of gut microbiota on the pathophysiology of Parkinson's disease? *Front. Neurosci.*, **15**, 708587, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.708587>.
202. Braak, H., Tredici, K. De., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Steur, E. J. N. H., and Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **24**, 197-211, [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9).

203. Mullin, J. M., Valenzano, M. C., Verrecchio, J. J., and Kothari, R. (2002) Age- and diet-related increase in transepithelial colon permeability of Fischer 344 rats, *Dig. Dis. Sci.*, 47, 2262-2270, <https://doi.org/10.1023/a:1020191412285>.
204. Ma, T. Y., Hollander, D., Dadufalza, V., and Krugliak, P. (1992) Effect of aging and caloric restriction on intestinal permeability, *Exp. Gerontol.*, 27, 321-333, [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(92\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0531-5565(92)90059-9).

ROLE OF THE GUT MICROBIOME AND BACTERIAL AMYLOIDS IN THE DEVELOPMENT OF SYNUCLEINOPATHIES

Review

N. P. Trubitsina¹, A. B. Matiiv¹, T. M. Rogoza^{1,2}, A. A. Zudilova¹, M. D. Bezgina¹,
G. A. Zhouravleva^{1,3}, and S. A. Bondarev^{1,3*}

¹ Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University,
199034 Saint Petersburg, Russia; e-mail: s.bondarev@spbu.ru, stanislavspbg@gmail.com

² St. Petersburg branch of the Institute of General Genetics named after N. I. Vavilova,
198504 Saint Petersburg, Russia

³ Laboratory of Amyloid Biology, Saint Petersburg State University, 199034 Saint Petersburg, Russia

Less than ten years ago, evidence began to accumulate about the association between changes in the composition of the gut microbiota and the development of human synucleinopathies, in particular the sporadic form of Parkinson's disease. We collected data from more than one hundred and thirty experimental studies that reported similar results and summarized the frequencies of detection of different groups of bacteria in these studies. It is important to note that it is extremely rare that a unidirectional change in the abundance of one or another group of microorganisms (only an increase or only a decrease) was detected in patients with Parkinson's disease. However, we were able to identify several groups of bacteria that were overrepresented in patients with Parkinson's disease in the studies analyzed. There are various hypotheses about the molecular mechanisms that explain such relationships. Usually, α -synuclein aggregation is associated with the development of inflammatory processes that occur in response to changes in the microbiome. However, experimental evidence is accumulating on the influence of bacterial proteins, including amyloids (curli), as well as various metabolites on α Syn aggregation. In the review, we provided up-to-date information about such examples.

Keywords: amyloids, alpha-synuclein, Parkinson's disease, microbiome, dysbiosis, neurodegenerative diseases, bacterial amyloids, curli

СВЯЗЬ ПОВЫШЕННОГО УРОВНЯ ГОМОЦИСТЕИНА С НАРУШЕНИЕМ МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ И ДЕФИЦИТОМ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В ПРИ РАННЕМ ДЕБЮТЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2024 В.И. Людыно^{1*}, Е.А. Цымбалова¹, Е.А. Чернявская¹, Е.Ю. Скрипченко²,
Г.Н. Бисага³, А.В. Дмитриев¹, И.Н. Абдурасулова¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
197022 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: vloudyno@mail.ru

² ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России,
197022 Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»,
197341 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 30.10.2023

После доработки 29.11.2023

Принята к публикации 08.12.2023

В исследовании выполнен анализ содержания гомоцистеина, цианокобаламина (витамина В12), фолиевой кислоты (витамина В9) и пиридоксина (витамина В6) в крови у детей с подтвержденным демиелинизирующим поражением ЦНС. Определены генотипы по основным полиморфизмам генов фолатного цикла – С677Т и А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR* и А66G гена *MTRR*. Сравнение исследуемых показателей проводили для пяти групп: контрольная группа – здоровые дети до 18 лет, дети в стадии дебюта рассеянного склероза (РС; с длительностью заболевания не более полугода), здоровые взрослые без неврологической патологии, взрослые пациенты с РС в стадии дебюта заболевания и пациенты с длительно протекающим РС. Выявлено значимое увеличение содержания гомоцистеина у детей в дебюте РС в сравнении со здоровыми детьми соответствующего возраста. Установлена высокая прогностическая ценность определения содержания гомоцистеина у детей. Продемонстрировано, что повышение уровня гомоцистеина выше безопасных значений не сопровождается наличием витаминдефицитного состояния, оцениваемого по содержанию фолиевой кислоты, витамина В6 и витамина В12 в крови. Отсутствие корреляции между лабораторными признаками витаминдефицитного состояния и содержанием гомоцистеина может быть обусловлено носительством полиморфных вариантов генов фолатного цикла, а повышение уровня гомоцистеина должно рассматриваться как маркер функциональных нарушений обмена фолатов, сопутствующих развитию патологического процесса при педиатрическом варианте РС. Выявленные закономерности могут быть использованы для разработки методов лечения и профилактики демиелинизирующего процесса у детей с РС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рассеянный склероз, гомоцистеин, метаболизм фолатов.

DOI: 10.31857/S0320972524030094 EDN: WJVDDR

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся появлением очагов воспаления, демиелинизации и нейродеструкции в центральной нервной системе (ЦНС) [1, 2]. По этиологии заболевание относится к мультифакториальным, его инициация явля-

ется результатом взаимодействия генетических и средовых факторов. Для большинства пациентов дебют РС приходится на возраст от 20 до 40 лет, более раннее начало заболевания регистрируется приблизительно в 3–10 % случаев. В ряде исследований отмечают рост заболеваемости РС среди детей и подростков, что, однако, может быть связано с совершенствованием методов диагностики [3].

Принятые сокращения: РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; *MTHFR* – метилентетрагидрофолатредуктаза; *MTR* – метионинсинтаза; *MTRR* – метионинсинтаза-редуктаза.

* Адресат для корреспонденции.

Несмотря на то что педиатрический РС (РС с дебютом до 18 лет) прогностически является относительно благоприятным, медленно прогрессирующим вариантом заболевания, в среднем у таких пациентов переход к вторично-прогрессирующему типу течения и развитие необратимых неврологических нарушений происходит в более молодом возрасте [4, 5], то есть существует опасность ранней инвалидизации. Стоит отметить также, что большинство используемых для лечения РС иммуномодулирующих препаратов разрешены к применению с 18-летнего возраста, следовательно, патогенетическая терапия может быть недоступна для пациентов с ранним дебютом РС [6].

Очевидна в связи с этим актуальность исследования механизмов педиатрического РС, поиск возможных специфических звеньев патогенеза РС с ранним дебютом и выявление специфических маркеров патологии.

Важную роль в повышении риска развития педиатрического РС могут играть факторы, нарушающие процессы созревания ЦНС, прежде всего формирование белого вещества и миелинизацию. В частности, в данном контексте представляет интерес изучение роли метаболизма фолатов. Особенности обмена фолатов, в том числе обусловленные наличием полиморфизмов в ключевых генах фолатного цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), метионинсинтазы (*MTR*), метионинсинтазы-редуктазы (*MTRR*), могут оказывать существенное влияние на созревание миелина, устойчивость к демиелинизирующим процессам и недостаточность механизмов репарации при повреждениях белого вещества [7–10]. Реализация этого влияния объясняется тем, что перечисленные ферменты, осуществляя превращения фолатов, контролируют обмен гомоцистеина и метионина, обеспечивают метаболизм одноуглеродных фрагментов и образование доноров метильных групп.

Целью представленного исследования было определение генотипов по полиморфным вариантам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* в группах пациентов с РС, разделённых по возрасту дебюта заболевания, анализ содержания гомоцистеина и витаминов группы В (фолиевой кислоты, цианокобаламина и пиридоксина) в крови пациентов и выявление взаимосвязи между определяемыми показателями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка уровня гомоцистеина и витаминов группы В в сыворотке крови. Для анализа уровня гомоцистеина, цианокобаламина (витамина В12), фолиевой кислоты (витамина В9) и пиридоксина (витамина В6) было сформировано несколько

групп. В группу пациентов детского возраста с демиелинизирующим заболеванием ЦНС было включено 18 детей в возрасте от 10 до 18 лет с клиническими и нейровизуализационными признаками демиелинизации; из них 13 детей – с подтверждённым диагнозом РС (дебют заболевания) и 5 детей – с диагнозами «острый диссеминированный энцефаломиелит» (ОДЭМ) и «демиелинизирующее заболевание ЦНС, высокий риск трансформации в РС». Контрольную группу составили здоровые дети от 8 до 18 лет. Кроме того, было сформировано 3 группы сравнения: взрослые пациенты в возрасте от 21 года до 69 лет с диагнозом РС и длительностью заболевания от 3 до 23 лет; взрослые пациенты в возрасте от 19 до 45 лет с диагнозом РС и длительностью заболевания менее 6 месяцев (начальная стадия заболевания) и контрольная группа – здоровые добровольцы в возрасте от 19 лет до 61 года без неврологической патологии. Диагноз РС как у детей, так и у взрослых был установлен на основании соответствия международным критериям МакДональда 2005, 2010 и 2017 гг. [11, 12], в сложных случаях, у пациентов, перенёсших ранее ОДЭМ, учитывались критерии, предложенные Международной группой по исследованию педиатрического РС (International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group, IPMSSG). Данные о возрасте на момент исследования, возрасте дебюта заболевания и длительности заболевания приведены в табл. 1.

Содержание гомоцистеина и цианокобаламина (витамина В12) определяли методом иммунохемилюминесцентного анализа, содержание фолиевой кислоты (витамина В9) определяли методом колориметрического анализа, содержание пиридоксина (витамина В6) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследования были выполнены на базе клинко-диагностической лаборатории с соблюдением всех правил преаналитического этапа. Забор крови осуществляли в утренние часы натощак, определение содержания гомоцистеина и витаминов группы В проводили непосредственно после взятия материала, образцы не хранили.

Определение генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*. Для проведения генетических исследований использовали образцы венозной крови, взятой в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА), тотальную ядерную ДНК выделяли по стандартной методике с применением набора реагентов «ДНК-сорб Б» (ООО «Некст-Био», Санкт-Петербург, Россия). Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Для проведения ПЦР использовали специфические олигонуклеотидные праймеры и аллель-специфические зонды с LNA-модификациями (LNA-нуклеотиды – замкнутые

Таблица 1. Демографические характеристики контрольной группы и пациентов с РС. Данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего

	Дети		Взрослые		
	Контрольная группа, n = 20	Пациенты с РС, дебют, n = 18	Контрольная группа, n = 31	Пациенты с РС, дебют, n = 17	Пациенты с РС, n = 16
Возраст, лет	13,3 \pm 0,66	14,5 \pm 0,70	39,1 \pm 2,27	33,8 \pm 1,93	41,7 \pm 3,38
Возраст дебюта РС, лет	–	14,5 \pm 0,70	–	33,8 \pm 1,93	30,3 \pm 2,89
Длительность заболевания, лет	–	< полугодом	–	< полугодом	11,4 \pm 1,58
Пол (М : Ж)	11 : 9	7 : 11	8 : 23	5 : 12	1 : 15

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, использованные для определения генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*

Полиморфизм	Название	Последовательность 5' – 3'
Полиморфизм С677Т гена <i>MTHFR</i> (rs1801133)	F	CTTCACAAAGCGGAAGAATGTG
	R	CCTGAAGCACTTGAAGGAGAA
	Probe, C-allele	FAM–CGGGA+G+C+CG+ATTTTC–BHQ-1
	Probe, T-allele	ROX–CGG+GA+G+T+C+GATTTTC–BHQ-2
Полиморфизм А1298С гена <i>MTHFR</i> (rs1801131)	F	AGGAGCTGCTGAAGATGTG
	R	GTTCTCCCGAGAGGTAAGA
	Probe, A-allele	FAM–AGA+CA+CTT+T+CTT+CACTGG–BHQ1
	Probe, C-allele	ROX–AGA+CA+CTT+G+CTT+CACTG–BHQ2
Полиморфизм А2756G гена <i>MTR</i> (rs1805087)	F	CAGTGTTCCAGCTGTTAGATGAA
	R	TCTACCACTTACCTTGAGAGACTCAT
	Probe, A-allele	FAM–AAT+G+G+T+C+CTGTCTA–BHQ-1
	Probe, G-allele	ROX–AATG+G+C+C+CTGTCTA–BHQ-2
Полиморфизм А66G гена <i>MTRR</i> (rs1801394)	F	ATATGCTACACAGCAGGG
	R	CATAAATATCACTTCCCAACCA
	Probe, A-allele	FAM–AGAA+A+T+A+T+GTGAGCA–BHQ-1
	Probe, G-allele	ROX–GAAA+T+G+T+GTGAGC–BHQ-2

Примечание. Знаком «+» обозначены модифицированные LNA-нуклеотиды.

