

Том 89, Номер 8

ISSN 0320-9725

Август 2024



БИОХИМИЯ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 8, 2024

Ультрабыстрая протеомика (мини-обзор)

И.И. Федоров, С.А. Протасов, И.А. Тарасова, М.В. Горшков 1307

Функциональный анализ генов канальных родопсинов зеленых водорослей
Беломорского бассейна

*О.В. Карпова, Е.Н. Виноградова, А.М. Мойсенович, О.Б. Пустовит, А.А. Рамонова,
Д.В. Абрамочкин, Е.С. Лобакова* 1322

IGF-Сигнальный путь в сердце в норме и при развитии патологических состояний (обзор)

Д.А. Адашева, Д.В. Серебряная 1334

Эпигенетический феномен парамутации у растений и животных (обзор)

Д.А. Куликова, А.В. Беспалова, Е.С. Зеленцова, М.Б. Евгенийев, С.Ю. Фуников 1364

Методы молекулярного моделирования в разработке аффинных и специфичных
белок-связывающих систем (обзор)

*Ш.Ш. Насеев, А.Р. Муканов, И.В. Мишкорез, И.И. Кузнецов, И.В. Лейбин, В.А. Долгушева,
Г.А. Павлюк, А.Л. Манасян, А.В. Веселовский* 1386

РНК-Редактирование аденозиндезаминазами ADAR в клеточных моделях болезней экспансии
CAG-повторов: значимый эффект дифференцировки из стволовых клеток в органоиды мозга
при отсутствии существенного влияния числа повторов на уровень редактирования

*В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров, А.В. Еремеев, Е.С. Ручко, В.А. Веселовский, К.М. Климина,
А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, С.А. Мошковский, А.А. Ключникова* 1412

NMDA-Рецепторы и показатели энергетического обмена в эритроцитах: недостающее звено
для оценки эффективности кислородтранспортной системы при гепатоэнцефалопатии

Г.А. Алилова, Л.А. Тихонова, Е.А. Косенко 1430

Сверхэкспрессия нейротрофического фактора мозга (BDNF) во фронтальной коре усиливает
социальный интерес у мышей линии BTBR – модели аутизма

*Я.П. Каминская, Т.В. Ильчибаева, А.И. Щербакова, Э.Р. Аллаярова, Н.К. Попова,
В.С. Науменко, А.С. Цыбко* 1451

Фермент СУР74В34 моркови (*Daucus carota*) с двойной активностью гидропероксидлиазы
и эпоксиалкогольсинтазы: выявление и биохимические свойства

Я.Ю. Топоркова, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Н.В. Ланцова, А.Н. Гречкин 1462

CONTENTS

Vol. 89, Issue 8, 2024

Ultrafast Proteomics (Mini-Review)

I. I. Fedorov, S. A. Protasov, I. A. Tarasova, and M. V. Gorshkov 1307

Functional Analysis of the Channel Rhodopsin Genes from the Green Algae of the White Sea Basin

*O. V. Karpova, E. N. Vinogradova, A. M. Moisenovich, O. B. Pustovit, A. A. Ramonova,
D. V. Abramochkin, and E. S. Lobakova* 1322

IGF-Signaling Pathway in the Heart Innormal and Pathological Conditions (Review)

D. A. Adasheva and D. V. Serebryanaya 1334

Epigenetic Phenomenon of Paramutation in Plants and Animals (Review)

D. A. Kulikova, A. V. Bespalova, E. S. Zelentsova, M. B. Evgen'ev, and S. Yu. Funikov 1364

Current Methods of Molecular Modeling in the Development of Affine and Specific Agents Binding Proteins (Review)

*Sh. S. Nasaev, A. R. Mukanov, I. V. Mishkorez, I. I. Kuznetsov, I. V. Leibin, V. A. Dolgusheva,
G. A. Pavlyuk, A. L. Manasyan, and A. V. Veselovsky* 1386

RNA Editing by ADAR Adenosine Deaminases in Cell Models of CAG Repeat Expansion Diseases: A Significant Effect of Differentiation from Stem Cells into Brain Organoids in Absence of a Substantial Influence of CAG Repeats on the Level of Editing

*V. V. Kudriavskii, A. O. Goncharov, A. V. Ereemeev, E. S. Ruchko, V. A. Veselovsky, K. M. Klimina,
A. N. Bogomazova, M. A. Lagarkova, S. A. Moshkovskii, and A. A. Kliuchnikova* 1412

NMDA Receptors and Indices of Energy Exchange in Erythrocytes: The Missing Link to the Assessment of the Efficiency of Oxygen Transport in Hepatic Encephalopathy

G. A. Alilova, L. A. Tikhonova, and E. A. Kosenko 1430

Overexpression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the Frontal Cortex Enhances Social Interest in BTBR Mice, a Model of Autism

*Y. P. Kaminskaya, T. V. Ilchibaeva, A. I. Shcherbakova, E. R. Allayarova, N. K. Popova,
V. S. Naumenko, and A. S. Tsybko* 1451

The CYP74B34 Enzyme of Carrot (*Daucus carota*) with Double Hydroperoxyde Lyase/Epoxyalcohol Synthase Activity: Identification and Biochemical Properties

Y. Y. Toporkova, S. S. Gorina, T. M. Iljina, N. V. Lantsova, and A. N. Grechkin 1462

УЛЬТРАБЫСТРАЯ ПРОТЕОМИКА

Мини-обзор

© 2024 И.И. Федоров^{1,2}, С.А. Протасов^{1,2}, И.А. Тарасова², М.В. Горшков^{2*}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

² Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова РАН,
Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе,
119334 Москва, Россия; электронная почта: mike.gorshkov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.05.2024

После доработки 21.06.2024

Принята к публикации 24.06.2024

Современный этап развития протеомных исследований в области биологии, медицины, разработки новых лекарств, популяционного скрининга или персонализированных подходов к терапии диктует необходимость анализа больших выборок образцов с наименьшими затратами экспериментального времени. До недавнего времени технологии масс-спектрометрических измерений в протеомике относились к уникальным для идентификации и количественного определения белкового состава, но также были низкопроизводительными, с многочасовым анализом одного образца. Это входило в противоречие с динамикой изменений биологических систем на уровне всего клеточного протеома под воздействием внешних и внутренних факторов. Так, низкая скорость полнопротеомного анализа является основным фактором, ограничивающим развитие функциональной протеомики, где требуется аннотировать участие белков во внутриклеточных процессах не только в широком диапазоне условий жизнедеятельности клетки, но и на протяжении длительного времени. Огромный уровень гетерогенности клеток тканей или новообразований даже одного типа диктует необходимость анализа биологической системы на уровне индивидуальных клеток. В этих исследованиях речь идёт о получении молекулярных характеристик уже для десятков, если не сотен тысяч индивидуальных клеток, в том числе их полного протеомного профиля. Развитие технологий масс-спектрометрии высокого разрешения и точности измерения масс, предсказательной хроматографии, новых методов разделения ионов пептидов в газовой фазе и обработки протеомных данных на основе алгоритмов искусственного интеллекта открыли перспективу существенно, если не радикально, увеличить производительность полнопротеомного анализа и привели к реализации концепции ультракороткой протеомики. В работах буквально последних нескольких лет были продемонстрированы производительности полнопротеомного анализа на уровне нескольких сотен образцов в сутки при глубине анализа в несколько тысяч белков, что было немыслимо ещё буквально три-четыре года назад. В обзоре рассматриваются предпосылки развития, а также основные современные методы и подходы в реализации ультракороткого полнопротеомного анализа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеомика, масс-спектрометрия, пептиды, белки, ультракороткий анализ, количественная протеомика.

DOI: 10.31857/S0320972524080011 EDN: KEERFQ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время полнопротеомный анализ широко используется в различных областях биологии и медицины [1, 2]. Основным методом такого анализа является масс-спектрометрия,

позволяющая получать количественную информацию об изменении белкового состава клеток, подверженных тому или иному воздействию. Среди основных начальных этапов становления количественной протеомики следует отметить реализацию концепций поиска по базам данных и/или спектральным библиотекам [3] и идентификации белков по уникальному набору масс

* Адресат для корреспонденции.

их протеолитических (как правило, триптических) пептидов (пептидные отпечатки белков – Peptide Mass Fingerprint, PMF [4]). Если говорить об используемых типах масс-анализаторов, то первые протеомы модельных организмов были идентифицированы на радиочастотных квадрупольных ионных ловушках и времяпролётных масс-спектрометрах [5]. В этих результатах, как правило, отсутствовал контроль доли ложноположительных идентификаций (FDR, False Discovery Rate) [6, 7], концепция которого появилась в протеомике в 2007 г. с реализацией подхода на основе ложных или «бессмысленных» (декойных) последовательностей [7]. Ранее, начиная с работ Смита и др., появилось понимание необходимости использования для полнопротеомного анализа масс-спектрометрии высокого разрешения, представленной на начальных этапах исключительно масс-анализаторами ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ) в сочетании с нанопотоковыми режимами разделения и ионизации пептидов [8, 9]. Появление более производительных по сравнению с ИЦР ПФ масс-анализаторов высокого разрешения Орбитрэп (Orbitrap) позволило к 2015 г. выйти на уровень идентификации до половины и более всех белков простых организмов в рамках одночасового, «однопрогонного» эксперимента ВЭЖХ–МС/МС (МС/МС – тандемная масс-спектрометрия) [10]. В настоящее время для протеомов клеток человека идентифицируется 5000–6000 белков в однопрогонном двухчасовом эксперименте [11]. Дальнейшее увеличение глубины полнопротеомного анализа достигается либо дополнительным фракционированием проб на уровне белков или пептидов [12–14], либо увеличением длительности градиента ВЭЖХ до нескольких часов и использованием длинных хроматографических колонок [12, 15]. Так, например, комбинация фракционирования протеолитических смесей и многочасовых градиентов ВЭЖХ-разделения на капиллярных колонках длиной 40 см и более позволила идентифицировать более половины кодируемого протеома человека [16]. Хотя достижение такого уровня покрытия протеома представляет значительный интерес, полное затраченное инструментальное время в цитируемых выше экспериментах составило 288 часов, что делает такой анализ уникальным, но нецелесообразным для многих

задач химической, клинической или популяционной протеомики, предполагающих рутинный поток из сотен образцов в сутки. Одновременный анализ нескольких меченых образцов, объединённых в один пул (мультиплексинг образцов) [17, 18], в настоящее время реализуемый с использованием ТМТ-(Tandem Mass Tag) меток [19], частично решает проблему инструментальных затрат на полнопротеомный количественный анализ в пересчёте на один образец. Однако связанные с его использованием проблемы увеличения аналитической сложности образцов и необходимости использования фракционирования не переводят его в разряд методов ультракороткой протеомики, которую можно определить как анализ 200 и более образцов в сутки. Действительно, как показали недавние исследования на примере клеточных линий глиобластомы, обработанных интерфероном, количественный 40-минутный анализ с использованием 10-плексного набора ТМТ-меток (что примерно соответствует производительности в 200 протеомных анализов в сутки) даёт довольно скудную картину по количеству идентификаций интерферон-регулируемых белков [20].

После значительного промежутка времени, прошедшего с момента первых демонстраций количественного полнопротеомного анализа на основе меток точных масс и времён элюирования пептидов (ATM, Accurate Mass and Time tags) в минутном диапазоне градиентов разделения, в последние годы возобновился интерес к этому направлению, которое можно условно назвать «ультрабыстрой протеомикой». В её основе лежит реализация новых методов масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с ультракоротким разделением смесей пептидов (включая разделение ионов пептидов в газовой фазе), таких как информационно независимый полнопротеомный анализ (DIA, Data Independent Acquisition) [13] и прямая хроматомасс-спектрометрическая идентификация белков (DirectMS1) [20]. Эти методы позволяют полуколичественно анализировать протеомы с производительностью более 200 образцов в сутки.

В данном обзоре рассматриваются развиваемые в последние несколько лет новые подходы ультрабыстрой протеомики и кратко обсуждаются перспективы их дальнейшего развития.

Принятые сокращения: AMT tags – метки точных масс и времён элюирования пептидов; DDA – метод информационно зависимого полнопротеомного анализа; DIA – метод информационно независимого полнопротеомного анализа; DirectMS1 – метод прямой хроматомасс-спектрометрической идентификации белков; DISPA – метод протеомного анализа на основе прямой подачи протеолитической смеси в источник ионизации, минуя стадию жидкостно-хроматографического разделения; МС/МС – тандемная масс-спектрометрия, МС1 – масс-спектры первого уровня ионов-предшественников; PMF – пептидные отпечатки белков.

ПРЕДЫСТОРИЯ УЛЬТРАКОРОТКОЙ ПРОТЕОМИКИ

Одной из первых реализаций идеи ультракороткого протеомного анализа являлся подход на основе пептидных отпечатков белков (PMF) [4, 21, 22]. Этот подход заключается в предварительном разделении белков с помощью гель-электрофореза или жидкостной хроматографии, специфическом гидролизе белковых фракций на протеолитические пептиды (обычно используется фермент трипсин), что образует уникальный для каждого белка набор масс его пептидных фрагментов, и регистрации масс-спектров ионов пептидов. Для идентификации белков экспериментально полученные массы ионов пептидов сравниваются с теоретическими, полученными на основе имеющихся баз данных последовательностей белков протеома соответствующего организма, что схематично представлено на рис. 1 [23].

Масс-спектрометрия на основе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-MS, Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry) является наиболее часто используемым методом для реализации PMF-подхода [4, 24]. Понятно, что такой подход не является в буквальном смысле ультракоротким, поскольку он требует предварительного разделения белков на большое количество фракций – как правило, с использованием электрофореза SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) [21] – каждая из которых подвергается гидролизу и анализу. Также довольно быстро пришло понимание того, что метод PMF неэффективен при анализе сложных смесей [25], в которых представлены гидролизаты десятков белков, не говоря уже о тех, которые содержат тысячи белков протеома. В настоящее время он используется практически исключительно в ана-

лизе и подтверждении индивидуальных, как правило, предварительно выделенных белков.

С прогрессом в разработке масс-анализаторов высокого разрешения, таких как масс-спектрометры ионного циклотронного резонанса, идея идентификации белков на основе измерения масс-спектров ионов пептидов как способ быстрого полнопротеомного анализа была воплощена в методе точных массовых меток (Accurate Mass Tags, AMT) [26]. Метод заключается в предварительном МС/МС-анализе объединённого образца (пула) с идентификацией и составлением списка пептидов, потенциально присутствующих в анализируемых пробах. Последующая идентификация белков в каждом образце пула осуществляется на основе сопоставления этого «пул»-специфичного списка масс идентифицированных пептидов с массами пептидов, регистрируемых в отдельном анализе каждого из образцов. Базовая идея подхода состоит в том, что если молекулярную массу одного пептида можно измерить с достаточно высокой точностью, так, чтобы его масса была уникальной среди всех возможных пептидов, предсказанных на основе полногеномного секвенирования, то её можно было бы использовать в качестве «точной массовой метки» для идентификации белков. Соответственно, генерация списка таких AMT позволяет анализировать продукты гидролиза белков всего протеома (например, в результате расщепления трипсином) с большей скоростью и чувствительностью. Более того, последующий анализ можно проводить без использования фрагментации пептидов, т.е. подход потенциально является бесфрагментационным и, соответственно, совместимым с короткими градиентами разделения протеолитических смесей.

Довольно быстро стало понятно, что использование дополнительных к точной массе комплементарных данных, таких как времена

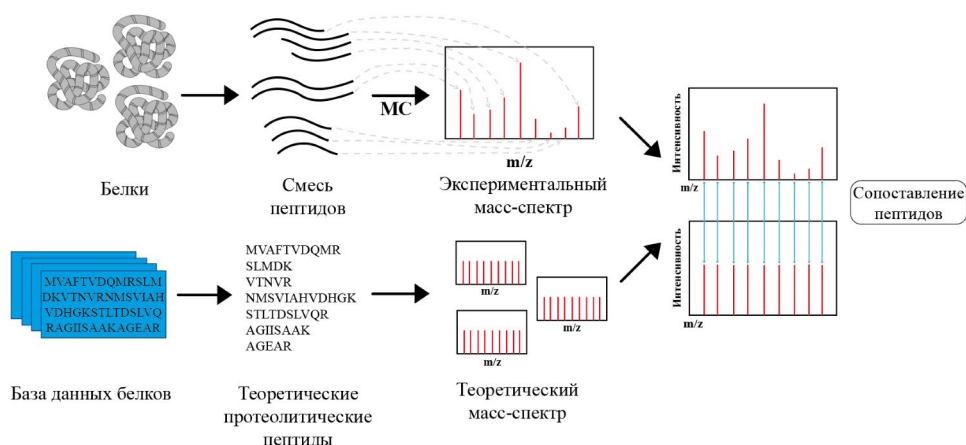


Рис. 1. Схема реализации метода PMF. Поскольку массы пептидов не специфичны относительно аминокислотной последовательности, то в сложных смесях на одну и ту же измеренную массу или набор масс может попадать несколько, в некоторых случаях десятки возможных белков, что затрудняет их идентификацию

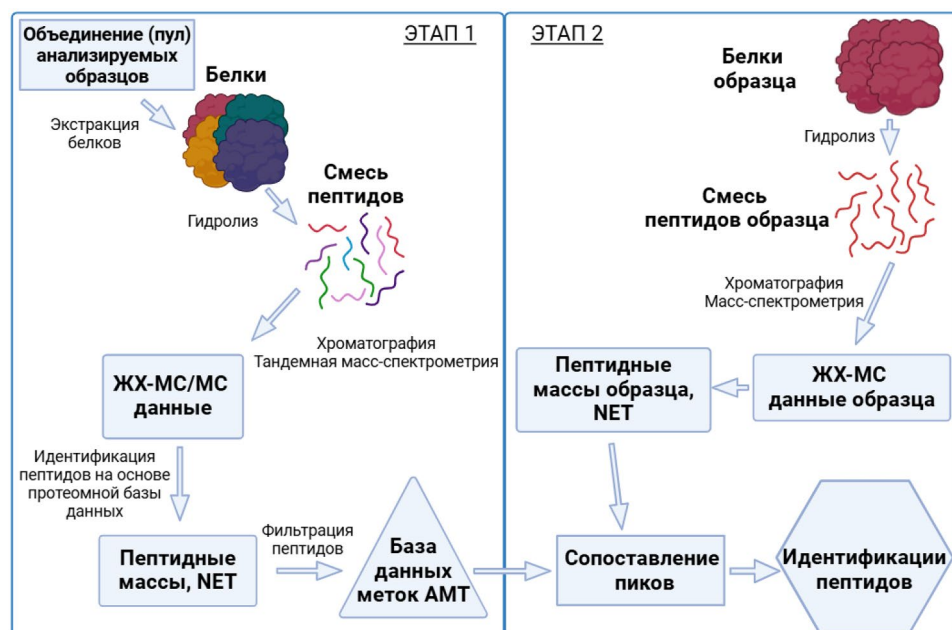


Рис. 2. Схема реализации метода АМТ на основе точных масс ионов пептидов и нормализованных времён элюирования, NET. Нормализация времён осуществляется в диапазон [0, 1]. Предсказанные NET рассчитываются для используемых условий разделения с помощью либо простых линейных преобразований, либо на основе нейронных сетей [27]

элюирования пептидов, существенно повышает уникальность такой комбинации для аминокислотной последовательности пептидов. Соответственно, дальнейшим развитием этого подхода явилось добавление нормализованных времён элюирования пептидов, что превратило его в метод меток точных масс и времён (AMT-tags) [26]. Уже в первых демонстрациях метода AMT-tags была продемонстрирована возможность полнопротеомного анализа для относительно небольших протеомов, в частности *Deinococcus radiodurans* [27]. Более того, поскольку метод не требует фрагментации пептидов для их идентификации (за исключением стадии составления списка АМТ-меток), такой полнопротеомный анализ был впервые продемонстрирован в минутном диапазоне времён.

Стандартная реализация метода АМТ содержит 2 основных этапа (рис. 2): (1) создание «пул»-специфичной базы данных меток АМТ пептидов для пулов образцов контрольной и тестовой групп с использованием глубокого (как правило, на основе фракционирования) полнопротеомного МС/МС-анализа; и (2) быстрый анализ ВЭЖХ-МС1 образцов (МС1 – масс-спектры первого уровня ионов-предшественников) с идентификацией белков на основе созданной на первом этапе «пул»-специфичной базы данных меток АМТ. На первом этапе с каждым из идентифицированных пептидов сопоставляется его точная масса в пределах ошибки измерения и нормализованное время выхода (NET, Normalized Elution Time). Затем сле-

дует этап ВЭЖХ-МС1-анализа большой когорты нефракционированных образцов, результатом которого является получение списка экспериментальных точных масс и зарядовых состояний пептидов, а также времён элюирования. Последние приводятся к нормализованной шкале времён, в наиболее простом исполнении – линейным преобразованием. Также могут использоваться NET, предсказанные на основе нейронных сетей и ранее полученных экспериментальных наборов данных идентифицированных пептидов [27]. Идентификация пептидов проанализированного образца осуществляется на основе сравнения экспериментальных наборов данных с базой меток АМТ, после чего осуществляется идентификация белков и их количественный анализ. Количественные характеристики идентифицированных белков определяются на основе интенсивностей ионов пептидов в масс-спектрах.

В то время как метод АМТ продемонстрировал возможность ультракороткого количественного анализа протеомов ряда организмов [28, 29], его более широкое применение в протеомике затруднено отсутствием контроля FDR. Также проблемами являются выравнивание времён элюирования пептидов для расчёта NET между различными экспериментами и различными хроматографическими условиями. В первую очередь речь идёт об условиях, при которых создавалась база меток АМТ, и условиях, при которых проводился последующий быстрый протеомный анализ [30]. Одним из решений последней из перечисленных

проблем стало использование различных моделей предсказания времён элюирования пептидов [31, 32] и создание стандартизированных и/или универсальных баз данных времён элюирования пептидов для АМТ-меток на их основе [33].

По мере внедрения полнопротеомного анализа с использованием информационно зависимо-го подхода (DDA, Data Dependent Acquisition) на основе гибридных масс-спектрометров с ионной ловушкой высокого разрешения Орбитрэп [34–36] в лабораторную практику метод АМТ перестал широко использоваться. При этом сама концепция DDA, в котором ионы пептидов, детектируемые в спектрах MS1, последовательно изолируются в радиочастотной ионной ловушке гибридного масс-спектрометра и накапливаются до количества, достаточного для получения полноценного спектра фрагментации, подразумевает использование длинных градиентов ВЭЖХ. Даже в случае многочасовых разделений гидролизатов протеомов, достигающих до 10 часов в отдельных экспериментах [37], идентифицируется только малая часть регистрируемых в MS1 и доступных для анализа пептидов [38–40]. Тем не менее DDA стал основным методом количественного полнопротеомного анализа в последние годы с глубиной покрытия протеома, достигающей в ряде работ 10 000 и более белковых идентификаций [16, 37, 41, 42]. Несмотря на очевидную важность получения как можно большей глубины анализа протеома, нельзя также не указать и на очевидную проблему: огромные затраты инструментального времени для анализа одного образца, особенно в случае использования интенсивного префракционирования анализируемых смесей [41, 43–47].

МЕТОД ИНФОРМАЦИОННО НЕЗАВИСИМОГО АНАЛИЗА В УЛЬТРАБЫСТРОЙ ПРОТЕОМИКЕ

Одним из наиболее очевидных методов ультракороткой протеомики стал метод информационно независимого анализа (DIA) [13]). В отличие от DDA, в этом методе отсутствует стадия последовательного отбора ионов-предшественников по точной измеренной массе MS1 для последующей изоляции, накопления и фрагментации, которая является одной из основных причин использования длинных градиентов разделения. Вместо этого в DIA накопление и фрагментация ионов осуществляются в широком окне масс с последующим перестроением накопительного устройства на соседнее окно и т.д. (рис. 3). В результате практически все прекурсорные ионы, присутствующие в MS1, фрагментируются в серии таких окон (стандартно, размером в 20–25 Th), покрыва-

ющих весь диапазон m/z детектирования ионов пептидов. Понятно, что спектры фрагментации в таких окнах являются смешанными (или, как ещё говорят, обладают высоким уровнем мультиплексности), с одновременным присутствием фрагментов от десятков ионов пептидов, что ставит перед экспериментаторами непростую задачу их интерпретации (деконволюции). Каждой серии таких окон соответствует предварительно зарегистрированный масс-спектр MS1 и время элюирования. Последнее является также одним из ключевых параметров для последующей деконволюции спектров фрагментации и идентификации пептидов. Размер окон и, соответственно, эффективность деконволюции спектров фрагментации определяется характеристиками масс-анализатора. Так, комбинация масс-анализатора Орбитрэп и анализатора Astral (ASymmetric TRAck Lossless) позволила уменьшить окна фрагментации до 2 Th, что фактически стирает границу между методами DIA и DDA в полнопротеомном анализе [48, 49].

Описанная выше схема DIA является его наиболее широко используемой реализацией, называемой SWATH-MS (Sequential Window Acquisition of All THeoretical Mass Spectra [50]). Основным преимуществом этого метода является преодоление проблемы стохастичности данных в стандартном подходе на основе DDA, связанной с выбором ограниченного количества наиболее интенсивных в данном масс-спектре ионов-предшественников для селективного накопления и фрагментации. Результатом является существенно меньший уровень пропущенных значений интенсивностей пептидов, что делает DIA альтернативой DDA в количественной протеомике [51]. Одновременно, поскольку в DIA происходит фрагментация всех ионов прекурсоров в ограниченном числе окон, этот метод позволяет работать с более короткими градиентами ВЭЖХ [52]. Дальнейшая оптимизация окон изоляции позволила увеличить глубину анализа протеомов с использованием ультракоротких градиентов разделения [53, 54]. Дополнительное разделение ионов пептидов по ионной подвижности продемонстрировало возможность идентифицировать в 5 нг гидролизата HeLa более 1000 белков в режиме DIA и 5-минутных градиентов ВЭЖХ [55].

Одним из сдерживающих факторов в развитии DIA в качестве рутинно используемого метода ультрабыстрого полнопротеомного анализа являлся высокий уровень мультиплексности масс-спектров фрагментации, что требует сложных алгоритмов обработки данных и деконволюции спектров. Стандартным решением этой проблемы являлось использование библиотек спектров фрагментации для анализируемого пула образцов. Такие библиотеки создавались с использованием

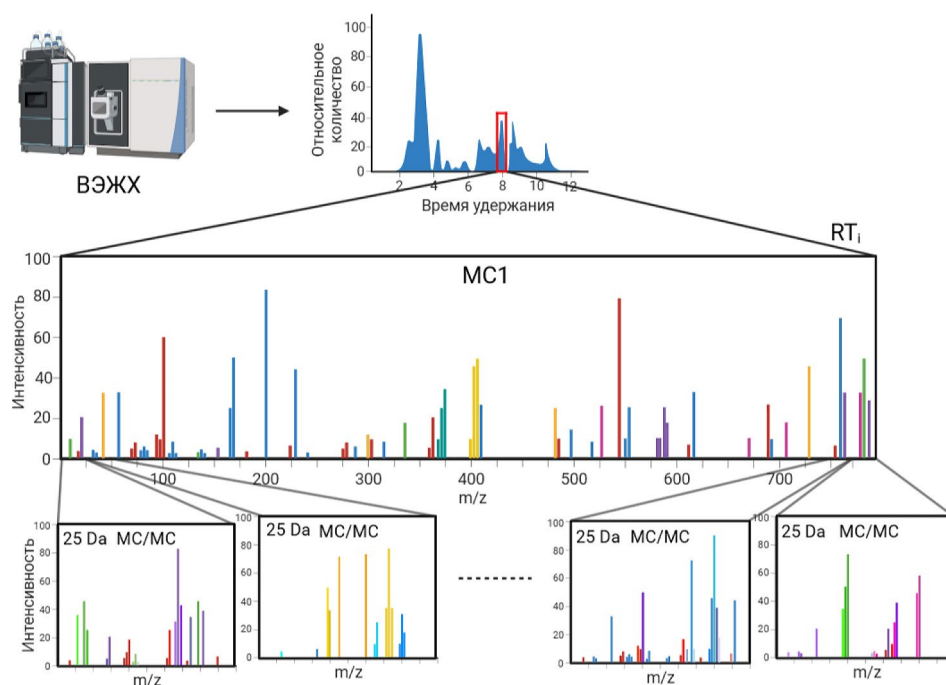


Рис. 3. Схема работы метода DIA. Вместо изолирования для последующей фрагментации отдельных ионов-предшественников, регистрируемых в масс-спектрах первого уровня, MS1, весь диапазон масс делится на широкие окна, в которых осуществляется накопление и фрагментация всех присутствующих в них ионов. Таким образом, DIA позволяет получить спектры фрагментации для всех ионов-предшественников, потенциально присутствующих в образце

глубокого полнопротеомного анализа методом DDA, что, в свою очередь, делало DIA не в полной мере информационно независимым. Помимо очевидных затрат инструментального времени на получение таких библиотек, что превращает DIA в условно быстрый метод протеомного анализа, использование экспериментальных библиотек существенно сдерживало использование DIA в межлабораторных и клинических исследованиях. Наконец, остаётся базовая проблема такого подхода – невозможность идентифицировать пептиды, спектры фрагментации которых в библиотеке отсутствуют. Прогресс в разработке алгоритмов на основе машинного обучения для предсказания спектров фрагментации и времён удерживания пептидов *in silico* позволил решить эту проблему [56–58]. Тем не менее крайне высокий уровень мультиплексности спектров в результате интерференции спектров фрагментации от разных одновременно элюируемых ионов-предшественников существенно усиливается в случае использования коротких градиентов разделения. До недавнего времени это делало невозможным извлечение сколь-либо значимого количества идентификаций в таких спектрах и ограничивало использование DIA в приложениях, требующих анализа больших выборок образцов. Эти проблемы были учтены в недавней разработке алгоритма DIA-NN, основанного на использовании нейронных сетей для различения сигналов ионов фрагментов и

шума в масс-спектрах, а также использующего новые стратегии для извлечения количественной информации и выравнивания хроматограмм по идентифицируемым пептидам образца [59]. В ходе работы алгоритма DIA-NN каждый пик элюирования ионов-предшественников описывается набором индексов, и через процедуру итераций на основе линейного классификатора определяется наилучший кандидат на пик элюирования того или иного иона. Ключевым этапом работы алгоритма является присвоение статистической значимости (q-value) идентифицированным предшественникам, которая рассчитывается для целевых и ложных кандидатов на основе характеристик соответствующих пиков элюирования с использованием глубокой нейронной сети. Возможности алгоритма DIA-NN для использования в ультракоротком полнопротеомном анализе в полной мере были продемонстрированы на примере реализации метода ScanningSWATH [60, 61]. Технически этот метод заключается в замене последовательного выбора окон изоляции пептидов, в которых осуществляется фрагментация, непрерывным сканированием в широком окне m/z первого изолирующего ионы радиочастотного квадрупольного масс-спектрометра по всему диапазону масс с одновременной фрагментацией поступающих из него ионов-предшественников в столкновительном радиочастотном квадруполе. Таким образом, создаётся дополнительная размер-

ность для сопоставления спектров фрагментации и кандидатов-предшественников в последующей деконволюции сильно интерферирующих тандемных масс-спектров и идентификации пептидов алгоритмом DIA-NN. В недавней совместной работе создателей метода ScanningSWATH и разработчиков алгоритма DIA-NN была продемонстрирована ранее недостижимая возможность его использования в режиме ультракоротких, порядка 0,5–5 мин, градиентов ВЭЖХ-разделения протеолитических смесей пептидов при глубине анализа протеомов клеточных линий человека, достигающей нескольких тысяч белков [61]. Следует отметить, что для работы метода в режиме ультракоротких градиентов с целью сохранения разрешающей способности хроматографического разделения сложных смесей необходимо использование микропоточковой ВЭЖХ (порядка нескольких сотен мкл/мин), что, в свою очередь, приводит к большим затратам образца (до нескольких мкг гидролизата протеомов клеточных линий человека).

Реализация метода DIA в режиме ультракороткого разделения наиболее естественна для времяпролётных масс-анализаторов, которые в настоящее время позволяют получать масс-спектры в широком диапазоне m/z с разрешением пиков в спектрах 50 000 и выше и частотой сканирования порядка 100 Гц, что на порядок превосходит производительность масс-анализаторов высокого разрешения на основе ионных ловушек. Одним из примеров использования времяпролётного масс-анализатора высокого разрешения для ультракороткого полнопротеомного анализа является комбинация дополнительного разделения ионов-предшественников по ионной подвижности в режиме удерживания ионов в градиенте электрического поля (TIMS, Trapped Ion Mobility Spectrometry [62, 63]) с методом параллельного накопления и последовательной фрагментации ионов пептидов (PASEF, Parallel Accumulation SErial Fragmentation [64]). В TIMS ионы пептидов, элюируемых с колонки ВЭЖХ и ионизируемых в источнике ионизации, поступают в дрейфовую камеру, в которой удерживаются в радиальном направлении постоянным электрическим полем, компенсирующим их дрейф в столкновениях с молекулами газа-носителя, и, соответственно, разделяются по ионной подвижности. Вместо выбора массы одного иона-предшественника для фрагментации реализуется синхронизированное с работой камер ионной подвижности изменение параметров радиочастотного квадрупольного поля для изолирования и фрагментации ионов с выделенными значениями или диапазоном m/z . Один шаг изменения напряжённости удерживающего электрического поля в камере TIMS длительностью

50 мс позволяет получить спектры фрагментации нескольких ионов пептидов. PASEF многократно увеличивает скорость наработки спектров фрагментации без потери чувствительности анализа [65]. Реализация комбинации TIMS-TOP/PASEF в режиме DIA-анализа (dia-PASEF), а также использование алгоритма DIA-NN для обработки данных продемонстрировало возможность осуществления полнопротеомного анализа с глубиной в несколько тысяч идентифицированных белков клеточных линий человека со скоростью до 400 образцов в сутки инструментального времени (3 минуты градиента ВЭЖХ) [66].

МЕТОД ПРЯМОГО ВВОДА ОБРАЗЦА DISPA

Одним из логичных шагов в развитии методов ультракороткой протеомики и упрощения инструментальной составляющей самого анализа является отказ от хроматографического разделения протеолитических смесей в реальном времени. Сам подход, конечно, не является чем-то уникальным и использовался в практике анализа протеомов более полутора десятков лет [67]. Однако его ранние реализации осуществлялись на масс-анализаторах низкого разрешения и точности измерения масс при отсутствии как развитых инструментов поиска идентификаций, так и каких-либо возможностей дополнительного разделения ионов, например, по ионной подвижности. Несколько лет назад с развитием масс-спектрометрических технологий, появлением масс-анализаторов высокого разрешения, а также методов быстрого разделения ионов в газовой фазе по ионной подвижности концепция прямой подачи протеолитической смеси в источник ионизации без предварительного хроматографического разделения приобрела новое звучание в методе скорострельного протеомного анализа на основе прямого ввода (DISPA, Direct Infusion Shotgun Proteomic Analysis) [68]. Технически реализация метода довольно проста: протеолитическая смесь подаётся в нанопотоковом режиме напрямую со шприца с пробой в источник ионизации масс-спектрометра. В качестве дополнительной размерности используется разделение ионов по ионной подвижности. Сам анализ осуществляется методом DIA. Понятно, что мультиплексность спектров фрагментации в этом случае более чем на порядок выше, чем в случае разделения ВЭЖХ, что, соответственно, ограничивает достижимую глубину анализа протеома. Так, в указанной работе удалось достичь глубины порядка 500 белков для протеома клеточной линии человека. Однако эта глубина была достигнута за несколько минут экспериментального времени, что позволило

авторам проанализировать 132 образца за 4,5 часа (3 минуты на образец) с количественной идентификацией более 300 белков. Отсутствие возможности «привязки» пиков фрагментов к хроматографическим временам с целью эффективной деконволюции получаемых тандемных спектров с крайне высоким уровнем мультиплексности существенно ограничивало возможности метода DISPA при использовании стандартных, ВЭЖХ-ориентированных алгоритмов обработки данных. Чтобы преодолеть эти ограничения, было разработано программное обеспечение на основе алгоритма CsoDIAq (Cosine similarity optimization for DIA qualitative and Quantitative analysis [69]). Использование этого алгоритма для работы с данными DISPA позволило продемонстрировать глубину анализа протеомов клеточных линий человека (HeLa и 293T) порядка 2000 белков в одном прогоне образца с суммарными затратами экспериментального времени порядка нескольких минут [70]. Также в этой работе были продемонстрированы возможности метода для количественного анализа больших выборок образцов. В частности, 96 образцов протеома клеточных линий человека, обработанных лекарственным соединением, были проанализированы за 8 часов с глубиной около 1000 количественно идентифицированных белков. Следует отметить, что метод DISPA является интересной альтернативой стандартным подходам к ультракороткому полнопротеомному анализу на основе ВЭЖХ, однако находится в начальной стадии своего развития. Ограничения метода вытекают из крайней сложности протеолитических смесей (если речь идёт о полнопротеомном анализе), в которых одновременно могут присутствовать миллионы индивидуальных пептидных последовательностей в динамическом диапазоне концентраций, достигающем нескольких порядков (более 10 порядков в случае, например, протеома плазмы крови человека). Эти ограничения влияют как на общее число идентификаций, так и на точность количественного анализа. Высокий динамический диапазон концентраций пептидов приводит к сильному эффекту подавления ионов низкоконцентрационных пептидов в источнике ионизации и в накопительной ионной ловушке. К ограничениям метода следует отнести низкое покрытие последовательностей идентифицируемых белков из-за низкой эффективности деконволюции смешанных тандемных масс-спектров, а также сложности контроля уровня ложноположительных идентификаций в результатах анализа. Тем не менее метод DISPA продолжает демонстрировать свою потенциально высокую эффективность как метод ультрабыстрого протеомного анализа. Так, в совсем недавней работе была продемонстрирована производительность в

1000 образцов в сутки (1,4 минуты на образец) на примере профилирования белков плазмы крови в короне наночастиц с идентификацией 280 белков, из которых 44 являлись подтверждёнными биомаркерами различных патологий [71].

МЕТОД ПРЯМОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Как уже было отмечено выше, одной из причин длительности классического полнопротеомного анализа с использованием метода DDA является необходимость получения спектров фрагментации от как можно большего количества ионов пептидов, элюируемых из хроматографической колонки. Доминирующим методом фрагментации является диссоциация пептидов в столкновениях с молекулами газа-носителя по связям -CO-NH- между остатками аминокислотной последовательности с образованием преимущественно *y*- и *b*-серий фрагментов. Процесс столкновительной диссоциации пептидов является эргодическим, требующим времени для разрыва связей. Кроме того, для повышения информативности спектров фрагментации и, соответственно, большей точности идентификации последовательности пептида желательнее получить как можно большее количество ионов фрагментов, что также требует времени на накопление изолируемых для этой цели ионов-предшественников. Таким образом, в процессе анализа протеолитической смеси на каждый MS1 в широком диапазоне *m/z*, регистрируемый для всех ионов пептидов, элюируемых в данный конкретный момент времени, в методе DDA идёт последовательный отбор ограниченного количества наиболее интенсивных пиков ионов-предшественников, их накопление и фрагментация. В случае протеомов сложных организмов анализируемая протеолитическая смесь может содержать миллионы индивидуальных пептидных последовательностей. Соответственно, чтобы увеличить количество отбираемых на фрагментацию ионов пептидов и, следовательно, глубину протеомного анализа, а также учесть временные ограничения, накладываемые скоростями накопления ионов и получения тандемных масс-спектров, используются многочасовые градиенты ВЭЖХ. Таким образом, для решения проблемы повышения производительности полнопротеомного анализа была создана концепция прямой масс-спектрометрической идентификации белков, в которой отсутствует стадия фрагментации ионов пептидов. Белки идентифицируются напрямую из MS1 на основе точно измеряемых масс всех представленных в них ионов с учётом специфичности гидролиза. При этом распределение интенсивностей

регистрируемых пиков иона пептида в масс-спектре, соответствующих разному содержанию в последовательности изотопа ^{13}C (спектральный профиль иона пептида), даёт информацию, специфичную по отношению к атомному составу пептида [72]. Также времена хроматографического элюирования являются специфичными по отношению к аминокислотным последовательностям пептидов [73–75], включая пептиды с модификациями остатков [76, 77]. Таким образом, MS1 позволяют извлекать набор комплементарных данных о последовательности и элементном составе пептидов. Понятно, что отказ от фрагментации пептидов снижает возможности их идентификации в силу существенно более низкой специфичности хроматографических времён к аминокислотной последовательности по сравнению с тандемными масс-спектрами. В то же время отказ от стадии фрагментации позволяет существенно сократить время анализа за счёт возможности использования коротких градиентов ВЭЖХ.

Концепция прямой масс-спектрометрической идентификации белков была реализована в методе DirectMS1, который уже в первых работах продемонстрировал глубину полнопротеомного анализа более 1000 белков при использовании 5-минутных градиентов разделения [78]. Схема реализации метода представлена на рис. 4. Масс-анализатор работает в режиме непрерывной регистрации MS1 в течение всего времени гради-

ентного элюирования протеолитической смеси. Скорость получения MS1 зависит от типа масс-анализатора и требований к разрешению масс в спектрах и точности их измерения. Эти требования высоки, и метод работает только с масс-анализаторами высокого разрешения: не менее 100 000 по массам и менее 1 ppm по точности их измерения. Важным условием эффективности метода является также производительность масс-анализатора. Так, современные масс-анализаторы на основе ионной ловушки Орбитреп позволяют получать до 10 спектров в секунду с указанными выше масс-спектральными характеристиками. Ещё одним ключевым фактором достижения высокой эффективности метода является точность предсказания времён элюирования пептидов, которая сравнивается с экспериментальными временами и используется в алгоритме обработки данных DirectMS1 для различения правильных и ложных идентификаций. До недавнего времени существовало несколько моделей и алгоритмов предсказания времён элюирования пептидов с точностью предсказания (по корреляции экспериментальных и предсказанных времён) $R^2 \sim 0,96$ [32]. В последние годы с развитием алгоритмов машинного обучения появились модели предсказания времён элюирования пептидов на их основе с существенно более высокой точностью. В частности, в алгоритме поиска DirectMS1 используется модель предсказания DeepLC,

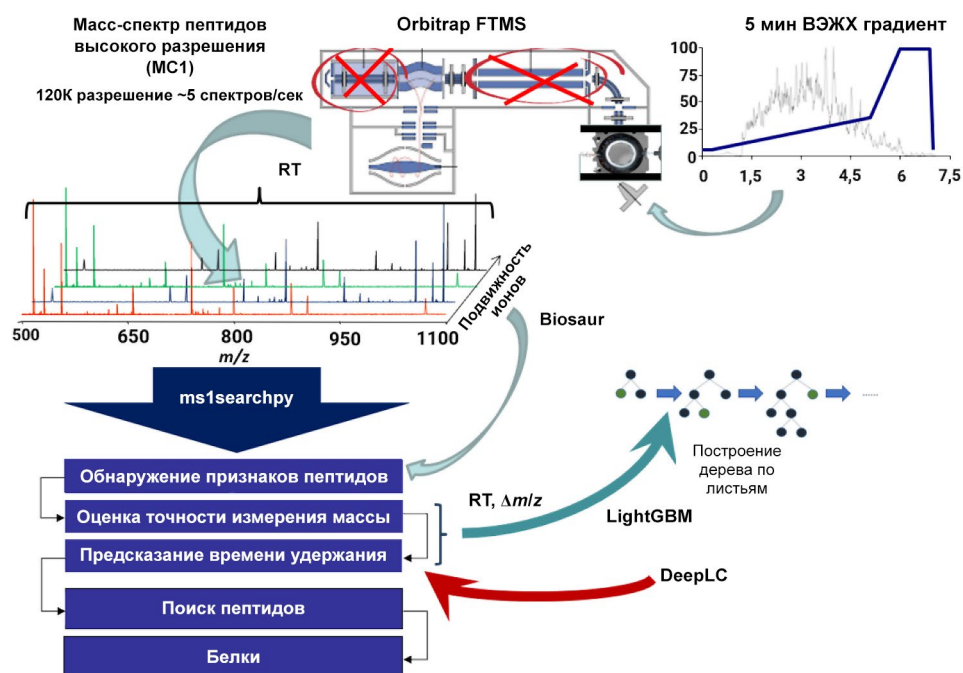


Рис. 4. Схема реализации метода DirectMS1. Ключевым фактором эффективности метода является использование алгоритмов машинного обучения для предсказания времён элюирования пептидов и классификации правильных и ложных идентификаций на основе совокупности комплементарных данных, таких как спектральный профиль иона пептида по изотопу углерода ^{13}C , времена элюирования, ионная подвижность (при использовании дополнительного разделения по ионной подвижности) и точные массы пептидов

которая позволила существенно увеличить глубину анализа протеома до более 2000 при использовании 5-минутных градиентов ВЭЖХ и 7,5 минут общих затрат времени на один экспериментальный прогон [79]. Дополнительное увеличение количества идентифицируемых белков даёт разделение пептидов по ионной подвижности. Реализация метода DirectMS1 не требует каких-либо существенных изменений в инструментальной составляющей, за исключением необходимости использования более высоких потоков ВЭЖХ, до 1 мкл/мин и более, с целью поддержания хроматографического разрешения в условиях ультракоротких градиентов. Ключевыми элементами метода являются программные средства для обработки масс-спектров ионов пептидов, ранжирование идентификаций, соотнесение их с белками в соответствующих базах данных и определение уровня достоверности. Эту работу выполняют алгоритмы определения спектральных профилей ионов пептидов в масс-спектрах первого уровня, такие как Biosaur [80] и алгоритм прямой идентификации белков ms1searchpy [81], основанный на использовании алгоритмов машинного обучения и интегрированный с моделями предсказания времён элюирования пептидов. Следует отметить, что недостатком метода прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 является отсутствие контроля FDR на пептидном уровне. По оценкам авторов метода уровень ложноположительных идентификаций пептидов может достигать 30% [78]. Важно, что в режиме ультракоротких градиентов, в отличие от подходов на основе МС/МС, метод DirectMS1 позволяет идентифицировать белки с существенно (почти на порядок) большим покрытием их аминокислотных последовательностей. Это, в свою очередь, даёт более точные измерения относительного содержания белков. В частности, было показано, что, несмотря на меньшую глубину покрытия протеома, метод DirectMS1 позволяет получать результаты количественной протеомики ультракороткого анализа, включая идентификацию дифференциально экспрессированных белков в задачах поиска специфического отклика клеток на химическое или лекарственное воздействие [82]. Эти результаты сравнимы с полученными методами DIA и DDA на основе длинных градиентов ВЭЖХ [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент происходит активное развитие полнопротеомного масс-спектрометрического анализа и его использование во многих

областях постгеномных исследований. При этом производительность анализа, который в типичном случае занимает часы экспериментального времени на количественное профилирование одной протеолитической смеси, является одним из основных сдерживающих факторов использования протеомики в большом круге современных областей биомедицины, включая разработку новых и перетаргетирование существующих лекарственных препаратов, персонализированную медицину, популяционную и клиническую протеомику, протеомику единичных клеток и др. При этом развитие технологий высокопроизводительной масс-спектрометрии высокого разрешения и точности измерения масс, а также новых методов обработки масс-спектрометрических данных, основанных на алгоритмах машинного обучения, позволило вывести производительность на уровень нескольких сотен полнопротеомных анализов в сутки. Эти возможности в протеомике были реализованы буквально за несколько последних лет, и в настоящее время методы ультракороткой протеомики испытывают период бурного развития и становятся доминирующими подходами в решении многих из перечисленных выше задач. Такие методы, как DIA, DirectMS1 и DISPA, позволяют не только сократить время анализа более чем на порядок, но и увеличить его глубину до невозможных ещё десятилетие назад 2000–5000 белков, идентифицируемых за 3–5 минут суммарных затрат экспериментального времени. Дальнейшее развитие технологий и методов ультракороткого протеомного анализа позволит с меньшими затратами времени проводить масштабные исследования на больших выборках образцов, что позволяет более точно определять механизмы взаимодействия белков между собой и изменения в клетках на протеомном уровне в результате патологического процесса, химиотерапевтического или внешнего воздействия.

Вклад авторов. И.И. Федоров, С.А. Протасов – подбор и анализ литературы по теме обзора, написание текста обзора; И.А. Тарасова – обсуждение темы и структуры обзора; М.В. Горшков – руководство работой над обзором, написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00229-П.

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. Wang, H., Dey, K. K., Chen, P. C., Li, Y., Niu, M., Cho, J. H., Wang, X., Bai, B., Jiao, Y., Chepyala, S. R., Haroutunian, V., Zhang, B., Beach, T. G., and Peng, J. (2020) Integrated analysis of ultra-deep proteomes in cortex, cerebrospinal fluid and serum reveals a mitochondrial signature in Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.*, **15**, 43, <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00384-6>.
2. Radovanovic, M., Day, R. O., Jones, G. D. R., Galettis, P., and Norris, R. L. G. (2022) LC-MS/MS method for simultaneous quantification of ten antibiotics in human plasma for routine therapeutic drug monitoring, *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab.*, **26**, 48-59, <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.11.001>.
3. Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., Eddes, J., Loevenich, S. N., and Aebersold, R. (2006) The PeptideAtlas project, *Nucleic Acids Res.*, **34**, D655-D658, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj040>.
4. Henzel, W. J., Watanabe, C., and Stults, J. T. (2003) Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 931-942, [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00214-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00214-9).
5. Lay, J. O., Jr. (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria, *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 172-194, <https://doi.org/10.1002/mas.10003>.
6. Aggarwal, S., and Yadav, A. K. (2016) False Discovery Rate Estimation in Proteomics, in *Statistical Analysis in Proteomics* (Jung, K., ed) Springer, New York, NY, pp. 119-128.
7. Elias, J. E., and Gygi, S. P. (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry, *Nat. Methods*, **4**, 207-214, <https://doi.org/10.1038/nmeth1019>.
8. Shen, Y., Tolić, N., Masselon, C., Pasa-Tolić, L., Camp, D. G., 2nd, Hixson, K. K., Zhao, R., Anderson, G. A., and Smith, R. D. (2004) Ultrasensitive proteomics using high-efficiency on-line micro-SPE-nanoLC-nanoESI MS and MS/MS, *Anal. Chem.*, **76**, 144-154, <https://doi.org/10.1021/ac030096q>.
9. Shen, Y., Zhao, R., Berger, S. J., Anderson, G. A., Rodriguez, N., and Smith, R. D. (2002) High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics, *Anal. Chem.*, **74**, 4235-4249, <https://doi.org/10.1021/ac0202280>.
10. Richards, A. L., Hebert, A. S., Ulbrich, A., Bailey, D. J., Coughlin, E. E., Westphall, M. S., and Coon, J. J. (2015) One-hour proteome analysis in yeast, *Nat. Protoc.*, **10**, 701-714, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.040>.
11. Hebert, A. S., Prasad, S., Belford, M. W., Bailey, D. J., McAlister, G. C., Abbatiello, S. E., Huguet, R., Wouters, E. R., Dunyach, J. J., Brademan, D. R., Westphall, M. S., and Coon, J. J. (2018) Comprehensive single-shot proteomics with FAIMS on a hybrid orbitrap mass spectrometer, *Anal. Chem.*, **90**, 9529-9537, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02233>.
12. Zubarev, R. A. (2013) The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics, *Proteomics*, **13**, 723-726, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200451>.
13. Doerr, A. (2015) DIA mass spectrometry, *Nat. Methods*, **12**, 35-35, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3234>.
14. Geyer, P. E., Kulak, N. A., Pichler, G., Holdt, L. M., Teupser, D., and Mann, M. (2016) Plasma proteome profiling to assess human health and disease, *Cell Syst.*, **2**, 185-195, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.02.015>.
15. Pirmoradian, M., Budamgunta, H., Chingin, K., Zhang, B., Astorga-Wells, J., and Zubarev, R. A. (2013) Rapid and deep human proteome analysis by single-dimension shotgun proteomics, *Mol. Cell Proteomics*, **12**, 3330-3338, <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.028787>.
16. Nagaraj, N., Wisniewski, J. R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Pääbo, S., and Mann, M. (2011) Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 548, <https://doi.org/10.1038/msb.2011.81>.
17. Masselon, C., Anderson, G. A., Harkewicz, R., Bruce, J. E., Pasa-Tolic, L., and Smith, R. D. (2000) Accurate mass multiplexed tandem mass spectrometry for high-throughput polypeptide identification from mixtures, *Anal. Chem.*, **72**, 1918-1924, <https://doi.org/10.1021/ac991133+>.
18. Chapman, J. D., Goodlett, D. R., and Masselon, C. D. (2014) Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling, *Mass Spectrom. Rev.*, **33**, 452-470, <https://doi.org/10.1002/mas.21400>.
19. Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K., and Hamon, C. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS, *Anal. Chem.*, **75**, 1895-1904, <https://doi.org/10.1021/ac0262560>.
20. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Lipatova, A. V., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2022) DirectMS1Quant: ultrafast quantitative proteomics with MS/MS-free mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **94**, 13068-13075, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02255>.
21. Aebersold, R., and Goodlett, D. R. (2001) Mass spectrometry in proteomics, *Chem. Rev.*, **101**, 269-295, <https://doi.org/10.1021/cr990076h>.

22. Pappin, D. J., Hojrup, P., and Bleasby, A. J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting, *Curr. Biol.*, **3**, 327-332, [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90195-t](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90195-t).
23. Aebersold, R., and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, **422**, 198-207, <https://doi.org/10.1038/nature01511>.
24. Gevaert, K., and Vandekerckhove, J. (2000) Protein identification methods in proteomics, *Electrophoresis*, **21**, 1145-1154, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6<1145::AID-ELPS1145>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1145::AID-ELPS1145>3.0.CO;2-Z).
25. He, Z., Yang, C., Yang, C., Qi, R. Z., Tam, J. P., and Yu, W. (2010) Optimization-based peptide mass fingerprinting for protein mixture identification, *J. Comput. Biol.*, **17**, 221-235, <https://doi.org/10.1089/cmb.2009.0160>.
26. Conrads, T. P., Anderson, G. A., Veenstra, T. D., Pasa-Tolić, L., and Smith, R. D. (2000) Utility of accurate mass tags for proteome-wide protein identification, *Anal. Chem.*, **72**, 3349-3354, <https://doi.org/10.1021/ac0002386>.
27. Norbeck, A. D., Monroe, M. E., Adkins, J. N., Anderson, K. K., Daly, D. S., and Smith, R. D. (2005) The utility of accurate mass and LC elution time information in the analysis of complex proteomes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1239-1249, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.05.009>.
28. Shen, Y., Strittmatter, E. F., Zhang, R., Metz, T. O., Moore, R. J., Li, F., Udseth, H. R., Smith, R. D., Unger, K. K., Kumar, D., and Lubda, D. (2005) Making broad proteome protein measurements in 1-5 min using high-speed RPLC separations and high-accuracy mass measurements, *Anal. Chem.*, **77**, 7763-7773, <https://doi.org/10.1021/ac051257o>.
29. Shen, Y., Smith, R. D., Unger, K. K., Kumar, D., and Lubda, D. (2005) Ultrahigh-throughput proteomics using fast RPLC separations with ESI-MS/MS, *Anal. Chem.*, **77**, 6692-6701, <https://doi.org/10.1021/ac050876u>.
30. Lange, E., Tautenhahn, R., Neumann, S., and Gröpl, C. (2008) Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements, *BMC Bioinformatics*, **9**, 375, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-375>.
31. Petritis, K., Kangas, L. J., Yan, B., Monroe, M. E., Strittmatter, E. F., Qian, W. J., Adkins, J. N., Moore, R. J., Xu, Y., Lipton, M. S., Camp, D. G., 2nd, and Smith, R. D. (2006) Improved peptide elution time prediction for reversed-phase liquid chromatography-MS by incorporating peptide sequence information, *Anal. Chem.*, **78**, 5026-5039, <https://doi.org/10.1021/ac060143p>.
32. Tarasova, I. A., Masselon, C. D., Gorshkov, A. V., and Gorshkov, M. V. (2016) Predictive chromatography of peptides and proteins as a complementary tool for proteomics, *Analyst*, **141**, 4816-4832, <https://doi.org/10.1039/c6an00919k>.
33. Tarasova, I. A., Guryca, V., Pridatchenko, M. L., Gorshkov, A. V., Kieffer-Jaquinod, S., Evreinov, V. V., Masselon, C. D., and Gorshkov, M. V. (2009) Standardization of retention time data for AMT tag proteomics database generation, *J. Chromatogr. B*, **877**, 433-440, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.047>.
34. Han, X., Aslanian, A., and Yates, J. R. (2008) Mass spectrometry for proteomics, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 483-490, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>.
35. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., and Yates, J. R., 3rd (2013) Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics, *Chem. Rev.*, **113**, 2343-2394, <https://doi.org/10.1021/cr3003533>.
36. Miller, R. M., and Smith, L. M. (2023) Overview and considerations in bottom-up proteomics, *Analyst*, **148**, 475-486, <https://doi.org/10.1039/d2an01246d>.
37. Wang, H., Yang, Y., Li, Y., Bai, B., Wang, X., Tan, H., Liu, T., Beach, T. G., Peng, J., and Wu, Z. (2015) Systematic optimization of long gradient chromatography mass spectrometry for deep analysis of brain proteome, *J. Proteome Res.*, **14**, 829-838, <https://doi.org/10.1021/pr500882h>.
38. Michalski, A., Cox, J., and Mann, M. (2011) More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS, *J. Proteome Res.*, **10**, 1785-1793, <https://doi.org/10.1021/pr101060v>.
39. Kreimer, S., Belov, M. E., Danielson, W. F., Levitsky, L. I., Gorshkov, M. V., Karger, B. L., and Ivanov, A. R. (2016) Advanced precursor ion selection algorithms for increased depth of bottom-up proteomic profiling, *J. Proteome Res.*, **15**, 3563-3573, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00312>.
40. Hebert, A. S., Thöing, C., Riley, N. M., Kwiecien, N. W., Shiskova, E., Huguet, R., Cardasis, H. L., Kuehn, A., Eliuk, S., Zabrouskov, V., Westphall, M. S., McAlister, G. C., and Coon, J. J. (2018) Improved precursor characterization for data-dependent mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **90**, 2333-2340, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04808>.
41. Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods*, **11**, 319-324, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2834>.
42. Zhang, B., Pirmoradian, M., Chernobrovkin, A., and Zubarev, R. A. (2014) DeMix workflow for efficient identification of cofragmented peptides in high resolution data-dependent tandem mass spectrometry, *Mol. Cell Proteomics*, **13**, 3211-3223, <https://doi.org/10.1074/mcp.O114.038877>.

43. Angel, T. E., Aryal, U. K., Hengel, S. M., Baker, E. S., Kelly, R. T., Robinson, E. W., and Smith, R. D. (2012) Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 3912-3928, <https://doi.org/10.1039/c2cs15331a>.
44. Stanley, J. R., Adkins, J. N., Slys, G. W., Monroe, M. E., Purvine, S. O., Karpievitch, Y. V., Anderson, G. A., Smith, R. D., and Dabney, A. R. (2011) A statistical method for assessing peptide identification confidence in accurate mass and time tag proteomics, *Anal. Chem.*, **83**, 6135-6140, <https://doi.org/10.1021/ac2009806>.
45. Zimmer, J. S. D., Monroe, M. E., Qian, W.-J., and Smith, R. D. (2006) Advances in proteomics data analysis and display using an accurate mass and time tag approach, *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 450-482, <https://doi.org/10.1002/mas.20071>.
46. Dos Santos, A., Court, M., Thiers, V., Sar, S., Guettier, C., Samuel, D., Bréchet, C., Garin, J., Demaugre, F., and Masselon, C. D. (2010) Identification of cellular targets in human intrahepatic cholangiocarcinoma using laser microdissection and accurate mass and time tag proteomics, *Mol. Cell Proteomics*, **9**, 1991-2004, <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000026>.
47. Agron, I. A., Avtonomov, D. M., Kononikhin, A. S., Popov, I. A., Moshkovskii, S. A., and Nikolaev, E. N. (2010) Accurate mass tag retention time database for urine proteome analysis by chromatography-mass spectrometry, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 636-641, <https://doi.org/10.1134/s0006297910050147>.
48. Heil, L. R., Damoc, E., Arrey, T. N., Pashkova, A., Denisov, E., Petzoldt, J., Peterson, A. C., Hsu, C., Searle, B. C., Shulman, N., Riffle, M., Connolly, B., MacLean, B. X., Remes, P. M., Senko, M. W., Stewart, H. I., Hock, C., Makarov, A. A., Hermanson, D., Zabrouskov, V., Wu, C. C., and MacCoss, M. J. (2023) Evaluating the performance of the astral mass analyzer for quantitative proteomics using data-independent acquisition, *J. Proteome Res.*, **22**, 3290-3300, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00357>.
49. Guzman, U. H., Martinez-Val, A., Ye, Z., Damoc, E., Arrey, T. N., Pashkova, A., Renuse, S., Denisov, E., Petzoldt, J., Peterson, A. C., Harking, F., Østergaard, O., Rydbirk, R., Aznar, S., Stewart, H., Xuan, Y., Hermanson, D., Horning, S., Hock, C., Makarov, A., Zabrouskov, V., and Olsen, J. V. (2024) Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition, *Nat. Biotechnol.*, <https://doi.org/10.1038/s41587-023-02099-7>.
50. Gillet, L. C., Navarro, P., Tate, S., Röst, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012) Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis, *Mol. Cell Proteomics*, **11**, O111.016717, <https://doi.org/10.1074/mcp.O111.016717>.
51. Bruderer, R., Bernhardt, O. M., Gandhi, T., Miladinović, S. M., Cheng, L. Y., Messner, S., Ehrenberger, T., Zanotelli, V., Butscheid, Y., Escher, C., Vitek, O., Rinner, O., and Reiter, L. (2015) Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues, *Mol. Cell Proteomics*, **14**, 1400-1410, <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044305>.
52. Kelstrup, C. D., Bekker-Jensen, D. B., Arrey, T. N., Hogrebe, A., Harder, A., and Olsen, J. V. (2018) Performance evaluation of the Q Exactive HF-X for shotgun proteomics, *J. Proteome Res.*, **17**, 727-738, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00602>.
53. Doellinger, J., Blumenschein, C., Schneider, A., and Lasch, P. (2020) Isolation window optimization of data-independent acquisition using predicted libraries for deep and accurate proteome profiling, *Anal. Chem.*, **92**, 12185-12192, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00994>.
54. Doellinger, J., Blumenschein, C., Schneider, A., and Lasch, P. (2023) Increasing proteome depth while maintaining quantitative precision in short-gradient data-independent acquisition proteomics, *J. Proteome Res.*, **22**, 2131-2140, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00078>.
55. Bekker-Jensen, D. B., Martínez-Val, A., Steigerwald, S., Rütger, P., Fort, K. L., Arrey, T. N., Harder, A., Makarov, A., and Olsen, J. V. (2020) A compact quadrupole-orbitrap mass spectrometer with FAIMS interface improves proteome coverage in short LC gradients, *Mol. Cell Proteomics*, **19**, 716-729, <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001906>.
56. Yang, Y., Liu, X., Shen, C., Lin, Y., Yang, P., and Qiao, L. (2020) In silico spectral libraries by deep learning facilitate data-independent acquisition proteomics, *Nat. Commun.*, **11**, 146, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13866-z>.
57. Lou, R., Liu, W., Li, R., Li, S., He, X., and Shui, W. (2021) DeepPhospho accelerates DIA phosphoproteome profiling through in silico library generation, *Nat. Commun.*, **12**, 6685, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26979-1>.
58. Van Puyvelde, B., Willems, S., Gabriels, R., Daled, S., De Clerck, L., Vande Castele, S., Staes, A., Impens, F., Deforce, D., Martens, L., Degroove, S., and Dhaenens, M. (2020) Removing the hidden data dependency of DIA with predicted spectral libraries, *Proteomics*, **20**, e1900306, <https://doi.org/10.1002/pmic.201900306>.
59. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., and Ralser, M. (2020) DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput, *Nat. Methods*, **17**, 41-44, <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>.
60. Moseley, M. A., Hughes, C. J., Juvvadi, P. R., Soderblom, E. J., Lennon, S., Perkins, S. R., Thompson, J. W., Steinbach, W. J., Geromanos, S. J., Wildgoose, J., Langridge, J. I., Richardson, K., and Vissers, J. P. C. (2018) Scanning

- quadrupole data-independent acquisition, part A: qualitative and quantitative characterization, *J. Proteome Res.*, **17**, 770-779, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00464>.
61. Messner, C. B., Demichev, V., Bloomfield, N., Yu, J. S. L., White, M., Kreidl, M., Egger, A. S., Freiwald, A., Ivosev, G., Wasim, F., Zelezniak, A., Jürgens, L., Suttorp, N., Sander, L. E., Kurth, F., Lilley, K. S., Mülleider, M., Tate, S., and Ralser, M. (2021) Ultra-fast proteomics with Scanning SWATH, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 846-854, <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00860-4>.
62. Fernandez-Lima, F., Kaplan, D. A., Suetering, J., and Park, M. A. (2011) Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.*, **14**, <https://doi.org/10.1007/s12127-011-0067-8>.
63. Ridgeway, M. E., Lubeck, M., Jordens, J., Mattias, M., and Melvin, A. P. (2018) Trapped ion mobility spectrometry: a short review, *Int. J. Mass Spectrom.*, **425**, 22-35, <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.01.006>.
64. Meier, F., Beck, S., Grassl, N., Lubeck, M., Park, M. A., Raether, O., and Mann, M. (2015) Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF): multiplying sequencing speed and sensitivity by synchronized scans in a trapped ion mobility device, *J. Proteome Res.*, **14**, 5378-5387, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00932>.
65. Meier, F., Brunner, A. D., Koch, S., Koch, H., Lubeck, M., Krause, M., Goedecke, N., Decker, J., Kosinski, T., Park, M. A., Bache, N., Hoerning, O., Cox, J., Räther, O., and Mann, M. (2018) Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer, *Mol. Cell Proteomics*, **17**, 2534-2545, <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR118.000900>.
66. Szyrwiell, L., Gille, C., Mülleider, M., Demichev, V., and Ralser, M. (2024) Fast proteomics with dia-PASEF and analytical flow-rate chromatography, *Proteomics*, **24**, e2300100, <https://doi.org/10.1002/pmic.202300100>.
67. Chen, S. (2006) Rapid protein identification using direct infusion nanoelectrospray ionization mass spectrometry, *Proteomics*, **6**, 16-25, <https://doi.org/10.1002/pmic.200500043>.
68. Meyer, J. G., Niemi, N. M., Pagliarini, D. J., and Coon, J. J. (2020) Quantitative shotgun proteome analysis by direct infusion, *Nat. Methods*, **17**, 1222-1228, <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00999-z>.
69. Cranney, C. W., and Meyer, J. G. (2021) CsoDIAq software for direct infusion shotgun proteome analysis, *Anal. Chem.*, **93**, 12312-12319, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02021>.
70. Jiang, Y., Hutton, A., Cranney, C. W., and Meyer, J. G. (2023) Label-free quantification from Direct Infusion Shotgun Proteome Analysis (DISPA-LFQ) with CsoDIAq software, *Anal. Chem.*, **95**, 677-685, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02249>.
71. Jiang, Y., and Meyer, J. G. (2024) 1.4 min plasma proteome profiling via nanoparticle protein corona and direct infusion mass spectrometry, *bioRxiv*, 2024.02.06.579213, <https://doi.org/10.1101/2024.02.06.579213>.
72. Miladinović, S. M., Kozhinov, A. N., Gorshkov, M. V., and Tsybin, Y. O. (2012) On the utility of isotopic fine structure mass spectrometry in protein identification, *Anal. Chem.*, **84**, 4042-4051, <https://doi.org/10.1021/ac2034584>.
73. Krokhnin, O. V. (2006) Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-A pore size C18 sorbents, *Anal. Chem.*, **78**, 7785-7795, <https://doi.org/10.1021/ac060777w>.
74. Gorshkov, A. V., Tarasova, I. A., Evreinov, V. V., Savitski, M. M., Nielsen, M. L., Zubarev, R. A., and Gorshkov, M. V. (2006) Liquid chromatography at critical conditions: comprehensive approach to sequence-dependent retention time prediction, *Anal. Chem.*, **78**, 7770-7777, <https://doi.org/10.1021/ac060913x>.
75. Pridatchenko, M. L., Perlova, T. Y., Ben Hamidane, H., Goloborodko, A. A., Tarasova, I. A., Gorshkov, A. V., Evreinov, V. V., Tsybin, Y. O., and Gorshkov, M. V. (2012) On the utility of predictive chromatography to complement mass spectrometry based intact protein identification, *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 2521-2529, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5350-3>.
76. Perlova, T. Y., Goloborodko, A. A., Margolin, Y., Pridatchenko, M. L., Tarasova, I. A., Gorshkov, A. V., Moskovets, E., Ivanov, A. R., and Gorshkov, M. V. (2010) Retention time prediction using the model of liquid chromatography of biomacromolecules at critical conditions in LC-MS phosphopeptide analysis, *Proteomics*, **10**, 3458-3468, <https://doi.org/10.1002/pmic.200900837>.
77. Sargaeva, N. P., Goloborodko, A. A., O'Connor, P. B., Moskovets, E., and Gorshkov, M. V. (2011) Sequence-specific predictive chromatography to assist mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in peptides, *Electrophoresis*, **32**, 1962-1969, <https://doi.org/10.1002/elps.201000507>.
78. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Lobas, A. A., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2020) DirectMS1: MS/MS-Free identification of 1000 proteins of cellular proteomes in 5 minutes, *Anal. Chem.*, **92**, 4326-4333, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05095>.
79. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Abdrakhimov, D. A., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2021) Boosting MS1-only proteomics with machine learning allows 2000 protein identifications in single-shot human proteome analysis using 5 min HPLC gradient, *J. Proteome Res.*, **20**, 1864-1873, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00863>.

80. Abdrakhimov, D. A., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Kjeldsen, F., Gorshkov, M. V., and Ivanov, M. V. (2021) Biosaur: An open-source Python software for liquid chromatography-mass spectrometry peptide feature detection with ion mobility support, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, e9045, <https://doi.org/10.1002/rcm.9045>.
81. Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., Lobas, A. A., Bubis, J. A., and Gorshkov, M. V. (2017) MS/MS-free protein identification in complex mixtures using multiple enzymes with complementary specificity, *J. Proteome Res.*, **16**, 3989-3999, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00365>.
82. Solovyeva, E. M., Bubis, J. A., Tarasova, I. A., Lobas, A. A., Ivanov, M. V., Nazarov, A. A., Shutkov, I. A., and Gorshkov, M. V. (2022) On the feasibility of using an ultra-fast DirectMS1 method of proteome-wide analysis for searching drug targets in chemical proteomics, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1342-1353, <https://doi.org/10.1134/S000629792211013X>.

ULTRAFast PROTEOMICS

Mini-Review

I. I. Fedorov^{1,2}, S. A. Protasov^{1,2}, I. A. Tarasova², and M. V. Gorshkov^{2*}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (National University),
141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

² Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics,
N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; e-mail: mike.gorshkov@gmail.com

The current stage of development of proteomic research in the field of biology, medicine, development of new drugs, population screening, or personalized approaches to therapy dictates the need to analyze large sets of samples within the reasonable experimental time. Until recently, mass spectrometry measurements in proteomics were characterized as unique in identifying and quantifying cellular protein composition, but low throughput, requiring many hours to analyze a single sample. This was in conflict with the dynamics of changes in biological systems at the whole cellular proteome level upon the influence of external and internal factors. Thus, the low speed of whole proteome analysis has become the main factor limiting the developments in functional proteomics, where it is necessary to annotate the intracellular processes not only in a wide range of conditions, but also over a long period of time. The enormous level of heterogeneity of tissue cells or tumors, even of the same type, dictates the need to analyze the biological system at the level of individual cells. These studies involve obtaining molecular characteristics for tens, if not hundreds of thousands of individual cells, including their whole proteome profiles. The development of mass spectrometry technologies providing high resolution and mass measurement accuracy, predictive chromatography, new methods for peptide separation by ion mobility and processing proteomic data based on artificial intelligence algorithms have opened a way for significant, if not radical, increase in the throughput of whole proteome analysis and led to the implementation of the novel concept of ultrafast proteomics. Work done just in the last few years has demonstrated proteome-wide analysis throughput of several hundred samples per day at a depth of several thousand proteins, levels unimaginable three or four years ago. The review examines the background of these developments, as well as modern methods and approaches that implement ultrafast analysis of the entire proteome.

Keywords: proteomics, mass spectrometry, peptides, proteins, ultrafast analysis, quantitative proteomics

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ КАНАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ БЕЛОМОРСКОГО БАССЕЙНА

© 2024 О.В. Карпова^{1*}, Е.Н. Виноградова^{1,2}, А.М. Мойсенович¹, О.Б. Пустовит¹,
А.А. Рамонова¹, Д.В. Абрамочкин¹, Е.С. Лобакова¹

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

² НИЦ «Курчатовский Институт», НБИКС Геномный Центр, 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.03.2024

После доработки 31.05.2024

Принята к публикации 19.06.2024

Оптогенетика как метод светуправляемой регуляции клеточных процессов базируется на применении канальных родопсинов, напрямую генерирующих фотоиндуцированные токи. Наибольшее количество генов канальных родопсинов идентифицировано у зеленых микроводорослей Chlorophyta, и запрос на увеличение числа функционально охарактеризованных канальных родопсинов и разнообразие их фотохимических параметров постоянно растет. Мы провели экспрессионный анализ генов катионных канальных родопсинов (CCR) в природных изолятах микроводорослей родов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* из уникальной зоны Полярного круга. Обнаруженный полноразмерный CCR транскрипт *Haematococcus lacustris* является продуктом альтернативного сплайсинга и кодирует белок H198CCR2, не обладающий фотохимической активностью. 5'-Концевой фрагмент транскрипта CCR *Bracteacoccus aggregatus* кодирует белок Ba34CCR, содержащий консервативный мембранный домен TM1–TM7 и короткий участок цитозольного фрагмента. При гетерологичной экспрессии фрагмента TM1–TM7 в культуре клеток СНО-K1 наблюдалась светозависимая генерация тока, параметры которого соответствуют характеристикам CCR. Впервые обнаруженный функциональный канальный родопсин *Bracteacoccus* не имеет близких гомологов CCR и может представлять интерес в качестве кандидата для оптогенетики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: канальные родопсины, зеленые водоросли, фотоиндуцированный ток, оптогенетика.