нуклеотиды (Locked nucleic acid)), синтезированные ООО «ДНК-Синтез» (Россия) (последовательно праймеров и зондов приведены в табл. 2).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica (v. 10). Выбор статистических критериев основывался на соответствии или несоответствии данных закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Различия в содержании гомоцистеина в сыворотке крови у пациентов с разным возрастом начала РС. Анализ уровня гомоцистеина выявил достоверные различия между обследованными группами (ANOVA, $F = 3,495$; $p = 0,010$) (рис. 1). По результатам апостериорных сравнений выявлено

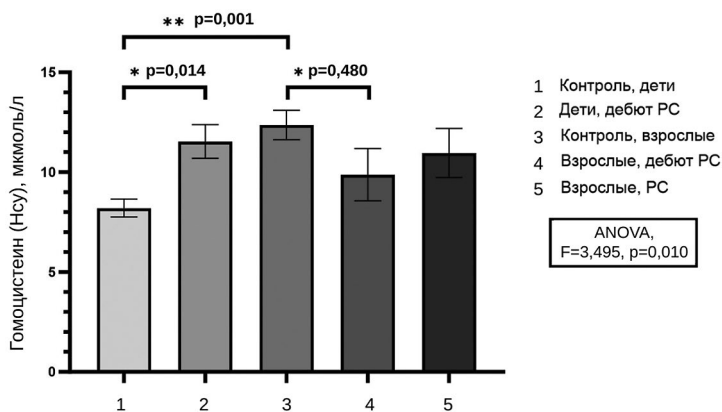


Рис. 1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови у здоровых испытуемых и пациентов с РС. Данные представлены в виде средних и ошибки среднего. * Достоверное отличие между группами, $p < 0,05$; ** достоверное отличие между группами, $p < 0,01$

достоверное увеличение содержания гомоцистеина у пациентов с детским вариантом РС в стадии дебюта заболевания по сравнению с детьми контрольной группы соответствующего возраста ($p = 0,014$).

Между двумя контрольными группами – детей и взрослых без неврологической патологии – также наблюдались достоверные различия ($p = 0,0006$): в группе взрослых ожидаемо регистрировались более высокие показатели уровня гомоцистеина. При сравнении среднегрупповых значений у взрослых пациентов в стадии дебюта заболевания не только не выявлено повышения содержания гомоцистеина относительно соответствующей группы контроля, но и, напротив, отмечено незначительное, но достоверное его снижение ($p = 0,048$). Нарастания уровня гомоцистеина у взрослых пациентов при большей длительности РС также выявлено не было.

В дополнение к сравнению среднегрупповых значений представлялось целесообразным провести анализ индивидуальной вариабельности уровня гомоцистеина в исследуемых группах. В первую очередь обращало на себя внимание то, что испытуемые, значения уровня гомоцистеина у которых выходили за границы референтного интервала, присутствовали не только среди пациентов с диагнозом РС, но и в контрольных группах. Кроме того, между группами контроля разного возраста были выявлены достоверные различия в содержании гомоцистеина, поэтому для проведения дальнейшего анализа отдельно для каждой из контрольных групп были рассчитаны значения концентрации гомоцистеина, соответствующие 95%-ному перцентилю. Эти значения были приняты как верхняя граница для соответствующей возрастной группы. Для детей из контрольной группы этот пороговый показатель составил 11,4 $\mu\text{mol/L}$. Содержание гомоцистеина, превышающее уровень 95%-ного перцентиля, было отмечено у 2 из 20 де-

тей контрольной группы и у 8 из 18 детей с дебютом демиелинизирующего заболевания; различия между группами в распределении испытуемых с нормальным и повышенным содержанием гомоцистеина были достоверны ($p = 0,039$, точный критерий Фишера). Величина отношения шансов (OR), характеризующая степень риска развития патологии, составила 7,2 (95% CI: 1,275, 40,67).

Для взрослых испытуемых контрольной группы 95%-ный перцентиль концентрации гомоцистеина оказался равен 19,7 $\mu\text{mol/L}$, значения выше этого уровня в контрольной группе имели 2 человека из 30, в группе дебюта РС – 2 из 17 пациентов, и 1 из 16 пациентов с длительностью заболевания более года. Величина OR составила 1,87 (95% CI: 0,239, 14,61) для взрослых пациентов в дебюте РС ($p = 0,919$) и 0,93 (95% CI: 0,078, 11,15) для пациентов с продолжительностью РС более полугода ($p > 0,99$). Соответственно, различий между группой контроля и группами пациентов выявлено не было.

Данные ROC-анализа подтвердили, что оценка содержания гомоцистеина у испытуемых детского возраста позволяет с высокой степенью точности определить наличие патологии, то есть повышение концентрации гомоцистеина является значимым маркером развития патологического процесса для детей в начальном периоде РС (рис. 2, а). Анализ на основе оценки уровня витамина В12 не позволяет выявить достоверные различия между группами здоровых детей и детей с дебютом РС (рис. 2, б). Совместное определение гомоцистеина и В12 также не приводит к улучшению прогностической ценности модели (рис. 2, в).

Анализ уровня витаминов группы В в сыворотке крови у пациентов с РС. Сравнение абсолютных значений уровней витамина В9 (фолиевой кислоты), В12 (цианокобаламина) и В6 (пиридоксина) не выявило различий между исследуемыми группами (табл. 3).

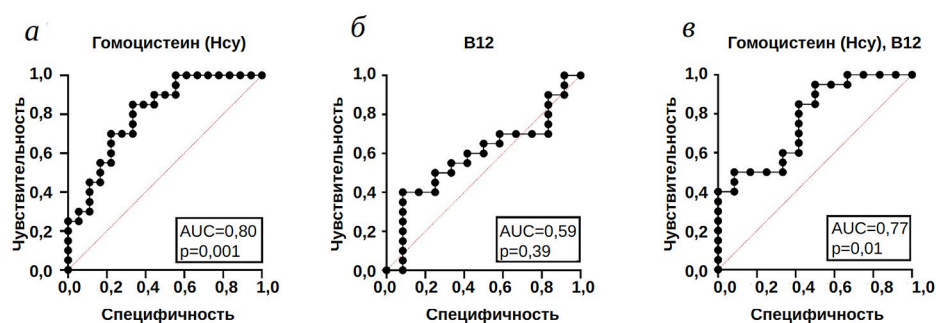


Рис. 2. Характеристические (ROC) кривые для оценки риска развития РС на основе определения уровня гомоцистеина (а), витамина В12 (б) и гомоцистеина и витамина В12 (в) у детей. AUC – площадь под кривой

Таблица 3. Содержание витаминов В6, В9 и В12 и значения отношений гомоцистеин/фолиевая кислота (Hcy/B9) и гомоцистеин/кобаламин (Hcy/B12) у пациентов с РС и здоровых испытуемых контрольных групп

Группа	В6	В9	Hcy/B9	В12	Hcy/B12
Дети, контроль (n = 20)	79,3 [58,4; 137]	11,8 [8,97; 18,0]	0,62 [0,42; 0,95]	254,9 [190,8; 403,3]	0,035 [0,022; 0,043]
Дети, дебют РС (n = 18)	69,4 [42,8; 92,1]	11,5 [9,97; 14,5]	0,78 [0,60; 1,28]	296,1 [254,4; 372,8]	0,034 [0,02; 0,049]
Взрослые, контроль (n = 31)	59,5 [45,9; 76,9]	15,1 [12,1; 18,9]	0,09 [0,03; 0,57]	306,1 [192,0; 412,3]	0,036 [0,023; 0,075]
Взрослые, дебют РС (n = 17)	65,6 [40,6; 94,0]	15,5 [12,3; 25,5]	0,52 [0,24; 0,73]	328,5 [232,5; 488,3]	0,022 [0,013; 0,046]
Взрослые, РС (n = 16)	67,6 [52,8; 99,5]	18,3 [11,4; 23,1]	0,69 [0,34; 0,99]	372,3 [286,0; 566,0]	0,029 [0,015; 0,039]

Примечание. Данные представлены в виде: медиана [1 квартиль; 3 квартиль]

Для оценки взаимосвязи между уровнем витаминов группы В и содержанием гомоцистеина и выявления роли дефицита витаминов в развитии РС были проанализированы корреляционные взаимосвязи между определяемыми показателями и рассчитаны соотношения гомоцистеин/кобаламин (Hcy/B12) и гомоцистеин/фолиевая кислота (Hcy/B9). У детей контрольной группы выявлена достоверная отрицательная связь между уровнем гомоцистеина и содержанием витамина В12. У детей в стадии дебюта РС этой зависимости обнаружено не было (данные приведены в табл. 4). Кроме того, все дети с РС, значения концентрации гомоцистеина у которых превышали 11,4 мкмоль/л (рассчитанный нами уровень 95%-ного перцентиля), имели нормальные значения концентрации витамина В12, у двоих из восьми детей отмечалось снижение концентрации фолиевой кислоты. Таким образом, для детей с педиатрическим вариантом РС в стадии дебюта заболевания характерно нарастание сывороточного уровня гомоцистеина, которое может не сопровождаться дефицитом фолиевой кислоты и/или кобаламина (В12) плазмы крови.

У здоровых взрослых уровень гомоцистеина отрицательно коррелировал и с содержанием витамина В12, и с уровнем фолиевой кислоты. У пациентов с РС (как в стадии дебюта, так и при большей продолжительности заболевания) эти корреляционные взаимосвязи отсутствовали (табл. 4). При этом гипергомоцистеинемия была отмечена у двух взрослых пациентов в стадии дебюта РС (21,5 и 23,9 мкмоль/л), у одного из этих пациентов повышение концентрации гомоцистеина сопровождалось дефицитом витамина В12, у другого отмечался недостаточный уровень фолиевой кислоты.

При сравнении соотношений гомоцистеин/кобаламин (Hcy/B12) и гомоцистеин/фолиевая кислота (Hcy/B9) с применением теста Крускала-Уоллиса были обнаружены достоверные различия между группами для показателя Hcy/B9 ($N = 28,271$, $p < 0,001$). По результатам попарных сравнений соотношение Hcy/B9 оказалось достоверно выше у взрослых пациентов с РС по сравнению с соответствующей контрольной группой ($p = 0,006$), а также у здоровых взрослых по сравнению со здоровыми детьми контрольной группы ($p = 0,001$).

Таблица 4. Данные корреляционного анализа для оценки взаимосвязи между уровнями гомоцистеина (Hcy), фолиевой кислоты (B9) и витамина B12

Группа	Hcy – B9	Hcy – B12
Дети, контрольная группа (n = 20)	r = -0,17; p = 0,47	r = -0,51; p = 0,02
Дети, дебют РС (n = 18)	r = -0,18; p = 0,58	r = 0,16; p = 0,62
Взрослые, контрольная группа (n = 31)	r = -0,56; p = 0,001	r = -0,40; p = 0,03
Взрослые, дебют РС (n = 17)	r = 0,02; p = 0,95	r = -0,41; p = 0,11
Взрослые, РС (n = 16)	r = -0,36; p = 0,17	r = -0,32; p = 0,23

Примечание. r – коэффициент корреляции Пирсона; p – значение для 95%-ного уровня значимости. Статистически значимые корреляции выделены жирным шрифтом.

У детей в стадии дебюта РС отличий по этому показателю от здоровых детей выявлено не было.

Анализ влияния генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла на уровень гомоцистеина. При оценке взаимосвязи между изменением уровня гомоцистеина и наличием полиморфных вариантов генов, контролирующих фолатный обмен, обнаружены следующие закономерности. С использованием многофакторного анализа выявлено достоверное влияние полиморфизма A2756G гена *MTR* на уровень гомоцистеина ($F = 4,766$, $p = 0,04$) у пациентов в дебюте РС, но не у испытуемых контрольных групп ($F = 0,855$, $p = 0,36$). При оценке взаимодействия факторов с использованием анализа ANOVA-MANOVA установлено, что также у пациентов в дебюте РС, но не у здоровых испытуемых контрольных групп наблюдается достоверное сочетанное зависимое от возрастной группы влияние на уровень гомоцистеина генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* ($F = 9,95$; $p = 0,004$) и достоверное совместное влияние генотипов по полиморфизмам A1298C гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* на уровень гомоцистеина ($F = 8,29$; $p = 0,008$), которое также зависело от возраста. Зависимость от возраста выражалась, в частности, в том, что у детей наиболее высокие значения уровня гомоцистеина были отмечены при сочетании наличия минорной аллели по полиморфизму A2756G гена *MTR* с генотипом CC по полиморфизму C677T гена *MTHFR*, а также при сочетании наличия минорных аллелей по двум полиморфизмам – A2756G гена *MTR* и A1298C гена *MTHFR*. У взрослых пациентов в дебюте РС при сочетании наличия минорной аллели по полиморфизму A2756G гена *MTR* с генотипом CC

по полиморфизму C677T гена *MTHFR*, напротив, отмечались самые низкие значения концентрации гомоцистеина. Выявленные закономерности указывают на то, что разнонаправленные изменения уровня гомоцистеина, наблюдаемые у взрослых и педиатрических пациентов в дебюте РС, могут быть, по крайней мере, частично, обусловлены наличием полиморфных вариантов генов фолатного цикла.

Показано также достоверное сочетанное влияние генотипа по полиморфизму A2756G гена *MTR* и B12-дефицитного состояния на уровень гомоцистеина (ANOVA-MANOVA, $F = 9,042$, $p = 0,004$). Важно, что это влияние не зависело от возраста, то есть было характерно и для детей, и для взрослых. При этом наиболее высокие значения уровня гомоцистеина наблюдались при сочетании дефицита B12 и генотипа AA по полиморфизму A2756G гена *MTR*. Принимая во внимание полученные данные о том, что влияние дефицита B12 на уровень гомоцистеина зависит от генотипа по полиморфизму A2756G гена *MTR*, можно заключить, что повышение уровня гомоцистеина у носителей минорной аллели по этому полиморфизму может не сопровождаться снижением содержания витамина B12 в крови. Лабораторное исследование крови у этих пациентов без проведения генотипирования будет неинформативным.

Интересные закономерности, согласующиеся с выводами, описанными выше, были выявлены при проведении корреляционного анализа между уровнем гомоцистеина и содержанием витамина B12 в плазме крови, если анализ выполнялся для отдельных подгрупп с учётом генотипа по полиморфизмам A2756G и C677T. Так, только для детей, у которых присутствовали минорные аллели по двум полиморфным локусам, была характерна достоверная сильная отрицательная корреляционная связь между уровнем гомоцистеина и содержанием витамина B12 в плазме крови (рис. 3). У взрослых такой закономерности выявлено не было. Полученные данные позволяют предположить, что именно при таком сочетании генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756G гена *MTR* применение препаратов кобаламина для нормализации повышенного уровня гомоцистеина у детей может быть наиболее эффективным.

Поскольку на достоверность выявленных взаимодействий может оказывать влияние распределение частот по исследуемым полиморфным вариантам в сравниваемых группах, целесообразно представление данных о соотношении генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у здоровых испытуемых и пациентов с РС. В табл. 5 обобщены данные для пяти групп – с разделением по возрасту и наличию патологии. В табл. 6 данные объединены в две группы –

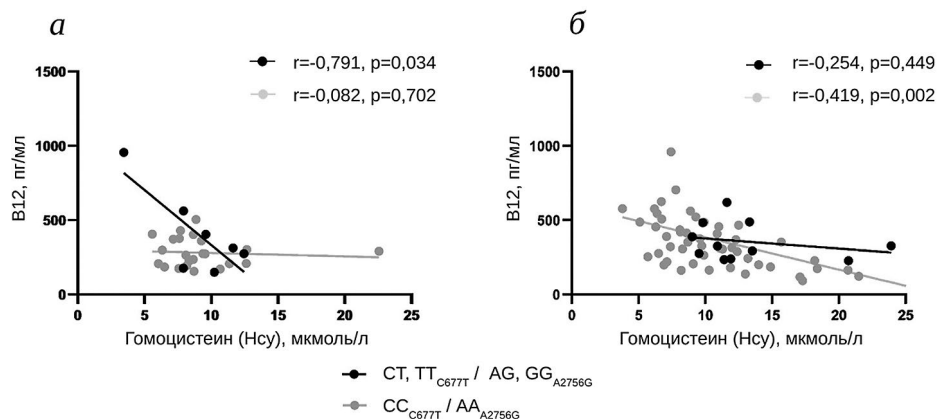


Рис. 3. Взаимосвязь между содержанием витамина B12 и уровнем гомоцистеина у испытуемых с учётом сочетания генотипов по полиморфизмам C677T гена *MTHFR* и A2756 гена *MTR*. *а* – Дети (контрольная группа и пациенты детского возраста в стадии дебюта РС); *б* – взрослые (контрольная группа и взрослые пациенты с продолжительностью заболевания не более полугода (дебют РС)). Результаты корреляционного анализа представлены в виде коэффициента корреляции Пирсона и значения *p* для уровня значимости 95%

Таблица 5. Распределение генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла и частоты минорных аллелей в сравниваемых группах

Полиморфизм	Генотипы, минорная аллель	Группа							
		Дети, контроль (n = 20)	Дети, дебют РС (n = 18)	<i>p</i> (χ^2)	Взрослые, контроль (n = 31)	Взрослые, дебют РС (n = 17)	<i>p</i> (χ^2)	Взрослые, РС (n = 16)	<i>p</i> (χ^2)
<i>MTHFR</i> : C677T	CC	13	8	0,18	19	7	0,54	10	0,99
	CT	7	8		9	9		6	
	TT	0	2		3	1		0	
	T, частота	0,18	0,33		0,24	0,32		0,19	
<i>MTHFR</i> : A1298C	AA	5	10	0,07	13	7	0,94	6	0,78
	AC	11	7		16	8		8	
	CC	4	1		2	2		2	
	C, частота	0,48	0,25		0,32	0,35		0,38	
<i>MTR</i> : A2756G	AA	8	12	0,30	14	10	0,72	12	0,14
	AG	11	5		14	5		3	
	GG	1	1		3	2		1	
	G, частота	0,33	0,19		0,32	0,26		0,16	
<i>MTRR</i> : A66G	AA	2	3	0,93	8	5	0,95	3	0,72
	AG	12	9		16	7		8	
	GG	6	6		7	5		5	
	G, частота	0,60	0,58		0,48	0,50		0,53	

Примечание. *p* – уровень достоверности различий для частот минорных аллелей между группами пациентов и соответствующей по возрасту контрольной группой (значения *p* рассчитаны для критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность).

Таблица 6. Сравнение распределений генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла и частот минорных аллелей в группах здоровых испытуемых и пациентов с РС без разделения по возрасту

Полиморфизм	Генотип	Группа		p (χ^2)
		Контроль ($n = 51$)	РС ($n = 51$)	
<i>MTHFR</i> : C677T	CC	32	25	0,63
	CT	16	23	
	TT	3	3	
	T-аллель, частота	0,22	0,26	
<i>MTHFR</i> : A1298C	AA	18	23	0,46
	AC	27	23	
	CC	6	5	
	C-аллель, частота	0,38	0,32	
<i>MTR</i> : A2756G	AA	22	34	0,08
	AG	25	13	
	GG	4	4	
	G-аллель, частота	0,32	0,21	
<i>MTRR</i> : A66G	AA	10	11	0,33
	AG	28	24	
	GG	13	16	
	G-аллель, частота	0,47	0,55	

Примечание. p – уровень достоверности различий для частот минорных аллелей между двумя группами (значения p рассчитаны для критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность).

здоровых испытуемых и пациентов с РС без разделения по возрастному признаку и длительности заболевания. В обоих случаях распределение генотипов у пациентов не отличалось достоверно от такового у контрольных испытуемых. Обращает на себя внимание, однако, тенденция к увеличению доли носителей минорной аллели по полиморфизму C677T гена *MTHFR* у пациентов в дебюте РС (как у детей, так и у взрослых) и тенденция к снижению частоты минорных аллелей по полиморфизмам A2756G гена *MTR* (у детей и взрослых) и A1298C гена *MTHFR* (у детей) (табл. 5). Несмотря на то что эти тенденции менее заметны в группах без разделения по возрастному признаку (табл. 6), оценить, обусловлены ли они малым размером групп или возрастными особенностями, не представляется возможным без дополнительных исследований. Достоверных различий в уровне витаминов при разделении сравниваемых групп на подгруппы в зависимости от генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла выявлено не было (данные приведены в табл. 1 и табл. 2 Приложения). Сравнение концентрации гомоци-

стеина в крови у носителей различных генотипов (табл. 7) подтверждает вклад исследуемых полиморфных локусов в нарушения фолатного обмена при РС. Так, в группах контроля (как у детей, так и у взрослых) различий в уровне гомоцистеина между гомозиготами по мажорной аллели и носителями минорных аллелей обнаружено не было. У пациентов в дебюте РС (и у детей, и у взрослых) выявлена зависимость изменений уровня гомоцистеина относительно соответствующих контрольных групп от генотипа по полиморфизмам генов *MTHFR* и *MTR*.

Стоит отметить также, что характер выявленных изменений уровня гомоцистеина у пациентов указывает на то, что они не являются следствием неравномерного распределения частот генотипов по исследуемым полиморфным вариантам. Так, в частности, достоверное повышение уровня гомоцистеина у детей с РС по сравнению со здоровыми детьми отмечено в подгруппе носителей генотипа CC по полиморфизму C677T гена *MTHFR* и у носителей минорной аллели по полиморфизму A2756G гена *MTR* (табл. 7), в то время как частоты этих

Таблица 7. Концентрация гомоцистеина (мкмоль/л) в крови здоровых испытуемых и пациентов с РС с различными генотипами по полиморфизмам генов фолатного цикла

Группа	Полиморфизмы генов фолатного цикла и соответствующие варианты генотипов							
	<i>MTHFR</i> , C677T		<i>MTHFR</i> , A1298C		<i>MTR</i> , A2756G		<i>MTRR</i> , A66G	
	CC	CT, TT	AA	AC, CC	AA	AG, GG	AA	AG, GG
Дети, контроль (n = 20)	8,35 [7,6; 8,74]	7,89 [6,37; 11,4]	7,6 [6,37; 9,56]	8,35 [7,73; 9,41]	8,21 [6,23; 10,06]	8,28 [7,74; 9,15]	9,57 [9,56; 9,85]	8,05 [6,53; 8,74]
Дети, дебют РС (n = 18)	12,68* [8,27; 13,71]	10,76 [9,3; 12,43]	10,76 [8,9; 12,96]	12,02* [8,92; 12,86]	10,34 [8,27; 12,99]	11,77* [10,41; 12,66]	11,37 [8,4; 14,41]	11,11* [8,9; 12,96]
Взрослые, контроль (n = 31)	11,65 [8,6; 14,9]	11,75 [9,75; 16,1]	11,8 [9,2; 13,65]	11,6 [8,7; 16,4]	11,1 [8,7; 16,4]	11,9 [9,3; 13,3]	9,9 [8,4; 14,9]	11,9 [9,8; 14,9]
Взрослые, дебют РС (n = 17)	6,91# [5,7; 9,74]	8,68 [6,74; 11,9]	7,44 [5,4; 13,5]	7,64# [6,3; 9,92]	6,94# [6,3; 9,92]	9,74 [6,91; 13,5]	7,13 [6,74; 7,44]	8,95 [6,35; 12,70]
Взрослые, РС (n = 16)	10,31 [8,89; 12,3]	9,71 [9,0; 10,9]	11,6 [9,9; 12,4]	9,31 [7,8; 11,02]	9,75 [8,35; 12,35]	10,21 [9,26; 11,6]	12,3 [9,52; 12,4]	9,6 [8,89; 11,02]
<i>p</i>	* <i>p</i> = 0,033 # <i>p</i> = 0,027			* <i>p</i> = 0,036 # <i>p</i> = 0,029	# <i>p</i> = 0,020	* <i>p</i> = 0,002		* <i>p</i> = 0,002

Примечание. Данные представлены в виде: медиана [1 квартиль; 3 квартиль]. * Достоверное отличие между группами «Дети, дебют РС» и «Дети, контроль»; # достоверное отличие между группами «Взрослые, дебют РС» и «Взрослые, контроль» (U-критерий Манна-Уитни). Достоверные различия дополнительно выделены жирным шрифтом.