DOI: 10.31857/S0320972524080023 EDN: KEESUN

ВВЕДЕНИЕ

Канальные родопсины представляют особую группу интегральных мембранных ретиналь-связывающих белков, которые в ответ на активацию светом напрямую осуществляют пассивный ионный транспорт, в отличие от остальных родопсинов (в частности, зрительных), регулирующих ионные каналы опосредованно, через активацию энзиматических каскадов [1]. В природе канальные родопсины обнаружены преимущественно у

подвижных фототрофных организмов, микроводорослей Chlorophyta и Cryptophyta, где выполняют функции фоторецепторов, участвующих в фототаксисе. Впервые фотоэлектрический ответ при фототаксисе *in vivo* был показан на клетках зеленой водоросли *Haematococcus pluvialis* [2] и впоследствии детально изучен на зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [3]. Идентифицированные фоторецепторы CrChR1 и CrChR2 *C. reinhardtii* являются катионными канальными родопсинами (CCR) и различаются как по параметрам фотоиндукции, так и по кинетике фотоэлектрического ответа [3, 4]. Предполагается, что основную роль при фототаксисе выполняет CrChR2, в то время как CrChR1 участвует в защите от света высокой интенсивности.

Принятые сокращения: CCR – катионные канальные родопсины; RACE – метод быстрой амплификации концов кДНК.

* Адресат для корреспонденции.

Благодаря своим уникальным качествам канальные родопсины нашли широкое применение в оптогенетике – методе светууправляемой регуляции процессов в клетке. В оптогенетическом эксперименте при гетерологичной экспрессии в клетках-мишенях гены канальных родопсинов и ионных помп со специфичностью к катионам и анионам обеспечивают деполяризацию и гиперполяризацию клеточной мембраны и позволяют таким образом регулировать нейрональную активность [5]. Несмотря на огромный прогресс в поиске новых генов канальных родопсинов методами геномного анализа, количество генов, кодирующих белки с экспериментально подтвержденной функциональной активностью, все еще очень ограничено [6]. В результате до сих пор для оптогенетических исследований наиболее изученным и применяемым в различных модификациях остается катионный канальный родопсин CrChR2 зеленой водоросли *C. reinhardtii*.

Наш проект нацелен на поиск новых генов канальных родопсинов у одноклеточных водорослей Chlorophyta и Cryptophyta Беломорского бассейна и базируется на уникальной коллекции природных изолятов микроводорослей NAMSU (<https://depo.msu.ru/open/public/search?collection=algabiotech>), созданной на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ. Представленные здесь результаты получены в продолжение нашего исследования по поиску новых CCR в зеленых водорослях *Haematococcus* и *Bracteacoccus*. Ранее с помощью разработанного нами ПЦР-теста впервые было показано наличие гена CCR (34CCR) в микроводоросли рода *Bracteacoccus*; также в двух изолятах *Haematococcus lacustris* были обнаружены гены CCR (37CCR и негомологичные гены 98CCR1, 98CCR1-1), соответствующие уже идентифицированным генам CCR *H. lacustris* [7]. Таким образом, данный ПЦР-тест оказался эффективен не только для анализа таксономической группы на присутствие генов CCR, но и для анализа мультигенных семейств CCR.

Для изучения экспрессии обнаруженных CCR-генов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* были получены их транскрипты, проведен структурный анализ их белковых продуктов (H198CCR2 и Ba34CCR) и определена функциональная активность H198CCR2 и Ba34CCR при гетерологичной экспрессии в культуре клеток китайского хомьика СНО-K1. Мы показали, что белки H198CCR2 и Ba34CCR содержат 7 консервативных мембранных участков (TM1–TM7) трансмембранной локализации и способны к образованию гомодимеров, что типично для пространственной структуры канальных родопсинов. В электрофизиологических экспериментах с трансфицированными клетками СНО-K1 по методике пэтч-кламп было показано,

что экспрессируемый белок Ba34CCR способен к светозависимой генерации тока и по параметрам сопоставим с катионным канальным родопсином CrChR2 *C. reinhardtii*. Таким образом, мы впервые обнаружили и охарактеризовали функциональный катионный канальный родопсин из зеленой микроводоросли *Bracteacoccus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение штаммов зеленых водорослей (Chlorophyta) и условия культивирования подробно описаны ранее [7]. Для выделения тотальной РНК использовали активно растущие культуры *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 и *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15 в среде BG-11 при инкубации в течение 1–2 недель при 25 °C и освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР м⁻²·с⁻¹.

Выделение РНК и получение CCR-специфических транскриптов. Суммарную РНК выделяли из 5–10 мл культур с помощью набора RNeasy plus («Qiagen», США). Для экстракции РНК образцы (~100 мг сырого веса) лизировали механическим разрушением в дезинтеграторе FastPrep-24™ 5G («MP Biomedicals», США) в присутствии микробусин Lysing Matrix type A. Для приготовления кДНК брали 250 нг РНК; полноразмерные транскрипты получали по методу быстрой амплификации концов кДНК (RACE) с использованием набора Mint-RACE («Евроген», Россия). Полученные ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1%-ной агарозе и элюировали из геля с помощью набора Cleanup Mini («Евроген»). Далее, ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера (ЦПК «Геном» при ИМБ РАН, Россия), последовательности выравнивали и совмещали по участкам гомологии (BLASTn, NCBI).

Структурно-функциональные характеристики транслированных продуктов CCR-специфических транскриптов и 3Д-моделирование. Для анализа транслированных аминокислотных последовательностей продуктов полученных CCR-транскриптов использовали построение гомологии с ранее идентифицированными белками CCR Chlorophyta методом множественного выравнивания CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). 3Д-Моделирование выполняли в программе SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) с использованием кристаллической структуры CrChR2 *C. reinhardtii* в качестве матрицы.

Гетерологичная экспрессия родопсинов в культуре клеток СНО-K1. Конструирование экспрессионных плазмид. Для экспрессии в клетках млекопитающих нуклеотидные последовательности транскриптов H198CCR2 (полная рамка

считывания, 350 а.о.) и Ва34CCR (1–295 а.о.) были кодон-оптимизированы (GeneArt; «Thermo Fisher Scientific», США), выполнен химический синтез обоих генов («Евроген») и проведено их субклонирование в экспрессионный вектор pcDNA3.1 eYFP[8] по рестрикционным сайтам BamHI и NotI.

Трансфекция экспрессионных плазмид в культуру клеток CHO-K1. Для гетерологичной экспрессии белков Ва34CCR и Н198CCR2 использовали иммортализованную линию эпителиальных клеток яичников китайского хомячка *Crictulus griseus* CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells). Трансфекцию клеток экспрессионными векторами pcDNA3.1 eYFP, Ва34CCR и pcDNA3.1 eYFP, Н198CCR2 выполняли с использованием реагента Lipofectamine® LTX with Plus™ Reagent («Thermo Fisher Scientific»). Маркером успешной трансфекции являлась флуоресценция клеток под действием света при длине волны 490 нм. Трансфицированные клетки содержали в стандартных условиях культивирования в питательной среде DMEM/F12 («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; «HyClone», США), 2 мМ глутамина («Sigma-Aldrich», США) и 100 мкг/мл пенициллин-стрептомицина («Gibco», «Thermo Fisher Scientific») при 37 °C в атмосфере 21% O₂ и 5% CO₂. Через 24 ч после трансфекции в культуральную среду добавляли 1 мкМ транс-ретинала R2500 («Sigma-Aldrich»).

Флуоресцентная микроскопия экспрессированных родопсинов. Для определения локализации экспрессированных белков Ва34CCR и Н198CCR2 трансфицированные клетки линии CHO-K1 обрабатывали флуоресцентными красителями, специфическими для цитоплазматических мембран (CellBrite Red; «Biotium», Великобритания) и ядер (Hoechst 33342, «Thermo Fisher Scientific»). Для этого клетки инкубировали с 10 мкМ CellBrite Red в нормальной среде, содержащей 1% ДМСО и 5 мкг/мл Hoechst 33342, в течение 15 мин, дважды промывали буфером PBS и один раз – DMEM. Прижизненные изображения были получены с использованием системы жизнеобеспечения на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом Apo TIRF 63×/1,49. Все захваты изображений были получены при одинаковых настройках динамического диапазона.

Определение фотоэлектрической активности родопсинов Ва34CCR и Н198CCR2. Электрофизиологические эксперименты проводили через 48 ч после трансфекции. Светоиндуцированный ток Н198CCR2 (I₉₈) или Ва34CCR (I₃₄) регистрировали в трансфицированных клетках CHO-K1 с помощью техники пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме фиксации потенциала.

Использовали усилитель Axopatch 200A («Molecular Devices», США).

Покровное стекло с культурой CHO-K1 помещали в экспериментальную камеру и перфузировали при комнатной температуре (23 ± 0,5 °C) раствором следующего состава: 150 мМ NaCl; 5,4 мМ KCl; 1,8 мМ CaCl₂; 1,2 мМ MgCl₂; 10 мМ глюкозы; 10 мМ HEPES (pH 7,6). Для регистрации выбирали только клетки, испускавшие зеленое флуоресцентное свечение при облучении их возбуждающим светом с длиной волны 490 нм. Пэтч-пипетки сопротивлением 2–2,5 МОм изготавливали из боросиликатного стекла («Sutter», США) и заполняли раствором следующего состава: 140 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 5 мМ EGTA; 4 мМ MgATP; 10 мМ HEPES; 0,03 мМ Na₂GTP (pH 7,2). Перед началом регистрации тока компенсировали емкость пипетки, емкость исследуемой клетки и сопротивление доступа, а также выключали как проходящий свет, так и свет с длиной волны 490 нм. При обработке данных амплитуды токов нормировали на емкость клетки и выражали в пА/пФ.

Для регистрации I₉₈ и I₃₄ использовали два различных протокола, позволяющих изучить соответственно зависимость плотности токов от интенсивности возбуждающего света и вольт-амперную зависимость токов. В обоих протоколах использовали поддерживаемый потенциал –60 мВ. В первом протоколе устанавливали значение потенциала, равное 0 мВ, а затем включали свет 490 нм на 1 с; возникающий при этом выходящий ток являлся светоиндуцированным, поскольку ток утечки при потенциале 0 мВ отсутствует. Последовательно подавали свет интенсивностью 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50 и 100% от максимально возможной для источника света CoolLED pE-100 («CoolLED», Великобритания). Абсолютные значения интенсивности света определяли с помощью датчика PM160T («Thorlabs», США). Во втором протоколе потенциал ступенчато изменяли от поддерживаемого потенциала до значений от –100 до +60 мВ с шагом 20 мВ на 2 с, при этом во время каждой из ступенек на 1 с включали свет 490 нм с интенсивностью 50% от максимума. Светоиндуцированный ток в этом случае вычисляли как разность между током в присутствии и при отсутствии возбуждающего света при каждом из значений мембранного потенциала. В обоих случаях измеряли как максимальное (пиковое) значение светоиндуцированного тока, так и уровень плато тока (среднее значение тока в интервале 500–1000 мс подачи света). Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью программы GraphPad Prism 7. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение CCR-транскриптов из зеленых микроводорослей *Haematococcus* и *Bracteacoccus*. Суммарную РНК *Haematococcus* и *Bracteacoccus* выделяли, как описано в разделе «Материалы и методы», после чего CCR-специфические транскрипты получали по методу быстрой амплификации концов кДНК (RACE). Процедуру RACE выполняли последовательно за 3 раунда ПЦР, согласно табл. 1.

В результате проделанной работы были получены полноразмерный транскрипт гена CCR *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 и 5'-концевой фрагмент транскрипта гена CCR *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15.

Транскрипт CCR *Haematococcus* не является продуктом ни одного из идентифицированных нами генов: 98CCR1 (GenBank: ON643073.1) и 98CCR1-1 (GenBank: ON643074.1), как предполагалось исходно, но впоследствии мы идентифицировали его как ген 98CCR2 (данные не приведены). Гомология между полученным транскриптом H198CCR2 (GenBank: PP103616) и геном 98CCR1 составляет 81,9%.

Нам не удалось получить полноразмерный транскрипт гена CCR *Bracteacoccus* NAMSU-BM-5/15, но определено, что 5'-концевой фрагмент транскрипта Ba34CCR (GenBank: PP103617) является продуктом ранее идентифицированного гена 34CCR (GenBank: ON643076.1). К настоящему времени транскрипт Ba34CCR целиком прокартирован по геномной последовательности; установлено, что соответствующий участок гена содержит 4 интрона.

Структурно-функциональные характеристики белковых продуктов H198CCR2, Ba34CCR и 3Д-моделирование. Для определения структурно-функциональных характеристик использовали построение гомологии путем выравнивания транслированных аминокислотных последовательностей нативных CCR-транскриптов, полу-

ченных методом гомологичного клонирования [9] либо идентифицированных при анализе транскриптомов [3, 10, 11].

На рис. 1 представлено выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей продуктов генов CCR *Haematococcus* и их нативных транскриптов. Как показано на рис. 1, продукты H137CCR, H198CCR1, H198CCR2 и H198CCR1-1 содержат 7 мембранных спиралей и консервативные аминокислотные остатки, типичные для канальных родопсинов. Присутствуют участок связывания ретиналя Lys257, Glu (82, 83, 101 и 123), а также Glu90, определяющий специфичность родопсинов к переносу катионов [1, 6]. Также консервативными являются Glu235 и Ser245, участвующие в определении pH-зависимости спектральных характеристик CCR-белков. Как было показано Hou et al. [9] на CCR *Mesostigma viride*, замена Ser в положении 245 на Glu приводила к полной потере канальной активности. Ser321 является единственным сайтом фосфорилирования белка CrChR2, который располагается в консервативном участке цитозольной петли, примыкающей к трансмембранному домену TM7 (helix 7). Мы не смогли определить наличие сайта фосфорилирования у H198CCR2, поскольку 3'-конец транскрипта является низкогомологичным.

Ближайшим гомологом продукта частичного транскрипта Ba34CCR *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15 является CrChR2 *C. reinhardtii* (59,2% идентичности при 73% покрытия последовательности). На рис. 2 представлено выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей Ba34CCR и нативных CCR-транскриптов из разных видов *Chlamydomonas*. Транскрипт Ba34CCR кодирует целиком мембранный фрагмент TM1–TM7 со всеми консервативными аминокислотными остатками в наличии и уникальный Lys-обогащенный фрагмент, не имеющий гомологии.

Таким образом, на основании анализа первичной структуры продуктов нативных тран-

Таблица 1. ПЦР-праймеры для амплификации кДНК CCR *Haematococcus* и *Bracteacoccus*

RACE, раунды		Ген-специфические праймеры	
		<i>Haematococcus</i>	<i>Bracteacoccus</i>
RACE 5'	раунд 1	CCR_rev: CCCTTGGGMACDGTGRTGGTA	34CCR-ORF_rev: ACCACAGTGTGCGGACGA
	раунд 2	Hae-687_rev: GTTGGGTGGACTCATAGCCGCAG	34CCR1_rev: CCGTAGCACAACCAATGCAGA
	раунд 3	98CCR1_rev: GGTGCGTTTGGAGTAGTCATCC	34CCR2_rev: CAAACCCGTCAGGTTGGACAAG
RACE 3'	раунд 1	CCR_fwd: YGGHTGGGARGAGRTBTACGT	34CCR1_fwd: CTTGTCCAACCTGACGGGTTTG
	раунд 2	Hae-536_fwd: GGAGTGGTTACTGTATGCCAGT	34CCR2_fwd: TCTGCATTGGTTTGTGCTACGG
	раунд 3	98CCR1_fwd: GGATGACTACTCCAAACGCACC	34CCR3_fwd: TCGTCGCGCACACTGTGGT

H137CCR	-----	0
HNG2ChR	MTAKTDQGGQTVKWLTTKKALEERRGLDMEAAA-KR-----IALAEVL	42
H198CCR2	-----MLPNMMGYSLAAL-TLLCVSPYPRAEASLSKFLLFDEGPG	41
HpChR1	-----MRICLGLLAVA-LATLTLPCCPVNASLSKFLLFFGNSPG	38
H198CCR1	-----	0
CrChR2	-----MDYGGALS-----	8
HdChR	-----MSVNLSLWEHGEDAGYGHWYQ-----	21
HpChR	-----MESLVMRSLLAGSTQPTNLLPGDKVSAGYDHYWI-----	34
H198CCR1-1	-----	0
HELIХ 1		
H137CCR	-----	0
HNG2ChR	VHGTADTTIRPKDAEAFSRMTANEDWACGPADDCFCYKWNKSHGNDSEKLGAKVMSWIVF	102
H198CCR2	LVPNSTVAYGEELYRGFHTLEANSDDWVGPRDTCYCEKWAWSHGTDKDEKLGAIVAMFIVF	101
HpChR1	LVPNNTVAYGEELYRGFHTLEANGDWWVGPRDSCYCEKWAWSHGTDKDEKLGAIVAMFIVF	98
H198CCR1	-----	0
CrChR2	-----AVGRELLFVTNPV-VVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGNTGAQASNVLQWLAA	60
HdChR	-----GTPNGT-----LVCSHEDNIAWLKNGKTDEMLGANICMMAF	59
HpChR	-----NTGDEI-----LVCTEEANAALWESHGTEKGTGVLCQWFAF	72
H198CCR1-1	-----	0
HELIХ 2		
H137CCR	-----AQLVIAIFHIESPSTMYLSTGNQVLWSX	29
HNG2ChR	AIC-----GGWEEVYVCIIHLAHVCAIWHITDSPSTLYLSTGNQALWLR	147
H198CCR2	GSCVGLIFYGFAAWRSTCGWEEVYVCIELCHVLAIFHIESPSTLYLSTGNQVLWLR	161
HpChR1	GSCVGLIFYGFAAWRTTCGWEEVYVCIELAHVLAIFHIESPSTLYLSTGNQVLWLR	158
H198CCR1	-----AHVLAIFHIESPSTLYLSTGNQVLWLR	29
CrChR2	GFISILLMFYAYQTWSTCGWEEIYVCAIMVKVILFFFFKFNPSMLYLATGHRVQWLR	120
HdChR	AACLCLCLFYAYSTWRATCGWEEVYVCLVMVKVMIIVFHENDSPATLYLSTGNFIMWLR	119
HpChR	CACIIILMIYAYHTWKATSGWEEVYVCCVLIKVLMIYHFDHPCTLYLSTGNWILWLR	132
H198CCR1-1	-----IYHFDHPCTLYLSTGNWILWLR	23
HELIХ 3		
HELIХ 4		
H137CCR	YGEWLLSCPVL IHLNLTGRKDEXCKRTMGLISDIGPMVHGTSEHMSPPANYRKVIVRF	89
HNG2ChR	YAEWLLSCPVL IHLNLTGMKNDYSKRTMGLLVSDIGTIVFGCTAAMAGVGYLKILFWF	207
H198CCR2	YAEWLLSCPVL IHLNLTGMKDDYSKRTMGLLVSDIGTIVFGTTAAMSPPGYKIIWF	221
HpChR1	YAEWLLSCPVL IHLNLTGMKDDYSKRTMGLLVSDIGTIVFGTTAAMSPPNYKVIWF	218
H198CCR1	YAEWLLSCPVL IHLNLTGMKDDYSKRTMGLLVSDIGTIVSGTTAAMSPPNYK-----	84
CrChR2	YAEWLLTSCPVL IHLNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATASAMA-TGYVKVIFFC	179
HdChR	YGEWLLSCPVL IHLNLTGLQDQYSKRTMGLLVSDLTITMGVTAALC-GNYVKWIFFI	178
HpChR	YGEWLLTSCPVL IHLNLTGLKNDYKRTMWLLVSDIGCVVMGVTAALC-YDYKKWIFYC	191
H198CCR1-1	YGEWLLTSCPVL IHLNLTGLKNDYKRTMWLLVSDIGCVVMGVTAALC-YDYKKWIFYC	82
HELIХ 5		
HELIХ 6		
H137CCR	WGLWY-----	94
HNG2ChR	MGLSYGCYSFFLVAKVYIEAYHTVPKGICRTIVRMLAYDFFGSWCMFPIIFALGP	267
H198CCR2	CGLCYGMITFYLAQVYIEAYHTVPKGICRIVRAMAWDYFGSWCMFPIIFVLGP	281
HpChR1	CGLSYGVITFYLAQVYIEAYHTVPKGICRIVRFMAWDYFGSWCMFPIIFVLGP	278
H198CCR1	-----	84
CrChR2	LGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRQVVTGMWLLFFVSWGMFPIIFILGP	239
HdChR	LGLCYGVNTYFHAQVYIESYHIVPGVCRVCRVMWCFGAWTCYPLLFVFGP	238
HpChR	LGLCYGNTYFHAQVYIEGYHTVPKGICRNVVRLMAWCFYMAWTFPIIFVLGP	251
H198CCR1-1	LGLCYGNTYFHAQVYIEGYHTVPKGICRNVVRLMAWCFYMAWTFPIIFVLGP	97
HELIХ 7		
H137CCR	-----	94
HNG2ChR	ITAYGSMIAHFILDITSNLWGLGGHLLRVKIEHEILIHGNITRKTKITVAGDPVEVEEY	327
H198CCR2	ISAYGSMIAHQVLDITSNLWLSMGHMLRVKVSQKPRVSLAGCGRHYLSAGRASSSCQL	341
HpChR1	ISAYGSMIAHQVLDITSNIWSMAGHFLRVKIEHEIIVHGNITKTKITLAGEPVEVEEY	338
H198CCR1	-----	84
CrChR2	LSVYGSTVGHTIIDLMSNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTKLNIIGTEIEVETL	299
HdChR	LSYNASIAHTIIDIFSKQVWGFVGHYLRKIEHEIIVHGNLVKPTKVKGMEIDAEM	298
HpChR	LSYGSTIILHTVADVLSQLWTLGGHLLRVKIEHEIIVHGNLVKPTKVTVAGEDKEVEEM	311
H198CCR1-1	-----	97
HELIХ 8		
H137CCR	-----	94
HNG2ChR	VDEAEAA-EEDPKVVMKGTQDLRN-----	350
H198CCR2	-----AARLDIVIV-----	350
HpChR1	IDSNEVDPAEMDQVQDKGTQA-----	359
H198CCR1	-----	84
CrChR2	VEDEAEAG----AVNKGTKGYASRESFLVMRDKMKEKIDVRASLDNSKEVEQEQAARA	354
HdChR	VEKD-EEG----AI-----	307
HpChR	VDSM-EEG----AKDNGTSALAGRESFIIMRDRMKQKIEVRAS-----	350
H198CCR1-1	-----	97

Рис. 1. Выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей (CLUSTAL Omega) продуктов генов CCR *Haematococcus* и их нативных транскриптов. H137CCR, 94 а.о.; H198CCR1, 84 а.о.; H198CCR1-1, 97 а.о. – фрагменты генов CCR *H. lacustris* [7]; H198CCR2, 350 а.о. – нативный транскрипт гена 98CCR2; нативные транскрипты – HpChR1 *H. pluvialis* (*lacustris*), 677 а.о. (GenBank: JN596950, [9]); HpChR *H. pluvialis* (*lacustris*), 449 а.о. [11]; HNG2ChR *Haematococcus* sp. NG2, 350 а.о. [11]; HdChR *H. droebakensis* (GenBank: KF992059, 307 а.о. [10]); CrChR2 *C. reinhardtii*, 737 а.о. (GenBank: AF508966, [3]). Функционально значимые аминокислотные остатки (даны в нумерации CrChR2) выделены цветом: Glu (82, 83, 90, 97, 101 и 123) – красным; Glu235 и Ser245 – голубым; Lys257 – зеленым; Ser321 – желтым

Ba34CCR	-----MSADFIMRG---L-LNAAA	15
CaChR1	MDTLAWARELLSTAHDATPATAT----PST-DHSTPSTDHGSGETFN--VTITIGGGH	52
CyChR1	MDTLAWARELLSSGHGDTATDS----GHGDTDSGGHSDSHDAVAHN--VTLLIAPPH	53
CrChR2	-----MASMAFSAISLASAMRSLQASGNGPFEHDAPPDNCSELTYPGCLNDFYCNPA-	53
CrChR1	MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYV--FHRAH--ERMLFQTS-	55
CrChR2	-----MDYGGALSAVG--RELLFVTN-	19
HELIX 1		
Ba34CCR	ATTDSHAEDT-----SSGHDDHAEACYCLA-VHSHGANYEKIMMILQWFMFAFSIG	66
CaChR1	HGGHAGPVDN-SIVIGGIDGWIAIPAGDCYAGWYVSHGSSFEATFAHVCQWSIFAVCIL	111
CyChR1	AGGHAGPTDT-SQGITGIDGWIAIPAGDCYAGWYVSHGSSFEATFAHVCQWSIFAVCVL	112
CrChR2	----YGLADAGNYCYVQSAVGKLAIVQTDQLSWLYSHGSSGAKAASIAFQWLAFATAVI	169
CrChR1	-----YTLENNGVSICIPN-----NGQCFLANLKSNGTNAEKLAAAILQWITFALSAL	104
CrChR2	----PVVNGSV--LVP-----EDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNLQWLAAGFSIL	65
HELIX 2		
Ba34CCR	CLCFYAYHSFKATCGWEEVYVCIILIKVLIIFATYSPCTVTQVNGVTPWLRYGWL	126
CaChR1	SLLWYAWQYWKATCGWEEVYVCCILVFICFELYHFDSPCSLYLSTANIVNWLRYSEWL	171
CyChR1	SLLWYAYQYWKATCGWEEVYVCCILVFICFELYHFDSPCSLYLSTSNVNVNWLRYSEWL	172
CrChR2	GLMFYAWDTWKATTGWEEVYVCTIILIKVLIIFKFEIPCSLYLPTGNVWLWLYAHL	169
CrChR1	CLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATICMIKFIIYFHFDEPAVYSSNGNKTVWLYRYAHL	164
CrChR2	LLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEVMKVILIFFFFKKNPSMLYLATGHRVQWLYRYAHL	125
HELIX 3		
Ba34CCR	LTCPVILIHLSNLTGLKNNSKRTMMLMSDLGTIVMGITAAALSSSPIKIIFFCIGLCYG	186
CaChR1	LCCPVILIHLSNLTGLSDDYGRRTMGLLVSDIATIVFGITAAMLVSWPKIIFYLIGFTMC	231
CyChR1	LCCPVILIHLSNLTGLSDDYGRRTMGLLVSDIATIVFGITAAMLVSWPKIIFYLIGFTMC	232
CrChR2	LTCPVILIHLSNLTGLKDDYNKRTMRLLVSDIGTIVMGVTSAMTVGYLKWIFFAIGLLYG	229
CrChR1	LTCPVILIHLSNLTGLANDYNKRTMGLLVSDIGTIVMGTTAALSKGYVRVIFFLMGLCYG	224
CrChR2	LTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVMGATSAMATGYVVKVIFFLGLCYG	185
HELIX 4		
Ba34CCR	CNTWFAAKVYVEAYHSVPKGE CRTIVKVMMAWFFASWTAFFILFVMGPFGHGLTYGG	246
CaChR1	CYTFYLAACKVLESFHVQVPGKICRHLVKAMAITYYVGWGFPLIFLFGQSGFKKISPYAD	291
CyChR1	CYTFYLAACKVLESFHVQVPGKICRHLVKAMAITYYVGWGFPLIFLFGQSGFKKISPYAD	292
CrChR2	SNTYFSAKVYIEAYHTVPKGRCRVIVRLMAYCFYLAWTFMFPILFALGPEGMGQMSAYMS	289
CrChR1	IYTFYFNAKVYIEAYHTVPKGRCDLVRYLAWLYFCSWAMFPVLFLGPEFGHINQFNS	284
CrChR2	ANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMMAWLFVSWGMFPILFILGPEFGFVLSVYGS	245
HELIX 5		
Ba34CCR	IYAHTVVDVFMNLWGLFGHHLRIKVRGTQKKR-----VKTQKKGPKKGDARM-----	294
CaChR1	VIASSFGDLISNMFGLLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEDE	351
CyChR1	VIASSFGDLISNAFGMLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEDE	352
CrChR2	TILTITADVLSKIWGLLGHHLRVKIYQHILIHGDIRKTTMQVGGEDVEEVEFVDEDE	349
CrChR1	ATIAHAILDLASNAWSMMGHFLRVKIHIEHILYGDIRKKQKVNVAQEMEVETMVHEED	344
CrChR2	TVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHIEHILIHGDIRKTTKLNGGTEIEVETLVEDEAE	305
HELIX 6		
Ba34CCR	-----TGPPAWPAVRHQ-KQCGMSC---LHQ---GEATSCGRH-----	325
CaChR1	D-TVKHSTKELANRGSFIVMRGNMKAQGIDVRASLDMEDEEGMG-----	396
CyChR1	D-TAKHSTKELANRGSFIVMRDKMKEQGIDVRASLDMEDEEARTG-----	397
CrChR2	EGV-RQANTQLANRESFVHMAEQMKNGIEVRATYDTGVDKEM-----	391
CrChR1	E-TQKVPTAKYANRDSFIIMRDLKEKGFETRASLDGDPNGDAEANAAGGKPGMEMGKM	403
CrChR2	AGAVNKGTKGYASRESFLVMRDKMKEGIDVRASLDNSKEVEQEQAARA---AMMMNG	361
HELIX 7		
Ba34CCR	-----VKTQKKGPKKGDARM-----	294
CaChR1	VIASSFGDLISNMFGLLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEDE	351
CyChR1	VIASSFGDLISNAFGMLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEDE	352
CrChR2	TILTITADVLSKIWGLLGHHLRVKIYQHILIHGDIRKTTMQVGGEDVEEVEFVDEDE	349
CrChR1	ATIAHAILDLASNAWSMMGHFLRVKIHIEHILYGDIRKKQKVNVAQEMEVETMVHEED	344
CrChR2	TVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHIEHILIHGDIRKTTKLNGGTEIEVETLVEDEAE	305

Рис. 2. Выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей (CLUSTAL Omega) продуктов нативных CCR-транскриптов *Bracteacoccus* и *Chlamydomonas*. Ba34CCR, 325 а.о. – частичный транскрипт гена 34CCR *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15; нативные транскрипты – CrChR2 *C. reinhardtii*, 737 а.о. (GenBank: AF508966, [3]); CaChR1 *C. augustae*, 715 а.о. (GenBank: JN596951, [9]); CrChR2 *C. raudensis*, 635 а.о. (GenBank: JN596949, [9]); CyChR1 *C. yellowstonensis*, 717 а.о. (GenBank: JN596948, [9]). Функционально значимые аминокислотные остатки (даны в нумерации CrChR2) выделены цветом: Glu (82, 83, 90, 97, 101 и 123) – красным; Glu235 и Ser245 – голубым; Lys257 – зеленым; Ser321 – желтым

скриптов H198CCR2 и Ba34CCR мы делаем вывод, что кодируемые белки содержат 7 консервативных мембранных участков (TM1–TM7), наряду с функционально значимыми аминокислотными остатками, характерными для канальных родопсинов. 3Д-Модели белков H198CCR2 и Ba34CCR также продемонстрировали типичную для канальных родопсинов пространственную структуру: трансмембранную локализацию фрагмента TM1–TM7 и формирование гомодимеров (рис. 3). Эти результаты позволяют идентифицировать белки

H198CCR2 и Ba34CCR как канальные родопсины и указывают на их возможную функциональную активность.

Определение функциональной активности канальных родопсинов Ba34CCR и H198CCR2. Эта задача была выполнена на экспериментальной базе, впервые предложенной Nagel et al. [12, 13]. Было показано, что при экспрессии в ооцитах *Xenopus laevis* или в животных клетках (HEK293, ВНК) канальные родопсины *C. reinhardtii* функционируют как свето-зависимые катионные каналы.

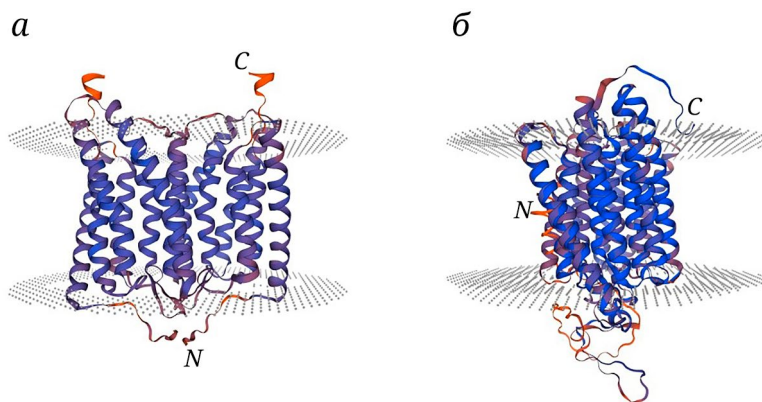


Рис. 3. 3Д-Модели идентифицированных канальных родопсинов (SWISSMODEL) Va34CCR (а) и H198CCR2 (б). В качестве матрицы взята 6e1d.1.A, кристаллическая структура CrChR2 *C. reinhardtii*. N и C указывают локализацию концов полипептидной цепи. Цветовой код (от красного к синему) показывает уровень гомологии с матрицей

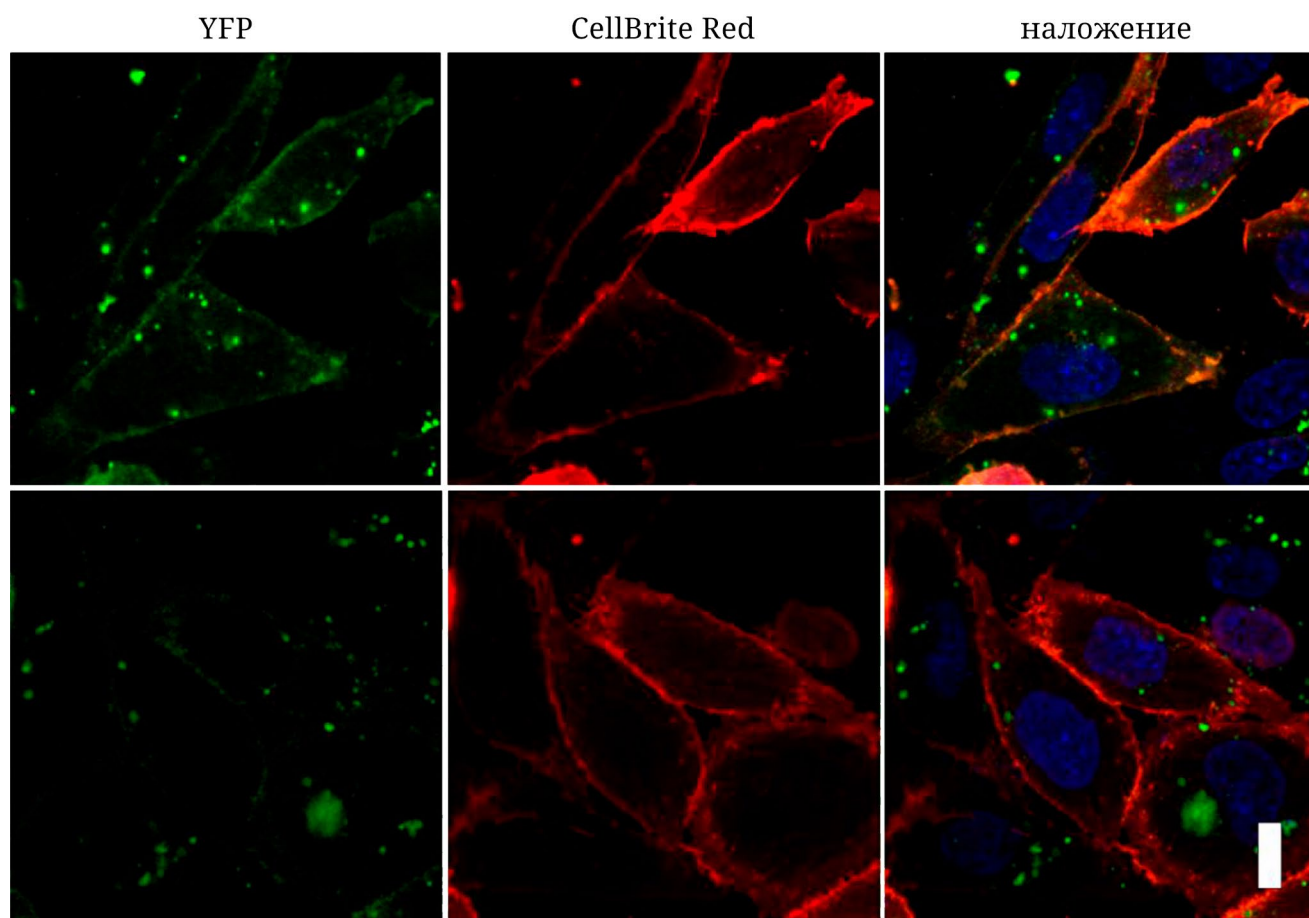


Рис. 4. Исследование локализации экспрессированных родопсинов Va34CCR и H198CCR2 в клетках CHO-K1 методом прижизненной конфокальной микроскопии: Va34CCR-YFP (верхний ряд) и H198CCR2-YFP (нижний ряд). Клеточные мембраны окрашены CellBrite Red, ядра окрашены Hoechst 33342. Линейка – 10 мкм

При этом не только полноразмерные белки, но и их TM1–TM7-фрагменты способны к фотоиндукции ионных токов, которые можно детектировать методом пэтч-кламп (patch-clamp). Таким образом, экспериментальная задача данного этапа заключалась в определении фотоэлектрической актив-

ности родопсинов Va34CCR и H198CCR при гетерологической экспрессии в клетках млекопитающих.

Гетерологичная экспрессия Va34CCR и H198CCR2 в клетках культуры CHO-K1. Для экспрессии в клетках млекопитающих кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательно-

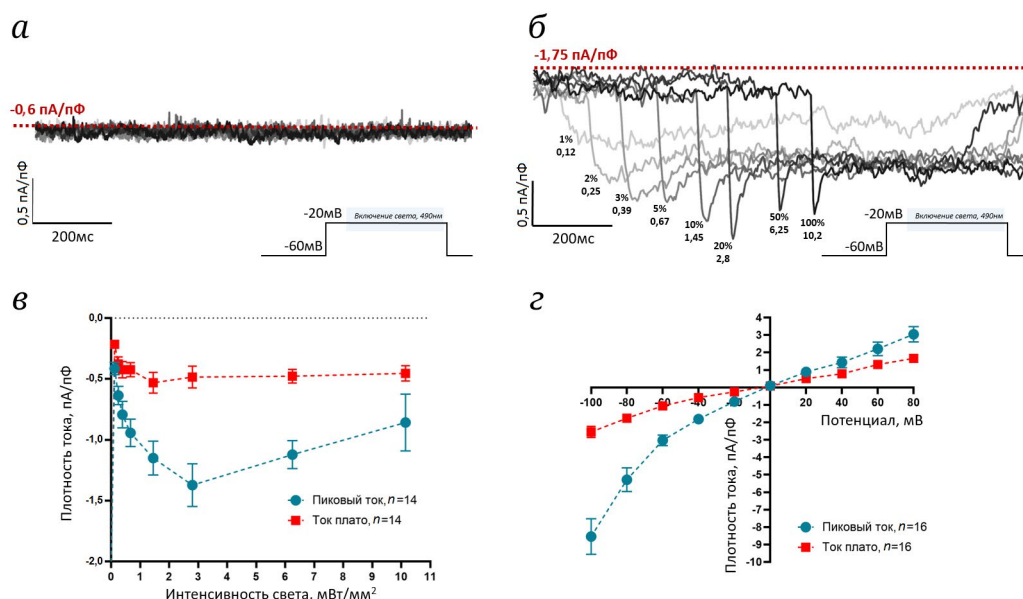


Рис. 5. Характеристика токов, генерируемых белками Ba34CCR и H198CCR2 при экспрессии в клетках CHO-K1. *а* – Репрезентативный пример оригинальных записей тока через H198CCR2 (I_{98}), индуцированного включением света с длиной волны 490 нм, различной интенсивности при уровне потенциала -20 мВ. *б* – Репрезентативный пример оригинальных записей тока через Ba34CCR (I_{34}) различной интенсивности, индуцированного включением света с длиной волны 490 нм (интенсивность указана у пика каждой из кривых в процентах от максимальной и в абсолютных значениях мВт/мм²), при уровне потенциала -20 мВ. *в* – Зависимость пикового тока I_{34} и тока плато I_{34} от уровня интенсивности света 490 нм. *г* – Вольтамперные кривые пикового тока и стационарного тока (плато) I_{34} , индуцируемого светом 490 нм, при интенсивности 50% от максимума (6,25 мВт/мм²).

сти кДНК H198CCR2 и Ba34CCR были субклонированы в экспрессионный вектор pcDNA3.1 eYFP, как описано в разделе «Материалы и методы». При этом анализируемые гены транскрибируются с высокоэффективного промотора цитомегаловируса P_{CMV} и транслируются в одной рамке с YFP в качестве флуоресцентного маркера. Полученные экспрессионные плазмиды pcDNA3.1 eYFP. Ba34CCR и pcDNA3.1 eYFP. H198CCR2 использовали для трансфекции immortalized линии эпителиальных клеток яичников китайского хомячка CHO-K1. Уровень экспрессии и внутриклеточную локализацию белковых конъюгатов Ba34CCR-YFP и H198CCR2-YFP в трансфицированных клетках определяли с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии после обработки клеток специфическими красителями.

Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 4. Сравнение собственного свечения YFP-конъюгатов Ba34CCR и H198CCR2 с окрашиванием клеток CellBrite Red однозначно определяет локализацию экспрессированных белков в цитоплазматической мембране. При этом уровень экспрессии полноразмерного белка H198CCR2 воспроизводимо наблюдался ниже уровня экспрессии мембранного фрагмента TM1–TM7 белка Ba34CCR.

Определение фотоэлектрической активности экспрессированных родопсинов Ba34CCR и H198CCR2. На рис. 5 показаны результаты экс-

периментов с клетками CHO-K1, трансфицированными плазмидами pcDNA3.1 eYFP. Ba34CCR и pcDNA3.1 eYFP. H198CCR2.

В клетках, экспрессирующих H198CCR2, включение света с длиной волны 490 нм при отсутствии проходящего света при мембранном потенциале -20 мВ не вызывало появления выраженного входящего или выходящего тока, I_{98} (рис. 5, *а*), либо же этот ток находился на уровне шума. Поэтому исследования зависимости тока от интенсивности и мембранного потенциала провести не удалось.

В клетках, экспрессирующих Ba34CCR, включение света с длиной волны 490 нм при отсутствии проходящего света при мембранном потенциале -20 мВ вызывало появление входящего тока, I_{34} (рис. 5, *б*), который при значениях интенсивности света от 0,67 мВт/мм² и выше имел выраженную пиковую компоненту, инактивирующуюся в течение 20–65 мс, и стационарную компоненту (плато). Среднее значение постоянной времени для инактивации пикового I_{34} при потенциале -60 мВ составило $11,3 \pm 0,78$ мс ($n = 14$). Среднее значение деактивации тока плато I_{34} при выключении света составило $25,5 \pm 2,5$ мс ($n = 14$). Наблюдаемая зависимость может быть объяснена десенситизацией каналов, образованных белком Ba34CCR.

Амплитуда пикового тока и тока плато I_{34} имели позитивную зависимость от интенсивно-

сти света 490 нм вплоть до значения 2,8 мВт/мм². При большем увеличении интенсивности света наблюдали снижение амплитуды пикового тока (рис. 5, б и в). При отрицательных значениях мембранного потенциала как пиковый ток, так и ток плато имеют входящее направление. При переходе через 0 мВ и положительных значениях мембранного потенциала направление тока меняется на выходящее (рис. 5, г). Таким образом, 0 мВ является реверсивным потенциалом для тока I_{34} при экспериментальных условиях, указанных в разделе «Материалы и методы».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С расширением оптогенетических исследований существенно возрастает потребность в увеличении разнообразия функциональных характеристик канальных родопсинов для решения различных экспериментальных задач. Именно поэтому в поисках новых генов-кандидатов для оптогенетики исследователи по-прежнему обращаются к анализу микроводорослей Chlorophyta, огромной группы фототрофных организмов, отличающейся многообразием форм и сред обитания. По данным на 2021 год [6], при тестировании 56 генов CCR Chlorophyta (из 164 идентифицированных) функциональная активность была обнаружена у 40 генов; также появились первые данные об идентификации и функциональной активности генов анионных канальных родопсинов (ACR) у зеленых водорослей [11]. Мы посчитали актуальным проанализировать гены канальных родопсинов природных изолятов микроводорослей родов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* из Беломорского бассейна и определить функциональную активность их белковых продуктов.

Ранее мы идентифицировали 2 негомологичных CCR-гена в микроводоросли *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 (98CCR1 и 98CCR1-1), однако при экспрессионном анализе был получен и охарактеризован полноразмерный транскрипт H198CCR2, не являющийся продуктом ни одного из вышеперечисленных генов. Таким образом, с помощью быстрой амплификации концов кДНК (RACE) при использовании вырожденных праймеров нам удалось обнаружить третий CCR-ген *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15.

Поскольку на данный момент в базе данных GenBank депонированы уже 7 предсказанных CCR-генов *H. lacustris*, представлялось актуальным определить гомологи генов 98CCR1-1, 98CCR1 и 98CCR2, идентифицированных нами в штамме *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15. По нашим данным, ген 98CCR1-1 картируется в единственном участ-

ке генома, содержащем ген (предположительно) канального родопсина (GenBank: GFH21497). Ген 98CCR1 проявляет одинаковую гомологию (85% идентичности при 95% покрытии последовательности) с двумя областями, содержащими гены канального опсина 1 (GenBank: GFH25618 и GFH12230). Ген 98CCR2 и, соответственно, транскрипт H198CCR2 картируются в обширной области 8 т.п.н. контига BLLF01000737, кодирующей ген канального опсина 1 (GenBank: GFH14526). Однако, что примечательно, открытая рамка считывания H198CCR2 не соответствует модельной сборке белка GFH14526. На основании этих результатов мы делаем вывод, что нативный транскрипт H198CCR2 является одним из вариантов альтернативного сплайсинга.

С учетом этого факта для сравнительного анализа белкового продукта транскрипта H198CCR2 мы использовали нативные CCR-транскрипты *Haematococcus*, идентифицированные в транскриптомах или полученные гомологичным клонированием (рис. 1). При этом обращает на себя внимание, что полноразмерный транскрипт H198CCR2 кодирует консервативный мембранный фрагмент TM1–TM7 с коротким Ser-обогащенным гидрофильным участком общим размером 350 а.о. В противоположность этому, все нативные CCR-транскрипты, а также 5 из 6 предсказанных полноразмерных CCR-генов *H. lacustris* кодируют гигантские белки размером ~700 а.о., включающие цитозольные последовательности. Примечательно, что идентифицированный нами H198CCR2 является продуктом единственного «короткого» предсказанного гена (GenBank: GFH14526). Остается невыясненным, почему доминирующий CCR-белок *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 содержит только мембранный фрагмент TM1–TM7, а также при каких условиях происходит экспрессия полноразмерных CCR-белков с регуляторными цитозольными участками [14]. Мембранный интегральный белок H198CCR2 содержит все функционально значимые аминокислотные остатки, характерные для CCR-белков, и образует димеры, однако не обнаруживает фотоэлектрической активности при гетерологичной экспрессии в животных клетках в стандартных условиях (рис. 5, а). Пока мы не исключаем, что у белка H198CCR2, возможно, иные параметры для генерации фототоков (спектр поглощения, pH), однако отметим, что у его ближайшего гомолога и единственного тестированного CCR-белка *H. lacustris*, HpChR1 (85% идентичности), фотоэлектрической активности также не наблюдалось [9]. Следует добавить, что из CCR-транскриптов *Haematococcus* только для транскрипта из *Haematococcus droebakensis* подтверждена функциональная активность его белкового продукта, HdChR [10].

Несомненный интерес представляет продукт гена *34CCR*, *Ba34CCR* – первый идентифицированный канальный родопсин у микроводорослей рода *Bracteacoccus*. Нам удалось получить 5'-концевой фрагмент транскрипта ССР-гена *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15, который кодирует мембранный фрагмент ТМ1–ТМ7 и короткий Lys-обогащенный участок, не имеющий гомологии. Белок *Ba34CCR* демонстрирует невысокий уровень гомологии с канальными родопсинами *Chlorophyta*: ближайшим гомологом является *CrChR2 C. reinhardtii* (59% идентичности). По результатам 3Д-моделирования, белок *Ba34CCR* имеет трансмембранную локализацию и образует гомодимеры, что характерно для канальных родопсинов (рис. 3). Все известные ССР-транскрипты *Chlamydomonas* кодируют белки размером 650–750 а.о., содержащие цитозольный фрагмент наряду с мембранным ТМ1–ТМ7 [9]. Вероятно, полноразмерный продукт *Ba34CCR* также относится к этому классу белков.

При гетерологичной экспрессии ТМ1–ТМ7-фрагмента белка *Ba34CCR* (1–295 а.о.) в культуре клеток СНО-K1 наблюдается его эффективное накопление в цитоплазматической мембране (рис. 4). Мы также выполнили электрофизиологические эксперименты с использованием техники пэтч-кламп и показали, что в клетках, экспрессирующих *Ba34CCR*, происходит генерация тока (I_{34}) в ответ на включение света с длиной волны 490 нм (рис. 5, б–г).

Поскольку спектр действия родопсина *Ba34CCR* на данном этапе не изучен, полученные результаты мы рассматриваем как предварительные, и их сравнение с имеющимися детальными электрофизиологическими характеристиками канальных родопсинов *CrChR1* и *CrChR2* возможно лишь отчасти. Тем не менее очевидно, что светоиндуцируемый ток I_{34} существенно ближе по своим свойствам к току, генерируемому *CrChR2*, по сравнению с током родопсина *CrChR1*. Как и ток *CrChR2* [13], I_{34} подвержен десенситизации (инактивации), то есть при постоянной подаче возбуждающего света он самопроизвольно ослабевает, выходя в течение нескольких десятков миллисекунд на стационарный уровень. Напротив, для тока, генерируемого *CrChR1*, десенситизация нехарактерна [12].

Данные, опубликованные в недавней работе Hososhima et al. [15], позволяют сравнить амплитуду и кинетические характеристики тока, генерируемого *CrChR2*, с I_{34} , учитывая, что данные по *CrChR2* были получены с использованием гетерологической экспрессии в другой клеточной линии (ND7/23). Клетки, экспрессирующие *CrChR2*, при облучении светом с интенсивностью 2,7 мВт/мм² генерировали при поддерживаемом потенциале –60 мВ ток с пиковой плот-

ностью $32 \pm 3,2$ пА/пФ, снижающийся до уровня плато $12 \pm 1,1$ пА/пФ [15]. В наших экспериментах свет практически такой же интенсивности (2,8 мВт/мм²) подавали при поддерживаемом потенциале –20 мВ, однако, учитывая известную вольтамперную зависимость I_{34} (рис. 5, г), можно приблизительно оценить значение пикового I_{34} при –60 мВ в 3,7 пА/пФ, а тока уровня плато – в 1,06 пА/пФ. Таким образом, *CrChR2* способен генерировать приблизительно в 10 раз больший ток, чем *Ba34CCR*, при облучении светом одинаковой интенсивности с длиной волны 470 нм и 490 нм соответственно. С другой стороны, величина тока плато составляет приблизительно 37,5% от величины пикового тока в случае *CrChR2* [15] и 35% – для I_{34} , то есть по этому параметру токи *CrChR2* и *Ba34CCR* практически не различаются.

Кинетические характеристики I_{34} сравнимы с характеристиками тока *CrChR2*. Постоянная времени деактивации тока плато, происходящей после выключения света 490 нм, для I_{34} составила $25,5 \pm 2,5$ мс ($n = 14$), в то время как ток *CrChR2*, по данным Hososhima et al. [15], деактивируется в 2 раза быстрее ($\tau_{\text{off}} = 12,2 \pm 0,69$ мс). Инактивация пиковой компоненты I_{34} , напротив, происходит в несколько раз быстрее ($\tau = 11,3 \pm 0,78$ мс; $n = 14$), чем можно приблизительно оценить для тока *CrChR2* (~63 мс).

Ток, генерируемый *CrChR2*, имеет потенциал реверсии ~0 мВ при ионном составе внешней среды, близком к использованному в нашем исследовании [13]. При этом если при потенциалах, близких к 0 мВ (от –40 до 40 мВ), вольтамперная зависимость этого тока близка к линейной, то при более сильной гиперполяризации зависимость входящего тока от потенциала становится близка к экспоненциальной. Точно такой же тип вольтамперной зависимости характерен и для I_{34} . В отличие от тока *CrChR1*, имеющего исключительно протонную природу, ток, генерируемый *CrChR2*, является смешанным катионным током, что обусловлено неизбирательной проницаемостью *CrChR2* для различных катионов, в том числе бивалентных [13]. Именно этим обусловлен нулевой потенциал реверсии данного тока в стандартных физиологических условиях. Дальнейшие эксперименты с вариациями ионного состава внешнего и внутриклеточного раствора позволят выяснить, является ли ток I_{34} также неселективным катионным током.

Вклад авторов. Е.С. Лобакова, О.В. Карпова, Д.В. Абрамочкин – концепция и руководство работой; Е.Н. Виноградова, О.В. Карпова, А.М. Мойсенович, О.Б. Пустовит, А.А. Рамонова – проведение экспериментов; Е.С. Лобакова, О.В. Карпова, Д.В. Абрамочкин – обсуждение результатов иссле-

дования; О.В. Карпова, Д.В. Абрамочкин – написание текста; Е.С. Лобакова, Д.В. Абрамочкин – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 г. Работы по ДНК-секвенированию проведены в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Благодарности. Авторы выражают благодарность Т.А. Федоренко (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) за предоставление культур и рекомендации по выращиванию, Центру старения МФТИ

(г. Долгопрудный) за предоставленный экспрессионный вектор pсDNA3.1 eYFP, а также Е.Г. Максимуму (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) за предоставленный измеритель интенсивности излучения. В работе использовали оборудование, приобретенное в рамках «Программы развития Московского университета до 2020 года», и оборудование ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

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. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2022) Emerging diversity of channelrhodopsins and their structure-function relationships, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 800313, <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.800313>.
2. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Der, A., Keszthelyi, L., and Nultsch, W. (1992) Photoelectric responses in phototactic flagellated algae measured in cell suspension, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **13**, 119-134, [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85051-U](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85051-U).
3. Sineshchekov, O. A., Jung, K.-H., and Spudich, J. L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689-8694, <https://doi.org/10.1073/pnas.122243399>.
4. Govorunova, E. G., Jung, K.-W., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2004) *Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses, *Biophys. J.*, **86**, 2342-2349, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74291-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74291-5).
5. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225, <https://doi.org/10.1038/nn.4091>.
6. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., Palmateer, A., Melkonian, M., Cheng, S., Carpenter, E., Patterson, J., Wong, G. K., and Spudich, J. L. (2021) Cation and anion channelrhodopsins: sequence motifs and taxonomic distribution, *mBio*, **12**, e0165621, <https://doi.org/10.1128/mBio.01656-21>.
7. Карпова О. В., Виноградова Е. Н., Лобакова Е. С. (2022) Идентификация генов канальных родопсинов в зеленых и криптофитовых водорослях Белого и Черного морей, *Биохимия*, **87**, 1492-1504, <https://doi.org/10.31857/S0320972522100141>.
8. Galletta, L. J., Haggie, P. M., and Verkman, A. S. (2001) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities, *FEBS Lett.*, **499**, 220-224, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02561-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02561-3).
9. Hou, S. Y., Govorunova, E. G., Ntefidou, M., Lane, C. E., Spudich, E. N., Sineshchekov, O. A., Spudich, J. L. (2012) Diversity of *Chlamydomonas* channelrhodopsins, *Photochem. Photobiol.*, **88**, 119-128, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01027.x>.
10. Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., Wong, G. K., and Boyden, E. S. (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations, *Nat. Methods*, **11**, 338-346, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>.
11. Rozenberg, A., Oppermann, J., Wietek, J., Fernandez Lahore, R. G., Sandaa, R. A., Bratbak, G., Hegemann, P., and Béjà, O. (2020) Lateral gene transfer of anion-conducting channelrhodopsins between green algae and giant viruses, *Curr. Biol.*, **30**, 4910-4920, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.056>.
12. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398, <https://doi.org/10.1126/science.1072068>.
13. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, <https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>.

14. Говорунова Е. Г., Синещеков О. А. (2023) Канальные родопсины: от фототаксиса к оптогенетике, *Биохимия*, **88**, 1880-1897, <https://doi.org/10.1134/S000629792310015>.
15. Hososhima, S., Ueno, S., Okado, S., Inoue, K., and Konno, M. (2023) A light-gated cation channel with high reactivity to weak light, *Sci. Rep.*, **13**, 7625, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34687-7>.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE CHANNEL RHODOPSIN GENES FROM THE GREEN ALGAE OF THE WHITE SEA BASIN

O. V. Karpova^{1*}, E. N. Vinogradova^{1,2}, A. M. Moisenovich¹, O. B. Pustovit¹,
A. A. Ramonova¹, D. V. Abramochkin¹, and E. S. Lobakova¹

¹ Biology Department, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: olgakarpova@ymail.com

² Genome Center, National Research Center "Kurtchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

Optogenetics as the method of light-controlled regulation of cellular processes is based on the use of the channel rhodopsins that directly generate photoinduced currents. The largest number of channel rhodopsin genes has been identified in the green microalgae Chlorophyta, and the demand for increasing the number of functionally characterized channel rhodopsins and the diversity of their photochemical parameters keeps growing. We performed the expression analysis of cation channel rhodopsin (CCR) genes in natural isolates of microalgae of the genera *Haematococcus* and *Bracteacoccus* from the unique Polar Circle region. The identified full-length CCR transcript of *H. lacustris* is the product of alternative splicing and encodes the H198CCR2 protein with no photochemical activity. The 5'-partial fragment of the *B. aggregatus* CCR transcript encodes the Ba34CCR protein containing a conserved TM1–TM7 membrane domain and a short cytosolic fragment. Upon heterologous expression of the TM1–TM7 fragment in CHO-K1 cell culture, light-dependent current generation was observed, and its parameters correspond to the characteristics of the CCR. The first discovered functional channel rhodopsin of *Bracteacoccus* has no close CCR homologs and may be of interest as a candidate for optogenetics.

Keywords: channel rhodopsins, green algae, photo-induced current, optogenetics

IGF-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ В СЕРДЦЕ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Обзор

© 2024 Д.А. Адашева¹, Д.В. Серебряная^{1,2*}

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

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.02.2024

После доработки 11.06.2024

Принята к публикации 22.06.2024

Поддержание функционирования сердечно-сосудистой системы является важнейшей задачей организма. Нормальное протекание физиологических процессов в клетках миокарда на молекулярном уровне контролируется множественными факторами и определяется балансом воздействия кардиоподдерживающих и патологических механизмов. Система инсулиноподобных факторов роста (IGF-система, IGF-сигнальный путь) является ключевой в регуляции роста и развития различных клеток и тканей. В миокарде IGF-система обеспечивает как кардиопротекторное действие, так и участвует в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний. В настоящей обзорной статье суммированы данные об участии компонентов IGF-сигнального пути в реализации функционирования миокарда в норме и при развитии различных патологических состояний, а также проведён анализ степени выраженности этих эффектов в различных условиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сердечно-сосудистые заболевания, кардиомиоциты, инсулиноподобные факторы роста IGF-I и IGF-II, IGF-связывающие белки (IGFBP), кардиопротекторное действие, IGFBP-4, RAPP-A.

DOI: 10.31857/S0320972524080031 EDN: KEBNKY

ВВЕДЕНИЕ

Сердце представляет собой важнейший орган, отвечающий за транспорт крови по кровеносным сосудам и обеспечение клеток и тканей организма кислородом и питательными веществами. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности и инвалидности по всему миру [1]. В условиях высокого распространения ССЗ в мире важную роль приобретает

понимание механизмов, опосредующих как развитие патологического фенотипа клеток сердечной ткани, так и обеспечение кардиопротекторного действия, направленного на сохранение жизнеспособности клеток миокарда.

Клетки миокарда, как и любые другие клетки сердечно-сосудистой системы, обнаруживают изменения в окружающей среде и вырабатывают соответствующие реакции благодаря системам передачи сигналов или клеточной сигнализации.

Принятые сокращения: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОКС – острый коронарный синдром; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; АКТ – серин-треониновая протеинкиназа B; ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; IGF – инсулиноподобный фактор роста; IGF-I и IGF-II – гомологичные белки семейства IGF; IGF-1R и IGF-2R – рецепторы инсулиноподобных факторов роста I и II; IGFBP – белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста; IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6 – гомологичные белки семейства IGFBP; INSR – инсулиновый рецептор; MMP – матриксные металлопротеиназы; MMP-2, MMP-7, MMP-9 – гомологичные белки семейства MMP; NLS – последовательность ядерной локализации; RAPP – ассоциированный с беременностью белок плазмы; RAPP-A, RAPP-A2 – изоформы A и A2 белка RAPP.

* Адресат для корреспонденции.

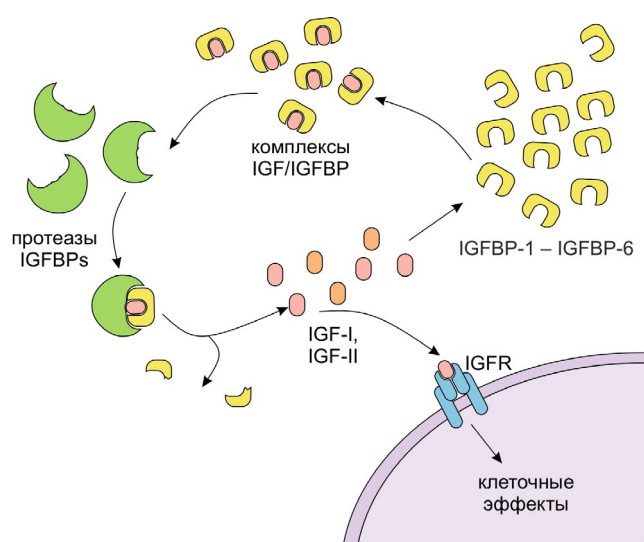


Рис. 1. Основные компоненты IGF-системы. IGF-I и IGF-II – инсулиноподобные факторы роста I и II семейства IGF; IGFBP-1–IGFBP-6 – IGF-связывающие белки 1–6; IGFR – рецептор IGF. Описание в тексте

Активация механизмов клеточной сигнализации в ответ на тот или иной стимул приводит к развитию адаптивного клеточного ответа, а нарушения в их функционировании могут вызывать развитие различных патологических состояний.

Система инсулиноподобных факторов роста (IGF, insulin-like growth factor; IGF-система; IGF-сигнальный каскад; IGF-сигнальная система; IGF-сигнальный путь) играет ключевую роль в регуляции роста, пролиферации и жизнеспособности клеток [2]. Экспрессия белков, входящих в состав IGF-системы, обнаружена практически во всех органах и тканях организма, причём в период эмбрионального развития экспрессия данных белков в большинстве случаев существенно выше, чем в постнатальный период и во взрослом состоянии [3].

IGF-сигнальная система включает в себя: 2 инсулиноподобных фактора роста I и II (IGF-I и IGF-II) и инсулин, которые выступают в роли лигандов; клеточные рецепторы, расположенные на поверхности клеток-мишеней, с которыми лиганды специфически взаимодействуют – рецептор IGF-I (IGF-1R, insulin-like growth factor-I-receptor), рецептор IGF-II (IGF-2R), рецептор маннозо-6-фосфат/IGF-II (M6P/IGF-2R), рецептор инсулина (INSR) и гибридный рецептор IR/IGF-1R; 6 высокоаффинных лиганд-связывающих белков (insulin-like growth factor binding protein; IGFBP-1–IGFBP-6), которые связывают IGF с высоким сродством; а также протеазы, которые расщепляют лиганд-связывающие белки, регулируя тем самым биодоступность IGF для их специфических рецепторов, расположенных на поверхности клеток организма (рис. 1) [2, 4, 5]. Также в состав IGF-

сигнального пути входят белки, участвующие во внутриклеточной передаче сигналов дистальнее IGF-1R. Так, семейство белков IRS (insulin receptor substrate) активируют такие сигнальные каскады, как, например, RAF/MAPK или PI3K/AKT, что стимулирует клеточную пролиферацию и повышает жизнеспособность клеток.

В сердечной ткани, как практически во всех тканях организма, компоненты IGF-сигнального пути необходимы для гиперплазии и роста сердца в период эмбрионального развития. В частности, IGF-I и IGF-II были идентифицированы как наиболее важные агенты, стимулирующие пролиферацию кардиомиоцитов в этот период.

Кроме этого, IGF в сердечной ткани выполняют защитные функции благодаря своим кардиопротекторным свойствам, реализующимся через их антиапоптотическое действие. Исследования, проведённые *in vitro* и *in vivo*, продемонстрировали, что IGF-I обладает выраженным кардиопротекторным эффектом [6–9]. IGF-I также является агентом, запускающим митотическое деление клеток, и антиапоптотическим фактором не только в сердечной ткани, но и в клетках сосудов, включая гладкомышечные и эндотелиальные клетки [10], и выполняет регуляторные функции в иммунной системе. Так, например, антитела к IGF-1R были обнаружены у пациентов с болезнью Грейвса (аутоиммунное заболевание щитовидной железы, выражающееся в ее гиперфункции). У пациентов с этим заболеванием существенно увеличивается частота IGF-1R-экспрессирующих В- и Т-лимфоцитов. Потенциальное участие IGF-I и IGF-1R в патогенезе аутоиммунных нарушений делает этот сигнальный путь одной из терапевтических мишеней для лечения подобных заболеваний [11]. Результаты ряда исследований позволяют предположить, что IGF-I, по-видимому, также обладает атеропротекторным действием, тем самым являясь перспективным терапевтическим агентом для возможной терапии ССЗ, вызванных атеросклеротическими изменениями сосудов [12].

В то же время активация и/или ингибирование функционирования IGF-системы в сердце могут быть ассоциированы с возникновением патологических состояний в сердечно-сосудистой системе. Так, низкие концентрации IGF-I в сыворотке крови коррелируют с повышенным риском ишемической болезни сердца (ИБС) и инсульта [13, 14], а повышенный уровень протеолитических фрагментов одного из IGFBP-связывающих белков, IGFBP-4, ассоциирован с увеличением риска возникновения острого коронарного синдрома (ОКС) у пациентов с ИБС, острой сердечной недостаточностью [15], а также с увеличением риска наступления смерти в связи с осложнениями ССЗ у больных диабетом 1-го типа [16, 17].

Недавно в нашей лаборатории было показано, что концентрация протеолитических фрагментов IGFBP-4 повышается при таких патологических состояниях сердечной мышцы, как гипертрофические изменения в кардиомиоцитах [18]. Уровни IGF-I и IGFBP-2 в плазме крови могут являться мощными прогностическими факторами риска развития ОКС [19]. Кроме этого, IGFBP-2 является важным биомаркером дисфункции левого желудочка при дилатационной кардиомиопатии [20].

Таким образом, несмотря на то что передача сигнала через IGF-сигнальный путь в миокарде приводит к активации кардиопротекторных и атеропротекторных механизмов, способствующих повышению жизнеспособности кардиомиоцитов, в некоторых исследованиях также показано, что IGF-сигнальная система активируется при различных патологических процессах, протекающих в миокарде, например, таких как гипертрофия и атеросклеротическое поражение сосудов. К настоящему моменту времени существует довольно большое количество обзорных статей, описывающих индивидуальные эффекты IGF в сердечной ткани как в норме, так и при отдельных патологиях, однако сравнительный анализ литературных данных о разнонаправленных эффектах IGF в сердечной ткани проведён не был. В настоящей обзорной статье суммированы основные известные на сегодняшний день эффекты IGF и других компонентов IGF-системы на функционирование клеток миокарда и проведён анализ степени их выраженности в норме и при сердечно-сосудистых патологиях. Учитывая важность IGF как участника нормального функционирования сердца и его потенциал как терапевтического агента при лечении ССЗ, данная обзорная статья может быть полезна широкому кругу исследователей, работающих в различных областях биомедицинской науки.

КОМПОНЕНТЫ IGF-СИСТЕМЫ В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

Как уже упоминалось выше, инсулиноподобные факторы роста оказывают широкий спектр эффектов на такие клеточные процессы в тканях организма, как клеточный рост, поддержание жизнеспособности клеток, а также их дифференцировку. Ключевым регуляторным механизмом активации IGF-сигнального пути в тканях организма является обеспечение биодоступности IGF для их клеточных рецепторов. Регуляция данного процесса осуществляется, с одной стороны, за счёт высвобождения лигандов (IGF), а с другой – за счёт их связывания с лиганд-связывающими белками (IGFBP).

Инсулиноподобные факторы роста. Ген, кодирующий IGF-I, у человека располагается на длинном плече 12-й хромосомы [21, 22]. В его состав входит 6 экзонов, 4 из которых подвергаются альтернативному сплайсингу, в результате чего синтезируются различные предшественники IGF-I [23, 24]. Экспрессия IGF-I регулируется на уровне процессов транскрипции, процессинга РНК и трансляции. В результате синтезируется белковый предшественник IGF-I, который впоследствии превращается в функционально активную форму IGF-I в результате специфического протеолиза [23, 24]. Функционально активная форма IGF-I представляет собой одноцепочечный пептид с молекулярной массой 7,5 кДа, состоящий из 70 а.о. и содержащий 3 дисульфидных связи между шестью аминокислотными остатками цистеина [23]. Большая часть IGF-I, содержащегося в крови, вырабатывается клетками печени, однако также показано, что IGF-I синтезируется и в других органах, осуществляя аутокринное или паракринное действие на различные клетки. Регуляция синтеза IGF-I в печени является многофакторной, и доминирующую роль в усилении экспрессии IGF-I играет гормон роста (GH), вырабатываемый гипофизом.

При проведении экспериментов по нарушению экспрессии IGF-I в различных тканях были получены противоречивые результаты. Так, в случае нарушенной экспрессии IGF-I в печени никаких значимых отклонений в развитии мышечной массы не наблюдалось. Возможно, это связано с компенсацией уровня экспрессии IGF-I посредством IGF-I, секретируемого клетками мышечной ткани [25]. Однако при проведении генетического нокаута *IGF1* в клетках скелетной мускулатуры у мышечной массы, что указывает на IGF-I, как на важнейшего участника поддержания нормального состояния скелетной мускулатуры [26]. При нарушенной экспрессии IGF-I в головном мозге у мышечной массы и крыс наблюдаются нарушения соматического и дендритного роста нейронов, когнитивных функций, памяти и терморегуляции [27, 28]. Помимо этого, IGF-I играет важную роль в тканях почек, лёгких и поджелудочной железы [29].

В сердечной ткани IGF-I играет важную роль, регулируя постнатальный рост сердца и оказывая антиапоптотическое действие через активацию как канонических, так и неканонических сигнальных путей в сердце взрослого человека (PI3K/AKT- и ERK-сигнальные пути и передача сигнала, опосредованная G-белками соответственно) [30]. Эксперименты по гиперэкспрессии IGF-I, проведённые в сердечной ткани мыши при индуцированной липополисахаридом сократительной дисфункции кардиомиоцитов, продемон-

стрировали поддерживающий эффект IGF-I на их жизнеспособность. Подобное действие IGF-I, по всей видимости, вызвано его антиоксидантными свойствами в сердечной ткани, так как гиперэкспрессия IGF-I приводит к снижению накопления активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, повреждённых белковых молекул, и, помимо этого, к ингибированию апоптотических процессов в кардиомиоцитах [31]. Антиапоптотическое действие IGF-I было также показано в кардиомиоцитах эмбрионов рыб рода *Danio* с нарушенной экспрессией *tbx5* – гена, кодирующего фактор транскрипции, участвующий в регуляции процессов развития [32].

Ген *IGF2* кодирует секретируемый одноцепочечный белок, состоящий из 67 а.о., структурно и функционально сходный с IGF-I [33, 34]. Уровень циркулирующего IGF-II резко снижается у мышей после рождения. Экспрессия IGF-II обнаруживается как в печени, так и в других тканях [35]. Несмотря на то что IGF-II важен на эмбриональных стадиях развития и не обнаруживается в плазме крови взрослых мышей, недавние исследования показывают, что локальная экспрессия IGF-II в постнатальном периоде развития важна, например, для развития костной ткани [36], а также для активации процессов нейрогенеза в гиппокампе, что играет важную роль в консолидации памяти [37]. Мыши с генетическим нокаутом *IGF2* демонстрируют задержку роста во время развития, но в послеродовом периоде рост происходит без изменений [38]. В то же время при повышенной экспрессии IGF-II у мышей наблюдается, например, повышение массы тела и снижение количества циркулирующих в крови глюкозы и холестерина [39], гиперплазия клеток тканей печени [40]. Установлено, что у трансгенных мышей с повышенной экспрессией IGF-II в гладкомышечной ткани наблюдаются структурные аномалии сердца, что приводит к брадикардии и гипотензии, ведущим к сердечной недостаточности [41].