генотипов у пациентов ниже, чем в контрольной группе (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе исследования результаты указывают на то, что уже в начальной стадии РС у пациентов наблюдаются нарушения фолатного обмена, маркером которых является изменение концентрации гомоцистеина. Однако у детей с педиатрическим РС и у взрослых пациентов выявленные нарушения, по-видимому, имеют в основе различные механизмы.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, образующаяся из незаменимой аминокислоты метионина и метаболизируемая двумя путями: обратной конверсией в метионин (реметилирование) и транссульфурацией. Повышение уровня гомоцистеина выше безопасных значений (гипергомоцистеинемия) признано важным фактором риска развития сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологии [13]. Активно исследуется роль гомоцистеина в патогенезе нейродегенера-

тивных заболеваний [14]. Отмечается, что увеличение концентрации гомоцистеина коррелирует с выраженностью когнитивного дефицита у пациентов с болезнью Альцгеймера [15], сывороточный уровень гомоцистеина отражает тяжесть моторных и немоторных нарушений при болезни Паркинсона, а также определяет прогноз заболевания [16, 17]. Результаты исследований, сравнивающих содержание гомоцистеина у пациентов с РС и контрольных лиц, достаточно противоречивы – в ряде исследований сообщается о повышенном уровне гомоцистеина при РС [18, 19], другие авторы не обнаруживают таких отличий [20, 21]. Однако связь повышения уровня гомоцистеина с прогрессированием заболевания у пациентов с РС убедительно доказана [22], установлено неблагоприятное влияние гипергомоцистеинемии на развитие когнитивных нарушений [23]. В ряде работ обнаружены различия в сывороточном уровне гомоцистеина у пациентов с ремитирующим и прогрессирующим течением [24].

Известно, что основной алиментарной причиной развития гипергомоцистеинемии является дефицит нутриентов и прежде всего витаминов

группы В, выполняющих роль кофакторов в цикле фолиевой кислоты и при реметилировании гомоцистеина [25, 26]. Процесс обратного превращения гомоцистеина в метионин (реметилирование гомоцистеина) контролируется тремя основными ферментами – *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*. Нарушение активности этих ферментов, вызванное наличием полиморфных вариантов в кодирующих их генах, также может способствовать избыточному накоплению гомоцистеина в крови [27, 28].

Наблюдаемое у детей с РС повышение уровня гомоцистеина относительно значений, характерных для группы контроля соответствующего возраста, в большинстве случаев не сопровождалось дефицитом фолиевой кислоты и витамина В12 в плазме крови. Причинами повышения уровня гомоцистеина при отсутствии лабораторных признаков витаминдефицитного состояния могут быть: 1) недостаточное поступление активной формы фолиевой кислоты (тетрагидрафолиевой кислоты, ТГФК) в клетку, то есть функциональный дефицит фолатов, обусловленный нарушением транспорта фолиевой кислоты; 2) низкий уровень ТГФК в тканях, связанный с наличием полиморфизмов в гене *MTHFR*; 3) генетические дефекты ферментов *MTR* и *MTRR*. Перечисленные причины способствуют снижению скорости реметилирования гомоцистеина в метионин и, соответственно, накоплению его в плазме крови. Кроме того, гипергомоцистеинемия может быть связана со снижением эффективности метаболического пути цистатиона, в процессе которого гомоцистеин метаболизируется до цистеина, сероводорода и других серосодержащих соединений.

Нарушение обмена гомоцистеина и развитие гипергомоцистеинемии у носителей полиморфизмов генов фолатного цикла обусловлено снижением активности фермента *MTHFR* при наличии Т-аллели полиморфизма С677Т и нарушением В12-зависимой реакции реметилирования, катализируемой ферментом *MTR* [29, 30]. Причём, по данным литературы, может наблюдаться кумулятивное действие полиморфизмов – большой метаболический эффект проявляется при наличии нескольких полиморфных вариантов [31].

Для выборки испытуемых, включённых в представленное исследование, получено подтверждение сочетанного влияния генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла на уровень гомоцистеина, причём это влияние проявлялось только у пациентов, но не в группах контроля, и, кроме того, зависело от возрастной группы. Также у обследованных детей в начальной стадии РС уровень гомоцистеина был достоверно выше, чем у здоровых детей, кроме того, у детей в дебюте РС не проявлялась характерная для здоровых детей контрольной группы взаимосвязь между уровнем

гомоцистеина и цианокобаламина (витамина В12). В целом, полученные данные позволяют сделать вывод о наличии у детей с РС признаков нарушения фолатного обмена. Предположительно, развитие этих нарушений в детском возрасте преимущественно связано с изменением биодоступности и/или нарушением реализации коферментной функции кобаламина, что, в свою очередь, определяется наличием полиморфизмов в генах *MTR* и *MTHFR* и их сочетанным влиянием. Стоит заметить, что размер выборки не позволяет сделать вывод о том, влияет ли наличие полиморфных аллелей генов фолатного цикла на риск развития педиатрического варианта РС. В частности, для уточнения вклада полиморфных вариантов генов фолатного цикла в патогенез педиатрического РС представляется целесообразным сравнение частот полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у пациентов с разным возрастом дебюта заболевания. Такое исследование, возможно, позволит оценить специфичность влияния этих полиморфных вариантов на восприимчивость к развитию РС и/или течение заболевания.

Сравнение лабораторных показателей у пациентов с РС на стадии дебюта заболевания с данными, полученными для здоровых испытуемых соответствующего возраста, выявило достоверное повышение уровня гомоцистеина только у пациентов педиатрической группы, но не у взрослых пациентов. Известно, что характерной особенностью дебюта заболевания при педиатрическом варианте РС является значительная выраженность воспалительной реакции с формированием крупных очагов демиелинизации [32, 33]. Кроме того, при раннем дебюте РС более выражены аксональные повреждения в зонах демиелинизации [34]. Одной из важных задач терапии на ранних стадиях заболевания у детей с РС является ограничение повреждения аксонов, вторичного по отношению к обширным воспалительным изменениям [35]. Контроль лабораторных показателей и нормализация сывороточного уровня гомоцистеина может быть одним из ценных инструментов в достижении этой цели. Важно, что такое раннее вмешательство может предотвратить когнитивные нарушения, риск развития которых также значителен у детей с РС [36–38].

В исследовании нами рассчитано значение сывороточного уровня гомоцистеина, соответствующее 95%-ному перцентилю для группы здоровых детей (11,4 мкмоль/л). Этот уровень близок к концентрациям (10–11 мкмоль/л), которые признаны Всемирной организацией здравоохранения как пограничные при диагностике заболеваний. Концентрация гомоцистеина 10,9 мкмоль/л была определена в работе Жлоба и Субботиной у пациентов с гипертонической болезнью как уровень,

указывающий на наличие функционального дефицита фолатов без снижения их уровня в плазме крови [39].

Необходимо отметить, что в лабораторной практике обычно используют более широкие диапазоны нормальных значений содержания гомоцистеина в крови – границы референтного интервала указывают в пределах от 4,44 до 13,56 мкмоль/л для женщин и от 5,46 до 16,2 мкмоль/л для мужчин. Такое определение максимальных значений диапазона обусловлено тем, что при концентрации в плазме, превышающей уровень 14–15 мкмоль/л, проявляется прямое токсическое действие гомоцистеина. Однако всё больший интерес у исследователей вызывает изучение механизмов и последствий умеренного повышения уровня гомоцистеина, не связанного с непосредственным повреждающим действием этой аминокислоты. Важно отметить также, что содержание гомоцистеина зависит от возраста, референтные интервалы для детей и подростков ниже, чем для взрослых – нормальным считается уровень 4,5–5 мкмоль/л и 6–7 мкмоль/л соответственно [40, 41].

Обобщая изложенные факты, стоит подчеркнуть, что механизмы повреждающего действия гомоцистеина на ЦНС включают различные пути. Прямое токсическое действие высоких концентраций гомоцистеина связывают с его стимулирующим влиянием на NMDA-рецепторы и чувствительностью нейронов к эксайтотоксичности [42]. Вазотоксическое влияние гомоцистеина способствует развитию эндотелиальной дисфункции и нарушению проницаемости гематоэнцефалического барьера [43, 44]. В частности, этот механизм играет важную роль в инициации демиелинирующего процесса при РС [45, 46]. Не меньшее внимание тем не менее должно уделяться умеренному повышению уровня гомоцистеина, являющемуся маркером нарушений метаболизма одноуглеродных фрагментов и, в частности, маркером нарушений фолатного обмена. Связанный с накоплением гомоцистеина дефицит метильных доноров, гипометилирование и, как следствие, нарушение процессов миелинизации и ремиелинизации – один из ключевых механизмов, опосредующих вовлечение фолатного обмена в патогенез демиелинизирующих заболеваний [47, 48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные дают основание рассматривать повышение уровня гомоцистеина как ранний маркер патологии при педиатрическом варианте РС. Важно, что гомоцистеин относится к так называемым потенциально модифицируемым факторам риска и его концентрация может быть нормализована назначением препаратов витаминов (в частности, В12, фолиевой кислоты), а также коррекцией пищевого рациона. Однако разработка алгоритмов коррекции должна проводиться с учётом обследования на наличие полиморфизмов генов *MTHFR* и *MTR*.

Вклад авторов. В.И. Людыно – написание текста, обсуждение результатов исследования; Е.А. Цымбалова – проведение экспериментов; Е.А. Чернявская – проведение экспериментов; Е.Ю. Скрипченко – обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи; Г.Н. Бисага – обсуждение результатов исследования; А.В. Дмитриев – концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования; И.Н. Абдурасулова – концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Санкт-Петербургского научного фонда (грант № 22-25-20191).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные при проведении исследования, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех включённых в исследование пациентов и контрольных испытуемых было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», протокол № 2/22 от 06.04.2022.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Compston, A., and Coles, A. (2008) Multiple sclerosis, *Lancet*, **372**, 1502-1517, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7).
2. Charabati, M., Wheeler, M. A., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2023) Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting, *Cell*, **186**, 1309-1327, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.008>.
3. Brenton, J. N., Kammeyer, R., Gluck, L., Schreiner, T., and Makhani, N. (2020) Multiple sclerosis in children: current and emerging concepts, *Semin Neuro.*, **40**, 192-200, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1703000>.