IGF-II является основным фактором, запускающим митотическое деление кардиомиоцитов во время роста плода [42–44]. Показано, что уровни мРНК IGF-II в эмбриональной ткани желудочков намного выше, чем уровни IGF-I, а также, что экспрессия IGF-II в сердечной ткани снижается после рождения [44]. IGF-II запускает пролиферацию кардиомиоцитов плода, взаимодействуя с рецептором IGF-1R и инсулиновым рецептором. Дальнейшая передача сигнала от IGF приводит к активации путей ERK/MAPK (mitogen-activated protein kinase) и PI3K (фосфоинозитид-3 киназа)/AKT (серин-треониновая протеинкиназа B). Активированный AKT способствует локализации в цитоплазме и инактивации FOXO-факторов, негативных регуляторов пролиферации миокарда [45],

что и является фактором, запускающим пролиферацию кардиомиоцитов.

Несмотря на то что IGF-I и IGF-II экспрессируются кардиомиоцитами [46], основным источником инсулиноподобных факторов роста в процессе развития сердца является эпикард. Как IGF-I, так и IGF-II экспрессируются в эпикарде между 11,5 и 17,5 неделями развития эмбриона мыши. Эпикардальная секреция IGF-II и дальнейшая передача сигнала через сигнальный путь ERK необходима для инициации процессов пролиферации кардиомиоцитов до момента установления коронарного кровообращения [42]. Изначально эпикардальная секреция IGF-II индуцируется циркулирующим в крови эритропоэтином (ЭПО). Показано, что при обработке культивируемых клеток ЭПО экспрессия IGF-II повышается [47]. Brade et al. [47] предполагают, что именно печень является источником экспрессии ЭПО, необходимой для индукции IGF-II в эпикарде. Начиная с 10-й недели эмбрионального развития, экспрессия эпикардального IGF-II перестаёт быть ЭПО-зависимой и начинает регулироваться под действием поступающих глюкозы и кислорода, связанным с транспортной функцией плаценты [48, 49].

Рецепторы IGF-системы. Для реализации сигнальной функции IGF связываются с несколькими рецепторами, заякоренными в мембране, основными из которых являются IGF-1R, IGF-2R и INSR. Аффинность вышеупомянутых рецепторов в отношении IGF-I, IGF-II и инсулина сильно различается. Так, IGF-1R связывает IGF-I и IGF-II с высоким сродством. IGF-2R взаимодействует с IGF-II с высоким сродством, однако его аффинность по отношению к IGF-I существенно ниже. Кроме этого, было показано, что и IGF-I, и IGF-II способны активировать INSR. При этом IGF-I и IGF-II связываются с INSR в 100 раз хуже, чем его классический лиганд, инсулин. IGF-1R принадлежит к семейству тирозинкиназных рецепторов и представляет собой гетеротетрамер ($\alpha_2\beta_2$), имеющий молекулярную массу ~400 кДа. Две α -субъединицы IGF-1R находятся во внеклеточном пространстве и отвечают за связывание лиганда, две β -субъединицы «заякоривают» молекулу рецептора в мембране, а внутриклеточные домены β -субъединиц обладают тирозинкиназной активностью. После связывания лиганда происходит аутофосфорилирование рецептора и фосфорилирование остатков тирозина, серина и треонина последующих участников сигнальных каскадов. Таким образом, происходит передача сигнала от IGF-I внутрь клетки. Кроме этого, было продемонстрировано, что IGF-1R обнаруживается в ядерной фракции клеток после лизиса, что позволяет говорить о присутствии этого рецептора в ядерной мембране. Также IGF-1R обнаруживается в мембране

Т-трубочек в неонатальных кардиомиоцитах. Такое распределение IGF-1R в клетке, по всей видимости, позволяет этому рецептору регулировать процессы, протекающие в различных клеточных органеллах [30]. Помимо IGF-1R, IGF-I способен связываться с INSR. INSR и IGF-1R имеют сходное гетеротетрамерное строение и похожие пути передачи сигнала внутрь клетки. Сходство IGF-1R и INSR настолько велико, что может происходить формирование гибридных рецепторов, включающих субъединицы каждого из них (IGF-1R/INSR). В качестве лигандов для гибридных рецепторов также могут выступать молекулы IGF-II [50]. В отличие от IGF-1R, рецепторы IGF-2R не имеют тирозинкиназных доменов. При взаимодействии IGF-II с IGF-2R происходит эндоцитоз лиганд-рецепторного комплекса. Таким образом, IGF-2R способен уменьшать количество свободного IGF-II и тем самым негативно влиять на активность сигнального каскада IGF в целом [50]. Тем не менее было показано, что IGF-2R все же обладает свойством передавать сигнал через гетеротримерные G-белки. Такая сигнализация способна активировать протеинкиназу C- α , Ca²⁺-кальмодулин-зависимую протеинкиназу II, MAP-киназу (ERK), а также белковые факторы, участвующие в развитии гипертрофии миокарда [51, 52].

Эксперименты по нарушенной экспрессии обоих типов рецепторов показывают их значимость в развитии организма. Так, при повышенной экспрессии IGF-1R в сердечной ткани у мышей наблюдалась гипертрофия миокарда вследствие увеличения кардиомиоцитов в размере, однако патологии сердечной ткани выявлено не было. Также в данном эксперименте было показано увеличение систолической функции как в возрасте 3, так и в возрасте 16 месяцев после рождения [53]. В экспериментах со сниженной экспрессией IGF-1R было показано, что происходит значительное уменьшение в размерах тела мышей и объемов большинства органов: мышц, головного мозга, сердца и др. При этом данные отклонения наблюдались у взрослых мышей в возрасте 10–12 месяцев и были более выражены

у самцов по сравнению с самками [54]. Интересно, что мыши, гетерозиготные по IGF-1R, несущие только одну функциональную копию гена, демонстрировали увеличение продолжительности жизни, при этом для самок данный эффект был сильнее: увеличение продолжительности жизни на 33% и на 15% соответственно [55]. В работах по исследованию эффектов при недостаточной экспрессии IGF-2R было показано, что такие мыши имеют на 25–30% больший размер тела, по сравнению с контрольной группой, у них обнаруживается повышенный уровень IGF-II и IGF-связывающих белков и, наконец, увеличение размеров сердца, связанное с гиперплазией миокарда. При этом у мышей, мутантных по гену, кодирующему IGF-2R, наблюдалась высокая летальность ещё до рождения [56, 57].

IGF-связывающие белки. Как уже упоминалось выше, IGF взаимодействуют с шестью представителями семейства IGF-связывающих белков. В организме человека каждый из шести IGFBP (IGFBP-1–IGFBP-6) кодируется определённым геном, в то время как у других представителей позвоночных несколько генов отвечают за экспрессию определённого белка IGFBP или трансляция некоторых IGFBP не осуществляется. Несмотря на то что для всех представителей семейства IGFBP характерна значительная гомология аминокислотного состава, они отличаются по своей структуре и функциям. Различие функций представителей IGFBP внутри семейства обусловлено наличием определённых мотивов в их белковой структуре. Все представители семейства IGFBP имеют консервативные N- и C-домены, содержащие 12 и 6 аминокислотных остатков цистеина соответственно и вариативный линкерный домен. N-Домен включает в себя IGF-связывающий мотив. Линкерный домен содержит аминокислотные остатки, которые могут подвергаться посттрансляционным модификациям, участки связывания с гепарином, а также в нём могут быть локализованы сайты протеолитического расщепления. C-Домен имеет дополнительный IGF-связывающий мотив, тиреоглобулиновый мотив,

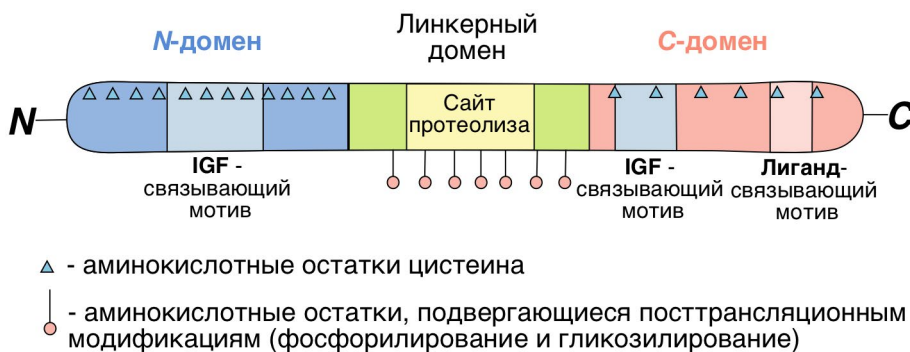


Рис. 2. Доменная структура IGFBP. Описание в тексте

который отвечает за взаимодействие с гепарином, а также может включать в себя сигнальную последовательность, необходимую для транслокации IGFBP в ядро (рис. 2) [58].

Так, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 и IGFBP-6 имеют сигнальную последовательность, благодаря которой они могут быть импортированы в нуклеоплазму ядер некоторых типов клеток [59]. В миокарде IGFBP находятся преимущественно в связанной с IGF форме [60], таким образом, IGFBP участвуют в создании примембранного пула IGF, доступного для рецепторов (в основном IGFBP-3 и -5), а также контролируют его тканеспецифичный отток и распределение между рецепторами различных клеток (в первую очередь в этом участвуют IGFBP-1, -2 и -4). Далее, мы рассмотрим роль каждого из IGF-связывающих белков в сердечной ткани.

IGFBP-1, имеющий молекулярную массу 28 кДа, экспрессируется в основном в тканях печени и почек. Ген, кодирующий IGFBP-1, у человека расположен на 7-й хромосоме. Непосредственно рядом с геном *IGFBP1* расположен ген, кодирующий IGFBP-3. N- и C-концевые домены белка IGFBP-1 являются высоко консервативными и гомологичны таковым у других представителей семейства IGFBP. В центральном линкерном домене расположены аминокислотные остатки, подвергающиеся посттрансляционным модификациям, таким как частичный протеолиз и фосфорилирование. При этом активность IGFBP-1 регулируется как его фосфорилированием, так и его дефосфорилированием [61, 62].

В спектр функций IGFBP-1 входит регуляция клеточной пролиферации, миграции, а также регуляция метаболизма глюкозы через активацию сигнальных путей интегрин-ILK/FAK/PTEN [63–65]. Так, например, Haywood et al. [63] было показано, что IGFBP-1 способен улучшать чувствительность клеток к инсулину и его секрецию, а также поглощение глюкозы из кровяного русла посредством своего RGD (Arg-Gly-Asp)-интегрин-связывающего домена. Более того, одним из эффектов передачи сигнала от IGFBP-1 через интегриновый сигнальный путь является стимуляция процесса ангиогенеза через активацию киназы фокальной адгезии [66].

Регуляция экспрессии IGFBP-1, по всей видимости, происходит на транскрипционном уровне и является гормонально-зависимой. Так, например, высокие уровни инсулина в крови ассоциированы с низкими концентрациями IGFBP-1, и наоборот. Критической концентрацией инсулина в крови, при которой происходит снижение количества IGFBP-1, является 90 пмоль/литр [67]. Также в экспериментах по обработке различными концентрациями инсулина изолированного

сокращающегося сердца крысы было показано, что под воздействием инсулина IGFBP-1 (равно, как и IGFBP-2, речь о котором пойдёт дальше) способен переходить из кровяного русла в ткани сердца [68]. Также существует большое количество данных, указывающих на то, что регуляция экспрессии IGFBP-1 является мультифакторной и зависит от метаболических и антропометрических факторов, а также от диеты [69].

Хотя к настоящему моменту времени экспериментальные данные об экспрессии IGFBP-1 в сердечной ткани отсутствуют, ряд исследований, посвящённых изучению влияния гипо- и гиперэкспрессии IGFBP-1, указывают на его участие в нормальной работе сердечно-сосудистой системы. Низкий уровень IGFBP-1 в крови, как правило, ассоциирован с рисками заболеваний сердечно-сосудистой системы. Также понижение концентрации IGFBP-1 в крови рассматривают как потенциальный прогностический маркер развития диабета и острого коронарного синдрома у человека [70, 71]. Повышенная экспрессия IGFBP-1, напротив, приводит к улучшению функционирования эндотелия сосудов (в том числе и сосудов сердца) за счёт увеличения продукции оксида азота (NO), являющегося основным вазодилататором. IGFBP-1 индуцирует фосфорилирование эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) через сигнальный путь PI3K/AKT [72, 73]. Помимо этого, повышение концентрации IGFBP-1 в крови ассоциировано с антиатеросклеротическим действием [74].

Данные, полученные в экспериментах на животных, дефицитных по IGFBP-1, указывают на то, что IGFBP-1 необходим для восстановления эндотелия сосудов в результате повреждений, но не является критически важным для метаболизма эндотелиальных клеток и физиологии сосудов [75]. В экспериментах с повышенной экспрессией IGFBP-1 мыши демонстрируют внутриутробную и постнатальную задержку роста, пропорциональное уменьшение веса большинства органов относительно массы тела за исключением мозга, который был непропорционально мал у трансгенных мышей. В почках наблюдалось снижение количества нефронов. Трансгенные мыши также демонстрировали гипергликемию натощак, нарушение толерантности к глюкозе и умеренную резистентность к инсулину в скелетных мышцах и ткани печени [76, 77].

IGFBP-2. Ещё один представитель семейства IGFBP – IGFBP-2 – имеет молекулярную массу 34 кДа и обнаруживается в основном в сыворотке крови плода. Ген, кодирующий IGFBP-2, в геноме человека расположен на 2-й хромосоме. IGFBP-2, как и IGFBP-1, в C-концевой части содержит RGD-интегрин-связывающий домен, и, кроме того, в его состав входят гепарин-связывающий домен (HBD)

и последовательность ядерной локализации (NLS; nuclear localization signal). Благодаря HBD IGFBP-2 взаимодействует с белками внеклеточного матрикса, а NLS обеспечивает ядерную локализацию IGFBP-2 [78–80].

Несмотря на то что IGFBP-2 экспрессируется во время внутриутробного развития в значительном количестве и осуществляет ключевые эндокринные, аутокринные и паракринные функции в процессах роста и развития, в экспериментах по исследованию нарушенной экспрессии IGFBP-2 не была показана его значимость для реализации вышеупомянутых процессов [81]. Интересным является тот факт, что при нарушении экспрессии IGFBP-2 увеличивается экспрессия IGFBP-1, IGFBP-3 и IGFBP-4, что может являться механизмом, компенсирующим функции IGFBP-2 при его отсутствии [82, 83].

При гиперэкспрессии IGFBP-2 у мышей наблюдалось снижение массы тела, при этом масса внутренних органов оставалась неизменной. Это указывает на то, что IGFBP-2 может быть негативным регулятором постнатального роста. В то же время у мышей, дефицитных по IGFBP-2, не наблюдалось изменения массы тела, включая размер и морфологию мозга, однако были отмечены изменения размеров селезёнки и печени.

Как и в случае с IGFBP-1, концентрация IGFBP-2 в плазме регулируется под действием инсулина. Концентрация IGFBP-2 в плазме крови обратно пропорциональна степени выраженности резистентности к инсулину, а результаты экспериментов по гиперэкспрессии IGFBP-2 указывают на его защитную роль в развитии ожирения и инсулиновой резистентности [84]. Помимо инсулина, в регуляции концентрации IGFBP-2 в крови могут участвовать онкосупрессоры PTEN (phosphatase and tensin homolog – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью) и p53, Ptc1 (Patched1), являющийся негативным регулятором сигнального пути Hh (hedgehog), а также другие факторы [81].

Berry et al. [85] в ходе масштабного протеомного анализа в поисках диагностических биомаркеров сердечной недостаточности выделили в качестве одного из достоверных кандидатов именно IGFBP-2. Этой же точки зрения придерживается Varutaut et al. [86], отмечая, что IGFBP-2 может являться прогностическим маркером, используемым для мониторинга сердечной недостаточности дополнительно к классическим методам, например измерению концентрации натрийуретического пептида В-типа. Данная гипотеза согласуется с результатами de Kort et al. [87], показавших, что у новорождённых детей пониженное количество IGFBP-2 ассоциировано с повышенным уровнем молекулярных маркеров риска сердечно-сосуди-

стых заболеваний. Кроме этого, Yang et al. [88] было показано, что экспрессия IGFBP-2 повышается в лёгких пациентов с лёгочной артериальной гипертензией.

IGFBP-3 имеет молекулярную массу 28,7 кДа, а ген, кодирующий этот белок, располагается на хромосоме 7 всего в 20 кб от гена, кодирующего IGFBP-1. IGFBP-3 является самым распространённым представителем семейства IGFBP у позвоночных: большая часть IGF-I и IGF-II, циркулирующих в плазме крови, связаны именно с IGFBP-3 [89]. IGFBP-3 взаимодействует с IGF-I и кислотно-лабильной субъединицей (ALS) с образованием тройного стабильного комплекса с массой 150 кДа и предотвращает дальнейший транспорт IGF-I в ткани [89]. N- и C-концевые домены IGFBP-3 являются консервативными, в то время как соединяющий их линкерный домен является наиболее вариабельным среди представителей семейства IGFBP. Так, например, в линкерном участке содержатся аминокислотные остатки, подвергающиеся гликозилированию и фосфорилированию, а также участки, по которым происходит специфический протеолиз. IGF-связывающие домены обнаруживаются как в N-, так и в C-концевой областях молекулы IGFBP-3. Также стоит отметить, что в линкерном участке молекулы IGFBP-3 присутствуют сайты для связывания с гепарином или глюкозаминогликаном (GAG) [79, 90].

IGFBP-3 реализует свои функции как зависимо, так и независимо от IGF. IGF-зависимые функции IGFBP-3 заключаются в «доставке» IGF до соответствующих клеточных мембранных рецепторов (стоит отметить, что это не является функцией, уникальной лишь для IGFBP-3, но актуально и для других IGFBP-связывающих белков). При этом реализация IGF-независимых функций IGFBP-3 возможна благодаря его способности связываться с белками внеклеточного матрикса клеток и белками плазматической мембраны и транслоцироваться в цитоплазму и в ядро. Среди таких функций IGFBP-3 можно выделить его работу как транскрипционного фактора в тандеме с ядерными рецепторами или РНК-полимеразой II, участие в репарации двцепочечных разрывов ДНК, регуляцию апоптоза и другие [90], однако рассмотрение всего спектра функций IGFBP-3 не является целью настоящего обзора. При повышенной экспрессии IGFBP-3 у мышей наблюдается потеря веса, в то время как пониженная его экспрессия не приводит к значительным изменениям массы тела [91, 92].

В контексте сердечной ткани показано, что IGFBP-3 экспрессируется в миокарде в норме и при патологических состояниях как на уровне мРНК, так и на уровне белкового продукта. При этом количество как мРНК, так и белка IGFBP-3,

детектируемое в сердце, выше, чем в печени в период внутриутробного развития, по сравнению с постнатальным периодом. Интересно, что количество IGFBP-3, детектируемого в крови у больных ишемической болезнью сердца, выше, чем в случае пациентов с патологической гипертрофией или дилатационной кардиомиопатией [93]. Также из данных литературы известно, что экспрессия IGFBP-3 увеличивается после трансплантации сердца [94]. На клеточной линии кардиомиоцитов H9C2 было показано, что экспрессия IGFBP-3 возрастает на фоне гипоксических условий [95]. Среди функций IGFBP-3 в сердечной ткани можно выделить его антипролиферативное действие в клетках-предшественниках кардиомиоцитов [96]. Также IGFBP-3 способен одновременно играть две роли в процессах ангиогенеза – индукторную и супрессорную [79]. Супрессорная функция IGFBP-3 делает его перспективным терапевтическим агентом для возможной терапии онкологических заболеваний. Например, в случае некоторых раковых опухолей экспрессия IGFBP-3 способствует снижению ангиогенеза в очагах опухолевых образований. В концентрациях, превышающих физиологические, IGFBP-3 ингибирует экспрессию фактора ангиогенеза VEGF [97]. Также IGFBP-3 способен ингибировать адгезию клеток эндотелия сосудов к внеклеточному матриксу, что является критическим фактором для развития ангиогенеза и репарации эндотелия [98]. Проангиогенный эффект IGFBP-3 заключается в его способности индуцировать экспрессию ряда генов, ассоциированных с ангиогенезом. При этом такая индукция является IGF-опосредованной [99].

IGFBP-4. В геноме человека ген, кодирующий белок-предшественник IGFBP-4, состоит из 258 а.о. и расположен в 17-й хромосоме. После отщепления сигнального пептида в состав зрелого белка IGFBP-4 входит 237 а.о. Среди всех представителей IGFBP IGFBP-4 имеет наименьшую молекулярную массу, равную 24 кДа. N- и C-концевые домены молекулы IGFBP-4 соединены коротким линкерным альфа-спиральным участком, который содержит участок протеолитического расщепления металлопротеазой PAPPA (pregnancy associated plasma protein A; белок, ассоциированный с беременностью А). Некоторые аминокислотные остатки, локализованные в области альфа-спирального участка, подвергаются различным посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование [100]. В отличие от остальных IGFBP, IGFBP-4, как и IGFBP-6, содержит 2 дополнительных аминокислотных остатка цистеина в линкерном участке. Гликозилирование IGFBP-4 происходит по аминокислотному остатку Asn104, и примерно половина всего IGFBP-4 плазмы находится в гликозилированной форме [15]. IGFBP-4 синтезиру-

ется в основном в печени, однако различными биохимическими и молекулярно-биологическими методами было показано, что и мРНК гена, кодирующего IGFBP-4, и его белковый продукт обнаруживаются в ряде других органов и тканей, таких как гладкие мышцы, лёгкие, яичники, почки, сердце и т.д. [100, 101].

В отличие от других IGFBP, основной функцией IGFBP-4 является регуляция биодоступности IGF для их специфических рецепторов, в особенности IGF-II. Если IGF взаимодействует с IGFBP-4, первый не может связываться с рецепторами на мембране и осуществлять передачу сигнала в клетку. Однако в том случае, если IGFBP-4 подвергается протеолитическому расщеплению, IGF высвобождается, связывается с рецептором и запускает различные сигнальные молекулярные каскады, активирующие миграцию, пролиферацию и другие регенеративные клеточные процессы [102].

В сердечной ткани IGFBP-4 является активным посредником тканевой регенерации независимо от присутствия IGF. Так, было показано, что IGFBP-4 усиливает дифференцировку кардиомиоцитов *in vitro*, в то время как его отсутствие замедляет процесс дифференцировки *in vitro* и *in vivo*. Регуляция этого процесса осуществляется через Wnt-сигнальный путь – IGFBP-4 взаимодействует с Wnt-рецептором и блокирует его [103]. Помимо этого, в 2012 г. Postnikov et al. [16] показали, что протеолитические фрагменты IGFBP-4, получаемые в результате активности протеазы PAPPA, являются молекулярными прогностическими биомаркерами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как острая сердечная недостаточность, при этом количество фрагментов пропорционально степени развития заболевания. Далее, в ряде работ была исследована диагностическая и прогностическая роль протеолитических фрагментов IGFBP-4 [15, 18, 104, 105], которая будет подробно рассмотрена нами в разделе «Роль IGF-системы в развитии патологических состояний сердечной ткани».

Эксперименты по повышенной экспрессии IGFBP-4 были проведены на трансгенных мышах, экспрессирующих повышенный уровень IGFBP-4 в гладкомышечных тканях. У таких мышей было отмечено уменьшение массы мочевого пузыря, кишечника, матки, аорты и желудка; при этом уменьшения общей массы тела не наблюдалось [106]. Также известно, что при повышенной экспрессии IGFBP-4 в остеобластах происходит замедление восстановления костной ткани [107], а также ряд работ указывают на то, что повышенная экспрессия IGFBP-4 подавляет рост злокачественных опухолей [108, 109]. На фоне отсутствия IGFBP-4 мыши демонстрировали небольшое

уменьшение массы тела [110], включая массу кишечника [111].

IGFBP-5 имеет молекулярную массу 28,6 кДа и, как и IGFBP-3, образует тройной комплекс с молекулами IGF и ALS. Как и все представители семейства IGFBP, IGFBP-5 включает в себя 3 домена: высококонсервативный *N*-домен, неструктурированный петлеобразный линкерный домен и *C*-концевой структурированный домен, содержащий, в частности, тиреоглобулиновый повтор типа I. Помимо упомянутых выше элементов, в его структуре обнаружены такие консервативные мотивы, как IGF-связывающий домен, участок расщепления протеазами, сигнальная последовательность NLS, а также ALS-связывающий мотив для взаимодействия с внеклеточным матриксом [112].

IGFBP-5 был впервые идентифицирован и выделен из экстрактов костной ткани, а также из культуры клеток остеосаркомы человека [113, 114]. К настоящему моменту времени экспрессия IGFBP-5 показана в тканях лёгких, костей, мышц, почек, половых желёз и т.д. При этом в некоторых тканях экспрессия IGFBP-5 находится под контролем гормональной системы, например, под действием пролактина – в молочных железах мышей или паратгормона – в остеобластоподобных клетках, а в ряде случаев экспрессия осуществляется конститутивно, т.е. на постоянном уровне [112]. Более того, регуляция экспрессии IGFBP-5 может происходить на посттранскрипционном уровне посредством РНК-интерференции с участием микроРНК [115, 116]. Среди посттрансляционных модификаций, которым подвергается IGFBP-5, стоит упомянуть фосфорилирование по некоторым аминокислотным остаткам серина, что приводит к снижению его аффинности к гепарину, но не к IGF, а также его протеолитическое расщепление, которое в некоторых случаях препятствует связыванию с IGF [117]. Также на активность IGFBP-5 может влиять его взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса. Так, ассоциация IGFBP-5 с поверхностью внешней мембраны фибробластов стимулирует клеточный рост IGF-зависимым способом: IGFBP-5 способен связываться с внеклеточным матриксом, что способствует высвобождению IGF-I из комплекса с IGFBP-5 [118]. Более того, в некоторых случаях элементы внеклеточного матрикса могут активировать экспрессию IGFBP-5, как это имеет место в случае фибронектина клеток гладких мышц у свиней [119].

В результате экспериментов по гиперэкспрессии IGFBP-5 на мышцах были выявлены такие эффекты, как снижение роста тела в пренатальном и постнатальном периоде, высокая неонатальная смертность, а также снижение фертильности самок и уменьшение массы скелетных

мышц примерно на 30% [120]. Это согласуется с представлением о том, что IGFBP-5 ингибирует IGF-сигнальный путь. При этом при дефиците IGFBP-5 у мышей не наблюдалось каких-либо значительных изменений в морфологии, что, по всей видимости, связано с компенсаторным механизмом, реализующимся благодаря наличию других представителей семейства IGFBP [121]. Для сердечно-сосудистых заболеваний показана положительная корреляция концентрации IGFBP-5 в крови и ИБС [122]. Помимо этого, известно, что подкожная инъекция IGFBP-5 значительно замедляла рост аденокарциномы и уменьшала количество кровеносных сосудов у мышей по сравнению с контрольной группой. По всей видимости, такая антиангиогенная активность опосредована ингибированием сигнального пути PI3K/АКТ [123].

IGFBP-6. Молекулярная масса IGFBP-6 составляет 22,8 кДа. Данный белок является гликозилированным, что увеличивает его молекулярную массу до 34 кДа [124].

Взаимодействие IGFBP-6 и IGF-II происходит в 50 раз эффективнее, чем в случае с IGF-I [125]. Таким образом, основной IGF-опосредованной функцией IGFBP-6 является ингибирование функции IGF-II, т.е. негативная регуляция процессов клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки [126]. При этом IGFBP-6 не оказывает эффекта на IGF-I-опосредованные процессы, что, по всей видимости, связано с более низкой аффинностью взаимодействия этих белков. Молекула IGFBP-6 построена аналогичным для представителей семейства IGFBP образом. Одно из основных отличий IGFBP-6 от остальных IGFBP заключается в наличии пяти, а не шести дисульфидных связей в *N*-концевом домене. Также стоит отметить, что в составе IGFBP-6 обнаруживается последовательность NLS, а также большое количество сайтов гликозилирования в линкерном участке.

Интересно, что промотор гена *IGFBP6*, находящегося на 12-й хромосоме, обладает регуляторными элементами, которые могут регулироваться в результате гипоксического воздействия. По-видимому, с этим связано увеличение количества IGFBP-6 после гипоксии в эндотелиальных клетках сосудов [127]. К регуляторам экспрессии IGFBP-6 *in vitro* также относятся cAMP, IGF, витамин D, p53, ретиноевая кислота и глюкокортикоиды [128].

Спектр функций IGFBP-6 очень широк – от участия в работе иммунной системы до регуляции фиброза и опухолеобразования [129]. Показано участие IGFBP-6 в фиброзе сердца. IGFBP-6 также вовлечён в развитие сопровождающихся развитием фиброза патологических состояний сердечно-сосудистой системы, таких как острый инфаркт миокарда и формирование атеросклеротических бляшек. В атеросклеротической бляшке

IGFBP-6 колокализуется с эндотелиальными клетками CD31⁺ и макрофагами CD68⁺ [130].

Специфические протеазы, расщепляющие IGF-связывающие белки. Регуляция биодоступности IGF за счёт активности IGF-связывающих белков и различных протеаз. Высвобождение IGF из комплекса с IGFBP, в свою очередь, регулируется различными протеазами, которые осуществляют специфический протеолиз IGFBP, тем самым увеличивая биодоступность IGF для взаимодействия с рецепторами. Степень аффинности взаимодействия IGFBP и IGF, как правило, не отличается или превышает таковую для взаимодействия IGF и их рецепторов. Так как концентрации IGFBP находятся в молярном избытке по отношению к концентрациям IGF, в свободной форме в плазме присутствует менее 1% от общего количества IGF. Дальнейший контроль биодоступности IGF для их специфических рецепторов осуществляется за счёт различных посттрансляционных модификаций IGFBP (таких как фосфорилирование, гликозилирование, протеолитическое расщепление), которые могут влиять на их стабильность или аффинность [89, 131].

Показано, что все 6 представителей IGFBP подвергаются протеолизу под действием специфических протеаз, причём протеолитическое расщепление, как правило, происходит по участкам, локализованным в линкерном домене [132, 133]. Для различных IGFBP известен целый ряд расщепляющих их протеолитических ферментов [100, 134], однако далеко не все из них идентифицированы на данный момент. Ниже будут приведены лишь некоторые примеры протеаз, расщепляющих субстраты IGFBP.

На данный момент известно, что единственная протеаза, которая способна расщеплять все типы IGFBP *in vitro* – это матриксная металлопротеаза-7 (MMP-7, matrix metalloproteinase-7) [135]. Протеолиз IGFBP-1 под действием данной протеазы с образованием двух фрагментов массой 12 и 19 кДа был показан в амниотической жидкости плода, что приводило к потере IGFBP-1 способности связывать IGF-I [136]. Также известно, что нефосфорилированная форма IGFBP-1 подвергается протеолизу под действием протеазы клеток децидуальной оболочки [137]. Для IGFBP-2 также известен ряд протеаз, одной из которых является ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 1 или дезинтегрин и металлопротеиназа (ADAM-протеаза), содержащая мотив тромбоспондина 1). Идентификация этой пары субстрат-фермент была осуществлена в рамках исследования IGFBP-2 как маркера глиомы [138]. IGFBP-3 также подвергается протеолизу и во время беременности присутствует в плазме крови в основном в виде протеолитических фраг-

ментов [139], однако наличие протеолитических фрагментов IGFBP-3 не является непосредственным маркером беременности [140]. В литературе описано большое количество протеаз, расщепляющих IGFBP-3, например, матриксная металлопротеаза-3 (MMP-3) [90], сериновая протеаза семенной жидкости [141], катепсин-D-подобная протеаза [142] и многие другие. IGFBP-5 подвергается протеолизу под действием таких протеаз, как тромбин [119], катепсин-G, эластаза [143] и многих других. При этом результаты *in vitro* исследований протеолитического расщепления IGFBP-5, проведённые в кондиционированной среде фибробластов кожи, указывают на то, что присоединение IGFBP-5 к гликозаминогликанам защищает его от протеолитической деградации [144]. Среди протеаз, расщепляющих IGFBP-6 в организме, выделяют катепсин-D-подобную кислотоактивируемую протеазу [142], нейтральную сериновую протеазу [145], а также MMP-7, MMP-9 и MMP-12 [146, 147].

Отдельное внимание стоит уделить матриксным металлопротеазам RAPP-A (ассоциированный с беременностью белок плазмы A) и RAPP-A2 (ассоциированный с беременностью белок плазмы A2) и их субстратам. Данные протеазы катализируют расщепление белка IGFBP-5 по одному и тому же сайту [148], при этом RAPP-A также может расщеплять IGFBP-2 и IGFBP-4, а RAPP-A2 – IGFBP-3. Более того, RAPP-A-опосредованное расщепление IGFBP-2 и IGFBP-4 происходит активнее в присутствии IGF-I или IGF-II, в то время как RAPP-A2-опосредованное расщепление IGFBP-3 и IGFBP-5 происходит эффективно и при отсутствии IGF, присутствие IGF лишь немного ускоряет реакцию. RAPP-A является одной из самых подробно описанных протеаз, которая способна расщеплять IGFBP-4 *in vivo* [102]. Протеолитически активная форма RAPP-A представлена димерной формой белка, ассоциированной с гликозаминогликанами внеклеточного матрикса [149].

Расщепление IGFBP-4 под действием RAPP-A происходит по участку между аминокислотными остатками Met135 и Lys136 в линкерном домене, в результате чего образуется два протеолитических фрагмента (NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4) [150]. При этом, по всей видимости, протеолитические фрагменты IGFBP-4 не обладают собственной биологической функцией [151]. Процесс расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A происходит преимущественно на поверхности клетки. В нашей лаборатории на моделях первичных культур неонатальных кардиомиоцитов, а также кардиомиоцитов человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), было впервые показано, что RAPP-A способен расщеплять IGFBP-4 в сердечной ткани, причём

не только на поверхности кардиомиоцитов, но и в кондиционированной среде. В результате во внеклеточном пространстве на внешней мембране кардиомиоцитов происходит накопление IGF, что, в свою очередь, способствует аутокринной и паракринной регуляции нормального состояния сердечной ткани [18, 152]. Протеолиз IGFBP-4 также может осуществляться под действием металлопротеаз матрикса, таких как MMP-2, MMP-7 и MMP-9 [135, 153].

Результаты последних исследований указывают на активацию RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани при различных сердечно-сосудистых патологиях. Результаты по этой проблеме будут суммированы ниже. Исследование протеолиза IGFBP и опосредованная этим процессом регуляция IGF-пути является перспективным направлением по поиску новых биомаркеров не только сердечно-сосудистых, но и других заболеваний.

РОЛЬ IGF-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИОКАРДЕ

Физиологическая и патологическая гипертрофия. Как было рассмотрено ранее, IGF-I и IGF-II играют ключевую роль как в эмбриональном развитии сердца, так и в поддержании его нормальной работы в постнатальном периоде жизни. Однако доминирующую роль в развитии сердца играет именно IGF-II. Количество мРНК *IGF-II*, детектируемое в ткани желудочков сердца плода, значительно выше по сравнению с мРНК *IGF-I*. Однако после рождения экспрессия IGF-II значительно снижается вплоть до недетектируемых количеств. IGF-II является основным агентом, стимулирующим митотическое деление клеток в процессе зародышевого развития. Его молекулярные эффекты опосредованы взаимодействием с тирозинкиназными рецепторами IGF-1R и INSR (рис. 3). Дальнейшая передача сигнала приводит к активации сигнальных каскадов ERK/MAPK и PI3K/AKT. Показано, что активация PI3K/AKT-каскада в сердце способствует развитию сердечной гипертрофии и дисфункции миокарда. Например, AKT инактивирует факторы Forkhead box O (FOXO: FOXO1 и FOXO3), которые являются негативными регуляторами пролиферации миокарда. AKT транслоцируется в ядро, где фосфорилирует белки FOXO, вследствие чего белки FOXO транслоцируются в цитоплазму, что приводит к снижению их транскрипционной активности. Помимо AKT, аналогичный эффект на FOXO осуществляет киназа ERK (extracellular-signal regulated kinase), являющаяся участником MAPK-сигнального каскада. В активном состоянии

FOXO связываются с промоторными областями генов, ассоциированных с аутофагией, и иницируют аутофагию кардиомиоцитов. И FOXO1, и FOXO3 являются антигипертрофическими агентами. Например, FOXO3 поддерживает нормальный размер кардиомиоцитов, ингибируя их рост и способствуя развитию аутофагических процессов. Помимо этого, FOXO3 способен активировать гены антиоксидантной системы, а также положительно регулировать экспрессию малой некодирующей РНК miR-1m, которая снижает количество IGF-I [154]. При IGF-индуцированной гипертрофии миокарда показано, что FOXO3 активирует экспрессию белка Atrogin-1, что вызывает значительное уменьшение размера кардиомиоцитов сердца *in vivo* [155]. Помимо FOXO, AKT-опосредовано происходит регуляция белков BCL-2, BAD, GSK-3 β [156]. BCL-2 (B-cell lymphoma-2) является регулятором апоптоза, при этом он может как индуцировать, так и подавлять апоптоз. Было показано, что как ингибирование сигнального пути PI3K/AKT, так и селективное ингибирование BCL-2 препятствуют развитию гипертрофии в сердечной ткани [157]. BAD (BCL-2 associated death promoter), относящийся к тому же семейству, что и BCL-2, является проапоптотическим фактором. Фосфорилирование BAD под действием PI3K/AKT-пути приводит к его взаимодействию с другими белками, что способствует развитию ингибиторного эффекта BAD на активность BCL-2 и BCL-x_L [158]. Фосфорилирование GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) в результате активации сигнального каскада PI3K/AKT ингибирует её активность. Ингибирование GSK-3 β приводит к изменениям активности транскрипционных и трансляционных факторов в миокарде, что также приводит к развитию гипертрофии [159]. Таким образом, IGF-II индуцирует развитие патологической гипертрофии в сердечной ткани, запуская процессы, приводящие к ингибированию действия сразу нескольких антигипертрофических факторов (рис. 3).

В случае IGF-I взаимодействие со специфическими рецепторами регулирует такие процессы в сердечной ткани, как сократимость, клеточный метаболизм, гипертрофический рост, аутофагия, апоптоз и др. Эффекты IGF-I на метаболическую активность клеток сердечной ткани реализуются путём активации мембранного рецептора IGF-1R. Ввиду того, что IGF-I так же, как и IGF-II, способен связываться с IGF-1R, многие сигнальные пути, индуцируемые этими лигандами, пересекаются. При связывании IGF-I с рецепторными тирозинкиназами происходит физиологическая активация PI3K/AKT-пути. Рецепторные тирозинкиназы обеспечивают локализацию PI3-киназ (PI3K) на цитоплазматической мембране. Далее, PI3K катализирует реакцию фосфорилирования мембран-

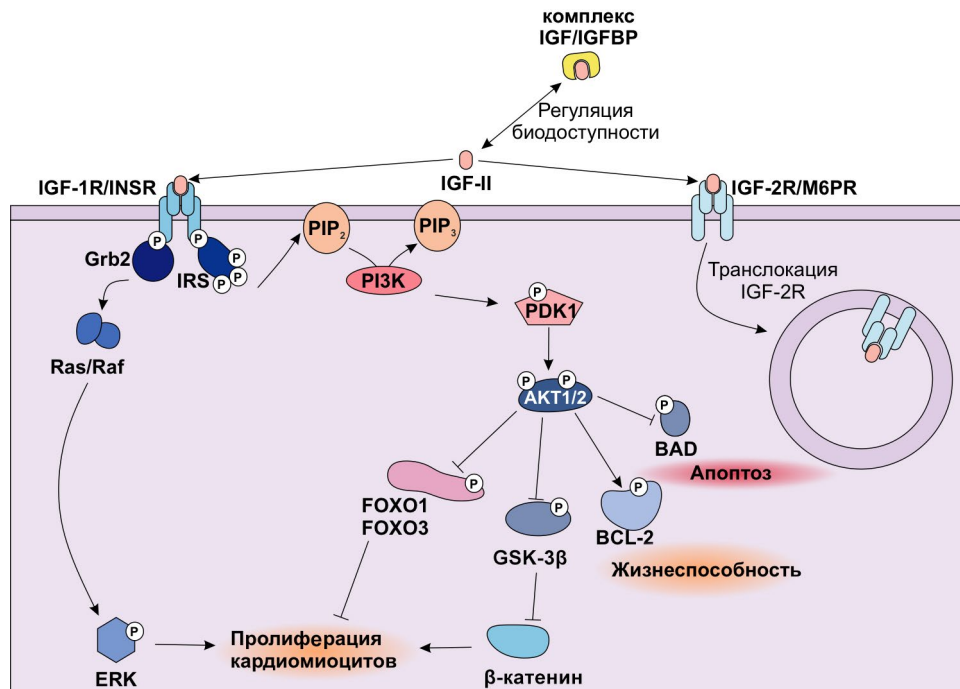


Рис. 3. Основные участники сигнальных каскадов, запускаемых IGF-II и вызываемые ими эффекты. Grb2 – белок 2, связанный с рецептором фактора роста; ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; IRS – субстрат инсулинового рецептора; PIP₂ – фосфотидилиназитол-2-фосфат; PI3K – липидные киназы, фосфорилирующие 3-гидроксильную группу фосфоинозила и фосфоинозитидов; PIP₃ – фосфотидилиназитол-3-фосфат; PDK – киназа пируватдегидрогеназы 1, AKT1/2 – серин-треониновая протеинкиназа B alpha/beta; FOXO – Forkhead box O факторы; BCL-2 – регулятор апоптоза В-клеточной лимфомы-2; BAD – агонист белка клеточной гибели, связанный с BCL2; GSK-3β – киназа гликогенсинтазы 3β. Описание в тексте

ного фосфотидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) с образованием фосфатидилиназитол-3,4,5-трифосфата (PIP₃). Затем начинается активация AKT, которая осуществляется за счёт присоединения PIP₃ к N-концевому домену AKT, а также серин-треонинового фосфорилирования каталитического домена AKT. Благодаря активации сигнального каскада PI3K/AKT происходит ингибирование белков FOXO, речь о которых шла выше. Протеинкиназа AKT также может активировать белок mTOR (mechanistic target of rapamycin, серин-треониновая протеинкиназа), который, в свою очередь, способствует усилению синтеза белков и подавляет аутофагию (рис. 4). Активация синтеза белков под действием mTOR происходит благодаря фосфорилированию белка, связывающего три изоформы эукариотических факторов инициации трансляции (eIF4E) – 4E-BP – и двух изоформ киназы S6 (S6K). При этом в клетках mTOR обнаруживается в виде двух функционально различных комплексов mTORC1 и mTORC2. В норме mTORC1 необходим для развития сердечно-сосудистой системы в эмбриогенезе и для постнатального поддержания структуры и функций сердечной ткани. Ингибирование mTORC1 предотвращает развитие патологической гипертрофии и повышает устойчивость кардиомиоцитов к стрессу, вызванному старением. Также у мышей при заболевании

LEOPARD, названном на основе аббревиатуры, обозначающей основные особенности этого расстройства: множественные лентиги (L), нарушения проводимости ЭКГ (E), глазной гипертелоризм (O), стеноз лёгочной артерии (P), аномалии гениталий (A), задержка роста (R) и нейросенсорная глухота (D), неконтролируемо возрастает активность mTOR, а ингибирование mTOR рапамицином полностью нивелирует возникшее гипертрофированное состояние сердечной мышцы [160]. Также mTORC1 способен фосфорилировать белок ULK, ингибируя его активность, заключающуюся в деградации белков и органелл при аутофагии [161]. Таким образом, активация mTOR под действием сигнальных каскадов, запускаемых IGF-I, стимулирует гипертрофический рост клеток миокарда.

Для передачи сигнала рецептором IGF-1R существует два канонических пути: PI3K/AKT и ERK. Также в ряде работ описан неканонический путь IGF-клеточной сигнализации, ассоциированный с G-белками. Было показано, что некоторые эффекты IGF-I ингибируются блокатором гетеротримерных G_i-белков – Petrussis toxin (PTX) или коклюшным токсином – на некоторых клеточных линиях, что позволило сделать вывод, что активация IGF-1R запускает клеточную сигнализацию через G_i-белки. Было показано, что IGF-1R физически взаимодействует с представителями семей-

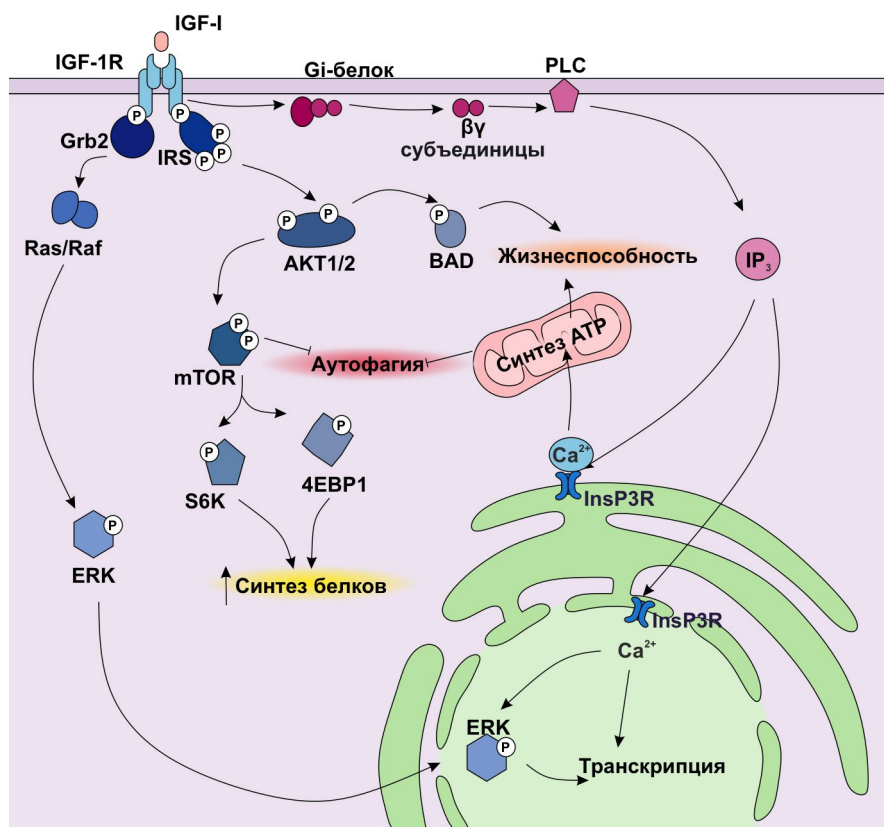


Рис. 4. Канонические (выделены синим цветом) и неканонический (выделен красным цветом) пути передачи сигнала от IGF-I через IGF-1R-рецептор. Grb2 – белок 2, связанный с рецептором фактора роста; ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; IRS – субстрат инсулинового рецептора; AKT1/2 – серин-треониновая протеинкиназа В alpha/beta; BAD – агонист белка клеточной гибели, связанный с BCL2; mTOR – серин-треониновая протеинкиназа (mechanistic target of rapamycin); 4EBP1 – белок, связывающий три изоформы эукариотических факторов инициации трансляции; S6K – изоформа киназы S6; PLC – фосфолипаза C; IP₃ – иназитол-3-фосфат; InsP3R – иназитолтрифосфатный рецептор. Описание в тексте

ства G-белков – G₁₂ и G₁₃. Такое взаимодействие усиливается после взаимодействия IGF-1R и IGF-I. Передача сигнала через G-белки приводит к активации мембранной фосфолипазы C (PLC), которая повышает количество инозитол 1-, 4- и 5-трифосфата, что, в свою очередь, ведёт к Ca²⁺-опосредованной регуляции транскрипции (рис. 4) [30].

Что касается канонических путей передачи сигнала через IGF-1R от IGF-I, то принято считать, что сигнальный путь IGF-I/PI3K/AKT, который был описан выше, является основным в развитии физиологической гипертрофии миокарда. Было показано, что у мышей с пониженной активностью сигнального пути IGF-I/PI3K/AKT был детектирован нормальный или уменьшенный размер сердца и сниженный гипертрофический ответ при физической нагрузке. В случае повышенной активности IGF-I/PI3K/AKT размер сердца оставался в пределах нормы, как и гипертрофический ответ на физическую нагрузку; более того, у таких мышей наблюдалась эффективная устойчивость к развитию инфаркта миокарда, дилатационной кардиомиопатии и развитию артериальной ги-

пертензии [162]. Кроме сигнального каскада IGF-I/PI3K/AKT, который рассматривается как основной в развитии физиологической гипертрофии, сигнальный путь ERK также может опосредовать её возникновение. Показано, что сигнальный путь ERK активируется при ранней адаптивной концентрической гипертрофии, но активация этого пути снижается при поздней деструктивной эксцентрической гипертрофии (компенсаторная гипертрофия миокарда, при которой происходит утолщение стенки миокарда с дилатацией сердечной полости). При повышенном давлении ERK-сигнальный путь активируется посредством рецепторов, ассоциированных с G-белками или посредством интегринов, которые являются сенсорами растяжения. У мышей, мутантных по одному из компонентов сигнального пути ERK, наблюдалась большая чувствительность к повышенному давлению и не происходило развития гипертрофического ответа в ответ на поперечное сужение аорты. Таким образом, понижение активности ERK-сигнального каскада ассоциировано с трансформацией от компенсаторной к патологической

гипертрофической сердечной недостаточности при избыточном давлении, и роль ERK в этом процессе заключается в предотвращении эксцентричного роста миокарда [163]. ERK-сигнальный путь, по-видимому, вовлечён и в транслокацию IGF-2R через мембрану. Было показано, что прогипертрофический фактор ангиотензин-II (ANG-II) повышает стабильность IGF-2R-рецептора, и его действие опосредовано активацией ERK-сигнального каскада. Использование ингибиторов ERK-сигнального пути, в свою очередь, понижает количество IGF-2R-рецепторов в клеточной мембране [164].

Среди факторов, которые способны индуцировать гипертрофию в миокарде, также выделяют такие агенты, как ангиотензин-II, эндотелин-I, норэпинефрин и др. В нашей лаборатории было показано, что при эндотелин-1-опосредованной гипертрофии кардиомиоцитов в первичной культуре кардиомиоцитов крысы повышается уровень протеолиза IGFBP-4 под действием протеазы RAPP-A, что приводит к увеличению количества свободного IGF-II. Такое изменение в концентрации свободного IGF-II вследствие гипертрофических изменений в кардиомиоцитах может являться потенциальным компенсаторным механизмом при патологической гипертрофии миокарда, поскольку, наряду с прогипертрофическими свойствами, IGF-II также проявляет кардиопротекторные свойства (см. раздел «Кардиопротекторная роль IGF в сердечной ткани») [18]. Таким образом, можно говорить о принципиально разных ролях IGF-I и IGF-II в регуляции и развитии физиологической и патологической гипертрофии миокарда, так как IGF-I в таком случае будет являться фактором, приводящим к развитию физиологической гипертрофии, как следствию внешних факторов, а функция IGF-II будет заключаться в ослаблении последствий развившейся патологической гипертрофии.

Атеросклероз. Известно, что система инсулиноподобного фактора роста вносит вклад в развитие атеросклероза, активируя рост и пролиферацию гладкомышечных клеток и макрофагов, а также иницируя такие процессы, как ангиогенез и рестеноз [165]. Атеросклероз, представляющий собой одну из основных причин различных сердечно-сосудистых заболеваний, является многофакторным заболеванием и обладает сложной патофизиологией. При атеросклерозе IGF-I локально вырабатывается эндотелиальными и гладкомышечными клетками стенок сосудов и обнаруживается в плазме крови [166]. Результаты недавних исследований указывают на то, что в формирование атеросклеротических бляшек вовлечены не только IGF, но и система белков, регулирующих их биодоступность [2].

Так, ряд исследований указывают на атерогенную роль протеазы RAPP-A, специфически расщепляющей IGFBP-4. Так, повышенный уровень RAPP-A детектируется у пациентов с нестабильной стенокардией, острым инфарктом миокарда, бессимптомной гиперлипидемией, ишемической болезнью сердца, атеросклеротическими заболеваниями периферических артерий и др. [167–171]. Conover et al. [172] показали, что при повышенной экспрессии RAPP-A в гладкомышечной ткани артерий происходит ускорение развития атеросклеротического поражения сосудов, т.е. RAPP-A является атерогенным фактором. Далее, в ряде исследований RAPP-A был использован как потенциальная мишень в терапии атеросклеротических заболеваний. При ингибировании RAPP-A под действием высокоспецифичных антител у мышей через 10 недель наблюдалось снижение количества атеросклеротических бляшек на 70% по сравнению с контрольной группой. Достигнутый эффект оставался постоянным на фоне искусственно повышенного уровня холестерина и триглицеридов [58, 172].

Убедительными доказательствами в пользу участия RAPP-A в атеросклерозе также являются исследования по гипер- и гипозэкспрессии RAPP-A у мышей. Так, повышенная экспрессия RAPP-A в гладкомышечных клетках артерий у мышей приводила к увеличению площади поражения артерий, однако количество очагов поражений при этом не изменялось. При этом отсутствие экспрессии RAPP-A препятствовало развитию атеросклеротических изменений в сосудах у мышей, дефицитных по аполипопротеину E на фоне диеты с высоким содержанием жиров. Более того, ингибирование RAPP-A посредством высокоспецифичных моноклональных антител приводило к уменьшению количества атеросклеротических бляшек в аорте [172–174]. Boldt et al. [175] показали, что атерогенная роль RAPP-A зависит от локализации протеолитической активности фермента по отношению к IGFBP-4. В том случае, когда протеолиз IGFBP-4 происходил не на поверхности клеток, а во внеклеточной среде, увеличения площади области поражения стенок сосудов не наблюдалось. Среди механизмов атерогенного действия RAPP-A предполагают многочисленные патофизиологические процессы, которые ассоциированы с атерогенезом, включая накопление липидов, сосудистое воспаление, дисфункцию эндотелия, пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток сосудов, стабильность атеросклеротических бляшек и атеротромбоз.

Таким образом, RAPP-A может являться потенциальной терапевтической мишенью для лечения атеросклероза через подавление её протеолитической активности. Среди известных ингибиторов

протеолитической активности RAPP-A можно назвать станниокальцин-2 (STC-2), который может образовывать ковалентный комплекс с RAPP-A, ингибируя её [176]. Среди других ингибиторов RAPP-A можно назвать микроРНК miR-490-2p, повышенная экспрессия которой понижает протеолитическую деградацию IGFBP-4 [177], станины и антиоксиданты [178]. В настоящий момент поиск эффективно действующих ингибиторов RAPP-A продолжается и является одной из ключевых задач исследования IGF-сигнального пути в сердечной ткани.

IGF-система и метаболические патологии.

Известно, что пациенты с диабетом 2-го типа имеют значительно большую частоту развития и худший прогноз сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению со здоровыми людьми [179–182]. Отчасти этот повышенный риск может быть связан с сопутствующими факторами, такими как гипертония, но, по-видимому, существуют дополнительные механизмы, благодаря которым диабет 2-го типа и сердечно-сосудистые заболевания взаимосвязаны. Резистентность к инсулину, ключевая особенность диабета 2-го типа, сама по себе ассоциирована с развитием сердечно-сосудистых патологий [183].

В ряде исследований была показана взаимосвязь между уровнями циркулирующего IGF-I и наличием ССЗ, в подавляющем большинстве из которых было продемонстрировано снижение уровня IGF-I на фоне повышения риска развития ССЗ [184–187]. Интересно, что усиление протеолитической деградации IGFBP-3, наблюдаемое при развитии диабета 2-го типа и сердечно-сосудистых заболеваний, может фактически представлять собой компенсаторный механизм в попытке увеличить концентрацию IGF-I в крови [188, 189]. Причинная роль снижения уровня IGF-I в развитии ССЗ и диабета хорошо объясняется при исследовании пациентов с полиморфизмом в промоторной области гена, кодирующего IGF-I [190]. Отсутствие «нормального» аллеля приводит к состоянию постоянного дефицита IGF-I, такой феномен был обнаружен у 12% из более чем 2000 индивидиумов. В этом случае риск развития диабета 2-го типа и инфаркта миокарда повышается в 1,7 раз. Более того, у пациентов с полиморфизмом в промоторной области гена, кодирующего IGF-I, и с диабетом 2-го типа риск инфаркта миокарда увеличивается в 3,4 раза. Эти данные указывают на то, что снижение концентрации IGF-I в крови является особенностью метаболических патологий, которая на данный момент до конца не изучена. Не менее интересен тот факт, что низкие концентрации IGF-I и IGFBP-1 в крови независимо связаны с развитием метаболических патологий и резистентности к инсулину [191].

Компоненты IGF-сигнального пути как биомаркеры ССЗ и их диагностическое значение. IGF-I и IGFBP-3.

IGF-I является прогностическим маркером острого инфаркта миокарда. Пороговое значение концентрации в сыворотке крови для IGF-I при данном заболевании составляет 137 нг/мл. Более высокие концентрации ассоциируются с улучшением функциональных параметров сердца, в то время как более низкие ассоциируются с плохим прогнозом для выздоровления. При этом наблюдается сильная корреляция между увеличением концентраций IGF-I и IGFBP-3 [46]. Также IGFBP-3 и IGF-I в тандеме являются диагностическими маркерами ИБС: низкие концентрации IGF-I и IGFBP-3 ассоциированы с этим заболеванием [192]. Также известно, что низкие концентрации IGF-I в сыворотке наблюдаются при хронической и прогрессирующей сердечной недостаточности наряду с кахексией [193].

IGF-II. При остром инфаркте миокарда в сыворотке пациентов наблюдается снижение уровня IGF-II. При этом снижение концентрации IGF-II происходит непосредственно после инфаркта, однако через неделю его концентрация достигает нормальных значений [194].

RAPP-A. Основной регулятор биодоступности IGF – RAPP-A – является маркером острого коронарного синдрома: он был обнаружен в нестабильных атеросклеротических бляшках на стенках кровеносных сосудов [165]. Сильная линейная корреляция была обнаружена между уровнем RAPP-A и двумя другими известными маркерами ранних стадий атеросклероза (концентрация кальция в коронарных артериях и толщина интима-медии сонных артерий). Так, при пороговом значении концентрации RAPP-A, равном 2,35 нг/мл, чувствительность и специфичность его как маркера атеросклероза была оценена в 94,3% и 63,9% соответственно [195]. Более того, циркулирующий в крови RAPP-A является сильным прогностическим маркером инфаркта, предполагается, что его прогностическая способность превосходит таковую для сердечной изоформы тропонина I (cTnI) [196, 197].

IGFBP-4. В ряде исследований было показано, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 (NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4) ассоциирован с увеличением риска возникновения ОКС у пациентов с ИБС и наступлением смерти от ССЗ у больных диабетом 1-го типа [16, 104]. Недавно было обнаружено, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 в крови у больных сердечной недостаточностью (СН) – состоянием, которое может развиваться вследствие ОКС и инфаркта миокарда – также ассоциирован с повышенным риском летального исхода [15, 105]. Одним из самых распространённых патологических изменений в сердечной ткани при СН

является патологическая гипертрофия кардиомиоцитов, в результате которой происходит увеличение сердечной мышечной массы. Недавно в нашей лаборатории было проведено исследование уровня протеолиза IGFBP-4 при гипертрофических изменениях в культуре кардиомиоцитов крысы. При этом фенотипические изменения в кардиомиоцитах были охарактеризованы как характерные для патологической гипертрофии. Было показано, что концентрация фрагментов IGFBP-4 вследствие RAPP-A-ассоциированной протеолитической реакции повышается в гипертрофированной культуре кардиомиоцитов, по сравнению с нормой, в 1,5–2 раза [18]. Эти данные позволяют предположить, что усиление RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии будет приводить к повышению биодоступности IGF, по сравнению с нормой, и частично объясняют механизм увеличения концентрации протеолитических фрагментов IGFBP-4 при развитии различных ССЗ.

IGFBP-5. Роль IGFBP-5, синтезируемого и секретируемого большим количеством типов клеток, как биомаркера сердечно-сосудистых заболеваний была показана при ИБС. Так, в сыворотке пациентов концентрация IGFBP-5 снижалась, что достоверно коррелирует с уровнями IGF-I, -II и IGFBP-3 [122].

В табл. 1 просуммирована вышесказанная информация об основных компонентах IGF-сигнального пути как биомаркеров ССЗ, а также их диагностическое значение.

КАРДИОПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ IGF В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ IGF-I В ЛЕЧЕНИИ ССЗ

Несмотря на большое количество данных о роли IGF-сигнального пути в развитии сердечно-сосудистых патологий, в ряде исследований

Таблица 1. Компоненты IGF-сигнального пути как биомаркеры ССЗ и их диагностическое значение

Компонент IGF-системы	Прогностическая и клиническая значимость	Ссылка
IGF-I	прогностический маркер острого инфаркта миокарда (концентрация в сыворотке < 137 нг/мл)	[46]
	диагностический маркер сердечной недостаточности (СН) (концентрация в сыворотке < 122 нг/мл)	[193]
IGF-II	диагностический маркер острого инфаркта миокарда (концентрация в сыворотке крови < 400 нг/мл)	[194]
IGFBP-3 и IGF-I	диагностический маркер ишемической болезни сердца (ИБС); на фоне ИБС – IGFBP-3 $2204,5 \pm 1343,3$ нг/мл; IGF-I $277,8 \pm 178,9$ нг/мл; при этом контрольные значения для IGFBP-3: $8499,5 \pm 2406,6$ нг/мл; для IGF-I: $492,8 \pm 222,9$ нг/мл; таким образом, на фоне ИБС наблюдается снижение количества IGFBP-3 и IGF-I	[192]
IGFBP-4	прогностический маркер ОКС у пациентов с ИБС и наступления смерти у больных диабетом 1-го типа	[16, 104]
	прогностический маркер СН (повышенный уровень протеолитических фрагментов у пациентов с СН ассоциирован с повышенным риском летального исхода: NT-IGFBP-4 > 214 мкг/литр, CT-IGFBP-4 > 124 мкг/литр)	[15, 105]
	повышение уровня фрагментов IGFBP-4 ассоциировано с развитием гипертрофии кардиомиоцитов (в 1,5 раза по сравнению с контролем)	[18]
IGFBP-5	диагностический маркер ишемической болезни сердца (у пациентов с ИБС уровень IGFBP-5 выше 298 ± 71 нг/мл; у здоровых пациентов – 200 ± 59 нг/мл)	[122]
RAPP-A	диагностический маркер ОКС – обнаруживается в нестабильных атеросклеротических бляшках; уровень RAPP-A на фоне нестабильной стенокардии – $14,9$ мкМЕ/литр; на фоне инфаркта миокарда – $20,6$ мкМЕ/литр; более 10 мкМЕ/литр – у пациентов с ОКС	[165, 195]
	прогностический маркер инфаркта миокарда (пороговое значение $12,6$ мкМЕ/литр)	[196, 197]

описываются кардиопротекторные свойства IGF при различных ССЗ. Так, в 2018 г. Yeves et al. [198] было показано, что IGF-I оказывает кардиопротекторное влияние на модели спонтанно гипертензивных крыс. Также в ряде экспериментов был показан положительный эффект гиперэкспрессии IGF-II и IGF-I на функции сердца мышей после инфаркта миокарда [199, 200]. В работе Vinciguerra et al. [201] было продемонстрировано, что гиперэкспрессия IGF-I в неонатальных кардиомиоцитах, переведённых в гипертрофированное состояние, повышает экспрессию кардиопротекторных генов. Кроме этого, в исследовании McMullen et al. [53] было показано, что гиперэкспрессия IGF-1R вызывает физиологическую гипертрофию сердца, не связанную с изменениями веса других органов, и положительно влияет на жизнеспособность кардиомиоцитов. В 2012 г. Zhang et al. [127] продемонстрировали, что гиперэкспрессия IGF-I в сердечной ткани может ослаблять, а в некоторых случаях и полностью предотвращать сократительную и метаболическую дисфункцию, вызванную питанием с высоким содержанием жиров. Также было показано, что избыточная экспрессия IGF-1R кардиомиоцитами предотвращает фиброз сердца, ассоциированный с диабетом 1-го типа и диастолическую дисфункцию [202].

В ряде работ на моделях различных животных было продемонстрировано, что внутривенное введение IGF-I улучшает переносимость ишемии и восстановление сердечной функции после инфаркта миокарда [203, 204]. Например, в работе Friehs et al. [203] было продемонстрировано, что IGF-I усиливает метаболизм глюкозы в организме и устойчивость к ишемии при гипертрофии миокарда. В контексте терапевтических подходов к лечению метаболических патологий, основанных на применении IGF-I, следует упомянуть, что рекомбинантный человеческий IGF-I (rhIGF-I) изучался в качестве потенциального средства для лечения диабета 1-го и 2-го типов. Было показано, что прием rhIGF-I улучшал гликемический контроль, но был связан с серьезными побочными эффектами, такими как обострение диабетической ретинопатии [205]. Кроме этого, в исследовании Donath et al. [206] было показано, что введение IGF-I пациентам с хронической сердечной недостаточностью улучшает работу сердца за счёт снижения постнагрузки и, возможно, за счёт положительного инотропного эффекта – увеличения силы сокращения сердца.

Поскольку в последнее время был накоплен значительный массив данных о разнонаправленных эффектах IGF, принципиально иной терапевтический подход с многообещающим потенциалом был недавно предложен Wang и Kukreja [207].

Данный подход заключался в том, что значительного повышения уровня IGF-I в крови пациентов можно достичь с помощью комбинированного лечения тадалафилом (TAD) и гидроксихлорохином HCQ. TAD – это ингибитор фосфодиэстеразы 5, который оказывает кардиопротекторное действие против ишемии/реперфузии (I/R) у мышей с сахарным диабетом, в то время как HCQ является противомаларийным и противовоспалительным препаратом, снижающим гипергликемию у пациентов с сахарным диабетом. Наблюдаемое повышение уровней инсулина и IGF-I при комбинированном лечении TAD + HCQ приводило к активации сигнального пути AKT/mTOR. В результате было высказано предположение, что одновременное лечение TAD и HCQ может стать легкодоступным новым фармакотерапевтическим подходом для защиты от внутримышечного повреждения миокарда при сахарном диабете 2-го типа [207]. Ингибиторы транспортера натрия-глюкозы-2 (SGLT-2is) и агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1RAs) проявляют многочисленные метаболические и сердечно-сосудистые эффекты, которые положительно влияют на состояние при диабете и метаболизм в целом, такие как уменьшение гипергликемии, жировой массы и ремоделирования костей, снижение веса при натрийурезе, и против атеросклероза [208]. Все больше данных указывает на участие оси IGF в плеiotропных реакциях, вызываемых SGLT-2is и GLP-1RAs. Например, GLP-1RA стимулируют реакции, активирующие жизнеспособность клеток в тканях, таких как β -клетки поджелудочной железы и ткани сердца, где IGF-I/IGF-1R играет важную роль. Влияние SGLT-2 на систему IGF плохо изучено, но было высказано предположение, что они способствуют усилению кетогенеза, опосредованного повышенным уровнем циркулирующего гормона роста (GH) [208]. Связь SGLT-2is и GLP-1RAs с IGF-сигнализацией представляет собой захватывающую новую фармакологическую стратегию модуляции уровней IGF-I, которая требует дальнейшей проверки для потенциального применения в лечении сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний [208]. В целом, эти результаты ещё раз подтверждают идею о том, что кардиоспецифическая терапия на основе модуляции концентраций свободного биологически доступного IGF-I может стать мощным полезным инструментом для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, регуляция развития патологических и кардиопротекторных процессов

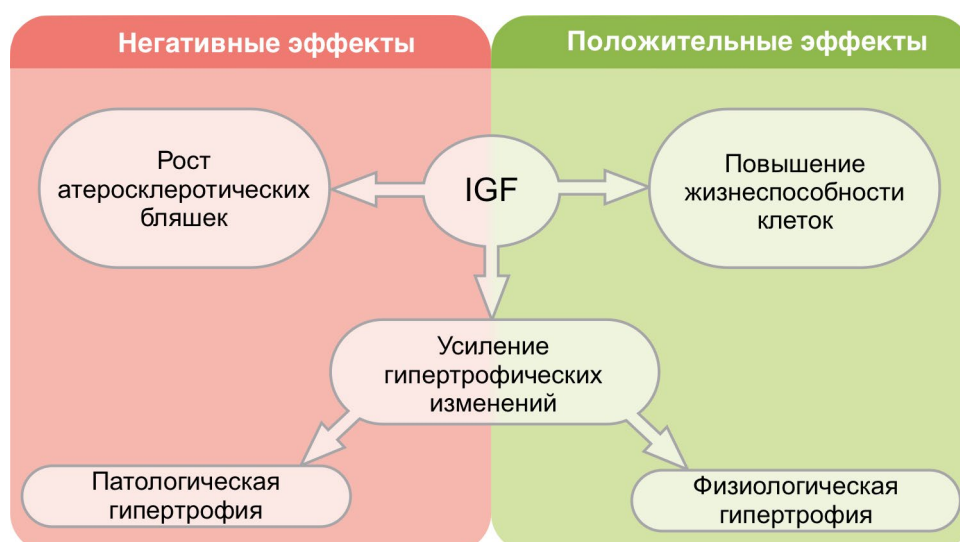


Рис. 5. Положительные и негативные эффекты IGF в сердце

в миокарде является одним из ключевых факторов поддержания физиологической активности сердца. Сигнальная система, активируемая инсулиноподобными факторами роста 1 и 2 (IGF-I, IGF-II), представляет собой путь клеточной сигнализации, оказывающий как позитивное, так и негативное влияние на миокард. С одной стороны, IGF активируют развитие кардиопротекторных механизмов, играющих адаптивную и в некоторых случаях даже компенсаторную роль при различных стрессовых воздействиях (рис. 5). С другой стороны, инициация IGF-сигнального каскада сопряжена с развитием широкого спектра сердечно-сосудистых патологий (рис. 5). Степень выраженности позитивного и негативного воздействия IGF варьирует в широких пределах. Поэтому исследования регуляции IGF-сигнального пути в миокарде являются актуальной фундаментальной и прикладной задачей, а ключевые компоненты IGF-системы – перспективными мишенями для терапевтического воздействия. Однако следует отметить, что разработка терапии ССЗ на основе IGF и её потенциальное применение невозможно без глубокого анализа данных как о его

положительных, так и о его негативных эффектах в миокарде.

Вклад авторов. Д.А. Адашева и Д.В. Серебряная провели анализ литературных данных и написали текст обзора; Д.А. Адашева сделала иллюстрации к обзору; Д.В. Серебряная осуществляла общее руководство при написании данной статьи.

Финансирование. Данное исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00051: «Исследование регуляции биодоступности IGF как адаптивного механизма при гипертрофических изменениях миокарда»).

Благодарности. Авторы выражают благодарность директору научного отдела ОАО «Хайтест», к.б.н. Постникову А.Б. за внимательное прочтение данной обзорной статьи и ценные комментарии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Williams, J., Rayner, M., and Townsend, N. (2015) The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014, *Heart*, **101**, 1182-1189, <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307516>.
2. Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E. (2011) The IGF system, *Acta Diabetol.*, **48**, 1-9, <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0227-z>.
3. Kiepe, D., Ciarmatori, S., Haarmann, A., and Tönshoff, B. (2006) Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes: the functional role of IGFBP-5, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **290**, E363-E371, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00363.2005>.
4. Roith, D. L. (2003) The insulin-like growth factor system, *Exp. Diabetes Res.*, **4**, 205-212, <https://doi.org/10.1155/EDR.2003.205>.