4. Simone, I. L., Carrara, D., Tortorella, C., Liguori, M., Lepore, V., Pellegrini, F., Bellacosa, A., Ceccarelli, A., Pavone, I., and Livrea, P. (2002) Course and prognosis in early-onset MS: comparison with adult-onset forms, *Neurology*, **59**, 1922-1928, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000036907.37650.8e>.
5. Renoux, C., Vukusic, S., Mikaeloff, Y., Edan, G., Clanet, M., et al. (2007) Natural history of multiple sclerosis with childhood onset, *N. Engl. J. Med.*, **356**, 2603-2613, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067597>.
6. Krysko, K. M., Graves, J. S., Rensel, M., Weinstock-Guttman, B., Rutatangwa, A., et al. (2020) US network of Pediatric MS centers. Real-world effectiveness of initial disease-modifying therapies in pediatric multiple sclerosis, *Ann. Neurol.*, **88**, 42-55, <https://doi.org/10.1002/ana.25737>.
7. Weng, Q., Wang, J., Wang, J., Tan, B., Wang, J., et al. (2017) Folate metabolism regulates oligodendrocyte survival and differentiation by modulating AMPK α activity, *Sci. Rep.*, **7**, 1705, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01732-1>.
8. McGarel, C., Pentieva, K., Strain, J. J., and McNulty, H. (2015) Emerging roles for folate and related B-vitamins in brain health across the lifecycle, *Proc. Nutr. Soc.*, **74**, 46-55, <https://doi.org/10.1017/S0029665114001554>.
9. Naninck, E. F. G., Stijger, P. C., and Brouwer-Brolsma, E. M. (2019) The importance of maternal folate status for brain development and function of offspring, *Adv. Nutr.*, **10**, 502-519, <https://doi.org/10.1093/advances/nmy120>.
10. Zou, R., El Marroun, H., Cecil, C., Jaddoe, V. W. V., Hillegers, M., et al. (2021) Maternal folate levels during pregnancy and offspring brain development in late childhood, *Clin. Nutr.*, **40**, 3391-3400, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.025>.
11. Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria", *Ann. Neurol.*, **58**, 840-846, <https://doi.org/10.1002/ana.20703>.
12. Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., et al. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria, *Lancet Neurol.*, **17**, 162-173, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2).
13. Ganguly, P., and Alam, S. F. (2015) Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease, *Nutr. J.*, **14**, 6, <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>.
14. Ansari, R., Mahta, A., Mallack, E., and Luo, J. J. (2014) Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review, *J. Clin. Neurol.*, **10**, 281-288, <https://doi.org/10.3988/jcn.2014.10.4.281>.
15. Farina, N., Jernerén, F., Turner, C., Hart, K., and Tabet, N. (2017) Homocysteine concentrations in the cognitive progression of Alzheimer's disease, *Exp. Gerontol.*, **99**, 146-150, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.008>.
16. Kocer, B., Guven, H., Conkbayir, I., Comoglu, S. S., and Delibas, S. (2016) The effect of hyperhomocysteinemia on motor symptoms, cognitive status, and vascular risk in patients with Parkinson's disease, *Parkinsons Dis.*, **2016**, 1589747, <https://doi.org/10.1155/2016/1589747>.
17. Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Elewa, Y. H. A., Zahran, M. H., Alexiou, A., et al. (2023) Parkinson's disease risk and hyperhomocysteinemia: the possible link, *Cell Mol. Neurobiol.*, **43**, 2743-2759, <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01350-8>.
18. Ramsaransing, G. S., Fokkema, M. R., Teelken, A., Arutjunyan, A. V., Koch, M., and De Keyser, J. (2006) Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **77**, 189-192, <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.072199>.
19. Li, X., Yuan, J., Han, J., and Hu, W. (2020) Serum levels of homocysteine, Vitamin B12 and folate in patients with multiple sclerosis: an updated meta-analysis, *Int. J. Med. Sci.*, **17**, 751-761, <https://doi.org/10.7150/ijms.42058>.
20. Kararizou, E., Paraskevas, G., Triantafyllou, N., Koutsis, G., Evangelopoulos, M. E., et al. (2013) Plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis in the Greek population, *J. Chin. Med. Assoc.*, **76**, 611-614, <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2013.07.002>.
21. Bystrická, Z., Laubertová, L., Ďurfinová, M., and Paduchová, Z. (2017) Methionine metabolism and multiple sclerosis, *Biomarkers*, **22**, 747-754, <https://doi.org/10.1080/1354750X.2017.1334153>.
22. Oliveira, S. R., Flauzino, T., Sabino, B. S., Kallaur, A. P., Alfieri, D. F., et al. (2018) Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis, *Metab. Brain Dis.*, **33**, 1393-1399, <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0224-4>.
23. Teunissen, C. E., Killestein, J., Kragt, J. J., Polman, C. H., Dijkstra, C. D., and Blom, H. J. (2008) Serum homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **79**, 1349-1353, <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.151555>.
24. Mititelu, R. R., Albu, C. V., Bacanoiu, M. V., Padureanu, V., Padureanu, R., et al. (2021) Homocysteine as a predictor tool in multiple sclerosis, *Discoveries (Craiova)*, **9**, e135, <https://doi.org/10.15190/d.2021.14>.
25. Pietrzik, K., and Brönstrup, A. (1998) Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population, *Eur. J. Pediatr.*, **157**, S135-S138, <https://doi.org/10.1007/pl00014298>.
26. Jakubowski, H. (2019) Homocysteine modification in protein structure/function and human disease, *Physiol. Rev.*, **99**, 555-604, <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2018>.

27. Цыбиков Н. Н., Цыбикова Н. М. (2007) Роль гомоцистеина в патологии человека, *Успехи современной биологии*, **127**, 471-481.
28. Smith, A. D., and Refsum, H. (2021) Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention, *J. Intern. Med.*, **290**, 826-854, <https://doi.org/10.1111/joim.13279>.
29. Tsai, M. Y., Bignell, M., Yang, F., Welge, B. G., Graham, K. J., and Hanson, N. Q. (2000) Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels, *Atherosclerosis*, **149**, 131-137, [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00297-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00297-x).
30. Raghubeer, S., and Matsha, T. E. (2021) Methylene tetrahydrofolate (MTHFR), the one-carbon cycle, and cardiovascular risks, *Nutrients*, **13**, 4562, <https://doi.org/10.3390/nu13124562>.
31. Li, W. X., Dai, S. X., Zheng, J. J., Liu, J. Q., and Huang, J. F. (2015) Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency, *Nutrients*, **7**, 6670-6687, <https://doi.org/10.3390/nu7085303>.
32. Ruet, A. (2018) Update on pediatric-onset multiple sclerosis, *Rev. Neurol. (Paris)*, **174**, 398-407, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.04.003>.
33. Хабиров Ф. А., Хайбуллин Т. И., Гранатов Е. В., Аверьянова Л. А., Бабичева Н. Н., и др. (2022) Дифференциальная диагностика рассеянного склероза у пациентов детского возраста, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **122**, 60-67, <https://doi.org/10.17116/jnevro202212207260>.
34. Pfeifenbring, S., Bunyan, R. F., Metz, I., Röver, C., Huppke, P., et al. (2015) Extensive acute axonal damage in pediatric multiple sclerosis lesions, *Ann. Neurol.*, **77**, 655-667, <https://doi.org/10.1002/ana.24364>.
35. Alroughani, R., and Boyko, A. (2018) Pediatric multiple sclerosis: a review, *BMC Neurol.*, **18**, 27, <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1026-3>.
36. Ghezzi, A., Goretti, B., Portaccio, E., Roscio, M., and Amato, M. P. (2010) Cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis, *Neurol. Sci.*, **31 (Suppl 2)**, S215-S218, <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0437-8>.
37. Weisbrot, D., Charvet, L., Serafin, D., Milazzo, M., Preston, T., et al. (2014) Psychiatric diagnoses and cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, **20**, 588-593, <https://doi.org/10.1177/1352458513504249>.
38. Portaccio, E., De Meo, E., Bellinva, A., and Amato, M. P. (2021) Cognitive issues in pediatric multiple sclerosis, *Brain Sci.*, **11**, 442, <https://doi.org/10.3390/brainsci11040442>.
39. Жлоба А. А., Субботина Т. Ф. (2019) Оценка фолатного статуса с использованием общего гомоцистеина у пациентов с гипертонической болезнью, *Российский медицинский журнал*, **25**, 158-165, <https://doi.org/10.18821/0869-2106-2019-25-3-158-165>.
40. Bates, C. J., Mansoor, M. A., Gregory, J., Pentiev, K., and Prentice, A. (2002) Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over, *Br. J. Nutr.*, **87**, 71-79, <https://doi.org/10.1079/BJN2001479>.
41. Полушин А. Ю., Одинак М. М., Янишевский С. Н., Голохвастов С. Ю., Цыган Н. В. (2013) Гипергомоцистеинемия – предиктор тяжести инсульта на фоне обширности повреждения мозгового вещества, *Вестник Российской Военно-Медицинской Академии*, **4**, 89-94.
42. Ho, P. I., Ortiz, D., Rogers, E., and Shea, T. B. (2002) Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage, *J. Neurosci. Res.*, **70**, 694-702, <https://doi.org/10.1002/jnr.10416>.
43. Beard, R. S., Jr., Reynolds, J. J., and Bearden, S. E. (2011) Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions, *Blood*, **118**, 2007-2014, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338269>.
44. Tawfik, A., Elsherbiny, N. M., Zaidi, Y., and Rajpurohit, P. (2021) Homocysteine and age-related central nervous system diseases: role of inflammation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6259, <https://doi.org/10.3390/ijms22126259>.
45. Dubchenko, E., Ivanov, A., Spirina, N., Smirnova, N., Melnikov, M., et al. (2020) Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in multiple sclerosis, *Brain Sci.*, **10**, 637, <https://doi.org/10.3390/brainsci10090637>.
46. Спирина Н. Н., Спирин Н. Н., Киселева Е. В., Дубченко Е. А., Бойко А. Н. (2021) Гомоцистеин и маркеры эндотелиальной дисфункции при рассеянном склерозе, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **121**, 90-93, <https://doi.org/10.17116/jnevro202112107290>.
47. Perla-Kaján, J., and Jakubowski, H. (2019) Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3140, <https://doi.org/10.3390/ijms20133140>.
48. Coppedè, F., Stoccoro, A., Tannorella, P., and Migliore, L. (2019) Plasma homocysteine and polymorphisms of genes involved in folate metabolism correlate with DNMT1 gene methylation levels, *Metabolites*, **9**, 298, <https://doi.org/10.3390/metabo9120298>.

ASSOCIATION OF INCREASED HOMOCYSTEINE LEVEL WITH IMPAIRED FOLATE METABOLISM AND VITAMINS B DEFICIENCY IN EARLY ONSET OF MULTIPLE SCLEROSIS

V. I. Lioudyno^{1*}, E. A. Tsymbalova¹, E. A. Chernyavskaya¹, E. Y. Scripchenko²,
G. N. Bisaga³, A. V. Dmitriev¹, and I. N. Abdurasulova¹

¹*Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental medicine",
197022 Saint Petersburg, Russia; e-mail: vlioudyno@mail.ru*

²*Federal State Budgetary Institution "Pediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases" FMBA,
197022 Saint Petersburg, Russia*

³*Almazov National Medical Research Center, 197341 Saint Petersburg, Russia*

The study analyzed the homocysteine, cyanocobalamin (vitamin B12), folic acid (vitamin B9) and pyridoxine (vitamin B6) levels in the blood of children with confirmed demyelinating lesions of the central nervous system. The genotypes of the main polymorphisms of the folate cycle genes such as C677T and A1298C of the *MTHFR* gene, A2756G of the *MTR* gene and A66G of the *MTRR* gene were determined. A comparison of the studied parameters was carried out for five groups: a control group – healthy children under 18 years old, children at the onset of MS (with disease duration of no more than six months), healthy adults without neurological pathology, adult patients with MS at the onset stage of the disease and patients with long-term MS. A significant increase in homocysteine amount was revealed in children at the onset of MS compared to healthy children of the corresponding age. A high predictive value of determining homocysteine levels in children has been established. It has been demonstrated that an increased above safe values level of homocysteine is not accompanied by the presence of a vitamin deficiency state, assessed by the amount of folic acid, vitamins B6 and B12 in the blood. The lack of correlation between laboratory signs of vitamin deficiency and homocysteine levels may be due to the carriage of polymorphic variants of folate cycle genes, and an increased homocysteine level should be considered as a marker of functional disorders of folate metabolism that accompany the onset of the pathological process in MS in children. The identified patterns can be used in the development of treating strategies and preventing of the demyelination process in children with multiple sclerosis.

Keywords: multiple sclerosis, homocysteine, folate metabolism

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДЪЮВАНТА НА ОСНОВЕ ФЛАГЕЛЛИНА

© 2024 О.О. Сокол¹, Н.А. Никитин^{2*}, Е.А. Евтушенко², О.В. Карпова²,
И.Н. Матвеева^{1,3}, С.А. Гринь¹, В.М. Попова¹, И.В. Иванов¹, Ю.Н. Федоров¹,
И.Ю. Литенкова³

¹ Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт биологической промышленности,
141142 пос. Биокомбината, городской округ Лосино-Петровский, Московская область, Россия
² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: nikitin@mail.bio.msu.ru
³ Щелковский биокомбинат,
141142 пос. Биокомбината, городской округ Лосино-Петровский, Московская область, Россия

Поступила в редакцию 06.10.2023

После доработки 19.01.2024

Принята к публикации 01.03.2024

Бешенство является зоонозным заболеванием с высокой степенью летальности. Большинство случаев смерти людей связаны с укусами, полученными от собак и кошек. Вакцинация является наиболее эффективным методом профилактики заболевания бешенством как у животных, так и у людей. В этом исследовании оценивалась способность адъюванта на основе рекомбинантного флагеллина *Salmonella typhimurium* повышать протективную активность инактивированной вакцины против бешенства у мышей. Для этого использовали серию инактивированной сухой культуральной вакцины для собак и кошек «Рабикан» (штамм «Щелково-51») с добавлением адъюванта в различных разведениях. Контрольным препаратом служила аналогичная серия инактивированной сухой культуральной вакцины без адъюванта. Протективную активность вакцинных препаратов оценивали методом НИН (НИН potency test), который является наиболее широко используемым и рекомендованным на международном уровне методом определения эффективности для тестирования инактивированных вакцин против бешенства. Значение специфической активности испытуемой антирабической вакцины при совместном введении с адъювантом было значительно выше (48,69 МЕ/мл), чем у вакцины без адъюванта (3,75 МЕ/мл). Таким образом, рекомбинантный флагеллин можно рассматривать в качестве эффективного адъюванта в составе будущих вакцинных препаратов против вируса бешенства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бешенство, инактивированная вакцина, адъювант, флагеллин, специфическая активность, метод НИН.

DOI: 10.31857/S0320972524030103 EDN: WJUFNH

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – чрезвычайно опасное вирусное заболевание млекопитающих и человека, характеризующееся поражением центральной нервной системы с неизбежным смертельным исходом. Для борьбы с этим заболеванием используются антирабические вакцины, которые при введении животным должны обеспечить формирование напряженного и длительного иммунитета [1]. Одним из наиболее важных показателей эффек-

тивности любого вакцинного препарата является специфическая активность, которая оценивается на целевых животных. Учитывая особенности инфекции и сложности с учетом результатов контроля, для определения протективной активности антирабических вакцин *in vivo* на мышах используется классический метод, предложенный Национальным институтом здравоохранения США (National Institutes of Health test, NIH), рекомендуемый международными регулирующими органами OIE (Всемирная организация по охране здоровья животных) и Европейской фармакопеей [2–3], в том числе отечественными стандартами

* Адресат для корреспонденции.

(ФС.3.3.1.0025.15; ГОСТ Р 55283-2012). Данный тест был разработан в США в 1953 г. и применяется в неизменном виде по настоящее время практически всеми производственными и контрольными лабораториями во всех странах [4].

Совершенствование существующих инактивированных вакцин и разработка современных субъединичных и ДНК-вакцин потребовали исследований, направленных на поиск и конструирование принципиально новых безопасных и эффективных адъювантов, способных повышать поствакцинальный иммунный ответ на вирусные патогены [5–12]. Также необходимы исследования действия различных адъювантов с целью совершенствования имеющихся в настоящее время вакцин в направлении снижения затрат и/или повышения их эффективности, оптимизации дозы вакцины при одновременном повышении иммуногенности и уменьшения количества прививок [13].

Предполагается, что основные причины недостаточной эффективности инактивированных вакцин против бешенства заключаются в их ограниченной способности вызывать формирование длительного и напряженного клеточного иммунитета, стойкой иммунологической памяти, что требует необходимости в повторной вакцинации инфицированных животных [14]. В связи с этим разработка подходов к повышению эффективности вакцин против бешенства является актуальной, и одним из способов решения такой задачи может быть использование различных адъювантов. Некоторые активно исследуемые адъюванты могут индуцировать ответ системы врожденного иммунитета путем регуляции экспрессии антигенов гистосовместимости (МНС), активировать антигенпрезентирующие клетки (АПК) с помощью рецепторов распознавания молекулярных паттернов возбудителей (PRR), что приводит к развитию локального воспаления и последующему эффективному запуску адаптивных иммунных реакций [15]. Одним из таких адъювантов, широко используемым в современных исследованиях, является флагеллин, способный индуцировать усиленный антигенспецифический иммунный ответ [16–18]. Целью настоящего исследования являлось изучение протективных свойств рекомбинантного флагеллина RecFlic-FM из *Salmonella typhimurium* как адъюванта в составе инактивированной вакцины против бешенства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы и вакцины. Референтный штамм вируса бешенства «CVS» (Challenge Virus Standard) был предоставлен референтным центром по

бешенству OIE Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife ANSES (Франция).

В работе использовали антирабическую инактивированную сухую культуральную вакцину для собак и кошек «Рабикан» (из штамма «Щелково-51») производства ФКП «Щелковский биокомбинат» (серия 1020, 12.01.2021 г.) и национальную стандартную (референс-) вакцину, имеющую специфическую активность, равную 5,2 МЕ/мл: отраслевой стандартный образец антирабической вакцины (СТО-00494189-0042-2010 ФКП «Щелковский биокомбинат»). Референс-вакцина откалибрована по международному стандарту, и оценка ее эффективности (МЕ/мл) проведена с использованием теста NIH [2], в сравнении с партией международного биологического эталонного препарата (BRP) №5 [19], предоставленной Европейским директором по качеству лекарств, как описано в монографии Европейской фармакопеи [20].

Антирабическая инактивированная сухая культуральная вакцина для собак и кошек из штамма «Щелково-51» представляет собой инактивированный β -пропиолактоном вирус бешенства штамма «Щелково-51», лиофилизированный в защитной среде с добавлением 33,3% сахароза-пептон-желатинового стабилизатора. Специфическая активность – 3,7 МЕ/мл.

Адъювант. Рекомбинантный флагеллин из *S. typhimurium* (RecFlic-FM) любезно предоставлен ООО «Фирн М» (пос. Оболенское, Россия). Это рекомбинантный белок флагеллина, кодируемый геном *fliC* из грамотрицательных бактерий *S. typhimurium*. Рекомбинантный флагеллин наработан в клетках *Escherichia coli* и очищен с применением аффинной хроматографии, как описано ранее [21] (производственная серия №5 от 15.02.2021 г. («Фирн М», Россия)).

Для получения вакцинного кандидата к 20 мкг адъюванта «RecFlic-FM» добавляли простым смешиванием 1 мл инактивированной культуральной вакцины против бешенства штамма «Щелково-51» для собак и кошек.

Электронная микроскопия. Образцы для электронной микроскопии были приготовлены согласно стандартной процедуре [22] с помощью 2%-ного водного раствора уранилацетата в качестве контрастирующего агента. Микрофотографии были получены с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1400 («JEOL», Япония) с ускоряющим напряжением 80 кВ. Анализ размеров частиц проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Животные. В экспериментах использовали самцов мышей Balb/c массой 13–15 г, возрастом не менее 3 недель (всего в экспериментах участвовало 280 животных). Мышей обеспечивали кормом и водой неограниченно и содержали группами

по 8 животных. За всеми животными проводили ежедневное наблюдение на протяжении всего периода эксперимента.

Все эксперименты *in vivo* проводили в соответствии с регламентом 2010/63/CE Европейского парламента и Совета ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, руководством по уходу и использованию лабораторных животных и в соответствии с Этическим кодексом российского ветеринара, рекомендованным на XIII Московском международном ветеринарном конгрессе Российской ассоциации ветеринаров мелких животных в апреле 2005 г. (Москва, Россия) [3]. Все эксперименты были одобрены комитетом по этике ФГБНУ ВНИТИБП, № 10-01 от 13.11.2021 г.

Оценка заражающей дозы вируса бешенства. Оценку титра стандарта вируса осуществляли после внутримозгового заражения 4-х групп мышей (по 10 животных в каждой группе): по 0,03 мл штамма вируса бешенства «CVS» (рабочее разведение) – мышам первой группы, а далее 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000. Титр вируса рассчитывали по методу Reed и Muench [23] и выражали в lg ЛД₅₀/мл.

Метод НИИ. Эталонную вакцину (Национальная антирабическая референс-вакцина, СТО-00494189-0042-2010, специфическая активность – 5,2 МЕ/мл), вакцину «Рабикан» и вакцинные кандидаты, содержащие адъювант, последовательно разбавляли PBS до 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125, 1 : 625, 1 : 3125, согласно стандартному протоколу [24]. Все препараты вводили внутрибрюшинно 16 мышам дважды с интервалом в 7 дней. Через 7 дней после последней иммунизации мышам вводили вирус бешенства «CVS» 5–50 ЛД₅₀ в дозе 0,03 мл и вели наблюдение в течение 14 дней. Учитывали случаи смерти мышей через 5 и 14 дней после заражения.

Случаи гибели мышей от бешенства в течение экспериментального периода регистрировали как специфические обнаружением в мазках-отпечатках головного мозга яркого зеленого свечения в реакции иммунофлуоресценции.

Расчет 50%-ной эффективной дозы (ЭД₅₀, 50%-ное конечное разведение) вакцины проводили по методу Спирмена–Кербера в модификации Ашмарина–Воробьева [25]. Для расчета специфической активности использовали следующую формулу:

$$\text{Специфическая активность} = A/B \times Y,$$

где А – обратная величины 50%-ного конечного разведения испытуемой вакцины; В – обратная величина 50%-ного конечного разведения референс-вакцины; Y – специфическая активность национальной референс-вакцины (5,2 МЕ/мл).

Реакция иммунофлуоресценции. Обнаружение антигенов бешенства в головном мозге

мышей проводили путем постановки реакции прямой иммунофлуоресценции, как описано ранее [26, 27]. Кратко, по 5 мазков для каждой погибшей мыши готовили из объединенного образца ткани головного мозга животных. Оттиски сушили при комнатной температуре и фиксировали в холодном ацетоне при –20 °С в течение 30 мин. Затем предметные стекла сушили на воздухе, и каждый оттиск окрашивали, добавляя 50 мкл поликлональных антител к нуклеокапсиду вируса бешенства, конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (#357-2112; «Biorad», Франция), в течение 30 мин при 37 °С в камере с высокой влажностью. Предметные стекла изучали при увеличении 200× с помощью флуоресцентного микроскопа «Olympus IX51» («Olympus», Япония), оборудованного цифровой цветной камерой CMOS 5 Мпикс и адаптером 0,35 C-mount («TourTek», Китай).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки возможности повышения протективной активности коммерческой инактивированной вакцины против вируса бешенства использовали рекомбинантный флагеллин из *S. typhimurium* RecFlic-FM. Результаты оценки подлинности и чистоты препарата с помощью электрофореза в 13%-ном ДСН-ПААГ представлены на рис. 1.

Анализ рекомбинантного флагеллина RecFlic-FM методом электрофореза подтвердил подлинность (51 кДа) и чистоту используемого в исследованиях адъюванта. Микроскопический анализ препарата флагеллина продемонстрировал наличие протяженных нитей диаметром около 18 нм.

Для оценки титра штамма вируса бешенства «CVS», используемого в дальнейших экспериментах по заражению животных, согласно протоколу НИИ, вирус титровали на мышах за день до начала эксперимента по оценке протективной активности кандидатной вакцины [28] (рис. 2). Почти все мыши в группах, где применили для заражения вирус в рабочем разведении и 1 : 10, погибли. Установлено, что титр вируса бешенства «CVS» составил 40 ЛД₅₀/0,03 мл и обеспечивал гибель мышей от бешенства (табл. 1), что достаточно для определения протективности вакцинного препарата [2].

Согласно протоколу НИИ, мыши, павшие в срок до 5 дней после контрольного заражения, регистрируются как неспецифические последствия (не в результате инфекции вирусом бешенства), о чем свидетельствовало отсутствие яркого зеленого свечения в мазках-отпечатках головного мозга мышей в реакции иммунофлуоресценции (рис. П1 в Приложении). Такие мыши исключаются

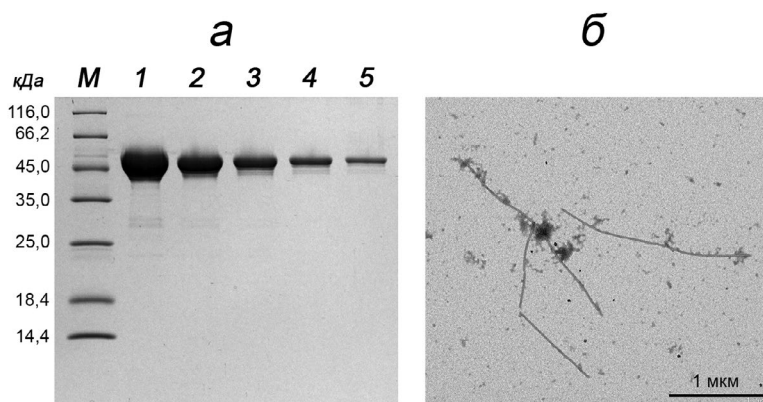


Рис. 1. Анализ препарата рекомбинантного флагеллина RecFlic-FM. *а* – Электрофоретический анализ в 13%-ном ДСН-ПААГ, окрашивание в Кумасси G-250; дорожки: *М* – маркеры молекулярной массы белков, кДа («Thermo Fisher Scientific», США), 1–5 – RecFlic-FM в концентрации 1, 0,5, 0,25, 0,1 и 0,05 мг/мл соответственно. *б* – Просвечивающая электронная микроскопия, контрастирование 2%-ным водным раствором уранилацетата; размер метки – 1 мкм

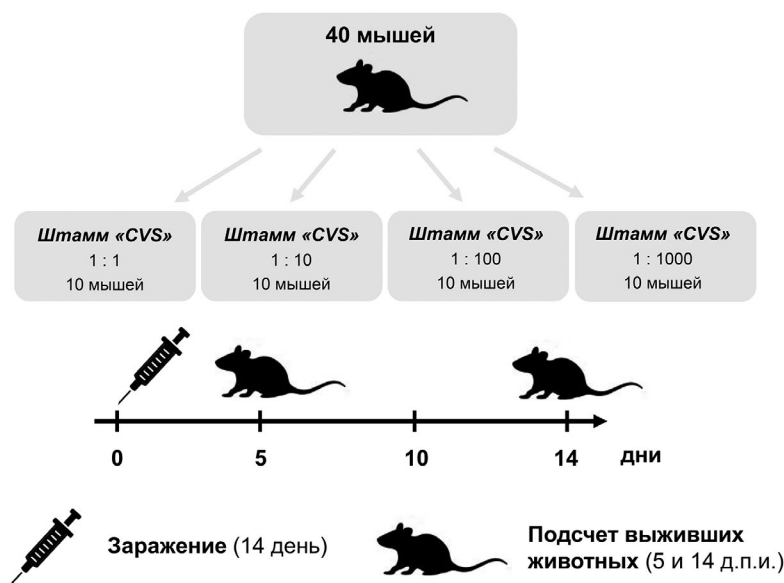


Рис. 2. Схематическое изображение эксперимента по оценке титра ЛД₅₀ вируса бешенства штамма «CVS»

Таблица 1. Определение титра вируса бешенства штамма «CVS»

Количество мышей	Разведение	Доза вируса (мл), интрацеребрально	Количество погибших мышей		lg титра ЛД ₅₀ /0,03 мл
			на 5 д.п.и.	на 14 д.п.и.	
10	1 : 1	0,03	1	8	1,6
10	1 : 10		0	9	
10	1 : 100		0	2	
10	1 : 1000		1	1	

Примечание. д.п.и. – день после инфекции.