5. Federici, M., Porzio, O., Zucaro, L., Fusco, A., Borboni, P., Lauro, D., and Sesti, G. (1997) Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **129**, 121-126, [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(97\)04050-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(97)04050-1).
6. Li, B., Setoguchi, M., Wang, X., Andreoli, A. M., Leri, A., Malhotra, A., Kajstura, J., and Anversa, P. (1999) Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart, *Circ. Res.*, **84**, 1007-1019, <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.9.1007>.
7. Welch, S., Plank, D., Witt, S., Glascock, B., Schaefer, E., Chimenti, S., Andreoli, A. M., Limana, F., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., and Sussman, M. A. (2002) Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice, *Circ. Res.*, **90**, 641-648, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000013780.77774.75>.
8. Colao, A. (2008) The GH-IGF-I axis and the cardiovascular system: clinical implications, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **69**, 347-358, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03292.x>.
9. Suleiman, M., Singh, R., and Stewart, C. (2007) Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I, *Pharmacol. Ther.*, **114**, 278-294, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.001>.
10. Arnqvist, H. (2008) The role of IGF-system in vascular insulin resistance, *Horm. Metab. Res.*, **40**, 588-592, <https://doi.org/10.1055/s-0028-1082325>.
11. Smith, T. J. (2010) Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? *Pharmacol. Rev.*, **62**, 199-236, <https://doi.org/10.1124/pr.109.002469>.
12. Higashi, Y., Sukhanov, S., Anwar, A., Shai, S.-Y., and Delafontaine, P. (2010) IGF-1, oxidative stress and atheroprotection, *Trends Endocrinol. Metab.*, **21**, 245-254, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.005>.
13. Saber, H., Himali, J. J., Beiser, A. S., Shoamanesh, A., Pikula, A., Roubenoff, R., Romero, J. R., Kase, C. S., Vasan, R. S., and Seshadri, S. (2017) Serum insulin-like growth factor 1 and the risk of ischemic stroke: the Framingham study, *Stroke.*, **48**, 1760-1765, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.016563>.
14. Carlzon, D., Svensson, J., Petzold, M., Karlsson, M. K., Ljunggren, Ö., Tivesten, Å., Mellström, D., and Ohlsson, C. (2014) Both low and high serum IGF-1 levels associate with increased risk of cardiovascular events in elderly men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **99**, E2308-E2316, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1575>.
15. Konev, A. A., Serebryanaya, D. V., Koshkina, E. V., Rozov, F. N., Filatov, V. L., Kozlovsky, S.V., Kara, A. N., Katrukha, A. G., and Postnikov, A. B. (2018) Glycosylated and non-glycosylated NT-IGFBP-4 in circulation of acute coronary syndrome patients, *Clin. Biochem.*, **55**, 56-62, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.004>.
16. Postnikov, A. B., Smolyanova, T. I., Kharitonov, A. V., Serebryanaya, D. V., Kozlovsky, S. V., Tryshina, Y. A., Malanicev, R. V., Arutyunov, A. G., Murakami, M. M., Apple, F. S., and Katrukha, A. G. (2012) N-terminal and C-terminal fragments of IGFBP-4 as novel biomarkers for short-term risk assessment of major adverse cardiac events in patients presenting with ischemia, *Clin. Biochem.*, **45**, 519-524, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.12.030>.
17. Hjortebjerg, R., Tarnow, L., Jorsal, A., Parving, H.-H., Rossing, P., Bjerre, M., and Frystyk, J. (2015) IGFBP-4 fragments as markers of cardiovascular mortality in type 1 diabetes patients with and without nephropathy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **100**, 3032-3040, <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2196>.
18. Serebryanaya, D. V., Adasheva, D. A., Konev, A. A., Artemieva, M. M., Katrukha, I. A., Postnikov, A. B., Medvedeva, N. A., and Katrukha, A. G. (2021) IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A in a primary culture of rat neonatal cardiomyocytes under normal and hypertrophic conditions, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1395-1406, <https://doi.org/10.1134/S0006297921110043>.
19. Wang, W., Sun, Y., Mo, D.-G., Li, T., and Yao, H.-C. (2023) Circulating IGF-1 and IGFBP-2 may be biomarkers for risk stratification in patients with acute coronary syndrome: a prospective cohort study, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **33**, 1740-1747, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2023.05.030>.
20. Yu, W., Gao, H., Hu, T., Tan, X., Liu, Y., Liu, H., He, S., Chen, Z., Guo, S., and Huang, J. (2023) Insulin-like growth factor binding protein 2: a core biomarker of left ventricular dysfunction in dilated cardiomyopathy, *Hereditas*, **160**, 36, <https://doi.org/10.1186/s41065-023-00298-5>.
21. Brissenden, J. E., Ullrich, A., and Francke, U. (1984) Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor, *Nature*, **310**, 781-784, <https://doi.org/10.1038/310781a0>.
22. Tricoli, J. V., Rall, L. B., Scott, J., Bell, G. I., and Shows, T. B. (1984) Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12, *Nature.*, **310**, 784-786, <https://doi.org/10.1038/310784a0>.
23. Rotwein, P., Pollock, K. M., Didier, D. K., and Krivi, G. G. (1986) Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides, *J. Biol. Chem.*, **261**, 4828-4832.
24. Smith, P. J., Spurrell, E. L., Coakley, J., Hinds, C. J., Ross, R. J. M., Krainer, A. R., and Chew, S. L. (2002) An exonic splicing enhancer in human IGF-I Pre-mRNA mediates recognition of alternative exon 5 by the serine-arginine protein splicing factor-2/Alternative splicing factor, *Endocrinology*, **143**, 146-154, <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8598>.

25. Yakar, S., Liu, J.-L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7324-7329, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7324>.
26. Vassilakos, G., Lei, H., Yang, Y., Puglise, J., Matheny, M., Durzynska, J., Ozery, M., Bennett, K., Spradlin, R., Bonanno, H., Park, S., Ahima, R. S., and Barton, E. R. (2019) Deletion of muscle IGF-I transiently impairs growth and progressively disrupts glucose homeostasis in male mice, *FASEB J.*, **33**, 181-194, <https://doi.org/10.1096/fj.201800459R>.
27. Fernandez, A. M., De La Vega, A. G., and Torres-Aleman, I. (1998) Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1253-1258, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1253>.
28. Soto, M., Cai, W., Konishi, M., and Kahn, C. R. (2019) Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6379-6384, <https://doi.org/10.1073/pnas.1817391116>.
29. LeRoith, D., Holly, J. M. P., and Forbes, B. E. (2021) Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors, *Mol. Metab.*, **52**, 101245, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101245>.
30. Troncoso, R., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Jaimovich, E., and Lavandero, S. (2014) New insights into IGF-1 signaling in the heart, *Trends Endocrinol. Metab.*, **25**, 128-137, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.002>.
31. Zhao, P., Turdi, S., Dong, F., Xiao, X., Su, G., Zhu, X., Scott, G. I., and Ren, J. (2009) Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor I (IGF-1) rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and activation of stress signaling in murine cardiomyocytes, *Shock*, **32**, 100-107, <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31818ec609>.
32. Tsai, T.-C., Shih, C.-C., Chien, H.-P., Yang, A.-H., Lu, J.-K., and Lu, J.-H. (2018) Anti-apoptotic effects of IGF-I on mortality and dysmorphogenesis in tbx5-deficient zebrafish embryos, *BMC Dev. Biol.*, **18**, 5, <https://doi.org/10.1186/s12861-017-0161-1>.
33. Chao, W., and D'Amore, P. A. (2008) IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **19**, 111-120, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.01.005>.
34. Baral, K., and Rotwein, P. (2019) The insulin-like growth factor 2 gene in mammals: Organizational complexity within a conserved locus, *PLoS One*, **14**, e0219155, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219155>.
35. Clemmons, D. (2006) Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **6**, 620-625, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.006>.
36. Uchimura, T., Hollander, J. M., Nakamura, D. S., Liu, Z., Rosen, C. J., Georgakoudi, I., and Zeng, L. (2017) An essential role for IGF2 in cartilage development and glucose metabolism during postnatal long bone growth, *Development*, **144**, 3533-3546, <https://doi.org/10.1242/dev.155598>.
37. Alberini, C. M., and Chen, D. Y. (2012) Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2, *Trends Neurosci.*, **35**, 274-283, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.007>.
38. DeChiara, T. M., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene, *Cell*, **64**, 849-859, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90513-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90513-X).
39. Zhang, Q., Qin, S., Huai, J., Yang, H., and Wei, Y. (2023) Overexpression of IGF2 affects mouse weight and glycolipid metabolism and IGF2 is positively related to macrosomia, *Front. Endocrinol.*, **14**, 1030453, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1030453>.
40. Petrik, J., Pell, J. M., Arany, E., McDonald, T. J., Dean, W. L., Reik, W., and Hill, D. J. (1999) Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia, *Endocrinology*, **140**, 2353-2363, <https://doi.org/10.1210/endo.140.5.6732>.
41. Zaina, S., Pettersson, L., Thomsen, A. B., Chai, C.-M., Qi, Z., Thyberg, J., and Nilsson, J. (2003) Shortened life span, bradycardia, and hypotension in mice with targeted expression of an *Igf2* transgene in smooth muscle cells, *Endocrinology*, **144**, 2695-2703, <https://doi.org/10.1210/en.2002-220944>.
42. Engelmann, G. L., Boehm, K. D., Haskell, J. F., Khairallah, P. A., and Ilan, J. (1989) Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development: ventricular gene expression and membrane receptor variations in normotensive and hypertensive rats, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **63**, 1-14, [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(89\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(89)90076-2).
43. Li, P., Cavallero, S., Gu, Y., Chen, T. H. P., Hughes, J., Hassan, A. B., Brüning, J. C., Pashmforoush, M., and Sucov, H. M. (2011) IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development, *Development*, **138**, 1795-1805, <https://doi.org/10.1242/dev.054338>.
44. Meganathan, K., Sotiriadou, I., Natarajan, K., Hescheler, J., and Sachinidis, A. (2015) Signaling molecules, transcription growth factors and other regulators revealed from *in-vivo* and *in-vitro* models for the regulation of cardiac development, *Int. J. Cardiol.*, **183**, 117-128, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.01.049>.
45. Evans-Anderson, H. J., Alfieri, C. M., and Yutzey, K. E. (2008) Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors, *Circ. Res.*, **102**, 686-694, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.163428>.

46. Lee, W.-L., Chen, J.-W., Ting, C.-T., Ishiwata, T., Lin, S.-J., Korc, M., and Wang, P. H. (1999) Insulin-like growth factor I improves cardiovascular function and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy, *Endocrinology*, **140**, 4831-4840, <https://doi.org/10.1210/endo.140.10.7082>.
47. Brade, T., Kumar, S., Cunningham, T. J., Chatzi, C., Zhao, X., Cavallero, S., Li, P., Sucov, H. M., Ruiz-Lozano, P., and Duester, G. (2011) Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial *Igf2*, *Development*, **138**, 139-148, <https://doi.org/10.1242/dev.054239>.
48. Shen, H., Cavallero, S., Estrada, K. D., Sandovici, I., Kumar, S. R., Makita, T., Lien, C.-L., Constancia, M., and Sucov, H. M. (2015) Extracardiac control of embryonic cardiomyocyte proliferation and ventricular wall expansion, *Cardiovasc. Res.*, **105**, 271-278, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu269>.
49. Barak, Y., Hemberger, M., and Sucov, H. M. (2019) Phases and mechanisms of embryonic cardiomyocyte proliferation and ventricular wall morphogenesis, *Pediatr. Cardiol.*, **40**, 1359-1366, <https://doi.org/10.1007/s00246-019-02164-6>.
50. Díaz Del Moral, S., Benaouicha, M., Muñoz-Chápoli, R., and Carmona, R. (2021) The insulin-like growth factor signalling pathway in cardiac development and regeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 234, <https://doi.org/10.3390/ijms23010234>.
51. Wang, K. C. W., Zhang, L., McMillen, I. C., Botting, K. J., Duffield, J. A., Zhang, S., Suter, C. M., Brooks, D. A., and Morrison, J. L. (2011) Fetal growth restriction and the programming of heart growth and cardiac insulin-like growth factor 2 expression in the lamb, *J. Physiol.*, **589**, 4709-4722, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.211185>.
52. Wang, K. C. W., Brooks, D. A., Thornburg, K. L., and Morrison, J. L. (2012) Activation of IGF-2R stimulates cardiomyocyte hypertrophy in the late gestation sheep fetus, *J. Physiol.*, **590**, 5425-5437, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238410>.
53. McMullen, J. R., Shioi, T., Huang, W.-Y., Zhang, L., Tarnavski, O., Bisping, E., Schinke, M., Kong, S., Sherwood, M. C., Brown, J., Riggi, L., Kang, P. M., and Izumo, S. (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110 α) pathway, *J. Biol. Chem.*, **279**, 4782-4793, <https://doi.org/10.1074/jbc.M310405200>.
54. Holzenberger, M., Hamard, G., Zaoui, R., Leneuve, P., Ducos, B., Beccavin, C., Périn, L., and Le Bouc, Y. (2001) Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular, *Endocrinology*, **142**, 4469-4478, <https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8461>.
55. Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Gélöën, A., Even, P. C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice, *Nature*, **421**, 182-187, <https://doi.org/10.1038/nature01298>.
56. Lau, M. M., Stewart, C. E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., and Stewart, C. L. (1994) Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality, *Genes Dev.*, **8**, 2953-2963, <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.2953>.
57. Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A. J., Davenport, M. L., and Efstratiadis, A. (1996) Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds, *Dev. Biol.*, **177**, 517-535, <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0182>.
58. Hoefflich, A., David, R., and Hjortebjerg, R. (2018) Current IGFBP-related biomarker research in cardiovascular disease – we need more structural and functional information in clinical studies, *Front. Endocrinol.*, **9**, 388, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00388>.
59. Allard, J. B., and Duan, C. (2018) IGF-binding proteins: why do they exist and why are there so many? *Front. Endocrinol.*, **9**, 117, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00117>.
60. Binoux, M., and Hossenlopp, P. (1988) Insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins: comparison of human serum and lymph, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**, 509-514, <https://doi.org/10.1210/jcem-67-3-509>.
61. Bae, J.-H., Song, D.-K., and Im, S.-S. (2013) Regulation of IGFBP-1 in metabolic diseases, *J. Lifestyle Med.*, **3**, 73-79.
62. Sala, A., Capaldi, S., Campagnoli, M., Faggion, B., Labò, S., Perduca, M., Romano, A., Carrizo, M. E., Valli, M., Visai, L., Minchiotti, L., Galliano, M., and Monaco, H. L. (2005) Structure and properties of the C-terminal domain of insulin-like growth factor-binding protein-1 isolated from human amniotic fluid, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29812-29819, <https://doi.org/10.1074/jbc.M504304200>.
63. Haywood, N. J., Cordell, P. A., Tang, K. Y., Makova, N., Yuldasheva, N. Y., Imrie, H., Viswambharan, H., Bruns, A. F., Cubbon, R. M., Kearney, M. T., and Wheatcroft, S. B. (2017) Insulin-like growth factor binding protein 1 could improve glucose regulation and insulin sensitivity through its RGD domain, *Diabetes*, **66**, 287-299, <https://doi.org/10.2337/db16-0997>.
64. Ammoun, S., Schmid, M. C., Zhou, L., Ristic, N., Ercolano, E., Hilton, D. A., Perks, C. M., and Hanemann, C. O. (2012) Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) regulates human schwannoma proliferation, adhesion and survival, *Oncogene*, **31**, 1710-1722, <https://doi.org/10.1038/onc.2011.357>.

65. Tang, X., Jiang, H., Lin, P., Zhang, Z., Chen, M., Zhang, Y., Mo, J., Zhu, Y., Liu, N., and Chen, X. (2021) Insulin-like growth factor binding protein-1 regulates HIF-1 α degradation to inhibit apoptosis in hypoxic cardiomyocytes, *Cell Death Discov.*, **7**, 242, <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00629-3>.
66. Peng, X., Ueda, H., Zhou, H., Stokol, T., Shen, T., Alcaraz, A., Nagy, T., Vassalli, J., and Guan, J. (2004) Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes angiogenesis in transgenic mice, *Cardiovasc. Res.*, **64**, 421-430, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.07.012>.
67. Lee, P. D. K., Conover, C. A., and Powell, D. R. (1993) Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1, *Exp. Biol. Med.*, **204**, 4-29, <https://doi.org/10.3181/00379727-204-43630>.
68. Bar, R. S., Boes, M., Clemmons, D. R., Busby, W. H., Sandra, A., Dake, B. L., and Booth, B. A. (1990) Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart, *Endocrinology*, **127**, 497-499, <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-497>.
69. Wolk, K., Larsson, S. C., Vessby, B., Wolk, A., and Brismar, K. (2004) Metabolic, anthropometric, and nutritional factors as predictors of circulating insulin-like growth factor binding protein-1 levels in middle-aged and elderly men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 1879-1884, <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031349>.
70. Heald, A. H., Cruickshank, J. K., Riste, L. K., Cade, J. E., Anderson, S., Greenhalgh, A., Sampayo, J., Taylor, W., Fraser, W., White, A., and Gibson, J. M. (2001) Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations, *Diabetologia*, **44**, 333-339, <https://doi.org/10.1007/s001250051623>.
71. Laughlin, G. A., Barrett-Connor, E., Criqui, M. H., and Kritz-Silverstein, D. (2004) The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the rancho Bernardo study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 114-120, <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030967>.
72. Aziz, A., Haywood, N. J., Cordell, P. A., Smith, J., Yuldasheva, N. Y., Sengupta, A., Ali, N., Mercer, B. N., Mughal, R. S., Riches, K., Cubbon, R. M., Porter, K. E., Kearney, M. T., and Wheatcroft, S. B. (2018) Insulin like growth factor-binding protein-1 improves vascular endothelial repair in male mice in the setting of insulin resistance, *Endocrinology*, **159**, 696-709, <https://doi.org/10.1210/en.2017-00572>.
73. Wheatcroft, S. B., Kearney, M. T., Shah, A. M., Grieve, D. J., Williams, I. L., Miell, J. P., and Crossey, P. A. (2003) Vascular endothelial function and blood pressure homeostasis in mice overexpressing IGF binding protein-1, *Diabetes*, **52**, 2075-2082, <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.8.2075>.
74. Rajwani, A., Ezzat, V., Smith, J., Yuldasheva, N. Y., Duncan, E. R., Gage, M., Cubbon, R. M., Kahn, M. B., Imrie, H., Abbas, A., Viswambharan, H., Aziz, A., Sukumar, P., Vidal-Puig, A., Sethi, J. K., Xuan, S., Shah, A. M., Grant, P. J., Porter, K. E., Kearney, M. T., and Wheatcroft, S. B. (2012) Increasing circulating IGFBP1 levels improves insulin sensitivity, promotes nitric oxide production, lowers blood pressure, and protects against atherosclerosis, *Diabetes*, **61**, 915-924, <https://doi.org/10.2337/db11-0963>.
75. Haywood, N. J., Slater, T. A., Drozd, M., Warmke, N., Matthews, C., Cordell, P. A., Smith, J., Rainford, J., Cheema, H., Maher, C., Bridge, K. I., Yuldasheva, N. Y., Cubbon, R. M., Kearney, M. T., and Wheatcroft, S. B. (2020) IGFBP-1 in cardiometabolic pathophysiology – insights from loss-of-function and gain-of-function studies in male mice, *J. Endocr. Soc.*, **4**, bvz006, <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz006>.
76. Murphy, L. J. (2000) Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice, *Pediatr. Nephrol.*, **14**, 567-571, <https://doi.org/10.1007/s004670000347>.
77. Doublier, S., Amri, K., Seurin, D., Moreau, E., Merlet-Benichou, C., Striker, G. E., and Gilbert, T. (2001) Overexpression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in the mouse leads to nephron deficit, *Pediatr. Res.*, **49**, 660-666, <https://doi.org/10.1203/00006450-200105000-00009>.
78. Russo, V. C., Schütt, B. S., Andaloro, E., Ymer, S. I., Hoeflich, A., Ranke, M. B., Bach, L. A., and Werther, G. A. (2005) Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion, *Endocrinology*, **146**, 4445-4455, <https://doi.org/10.1210/en.2005-0467>.
79. Slater, T., Haywood, N. J., Matthews, C., Cheema, H., and Wheatcroft, S. B. (2019) Insulin-like growth factor binding proteins and angiogenesis: from cancer to cardiovascular disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **46**, 28-35, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.03.005>.
80. Khan, S. (2019) IGFBP-2 signaling in the brain: from brain development to higher order brain functions, *Front. Endocrinol.*, **10**, 822, <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00822>.
81. Yau, S. W., Azar, W. J., Sabin, M. A., Werther, G. A., and Russo, V. C. (2015) IGFBP-2 – taking the lead in growth, metabolism and cancer, *J. Cell Commun. Signal.*, **9**, 125-142, <https://doi.org/10.1007/s12079-015-0261-2>.
82. Hoeflich, A., Wu, M., Mohan, S., Föll, J., Wanke, R., Froehlich, T., Arnold, G. J., Lahm, H., Kolb, H. J., and Wolf, E. (1999) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain, *Endocrinology*, **140**, 5488-5496, <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7169>.

83. Wood, T. L., Rogler, L. E., Czick, M. E., Schuller, A. G. P., and Pintar, J. E. (2000) Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene, *Mol. Endocrinol.*, **14**, 1472-1482, <https://doi.org/10.1210/mend.14.9.0517>.
84. Ko, J.M., Park, H. K., Yang, S., and Hwang, I. T. (2012) Influence of catch-up growth on IGFBP-2 levels and association between IGFBP-2 and cardiovascular risk factors in Korean children born SGA, *Endocr. J.*, **59**, 725-733, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0080>.
85. Berry, M., Galinier, M., Delmas, C., Fournier, P., Desmoulin, F., Turkieh, A., Mischak, H., Mullen, W., Barutaut, M., Eurlings, L. W., Van Wijk, S., Brunner-La Rocca, H.-P., Caubere, C., Butler, J., Roncalli, J., Evaristi, M. F., Cohen-Solal, A., Seronde, M.-F., Escamilla, R., Ferrières, J., Koukoui, F., Smih, F., and Rouet, P. (2015) Proteomics analysis reveals IGFBP2 as a candidate diagnostic biomarker for heart failure, *IJC Metab. Endocr.*, **6**, 5-12, <https://doi.org/10.1016/j.ijcme.2014.11.003>.
86. Barutaut, M., Fournier, P., Peacock, W. F., Evaristi, M. F., Caubère, C., Turkieh, A., Desmoulin, F., Eurlings, L. W. M., Van Wijk, S., Brunner-La Rocca, H.-P., Butler, J., Koukoui, F., Dambrin, C., Mazeres, S., Le Page, S., Delmas, C., Galinier, M., Jung, C., Smih, F., and Rouet, P. (2020) Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 predicts mortality risk in heart failure, *Int. J. Cardiol.*, **300**, 245-251, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.09.032>.
87. De Kort, S. W. K., Van Doorn, J., Van De Sande, A. G. M., Leunissen, R. W. J., and Hokken-Koelega, A. C. S. (2010) Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 levels and metabolic and cardiovascular risk factors in young adults and children born small for gestational age, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, 864-871, <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1508>.
88. Yang, J., Griffiths, M., Nies, M. K., Brandal, S., Damico, R., Vaidya, D., Tao, X., Simpson, C. E., Kolb, T. M., Mathai, S. C., Pauciulo, M. W., Nichols, W. C., Ivy, D. D., Austin, E. D., Hassoun, P. M., and Everett, A. D. (2020) Insulin-like growth factor binding protein-2: a new circulating indicator of pulmonary arterial hypertension severity and survival, *BMC Med.*, **18**, 268, <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01734-3>.
89. Firth, S. M., and Baxter, R. C. (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins, *Endocr. Rev.*, **23**, 824-854, <https://doi.org/10.1210/er.2001-0033>.
90. Varma Shrivastav, S., Bhardwaj, A., Pathak, K. A., and Shrivastav, A. (2020) Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): unraveling the role in mediating IGF-independent effects within the cell, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 286, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00286>.
91. Nguyen, K. H., Yao, X.-H., Erickson, A. G., Mishra, S., and Nyomba, B. L. G. (2015) Glucose intolerance in aging male IGFBP-3 transgenic mice: differential effects of human IGFBP-3 and its mutant IGFBP-3 devoid of IGF binding ability, *Endocrinology*, **156**, 462-474, <https://doi.org/10.1210/en.2014-1271>.
92. Scully, T., Firth, S. M., Scott, C. D., De Silva, H. C., Pintar, J. E., Chan-Ling, T., Twigg, S. M., and Baxter, R. C. (2016) Insulin-like growth factor binding protein-3 links obesity and breast cancer progression, *Oncotarget*, **7**, 55491-55505, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10675>.
93. Granata, R., Broglio, F., Migliorino, D., Cutrupi, S., Baldanzi, G., Sireno, M., Fubini, A., Graziani, A., Ghigo, E., and Pucci, A. (2000) Neonatal and adult human heart tissues from normal subjects and patients with ischemic, dilated or hypertrophic cardiomyopathy express insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), *J. Endocrinol. Invest.*, **23**, 724-726, <https://doi.org/10.1007/BF03345060>.
94. Pucci, A., Zanini, C., Granata, R., Ghignone, R., Iavarone, A., Broglio, F., Sorrentino, P., Bergamasco, L., Rinaldi, M., and Ghigo, E. (2009) Myocardial insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 gene expression in failing hearts harvested from patients undergoing cardiac transplantation, *J. Heart Lung Transplant.*, **28**, 402-405, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2008.12.022>.
95. Chang, R.-L., Lin, J.-W., Hsieh, D. J.-Y., Yeh, Y.-L., Shen, C.-Y., Day, C.-H., Ho, T.-J., Viswanadha, V. P., Kuo, W.-W., and Huang, C.-Y. (2015) Long-term hypoxia exposure enhanced IGFBP-3 protein synthesis and secretion resulting in cell apoptosis in H9c2 myocardial cells, *Growth Factors*, **33**, 275-281, <https://doi.org/10.3109/08977194.2015.1077824>.
96. Oikonomopoulos, A., Sereti, K.-I., Conyers, F., Bauer, M., Liao, A., Guan, J., Crapps, D., Han, J.-K., Dong, H., Bayomy, A. F., Fine, G. C., Westerman, K., Biechele, T. L., Moon, R. T., Force, T., and Liao, R. (2011) Wnt signaling exerts an antiproliferative effect on adult cardiac progenitor cells through IGFBP3, *Circ. Res.*, **109**, 1363-1374, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.250282>.
97. Oh, S., Kim, W., Lee, O., Kang, J., Woo, J., Kim, J., Glisson, B., and Lee, H. (2012) Insulin-like growth factor binding protein-3 suppresses vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Sci.*, **103**, 1259-1266, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02301.x>.
98. Lee, H.-J., Lee, J.-S., Hwang, S.J., and Lee, H.-Y. (2015) Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits cell adhesion via suppression of integrin $\beta 4$ expression, *Oncotarget*, **6**, 15150-15163, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3825>.

99. Granata, R., Trovato, L., Lupia, E., Sala, G., Settanni, F., Camussi, G., Ghidoni, R., and Ghigo, E. (2007) Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms, *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 835-845, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02431.x>.
100. Hjortebjerg, R. (2018) IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease, *Growth Horm. IGF Res.*, **41**, 7-22, <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2018.05.002>.
101. Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., Foster, B., Moser, M., Karasik, E., Gillard, B., Ramsey, K., Sullivan, S., Bridge, J., Magazine, H., Syron, J., Fleming, J., Siminoff, L., Traino, H., Mosavel, M., Barker, L., Jewell, S., Rohrer, D., Maxim, D., Filkins, D., Harbach, P., Cortadillo, E., Berghuis, B., Turner, L., Hudson, E., Feenstra, K., Sobin, L., Robb, J., Branton, P., Korzeniewski, G., Shive, C., Tabor, D., Qi, L., Groch, K., Nampally, S., Buia, S., Zimmerman, A., Smith, A., Burges, R., Robinson, K., Valentino, K., Bradbury, D., Cosentino, M., Diaz-Mayoral, N., Kennedy, M., Engel, T., Williams, P., Erickson, K., Ardlie, K., Winckler, W., Getz, G., DeLuca, D., MacArthur, D., Kellis, M., Thomson, A., Young, T., Gelfand, E., Donovan, M., Meng, Y., Grant, G., Mash, D., Marcus, Y., Basile, M., Liu, J., Zhu, J., Tu, Z., Cox, N. J., Nicolae, D. L., Gamazon, E. R., Im, H. K., Konkashbaev, A., Pritchard, J., Stevens, M., Flutre, T., Wen, X., Dermitzakis, E. T., Lappalainen, T., Guigo, R., Monlong, J., Sammeth, M., Koller, D., Battle, A., Mostafavi, S., McCarthy, M., Rivas, M., Maller, J., Rusyn, I., Nobel, A., Wright, F., Shabalina, A., Feolo, M., Sharopova, N., Sturcke, A., Paschal, J., Anderson, J. M., Wilder, E. L., Derr, L. K., Green, E. D., Struwing, J. P., Temple, G., Volpi, S., Boyer, J. T., Thomson, E. J., Guyer, M. S., Ng, C., Abdallah, A., Colantuoni, D., Insel, T. R., Koester, S. E., Little, A. R., Bender, P. K., Lehner, T., Yao, Y., Compton, C. C., Vaught, J. B., Sawyer, S., Lockhart, N. C., Demchok, J., and Moore, H. F. (2013) The genotype-tissue expression (GTEx) project, *Nat. Genet.*, **45**, 580-585, <https://doi.org/10.1038/ng.2653>.
102. Monget, P., and Oxvig, C. (2016) PAPP-A and the IGF system, *Ann. Endocrinol.*, **77**, 90-96, <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.015>.
103. Zhu, W., Shiojima, I., Ito, Y., Li, Z., Ikeda, H., Yoshida, M., Naito, A. T., Nishi, J., Ueno, H., Umezawa, A., Minamino, T., Nagai, T., Kikuchi, A., Asashima, M., and Komuro, I. (2008) IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis, *Nature*, **454**, 345-349, <https://doi.org/10.1038/nature07027>.
104. Konev, A. A., Smolyanova, T. I., Kharitonov, A. V., Serebryanaya, D. V., Kozlovsky, S. V., Kara, A. N., Feygina, E. E., Katrukha, A. G., and Postnikov, A. B. (2015) Characterization of endogenously circulating IGFBP-4 fragments – novel biomarkers for cardiac risk assessment, *Clin. Biochem.*, **48**, 774-780, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.010>.
105. Konev, A. A., Kharitonov, A. V., Rozov, F. N., Altschuler, E. P., Serebryanaya, D. V., Lassus, J., Harjola, V., Katrukha, A. G., and Postnikov, A. B. (2020) CT-IGFBP-4 as a novel prognostic biomarker in acute heart failure, *ESC Heart Fail.*, **7**, 434-444, <https://doi.org/10.1002/ehf2.12590>.
106. Wang, J., Niu, W., Witte, D. P., Chernauek, S. D., Nikiforov, Y. E., Clemens, T. L., Sharifi, B., Strauch, A. R., and Fagin, J. A. (1998) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle α -actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia, *Endocrinology*, **139**, 2605-2614, <https://doi.org/10.1210/endo.139.5.5986>.
107. Zhang, M., Faugere, M.-C., Malluche, H., Rosen, C.J., Chernauek, S. D., and Clemens, T. L. (2003) Paracrine overexpression of IGFBP-4 in osteoblasts of transgenic mice decreases bone turnover and causes global growth retardation, *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 836-843, <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.5.836>.
108. Damon, S. E., Maddison, L., Ware, J. L., and Plymate, S. R. (1998) Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation, *Endocrinology*, **139**, 3456-3464, <https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6150>.
109. Huynh, H., Beamer, W., and Pollak, M. (1997) Overexpression of insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP-4) in MCF-7 breast cancer cells is associated with reduced responsiveness to insulin-like growth factors in vitro and reduced tumour growth in vivo, *Int. J. Oncol.*, **11**, 193-197, <https://doi.org/10.3892/ijo.11.1.193>.
110. Ning, Y., Schuller, A. G. P., Bradshaw, S., Rotwein, P., Ludwig, T., Frystyk, J., and Pintar, J. E. (2006) Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2173-2186, <https://doi.org/10.1210/me.2005-0196>.
111. Austin, K., Imam, N. A., Pintar, J. E., and Brubaker, P. L. (2015) IGF binding protein-4 is required for the growth effects of glucagon-like peptide-2 in murine intestine, *Endocrinology*, **156**, 429-436, <https://doi.org/10.1210/en.2014-1829>.
112. Duan, C., and Allard, J. B. (2020) Insulin-like growth factor binding protein-5 in physiology and disease, *Front. Endocrinol.*, **11**, 100, <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00100>.
113. Andress, D. L., and Birnbaum, R. S. (1991) A novel human insulin-like growth factor binding protein secreted by osteoblast-like cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 213-218, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90911-P](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90911-P).

114. Bautista, C. M., Baylink, D. J., and Mohan, S. (1991) Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: a potential candidate for fixing IGF-II in human bone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 756-763, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80249-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80249-9).
115. Liu, L., Wang, J., Li, X., Ma, J., Shi, C., Zhu, H., Xi, Q., Zhang, J., Zhao, X., and Gu, M. (2015) miR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **457**, 621-626, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.037>.
116. Zhang, W. R., Zhang, H. N., Wang, Y. M., Dai, Y., Liu, X. F., Li, X., Ding, X. B., and Guo, H. (2017) miR-143 regulates proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by targeting IGFBP5, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **53**, 265-271, <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0109-y>.
117. Camacho-Hubner, C., Busby, W. H., McCusker, R. H., Wright, G., and Clemmons, D. R. (1992) Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11949-11956.
118. Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H., Camacho-Hubner, C., and Clemmons, D. R. (1993) Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I, *J. Cell Biol.*, **121**, 679-687, <https://doi.org/10.1083/jcb.121.3.679>.
119. Zheng, B., Duan, C., and Clemmons, D. R. (1998) The effect of extracellular matrix proteins on porcine smooth muscle cell insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 synthesis and responsiveness to IGF-I, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8994-9000, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8994>.
120. Salih, D. A. M., Tripathi, G., Holding, C., Szeszak, T. A. M., Gonzalez, M. I., Carter, E. J., Cobb, L. J., Eisemann, J. E., and Pell, J. M. (2004) Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4314-4319, <https://doi.org/10.1073/pnas.0400230101>.
121. Ning, Y., Hoang, B., Schuller, A. G. P., Cominski, T. P., Hsu, M.-S., Wood, T. L., and Pintar, J. E. (2007) Delayed mammary gland involution in mice with mutation of the insulin-like growth factor binding protein 5 gene, *Endocrinology*, **148**, 2138-2147, <https://doi.org/10.1210/en.2006-0041>.
122. Fischer, F., Schulte, H., Mohan, S., Tataru, M., Köhler, E., Assmann, G., and Von Eckardstein, A. (2004) Associations of insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins and acid-labile subunit with coronary heart disease, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **61**, 595-602, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02136.x>.
123. Rho, S. B., Dong, S. M., Kang, S., Seo, S.-S., Yoo, C. W., Lee, D. O., Woo, J. S., and Park, S.-Y. (2008) Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis, *Carcinogenesis*, **29**, 2106-2111, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn206>.
124. Martin, J. L., Willetts, K. E., and Baxter, R. C. (1990) Purification and properties of a novel insulin-like growth factor-II binding protein from transformed human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4124-4130.
125. Zhu, W., Wu, Y., Cui, C., Zhao, H.-M., Ba, J., Chen, H., and Yu, J. (2014) Expression of IGFBP-6 in proliferative vitreoretinopathy rat models and its effects on retinal pigment epithelial-J cells, *Mol. Med. Rep.*, **9**, 33-38, <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1794>.
126. Bach, L. A. (2015) Recent insights into the actions of IGFBP-6, *J. Cell Commun. Signal.*, **9**, 189-200, <https://doi.org/10.1007/s12079-015-0288-4>.
127. Zhang, C., Lu, L., Li, Y., Wang, X., Zhou, J., Liu, Y., Fu, P., Gallicchio, M. A., Bach, L. A., and Duan, C. (2012) IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis, *Int. J. Cancer*, **130**, 2003-2012, <https://doi.org/10.1002/ijc.26201>.
128. Bach, L. A., Fu, P., and Yang, Z. (2013) Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer, *Clin. Sci.*, **124**, 215-229, <https://doi.org/10.1042/CS20120343>.
129. Liso, A., Venuto, S., Coda, A. R. D., Giallongo, C., Palumbo, G. A., and Tibullo, D. (2022) IGFBP-6: at the crossroads of immunity, tissue repair and fibrosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4358, <https://doi.org/10.3390/ijms23084358>.
130. Liu, Y., Huan, W., Wu, J., Zou, S., and Qu, L. (2020) IGFBP6 is downregulated in unstable carotid atherosclerotic plaques according to an integrated bioinformatics analysis and experimental verification, *J. Atheroscler. Thromb.*, **27**, 1068-1085, <https://doi.org/10.5551/jat.52993>.
131. Frystyk, J., Skjærbaek, C., Dinesen, B., and Ørskov, H. (1994) Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum, *FEBS Lett.*, **348**, 185-191, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00602-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00602-4).
132. Berg, U., Bang, P., and Carlsson-Skewir, C. (2007) Calpain proteolysis of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) -2 and -3, but not of IGFBP-1, *Biol. Chem.*, **388**, 859-863, <https://doi.org/10.1515/BC.2007.098>.
133. Clay Bunn, R., and Fowlkes, J. L. (2003) Insulin-like growth factor binding protein proteolysis, *Trends Endocrinol. Metab.*, **14**, 176-181, [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(03)00049-3).
134. Coppock, H. A., White, A., Aplin, J. D., and Westwood, M. (2004) Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-11, *Biol. Reprod.*, **71**, 438-443, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023101>.