при оценке эффективности вакцинных композиций (ЭД₅₀ и специфической активности (МЕ/мл)).

Для получения вакцинных кандидатов использовали серию инактивированной культу-

ральной вакцины против бешенства штамма «Щелково-51» с добавлением нового адъюванта «RecFlic-FM» – 20 мкг на дозу вакцины. Контрольным препаратом служила коммерческая инакти-

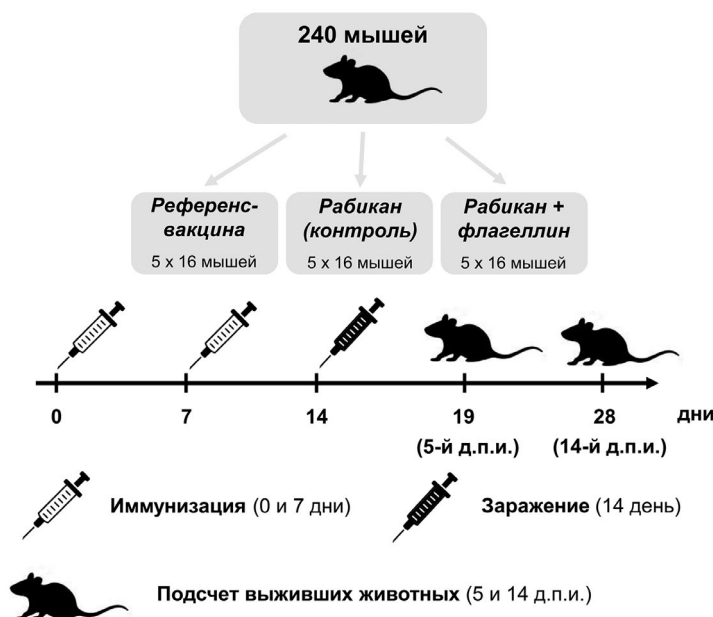


Рис. 3. Схематическое изображение эксперимента по оценке протективной активности инактивированной вакцины против вируса бешенства, содержащей флагеллин в качестве адъюванта; д.п.и. – день после инфекции

вированная сухая культуральная вакцина для собак и кошек «Рабикан» (штамм «Щелково-51») без адъюванта (рис. 3).

Используя данные анализа протективной активности вакцинного кандидата, была построена диаграмма, демонстрирующая соотношение процента выживших иммунизированных животных после заражения вирусом бешенства «CVS» в зависимости от разведения вакцинных препаратов (рис. П1 в Приложении). Как видно из рис. П1, начиная с разведения 1 : 625, выживаемость в группе, иммунизированной инактивированной антирабической вакциной «Рабикан», сопоставима с выживаемостью в группе, иммунизированной Национальной референс-вакциной. В то же время вакцинный кандидат, состоящий из инактивированной вакцины в смеси с адъювантом RecFlic-FM, уже начиная с разведения 1 : 25, демонстрирует более высокий процент выживших животных на 14 день после заражения.

ЭД₅₀ для референс-вакцины и вакцины «Рабикан» было определено путем экстраполяции по методу Спирмена–Кербера в модификации Ашмарина–Воробьева [25]. В случае группы «Рабикан» + RecFlic-FM (20 мкг/доза) в применении методов экстраполяции не было необходимости, так как 50% животных умерло при разведении 1 : 3125; соответственно, это разведение и является ЭД₅₀ для данного вакцинного кандидата (табл. 2; рис. П1 в Приложении).

Анализ специфической активности методом НИН показал, что флагеллин повышает протективные свойства российской антирабической вакцины «Рабикан», состоящей из инактивированных

вирионов бешенства. Показано, что добавление флагеллина к препарату «Рабикан» приводит к возрастанию специфической активности в 13 раз.

Для подтверждения причины гибели мышей от бешенства, начиная с пятого дня после инфекции, применяли тест с использованием специфических диагностических иммуноглобулинов IgG, конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (реакция прямой иммунофлуоресценции). Для этого изучали патологический материал мозга, собранный от мышей, зараженных суспензией вируса бешенства штамма «CVS» (n = 100), и от иммунизированных мышей всех экспериментальных групп, павших после контрольного заражения (n = 275) (рис. СП2–П5 в Приложении). На основании полученных данных было подтверждено, что все смерти были результатом инфекции вирусом бешенства.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Успех борьбы с бешенством в эндемичных регионах возможен при условии наличия эффективной вакцины и своевременной диагностики. Оценка эффективности антирабических препаратов является предметом многолетних исследований, выбор единого метода для контроля разных типов антирабических вакцин остается актуальной проблемой. Более полувека решающая роль в оценке протективности и безопасности вакцин была отведена методам *in vivo*, которые наиболее прямым и надежным способом демонстрировали способность тестовых вакцин защищать животных [29].

Таблица 2. Анализ протективной активности вакцинных препаратов против вируса бешенства методом НИН

Вакцина/адъювант	Объем пробы (мл)	Разведение вакцины	Количество мышей			ЭД ₅₀	Специфическая активность (МЕ/мл)
			Всего	Выжили на 5 д.п.и.	Выжили на 14 д.п.и.		
Национальная референс-вакцина	0,5	1 : 5	16	15	15	1 : 334	5,2
		1 : 25	16	14	12		
		1 : 125	16	15	8		
		1 : 625	16	14	6		
		1 : 3125	16	14	4		
Вакцина «Рабикан» (контроль)	0,5	1 : 5	16	15	12	1 : 241	3,75
		1 : 25	16	15	10		
		1 : 125	16	16	12		
		1 : 625	16	15	6		
		1 : 3125	16	14	4		
«Рабикан» + RecFlis-FM (20 мкг/доза)	0,5	1 : 5	16	14	14	1 : 3125	48,69
		1 : 25	16	16	16		
		1 : 125	16	13	11		
		1 : 625	16	14	9		
		1 : 3125	16	14	7		

Примечание. д.п.и. – день после инфекции.

Однако тестирование каждой производственной партии вакцины против бешенства на предполагаемых целевых видах требует значительных затрат и методических решений.

Разработанный в 1953 г. тест Национального института здоровья (НИН) был рекомендован на международном уровне и широко применялся для серийного тестирования инактивированных антирабических вакцин во всем мире. Учитывая смертельную опасность бешенства для человека, ВОЗ и Европейская фармакопея по-прежнему требуют проведения теста НИН для оценки эффективности инактивированных вакцин, несмотря на некоторые недостатки: применение инфекционного вируса бешенства для заражения; требование технических навыков и строгих мер биобезопасности, а также продолжительность испытания [20].

До настоящего времени ведется интенсивный поиск безопасного, эффективного адъюванта для вакцин против бешенства. Гидроксид алюминия, как часто применяемый адъювант, усиливает гуморальный ответ к вакцине против бешенства, но задерживает раннюю выработку антител, что неблагоприятно для профилактики бешенства [30]. Также выявленные эффекты по снижению стабильности антигенов и высокой реактогенности

приводят к отказам от использования соединений на основе алюминия в качестве компонентов вакцин [31–33]. Однако, например, в Китае с 2005 г. уже введен запрет на использование гидроксида алюминия в качестве адъюванта для вакцины против бешенства у людей [34]. В составе инактивированной антирабической вакцины КОКАВ («Микроген», Россия) продемонстрирован иммуноадъювантный эффект таких рекомбинантных цитокинов, как интерлейкин-1 β и фактор некроза опухоли- α . При этом развитие иммунного ответа сопровождалось формированием высокого уровня вируснейтрализующих антител [35]. В другом исследовании было показано, что адъювант РІКА в составе антирабической вакцины действовал через Толл-подобный рецептор 3 (TLR-3) и другие клеточные пути, усиливая презентацию антигена антигенпрезентирующими клетками и индуцируя выработку провоспалительных цитокинов [36]. В качестве адъюванта для инактивированной вакцины против бешенства были также использованы структурно модифицированные вирусы растений, эффективность которых была также исследована методом НИН и была сопоставима с неполным адъювантом Фрейнда [37].

Флагеллин обладает потенциалом для применения в качестве вакцинного адъюванта [38].

Флагеллин распознается поверхностно локализованными Toll-подобными рецепторами пятого типа (TLR-5), экспрессируемыми на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, лимфоцитах, НК-клетках, эпителиальных клетках и стромальных клетках лимфатических узлов. Активация этих типов клеток флагеллином или вакцинами на основе флагеллина приводит к индукции цитокинов и хемокинов, которые способствуют активному привлечению Т- и В-лимфоцитов в дренирующие клетки лимфатических узлов и, таким образом, увеличивает шансы антигенспецифичных лимфоцитов столкнуться с антигенами [39]. В ряде исследований показано, что флагеллин может действовать как эффективный адъювант в вакцинах против гриппа и вируса лихорадки Западного Нила [40–42]. Предпринимались попытки оценить адъювантные свойства флагеллина при применении в составе вакцины против бешенства, однако анализ эффективности такой комбинации методом НИН не проводился. Тем не менее авторы отметили перспективность использования флагеллина при разработке эффективных вакцин против бешенства [43]. В частности, были изучены иммуноадъювантные свойства трех рекомбинантных белков на основе флагеллина из *S. typhimurium* (FljB, FliC и FljB'-FliC) в композиции с инактивированной цельновирионной вакциной против бешенства (WKRВ). В экспериментах на мышах линии BALB/c адъювант FljB вызывал более сильные гуморальные и клеточные иммунные реакции по сравнению с WKRВ в отдельности или в композиции с FliC или FljB'-FliC [43].

В данной работе мы оценивали способность рекомбинантного флагеллина в составе инактивированной вакцины стимулировать иммунный ответ *in vivo*. Оценивая полученные результаты, можно сделать заключение о том, что инактивированная вакцина, содержащая рекомбинантный флагеллин, может быть использована в качестве эффективного препарата для вакцинации против вируса бешенства животных, поскольку обладает

более высокой протективной активностью в сравнении с используемыми вакцинами. Такая вакцина может быть дополнительно разведена или может быть использована в меньшей дозе для достижения минимальной эффективности, необходимой для вакцинации животных (до 2 МЕ/мл), что позволит проводить вакцинацию с меньшими затратами.

Полученные результаты подтверждают возможность получения эффективной инактивированной вакцины против бешенства при применении адъюванта на основе рекомбинантного флагеллина, а также показывают перспективность последнего по использованию в составе вакцин, направленных против других патогенов.

Вклад авторов. И.Н. Матвеева, И.Ю. Литенкова – концепция и руководство работой; О.О. Сокол, Н.А. Никитин, И.Н. Матвеева, С.А. Гринь, В.М. Попова, И.В. Иванов, Ю.Н. Федоров, И.Ю. Литенкова – проведение экспериментов; О.О. Сокол, Н.А. Никитин, О.В. Карпова, И.Н. Матвеева, С.А. Гринь, В.М. Попова, И.В. Иванов, Ю.Н. Федоров, И.Ю. Литенкова – обсуждение результатов исследования; О.О. Сокол, Н.А. Никитин, Е.А. Евтушенко, И.Н. Матвеева – написание текста; Н.А. Никитин, Е.А. Евтушенко, О.В. Карпова, И.Н. Матвеева – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (грант № 075–15–2021-1054).

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Natesan, K., Isloor, S., Vinayagamurthy, B., Ramakrishnaiah, S., Doddamane, R., and Fooks, A. R. (2023) Developments in rabies vaccines: the path traversed from Pasteur to the modern era of immunization, *Vaccines*, **11**, 756, <https://doi.org/10.3390/vaccines11040756>.
2. Wilbur, L. A., and Aubert, M. F. A. (1996) The NIH test for potency, in *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th Edn (Meslin F. X., Kaplan M. M., and Koprowski, H., ed) Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 360-368.
3. Matveeva, I., Karpova, O., Nikitin, N., Akilin, O., Yelnikov, V., Litenkova, I., Melnik, R., Melnik, N., Asimov, K., Zaberezhny, A., Fyodorov, Y., and Markova, E. (2022) Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against reindeer rabies, *Front. Microbiol.*, **13**, 988738, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.988738>.
4. Nedosekov, V., Polupan, I., and Slivko, I. (2019) Veterinary Vaccine Potency Testing: Improvement of the NIH Method, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **16**, 002850, <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.16.002850>.

5. Kim, J. Y., Rosenberger, M. G., Rutledge, N. S., and Esser-Kahn, A. P. (2023) Next-generation adjuvants: applying engineering methods to create and evaluate novel immunological responses, *Pharmaceutics*, **15**, 1687, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061687>.
6. Sun, H. X., Xie, Y., and Ye, Y. P. (2009) Advances in saponin-based adjuvants, *Vaccine*, **27**, 1787-1796, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>.
7. Leroux-Roels, G. (2010) Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response, *Vaccine*, **28**, 25-36, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>.
8. Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., and Sun, B. (2019) Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvant activity, *Vaccine*, **37**, 3167-3178, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>.
9. Gupta, T., and Gupta, S. K. (2020) Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses, *Int. Immunopharmacol.*, **86**, 106717, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106717>.
10. Halperin, S. A., Van Nest, G., Smith, B., Abtahi, S., Whiley, H., and Eiden, J. J. (2003) A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant, *Vaccine*, **21**, 2461-2467, [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00045-8).
11. Soldi, C., Pizzolatti, M. G., Luiz, A. P., Marcon, R., Meotti, F. C., Mioto, L. A., and Santos, A. R. (2008) Synthetic derivatives of the alpha- and beta-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3377-3386, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.12.008>.
12. Wilson-Welder, J. H., Torres, M. P., Kipper, M. J., Mallapragada, S. K., Wannemuehler, M. J., and Narasimhan, B. (2009) Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1278-1316, <https://doi.org/10.1002/jps.21523>.
13. Montaner, A., Nichilo, A., Rodriguez, J., Hernando-Insua, A., Fló, J., Lopez, R., Sierra, V., Paolazzi, C., Larghi, O., Horn, D., Zorzopulos, J., and Elias, F. (2012) IMT504: a new and potent adjuvant for rabies vaccines permitting significant dose sparing, *World J. Vaccines*, **2**, 182-188, <https://doi.org/10.4236/wjv.2012.24025>.
14. Hu, X., Liu, R., and Zhu, N. (2013) Enhancement of humoral and cellular immune responses by monophosphoryl lipid A (MPLA) as an adjuvant to the rabies vaccine in BALB/c mice, *Immunobiology*, **218**, 1524-1528, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.05.006>.
15. Coffman, R. L., Sher, A., and Seder, R. A. (2010) Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work, *Immunity*, **33**, 492-503, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>.
16. Stepanova, L. A., Mardanova, E. S., Shuklina, M. A., Blokhina, E. A., Kotlyarov, R. Y., Potapchuk, M. V., Kovaleva, A. A., Vityaeva, I. G., Korotkov, A. V., Eletskaia, E. I., Ravin, N. V., and Tsybalova, L. M. (2018) Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses subtypes, *J. Biomed. Sci.*, **25**, 33, <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0433-5>.
17. Софронов Г. А., Мурзина Е. В., Болехан В. Н., Веселова О. М., Симбирцев А. С. (2017) Перспективные направления использования препаратов на основе рекомбинантного флагеллина, *Мед. Акад. Журн.*, **17**, 7-20, <https://doi.org/10.17816/MAJ1727-20>.
18. Cui, B., Liu, X., Fang, Y., Zhou, P., Zhang, Y., and Wang, Y. (2018) Flagellin as a vaccine adjuvant, *Expert Rev. Vaccines*, **17**, 335-349, <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1457443>.
19. Daas, A., Bruckner, L., and Milne, C. (2015) EDQM biological reference preparation for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use, *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*, **2015**, 57-72.
20. Schiffelers, M. J., Blaauboer, B. J., Bakker, W. E., and Hendriksen, C. F. (2015) Regulatory acceptance and use of serology for inactivated veterinary rabies vaccines, *ALTEX*, **32**, 211-221, <https://doi.org/10.14573/altex.1501261>.
21. Гребенюк А. Н., Аксенова Н. В., Петров А. В., Аль-Шехадат Р. И., Климов Н. А., Симбирцев А. С. (2013) Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности, *Вестник Российской Воен. Мед. Акад.*, **3**, 75-80.
22. Nikitin, N., Trifonova, E., Evtushenko, E., Kirpichnikov, M., Atabekov, J., and Karpova, O. (2015) Comparative study of non-enveloped Icosahedral viruses size, *PLoS One*, **10**, e0142415, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142415>.
23. Reed, L. J., and Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent end points, *Am. J. Hyg.*, **27**, 493-497, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
24. Szaret, P. (1996) General consideration in testing the safety and potency of rabies vaccine, in *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th Edn (Meslin, F. X., Kaplan, M. M., and Koprowski, H., eds) Geneva, Switzerland, World Health Organisation, pp. 355-359.
25. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. (1962) *Статистические методы в микробиологических исследованиях*, Медгиз, Ленинград.

26. Rupprecht, C. E., Fooks, A. R., and Abela-Ridder, B. (2018) Laboratory techniques in rabies, *World Health Organization*, 5th Edn, Vol. 1, 108-123.
27. Servat, A., Picard-Meyer, E., Robardet, E., Muizniece, Z., Must, K., and Cliquet, F. (2012) Evaluation of a rapid immunochromatographic diagnostic test for the detection of rabies from brain material of European mammals, *Biologicals*, **40**, 61-66, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.12.011>.
28. Stokes, W., McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Gatewood, D., Levis, R., Halder, M., Pulle, G., Kojima, H., Casey, W., Gaydamaka, A., Miller, T., Brown, K., Lewis, C., Chapsal, J. M., Bruckner, L., Gairola, S., Kamphuis, E., Rupprecht, C. E., Wunderli, P., McElhinney, L., De Mattia, F., Gamoh, K., Hill, R., Reed, D., Doelling, V., Johnson, N., Allen, D., Rinckel, L., and Jones, B. (2012) Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward, *Biologicals*, **40**, 369-381, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.005>.
29. Akkermans, A., Chapsal, J. M., Coccia, E. M., Depraetere, H., Dierick, J. F., Duangkhae, P., Goel, S., Halder, M., Hendriksen, C., Levis, R., Pinyosukhee, K., Pullirsch, D., Sanyal, G., Shi, L., Sitrin, R., Smith, D., Stickings, P., Terao, E., Uhlrich, S., Viviani, L., and Webster, J. (2020) Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities, *Biologicals*, **68**, 92-107, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>.
30. Lin, H., and Perrin, P. (1999) Influence of aluminum adjuvant to experimental rabies vaccine, *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, **13**, 133-135.
31. Jones, L. S., Peek, L. J., Power, J., Markham, A., Yazzie, B., and Middaugh, C. R. (2005) Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13406-13414, <https://doi.org/10.1074/jbc.M500687200>.
32. Hogenesch, H. (2013) Mechanisms of immunopotentiality and safety of aluminium adjuvants, *Front. Immunol.*, **3**, 406, <https://doi.org/10.3389/fmmu.2012.00406>.
33. Lin, Y. J., Shih, Y. J., Chen, C. H., and Fang, C. T. (2018) Aluminum salts as an adjuvant for pre-pandemic influenza vaccines: a meta-analysis, *Sci. Rep.*, **8**, 11460, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29858-w>.
34. Yu, P., Yan, J., Wu, W., Tao, X., Lu, X., Liu, S., and Zhu, W. (2018) A CpG oligodeoxynucleotide enhances the immune response to rabies vaccination in mice, *Virology*, **15**, 174, <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1089-1>.
35. Авдеева Ж. И., Акользина С. Е., Алпатов Н. А., Мовсесянц А. А., Медуницын Н. В. (2007) Действие цитокинов на протективные свойства антирабической вакцины, *Цитокины Воспаление*, **6**, 46-50.
36. Zhang, Y., Zhang, S., Li, W., Hu, Y., Zhao, J., Liu, F., Lin, H., Liu, Y., Wang, L., Xu, S., Hu, R., Shao, H., and Li, L. (2016) A novel rabies vaccine based on toll-like receptor 3 (TLR3) agonist PIKA adjuvant exhibiting excellent safety and efficacy in animal studies, *Virology*, **489**, 165-172, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.029>.
37. Nikitin, N. A., Matveeva, I. N., Trifonova, E. A., Puhova, N. M., Samuilenko, A. Y., Gryn, S. A., Atabekov, J. G., and Karpova, O. V. (2018) Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine, *Data Brief*, **21**, 742-745, <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.030>.
38. Huleatt, J. W., Jacobs, A. R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E. B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V., and Powell, T. J. (2006) Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity, *Vaccine*, **25**, 763-775, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.08.013>.
39. Hajam, I. A., Dar, P. A., Shahnawaz, I., Jaume, J. C., and Lee, J. H. (2017) Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent, *Exp. Mol. Med.*, **49**, e373, <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>.
40. Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., and Rappuoli, R. (2010) New adjuvants for human vaccines, *Curr. Opin. Immunol.*, **22**, 411-416, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.004>.
41. Skountzou, I., Martin, M., Wang, B., Ye, L., Koutsonanos, D., Weldon, W., Jacob, J., and Compans, R. W. (2010) *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine, *Vaccine*, **28**, 4103-4112, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.058>.
42. McDonald, W. F., Huleatt, J. W., Foellmer, H. G., Hewitt, D., Tang, J., Desai, P., Price, A., Jacobs, A., Takahashi, V. N., Huang, Y., Nakaar, V., Alexopoulou, L., Fikrig, E., and Powell, T. J. (2007) A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity, *J. Infect. Dis.*, **195**, 1607-1617, <https://doi.org/10.1086/517613>.
43. Xiao, X. X., Zhang, Y., Liu, J. X., Wei, Q. L., and Yin, X. P. (2016) Immunoenhancement with flagellin as an adjuvant to whole-killed rabies vaccine in mice, *Arch. Virol.*, **161**, 685-691, <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2704-8>.

PROTECTIVE ACTIVITY OF INACTIVATED RABIES VACCINE USING FLAGELLIN-BASED ADJUVANT

O. O. Sokol¹, N. A. Nikitin^{2*}, E. A. Evtushenko², O. V. Karpova², I. N. Matveeva^{1,3},
S. A. Gryn¹, V. M. Popova¹, I. V. Ivanov¹, Y. N. Fedorov¹, and I. Y. Litenkova³

¹ *All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry,
141142 Biocombinat, Moscow Region, Russia*

² *Biology faculty, Lomonosov Moscow state University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru*

³ *Shchelkovo Biocombinat Federal State Enterprise, 141142 Biocombinat, Moscow Region, Russia*

Rabies is a zoonotic disease with a high degree of lethality. Most human deaths are related to bites received from dogs and cats. Vaccination is the most effective method of preventing rabies disease in both animals and humans. In this study, the ability of an adjuvant based on recombinant *Salmonella typhimurium* flagellin to increase the protective activity of an inactivated rabies vaccine in mice was evaluated. A series of inactivated dry culture vaccine for dogs and cats "Rabikan" (strain "Shchelkovo-51") with the addition of an adjuvant in various dilutions were used. The control preparation was a similar series of inactivated dry culture vaccine without an adjuvant. The protective activity of vaccine preparations was evaluated by the NIH potency test, which is the most widely used and internationally recommended method of determining the effectiveness for testing inactivated rabies vaccines. The value of the specific activity of the tested rabies vaccine when co-administered with an adjuvant was significantly higher (48.69 IU/ml) than that of the vaccine without an adjuvant (3.75 IU/ml). Thus, recombinant flagellin can be considered as an effective adjuvant in the composition of future vaccine preparations against rabies virus.

Keywords: rabies, inactivated vaccine, adjuvant, flagellin, specific activity, NIH-test