135. Nakamura, M., Miyamoto, S., Maeda, H., Ishii, G., Hasebe, T., Chiba, T., Asaka, M., and Ochiai, A. (2005) Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 1011-1016, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.010>.
136. Hills, F. A., Iles, R. K., and Sullivan, M. H. (2013) Differential proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) in pregnancy, *J. Perinat. Med.*, **41**, 241-249, <https://doi.org/10.1515/jpm-2012-0086>.
137. Gibson, J. M. (2001) Regulation of IGF bioavailability in pregnancy, *Mol. Hum. Reprod.*, **7**, 79-87, <https://doi.org/10.1093/molehr/7.1.79>.
138. Martino-Echarri, E., Fernández-Rodríguez, R., Bech-Serra, J. J., Plaza-Calonge, M. D. C., Vidal, N., Casal, C., Colomé, N., Seoane, J., Canals, F., and Rodríguez-Manzanegue, J. C. (2014) Relevance of IGFBP2 proteolysis in glioma and contribution of the extracellular protease ADAMTS1, *Oncotarget*, **5**, 4295-4304, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2009>.
139. Giudice, L. C., Farrell, E. M., Pham, H., Lamson, G., and Rosenfeld, R. G. (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 806-816, <https://doi.org/10.1210/jcem-71-4-806>.
140. Maile, L. A., and Holly, J. M. P. (1999) Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation, *Growth Horm. IGF Res.*, **9**, 85-95, <https://doi.org/10.1054/ghir.1999.0096>.
141. Cohen, P., Graves, H. C., Peehl, D. M., Kamarei, M., Giudice, L. C., and Rosenfeld, R. G. (1992) Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **75**, 1046-1053, <https://doi.org/10.1210/jcem.75.4.1383255>.
142. Marinaro, J. A., Hendrich, E. C., Leeding, K. S., and Bach, L. A. (1999) HaCaT human keratinocytes express IGF-II, IGFBP-6, and an acid-activated protease with activity against IGFBP-6, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **276**, E536-E542, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.3.E536>.
143. Gibson, T. L. B., and Cohen, P. (1999) Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases, *Growth Horm. IGF Res.*, **9**, 241-253, <https://doi.org/10.1054/ghir.1999.0115>.
144. Arai, T., Arai, A., Busby, W. H., and Clemmons, D. R. (1994) Glycosaminoglycans inhibit degradation of insulin-like growth factor-binding protein-5, *Endocrinology*, **135**, 2358-2363, <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7527332>.
145. Shalamanova, L., Kübler, B., Scharf, J.-G., and Bräulke, T. (2001) MDCK cells secrete neutral proteases cleaving insulin-like growth factor-binding protein-2 to -6, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **281**, E1221-E1229, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1221>.
146. Dean, R. A., Butler, G.S., Hamma-Kourbali, Y., Delbé, J., Brigstock, D. R., Courty, J., and Overall, C. M. (2007) Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 8454-8465, <https://doi.org/10.1128/MCB.00821-07>.
147. Larsen, P. H., DaSilva, A. G., Conant, K., and Yong, V. W. (2006) Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice, *J. Neurosci.*, **26**, 2207-2214, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1880-05.2006>.
148. Overgaard, M. T., Boldt, H. B., Laursen, L. S., Sottrup-Jensen, L., Conover, C. A., and Oxvig, C. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase, *J. Biol. Chem.*, **276**, 21849-21853, <https://doi.org/10.1074/jbc.M102191200>.
149. Laursen, L. S., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Boldt, H. B., Hopmann, K. H., Conover, C. A., Sottrup-Jensen, L., Giudice, L. C., and Oxvig, C. (2002) Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides: substrate residues distant from the scissile bond are critical for proteolysis, *Biochem. J.*, **367**, 31-40, <https://doi.org/10.1042/bj20020831>.
150. Monget, P. (2002) Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation, *Biol. Reprod.*, **68**, 77-86, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007609>.
151. Mazerbourg, S., Callebaut, I., Zapf, J., Mohan, S., Overgaard, M., and Monget, P. (2004) Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, *in vitro* and *in vivo*, *Growth Horm. IGF Res.*, **14**, 71-84, <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2003.10.002>.
152. Adasheva, D. A., Lebedeva, O. S., Goliusova, D. V., Postnikov, A. B., Teriakova, M. V., Kopylova, I. V., Lagarkova, M. A., Katrukha, A. G., and Serebryanaya, D. V. (2023) PAPP-A-specific IGFBP-4 proteolysis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 8420, <https://doi.org/10.3390/ijms24098420>.

153. Prudova, A., Auf Dem Keller, U., Butler, G. S., and Overall, C. M. (2010) Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 894-911, <https://doi.org/10.1074/mcp.M000050-MCP201>.
154. Xin, Z., Ma, Z., Jiang, S., Wang, D., Fan, C., Di, S., Hu, W., Li, T., She, J., and Yang, Y. (2017) FOXOs in the impaired heart: new therapeutic targets for cardiac diseases, *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Basis Dis.*, **1863**, 486-498, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.023>.
155. Skurk, C., Izumiya, Y., Maatz, H., Razeghi, P., Shiojima, I., Sandri, M., Sato, K., Zeng, L., Schiekofer, S., Pimentel, D., Lecker, S., Taegtmeyer, H., Goldberg, A. L., and Walsh, K. (2005) The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling, *J. Biol. Chem.*, **280**, 20814-20823, <https://doi.org/10.1074/jbc.M500528200>.
156. Jung, H. J., and Suh, Y. (2015) Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs, *Front. Genet.*, **5**, <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00472>.
157. Meng, X., Cui, J., and He, G. (2021) Bcl-2 is involved in cardiac hypertrophy through PI3K-Akt pathway, *BioMed Res. Int.*, **2021**, 1-8, <https://doi.org/10.1155/2021/6615502>.
158. Xia, P., Liu, Y., and Cheng, Z. (2016) Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis, *BioMed Res. Int.*, **2016**, 1-22, <https://doi.org/10.1155/2016/9583268>.
159. Sugden, P. H., Fuller, S. J., Weiss, S. C., and Clerk, A. (2008) Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis, *Br. J. Pharmacol.*, **153**, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707659>.
160. Sciarretta, S., Volpe, M., and Sadoshima, J. (2014) Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease, *Circ. Res.*, **114**, 549-564, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302022>.
161. Xu, L., and Brink, M. (2016) mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy, *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.*, **1863**, 1894-1903, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.003>.
162. Kim, J., Wende, A. R., Sena, S., Theobald, H. A., Soto, J., Sloan, C., Wayment, B. E., Litwin, S. E., Holzenberger, M., LeRoith, D., and Abel, E. D. (2008) Insulin-like Growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy, *Mol. Endocrinol.*, **22**, 2531-2543, <https://doi.org/10.1210/me.2008-0265>.
163. Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P., and Crepaldi, T. (2019) ERK: a key player in the pathophysiology of cardiac hypertrophy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2164, <https://doi.org/10.3390/ijms20092164>.
164. Huang, C., Lee, F., Peng, S., Lin, K., Chen, R., Ho, T., Tsai, F., Padma, V. V., Kuo, W., and Huang, C. (2018) HSF1 phosphorylation by ERK/GSK3 suppresses RNF126 to sustain IGF-IIR expression for hypertension-induced cardiomyocyte hypertrophy, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 979-989, <https://doi.org/10.1002/jcp.25945>.
165. Bayes-Genis, A., Conover, C. A., Overgaard, M. T., Bailey, K. R., Christiansen, M., Holmes, D. R., Virmani, R., Oxvig, C., and Schwartz, R. S. (2001) Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes, *N. Engl. J. Med.*, **345**, 1022-1029, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa003147>.
166. Higashi, Y., Gautam, S., Delafontaine, P., and Sukhanov, S. (2019) IGF-1 and cardiovascular disease, *Growth Horm. IGF Res.*, **45**, 6-16, <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2019.01.002>.
167. Beaudeau, J.-L., Burc, L., Imbert-Bismut, F., Giral, P., Bernard, M., Bruckert, E., and Chapman, M. J. (2003) Serum plasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000047448.76485.B8>.
168. Štulc, T., Malbohan, I., Malík, J., Fialová, L., Soukupová, J., and Češka, R. (2003) Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment, *Am. Heart J.*, **146**, 1060-1063, [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(03\)00446-0](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(03)00446-0).
169. Khan, N. U., Khan, F.A., Khan, D.A., and Asim, N. (2011) Pregnancy-associated plasma protein-A levels in individuals with and without coronary artery disease, *J. Coll. Physicians Surg. Pak. JCPSP.*, **21**, 450-454.
170. Gutiérrez-Leonard, H., Martínez-Lara, E., Fierro-Macías, A. E., Mena-Burciaga, V. M., Ronquillo-Sánchez, M. D., Floriano-Sánchez, E., and Cárdenas-Rodríguez, N. (2017) Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) as a possible biomarker in patients with coronary artery disease, *Ir. J. Med. Sci.*, **186**, 597-605, <https://doi.org/10.1007/s11845-016-1515-6>.
171. Mueller, T., Dieplinger, B., Forstner, T., Poelz, W., and Haltmayer, M. (2010) Pregnancy-associated plasma protein-A as a marker for long-term mortality in patients with peripheral atherosclerosis: inconclusive findings from the Linz peripheral arterial disease (LIPAD) study, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **48**, 537-542, <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.103>.
172. Conover, C. A., Mason, M. A., Bale, L. K., Harrington, S. C., Nyegaard, M., Oxvig, C., and Overgaard, M. T. (2010) Transgenic overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in murine arterial smooth muscle accelerates atherosclerotic lesion development, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**, H284-H291, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00904.2009>.

173. Harrington, S. C., Simari, R. D., and Conover, C. A. (2007) Genetic deletion of pregnancy-associated plasma protein-A is associated with resistance to atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice challenged with a high-fat diet, *Circ. Res.*, **100**, 1696-1702, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.146183>.
174. Conover, C. A., Bale, L. K., and Oxvig, C. (2016) Targeted inhibition of pregnancy-associated plasma protein-A activity reduces atherosclerotic plaque burden in mice, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **9**, 77-79, <https://doi.org/10.1007/s12265-015-9666-9>.
175. Boldt, H. B., Bale, L. K., Resch, Z. T., Oxvig, C., Overgaard, M. T., and Conover, C. A. (2013) Effects of mutated pregnancy-associated plasma protein-A on atherosclerotic lesion development in mice, *Endocrinology*, **154**, 246-252, <https://doi.org/10.1210/en.2012-1552>.
176. Jepsen, M. R., Kløverpris, S., Mikkelsen, J. H., Pedersen, J. H., Füchtbauer, E.-M., Laursen, L. S., and Oxvig, C. (2015) Stanniocalcin-2 inhibits mammalian growth by proteolytic inhibition of the insulin-like growth factor axis, *J. Biol. Chem.*, **290**, 3430-3439, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.611665>.
177. Sun, Y., Chen, D., Cao, L., Zhang, R., Zhou, J., Chen, H., Li, Y., Li, M., Cao, J., and Wang, Z. (2013) MiR-490-3p modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by ox-LDL through targeting PAPP-A, *Cardiovasc. Res.*, **100**, 272-279, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt172>.
178. Yu, X.-H., He, L.-H., Gao, J.-H., Zhang, D.-W., Zheng, X.-L., and Tang, C.-K. (2018) Pregnancy-associated plasma protein-A in atherosclerosis: molecular marker, mechanistic insight, and therapeutic target, *Atherosclerosis*, **278**, 250-258, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.004>.
179. McGill, H. C., and McMahan, C. A. (1998) Determinants of atherosclerosis in the young, *Am. J. Cardiol.*, **82**, 30-36, [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(98\)00720-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(98)00720-6).
180. Wilson, P. (1998) Diabetes mellitus and coronary heart disease, *Am. J. Kidney Dis.*, **32**, S89-S100, <https://doi.org/10.1053/ajkd.1998.v32.pm9820468>.
181. Stone, P. H., Muller, J. E., Hartwell, T., York, B. J., Rutherford, J. D., Parker, C. B., Turi, Z. G., Strauss, H. W., Willerson, J. T., Robertson, T., Braunwald, E., and Jaffe, A. S. (1989) The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **14**, 49-57, [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90053-3](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90053-3).
182. Singer, D. E., Moulton, A. W., and Nathan, D. M. (1989) Diabetic myocardial infarction: interaction of diabetes with other preinfarction risk factors, *Diabetes*, **38**, 350-357, <https://doi.org/10.2337/diab.38.3.350>.
183. Haffner, S. M. (1990) Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals: does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA*, **263**, 2893, <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03440210043030>.
184. Colao, A., Spiezia, S., Di Somma, C., Pivonello, R., Marzullo, P., Rota, F., Musella, T., Auriemma, R. S., De Martino, M. C., and Lombardi, G. (2005) Circulating insulin-like growth factor-I levels are correlated with the atherosclerotic profile in healthy subjects independently of age, *J. Endocrinol. Invest.*, **28**, 440-448, <https://doi.org/10.1007/BF03347225>.
185. Conti, E., Andreotti, F., Sciahbasi, A., Riccardi, P., Marra, G., Menini, E., Ghirlanda, G., and Maseri, A. (2001) Markedly reduced insulin-like growth factor-1 in the acute phase of myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **38**, 26-32, [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01367-5](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01367-5).
186. Juul, A., Scheike, T., Davidsen, M., Gyllenberg, J., and Jørgensen, T. (2002) Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study, *Circulation*, **106**, 939-944, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000027563.44593.CC>.
187. Reeves, I., Abribat, T., Laramee, P., Jasmin, G., and Brazeau, P. (2000) Age-related serum levels of insulin-like growth factor-I, -II and IGF-binding protein-3 following myocardial infarction, *Growth Horm. IGF Res.*, **10**, 78-84, <https://doi.org/10.1054/ghir.2000.0143>.
188. Booth, B. A., Boes, M., and Bar, R. S. (1996) IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **271**, E465-E470, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.3.E465>.
189. Bang, P., Brismar, K., and Rosenfeld, R. G. (1994) Increased proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in noninsulin-dependent diabetes mellitus serum, with elevation of a 29-kilodalton (kDa) glycosylated IGFBP-3 fragment contained in the approximately 130- to 150-kDa ternary complex, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 1119-1127, <https://doi.org/10.1210/jcem.78.5.7513716>.
190. Vaessen, N., Heutink, P., Janssen, J. A., Witteman, J. C. M., Testers, L., Hofman, A., Lamberts, S. W. J., Oostra, B. A., Pols, H. A. P., and Van Duijn, C. M. (2001) A polymorphism in the gene for IGF-I, *Diabetes*, **50**, 637-642, <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.3.637>.

191. Heald, A. H., Anderson, S. G., Ivison, F., Laing, I., Gibson, J. M., and Cruickshank, K. (2003) C-reactive protein and the insulin-like growth factor (IGF)-system in relation to risk of cardiovascular disease in different ethnic groups, *Atherosclerosis*, **170**, 79-86, [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(03\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00235-1).
192. Kucukhuseyin, O., Toptas, B., Timirci-Kahraman, O., Isbir, S., Karsidag, K., and Isbir, T. (2015) The effect of GHR/exon-3 polymorphism and serum GH, IGF-1 and IGFBP-3 levels in diabetes and coronary heart disease, *In Vivo*, **29**, 371-378.
193. Marra, A. M., Bobbio, E., D'Assante, R., Salzano, A., Arcopinto, M., Bossone, E., and Cittadini, A. (2018) Growth hormone as biomarker in heart failure, *Heart Fail. Clin.*, **14**, 65-74, <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2017.08.008>.
194. Hu, W. S., and Hwang, J. M. (2012) Association of serum cytokines, human growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF-binding protein (IGFBP)-3 with coronary artery disease, *Chin. J. Physiol.*, **55**, 267-273, <https://doi.org/10.4077/CJP.2012.BAA043>.
195. Guven, A., Demircelik, B., Selcoki, Y., Gurel, O., Er, O., Aydin, H., Bozkurt, A., and Eryonucu, B. (2017) A coronary proatherosclerotic marker: Pregnancy-associated plasma protein A and its association with coronary calcium score and carotid intima-media thickness, *Adv. Clin. Exp. Med.*, **26**, 467-473, <https://doi.org/10.17219/acem/62225>.
196. Lund, J., Qin, Q.-P., Ilva, T., Pettersson, K., Voipio-Pulkki, L.-M., Porela, P., and Pulkki, K. (2003) Circulating pregnancy-associated plasma protein A predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation, *Circulation*, **108**, 1924-1926, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000096054.18485.07>.
197. Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C. W., Fichtlscherer, S., Simoons, M. L., and Zeiher, A. M. (2005) Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **45**, 229-237, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.09.060>.
198. Yeves, A. M., Burgos, J. I., Medina, A. J., Villa-Abrille, M. C., and Ennis, I. L. (2018) Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: a key effect on NHE-1 activity, *Acta Physiol.*, **224**, e13092, <https://doi.org/10.1111/apha.13092>.
199. Sui, Y., Zhang, W., Tang, T., Gao, L., Cao, T., Zhu, H., You, Q., Yu, B., and Yang, T. (2020) Insulin-like growth factor-II overexpression accelerates parthenogenetic stem cell differentiation into cardiomyocytes and improves cardiac function after acute myocardial infarction in mice, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 86, <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1575-4>.
200. Lin, M., Liu, X., Zheng, H., Huang, X., Wu, Y., Huang, A., Zhu, H., Hu, Y., Mai, W., and Huang, Y. (2020) IGF-1 enhances BMSC viability, migration, and anti-apoptosis in myocardial infarction via secreted frizzled-related protein 2 pathway, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 22, <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1544-y>.
201. Vinciguerra, M., Santini, M. P., Claycomb, W. C., Ladurner, A. G., and Rosenthal, N. (2009) Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity, *Aging*, **2**, 43-62, <https://doi.org/10.18632/aging.100107>.
202. Huynh, K., McMullen, J. R., Julius, T. L., Tan, J. W., Love, J. E., Cemerlang, N., Kiriazis, H., Du, X.-J., and Ritchie, R. H. (2010) Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy, *Diabetes*, **59**, 1512-1520, <https://doi.org/10.2337/db09-1456>.
203. Friehs, I., Stamm, C., Cao-Danh, H., McGowan, F. X., and Del Nido, P. J. (2001) Insulin-like growth factor-1 improves postischemic recovery in hypertrophied hearts, *Ann. Thorac. Surg.*, **72**, 1650-1656, [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)03098-3](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)03098-3).
204. Otani, H., Yamamura, T., Nakao, Y., Hattori, R., Kawaguchi, H., Osako, M., and Imamura, H. (2000) Insulin-like growth factor-I improves recovery of cardiac performance during reperfusion in isolated rat heart by a wortmannin-sensitive mechanism, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35**, 275-281, <https://doi.org/10.1097/00005344-200002000-00015>.
205. Moses, A. C., Young, S. C., Morrow, L. A., O'Brien, M., and Clemmons, D. R. (1996) Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes, *Diabetes*, **45**, 91-100, <https://doi.org/10.2337/diab.45.1.91>.
206. Donath, M. Y., Sütsch, G., Yan, X.-W., Piva, B., Brunner, H.-P., Glatz, Y., Zapf, J., Follath, F., Froesch, E. R., and Kiowski, W. (1998) Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3177-3183, <https://doi.org/10.1210/jcem.83.9.5122>.
207. Wang, R., Xi, L., and Kukreja, R. C. (2017) PDE5 inhibitor tadalafil and hydroxychloroquine cotreatment provides synergistic protection against type 2 diabetes and myocardial infarction in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **361**, 29-38, <https://doi.org/10.1124/jpet.116.239087>.
208. Cignarelli, A., Genchi, V. A., Le Grazie, G., Caruso, I., Marrano, N., Biondi, G., D'Oria, R., Sorice, G. P., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., and Giorgino, F. (2022) Mini review: effect of GLP-1 receptor agonists and SGLT-2 inhibitors on the growth hormone/IGF axis, *Front. Endocrinol.*, **13**, 846903, <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.846903>.

IGF-SIGNALING PATHWAY IN THE HEART INNORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Review

D. A. Adasheva¹ and D. V. Serebryanaya^{1,2*}

¹ *Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

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

The proper functioning of the cardiovascular system is one of the most important goals of the body. The physiological processes in myocardium is regulated by the balance of cardioprotective and pathological mechanisms. The system of insulin-like growth factors (IGF system, IGF signaling pathway) plays pivotal role in regulating the growth and development of various cells and tissues. In the myocardium, the IGF system provides both cardioprotective and pathological effects. This review summarizes recent data on the role of IGF signaling in the realization of cardioprotection from one side and the pathogenesis of various cardiovascular diseases from the other side, as well as analyzes the severity of these effects in various conditions.

Keywords: cardiovascular diseases, cardiomyocytes, insulin-like growth factors IGF-I and IGF-II, IGF-binding proteins (IGFBP), cardioprotective effect, IGFBP-4, PAPP-A

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФЕНОМЕН ПАРАМУТАЦИИ У РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Обзор

© 2024 Д.А. Куликова^{1,2}, А.В. Беспалова¹, Е.С. Зеленцова¹,
М.Б. Евгеньев¹, С.Ю. Фуников^{1*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sergeifunikov@mail.ru

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.03.2024

После доработки 17.06.2024

Принята к публикации 27.06.2024

Феномен парамутации описывает взаимодействие между двумя аллелями, при котором один аллель инициирует наследуемые эпигенетические изменения в другом аллеле, не затрагивая последовательность ДНК. Эпигенетические преобразования вследствие парамутации сопровождаются изменением паттерна метилирования ДНК и/или гистонов, оказывая влияние на экспрессию генов. Исследования парамутации у растений и животных позволили заключить, что короткие некодирующие РНК являются главными эффекторными молекулами, необходимыми для инициации эпигенетического изменения геномных локусов. Благодаря тому, что различные классы коротких некодирующих РНК могут передаваться через поколения, эффект парамутации может наследоваться и сохраняться в популяции. В данном обзоре проведен систематический анализ описанных к настоящему времени примеров парамутации в различных живых системах и выделены общие и различные молекулярно-генетические аспекты парамутации в разных организмах, а также рассмотрена роль этого феномена в эволюции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эпигенетика, менделевское наследование, короткие некодирующие РНК, хроматин, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972524080046 EDN: KEBFAB

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время пристальный интерес ученых вызывает относительно молодая область молекулярной биологии, эпигенетика, исследующая механизмы изменения активности генов, не затрагивающие последовательность ДНК. Долгое время считалось, что наследование признаков происходит только путем передачи генетического материала в поколениях, а условия окружающей среды служат способом тестирования генетических вариантов и их отбора. За последние 20 лет открытие механизмов, в результате которых про-

исходят изменения хроматина в ответ на физиологические и патологические факторы, превратили наши знания об эпигенетике из коллекции любопытных биологических явлений в самостоятельное направление биологических исследований. В области эпигенетики исследуются такие явления, как парамутация, геномный импринтинг, эффект положения, а также подавление экспрессии мобильных генетических элементов (МЭ). Данный обзор посвящен систематическому анализу накопленных сведений о механизмах парамутации, а также сравнению особенностей этого эпигенетического феномена у животных и растений.

Принятые сокращения: дцРНК – двухцепочечная РНК; МЭ – мобильные генетические элементы; нт – нуклеотид; рiРНК – короткие некодирующие РНК, ассоциированные с белком Рiwi; siРНК – короткие интерферирующие РНК; Pol – ДНК-зависимая РНК-полимераза; RdDM – РНК-направленное метилирование ДНК; RdRP – РНК-зависимая РНК-полимераза; TSE – эффект *транс*-сайленсинга.

* Адресат для корреспонденции.

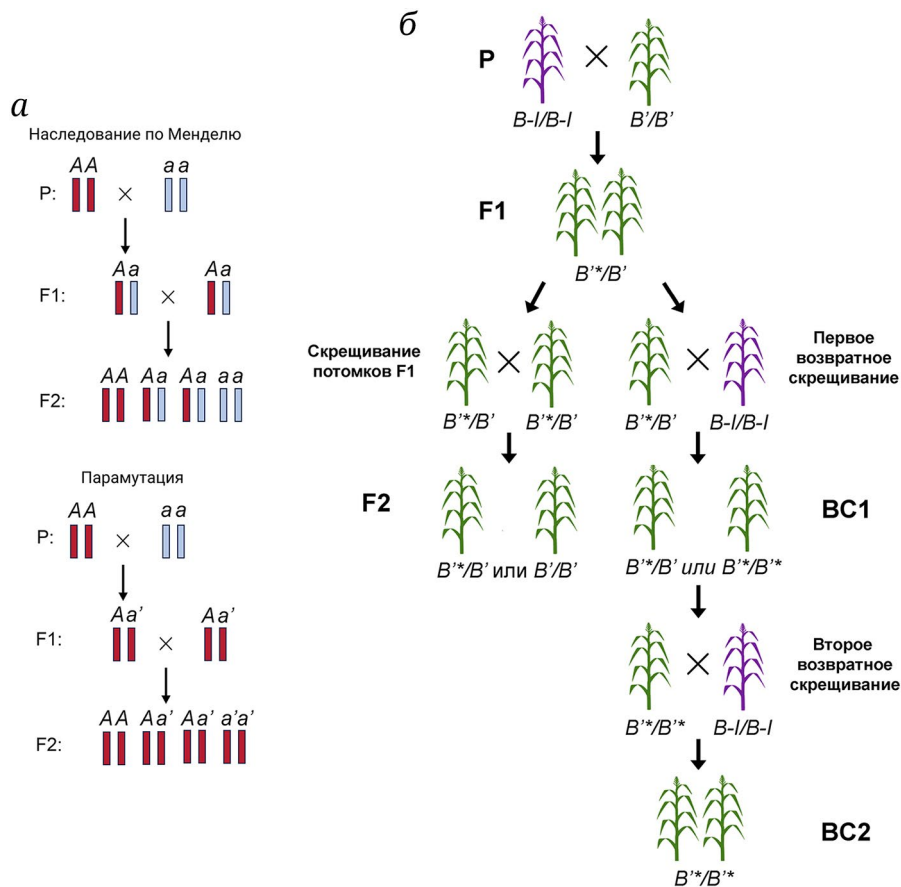


Рис. 1. Сравнение классического наследования признаков по Менделю и при парамутации на примере локуса *b1* у кукурузы. *а* – Классическое расщепление признаков в потомстве гибридов первого и второго поколений в соответствии с первым и вторым законами Менделя (сверху); возникновение в результате парамутации аллеля *a'*, который имеет фенотип «А», при этом фенотип «а» исчезает и больше не проявляется в поколениях (снизу). Красный цвет – фенотип «А», голубой цвет – фенотип «а». *б* – Взаимодействие аллелей *B-I* (фиолетовый фенотип) и *B'* (зеленый фенотип) приводит к формированию аллеля *B** и проявлению только «зеленого фенотипа» в потомстве первого поколения (F1). При дальнейшем скрещивании растений F1 между собой или при проведении возвратного скрещивания с гомозиготным родителем *B-I* все потомство будет также иметь «зеленый фенотип» независимо от генотипа родителей

Термином «парамутация» описывают взаимодействие между двумя аллелями, при котором один из аллелей (парамутагенный аллель) вызывает наследуемые эпигенетические модификации в другом аллеле (парамутабельный аллель) (рис. 1, *а*) [1–4]. Взаимодействие аллелей при парамутации не приводит к изменению последовательности ДНК, поэтому данный процесс приводит к нетипичному наследованию признаков у организмов. Парамутация является одной из форм неменделевского наследования. В этом случае при скрещивании гетерозиготных особей не происходит расщепление признаков, согласно второму закону Менделя, и все потомство обладает фенотипом одного из родителей – носителя парамутагенного аллеля (рис. 1, *а*). Эпигенетическое преобразование аллелей при парамутации приводит к транскрипционному сайленсингу геномных локусов. При этом парамутабельный аллель приобретает свойства парамутагенного

и может самостоятельно инициировать эпигенетическое преобразование гомологичного аллеля в следующих поколениях. Парамутагенный эффект может обладать чрезвычайной стабильностью и сохраняться на протяжении многих поколений, причем парамутированный аллель сохраняет приобретенные свойства даже при отсутствии в геноме исходного парамутагенного аллеля [1–4].

Таким образом, можно выделить три ключевые особенности парамутации: (1) изменение транскрипционной активности локуса не связано с изменением последовательности ДНК и осуществляется с помощью эпигенетических механизмов; (2) транскрипционная активность локуса вследствие парамутации передается следующим поколениям даже при отсутствии исходного парамутагенного аллеля в геноме; (3) геномный локус приобретает свойства исходного парамутагенного аллеля и способен также изменять активность

гомологичных последовательностей в следующих поколениях [1–4].

ПАРАМУТАЦИЯ У РАСТЕНИЙ

Исторически феномен парамутации впервые был открыт у растений. В 1915 г., проводя генетические опыты на садовом горохе *Pisum sativum*, Bateson и Pellew [5] обнаружили растения с уменьшенными листьями и побегами и назвали этот фенотип «rogue». При скрещивании растений с фенотипом «rogue» с растениями дикого типа во всех последующих поколениях проявлялся только фенотип «rogue». Однако в то время это открытие прошло незаметно и долгое время оставалось практически единственным примером неменделевского наследования признаков.

Впервые термин парамутация был предложен в 1950-х гг. Brink [6, 7] при описании взаимодействия аллелей, отвечающих за окраску стеблей, листьев и семян кукурузы. Позже парамутагенные локусы были обнаружены у других растений, например, у декоративного растения Энотера и у томата [8, 9]. Далее, в нашем обзоре парамутация у растений будет подробно рассмотрена у кукурузы, для которой наиболее полно изучены молекулярно-генетические особенности данного эпигенетического феномена.

У кукурузы описано 5 парамутагенных локусов: *r1* (*red1*, *coloured 1*), *b1* (*booster 1*), *pl1* (*purple plant 1*), *p1* (*pericarp color 1*) и локус *lpa1* (*low phytic acid 1*). Гены *r1*, *b1*, *pl1* и *p1* кодируют факторы транскрипции, участвующие в регуляции биосинтеза флавоноидов и антоцианов в растительных тканях, тогда как *lpa1* кодирует белок ZmMRP4 (*multidrug resistance-associated proteins 4*), участвующий в транспорте и запасании фитиновой кислоты в семенах растения [3, 10, 11]. Классический пример парамутации у кукурузы был описан в локусе *b1*, содержащем единственный ген, продукт которого определяет окраску стеблей растений. Для растений, гомозиготных по аллелю *B-I* (*Booster-Intense*), характерна высокая экспрессия гена *b1*, при которой стебли имеют темно-фиолетовую окраску. Другой аллель (*B'*) имеет слабую экспрессию *b1*, и растения, гомозиготные по этому аллелю, имеют окраску стеблей близкую к зеленой вследствие низкого содержания пигмента (рис. 1, б). При скрещивании растений *B-I* (фиолетовый фенотип) и *B'* (зеленый фенотип) все растения первого поколения будут иметь зеленый фенотип. У гетерозиготных растений *B-I/B'* аллель *B-I* преобразуется вследствие парамутации в новый аллель *B''*, который приобретает свойства аллеля *B'*. Новый парамутагенный аллель *B''*, как и исходный аллель *B'*, может приводить

к преобразованию аллеля *B-I* в *B''* в следующих поколениях (рис. 1, б) [12]. Аллель *B'* обладает полной пенетрантностью, а вызываемый им парамутагенный эффект на аллель *B-I* крайне стабилен. Так, на протяжении десятков лет наблюдения не обнаружено ни одного растения с реверсией генотипа к исходному состоянию *B-I* [12, 13].

РНК-направленное метилирование ДНК. В феномене парамутации у растений важную роль играет процесс РНК-направленного метилирования ДНК (от англ. RNA-directed DNA methylation, RdDM) [14]. Путь RdDM уникален для растений и является единственным путем, в ходе которого происходит метилирование ДНК *de novo* [15, 16]. В эволюции растений этот путь сформировался в основном для защиты генома от вирусных патогенов и перемещения МЭ [17]. Наиболее подробно путь RdDM изучен у *Arabidopsis thaliana*, поэтому в дальнейшем путь RdDM будет рассмотрен именно на примере этого растения. Необходимым условием для метилирования ДНК в пути RdDM является синтез коротких интерферирующих РНК (от англ. small interfering RNA, siРНК) из тех же геномных областей, которые впоследствии будут метилированы [18]. Этим он отличается от двух других путей метилирования ДНК у растений, осуществляемых продуктами генов *DDM1* (*Decrease in DNA Methylation 1*) и *DDM2* (*Decrease in DNA Methylation 2*). Эти пути не зависят от активности siРНК и служат для поддержания метилированных областей генома [19].

В зависимости от механизма образования siРНК из более длинных двухцепочечных РНК (дцРНК) предшественников выделяют канонический путь RdDM (осуществляется siРНК длиной 24 нуклеотида (нт.)) и неканонический путь RdDM (осуществляется 21–22-нуклеотидными siРНК) [20]. В обоих случаях в образовании и функции siРНК участвует белок Dicer, а также белки семейства Argonaute (Ago). Процесс образования дцРНК-предшественника является одним из ключевых различий между растениями и большинством животных [20]. У растений активна РНК-зависимая РНК-полимераза (от англ. RNA-dependent RNA Polymerase, RdRP), и образование дцРНК может происходить на матрице одноцепочечной РНК [20]. Ввиду утраты этого фермента в ходе эволюции у большинства животных дцРНК формируется в результате двунаправленной транскрипции геномных локусов или за счет образования шпилечных структур в одноцепочечной РНК с последующим процессингом до дцРНК [21]. Кроме того, ключевые роли в каноническом пути RdDM у растений играют РНК-полимеразы IV и V (Pol IV, Pol V), не встречающиеся у животных [22]. Они являются паралогами консервативной для всех живых организмов РНК-полимеразы II (Pol II)

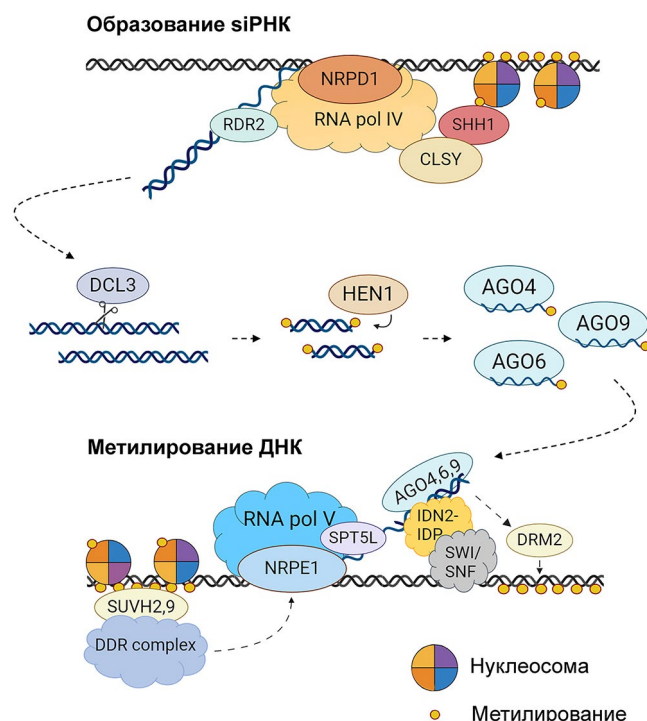


Рис. 2. Канонический путь РНК-направленного метилирования ДНК (путь RdDM) у растений. Канонический путь RdDM начинается с транскрипции предшественников siРНК из геномных локусов с помощью Pol IV. NRPD1 является самой большой субъединицей Pol IV. Привлечение Pol IV в геномные локусы осуществляется с помощью белков SHH1 и CLSY, которые распознают одновременно H3K4me0 (неметилированный лизин) и H3K9me2. Затем на матрице предшественников siРНК происходит синтез второй комплементарной цепи РНК с помощью RdRP, RDR2. Далее, белок DCL3 «нарезает» дцРНК на 24-нуклеотидные siРНК, которые подвергаются метилированию выступающих 3'-концевых рибонуклеотидов РНК-метилтрансферазой HEN1. На заключительном этапе образования гидовая цепь siРНК загружается в один из белков Ago (Ago4, Ago6 или Ago9) и связывается с комплементарной РНК-мишенью. Белок Ago, загруженный siРНК, взаимодействует с NRPE1, самой крупной субъединицей Pol V, и привлекает фактор SPT5L. Затем комплекс Pol V–Ago4–SPT5L привлекает в геномный локус метилтрансферазу DRM2, которая катализирует метилирование ДНК *de novo*. В привлечении Pol V к геномному локусу и его метилировании участвует комплекс DDR, в который входят факторы DRD1, DMS3 и RDM1, а также белки SUVH2 и SUVH9. Комплекс IDN2-IDP, связанный одновременно с ДНК и транскрибируемой РНК, привлекает АТФ-зависимый комплекс ремоделирования хроматина SWI-SNF в локус для облегчения метилирования ДНК

и возникли, по-видимому, в процессе дупликации кодирующего ее гена и специализации функций в пути RdDM [23]. Мутации данных белков не влияют на жизнеспособность и фертильность растений, благодаря чему появилась возможность для изучения процесса РНК-направленного метилирования ДНК [24, 25].

На первом этапе канонического пути RdDM в геномных локусах, которые впоследствии будут метилированы, происходит транскрипция одноцепочечных коротких некодирующих РНК размером 30–45 нт. с помощью Pol IV, которые сразу превращаются в дцРНК с помощью RDR2, РНК-зависимой РНК-полимеразы у *A. thaliana* (рис. 2) [26]. Важно отметить, что привлечение Pol IV в геномные локусы осуществляется с помощью RdDM-ассоциированного белка SHH1 (SAWADEE homeodomain homolog 1), а также белков семейства CLSY (CLASSY) [27]. Комплекс данных белковых факторов распознает одновременно H3K4me0

(неметилированный лизин) и H3K9me2 и рекрутирует Pol IV в эти локусы (рис. 2), в то время как метилирование H3K4 блокирует привлечение Pol IV [28, 29]. Далее, белок DCL3 (Dicer-like 3) «нарезает» дцРНК-предшественники на 23–24-нуклеотидные siРНК, преимущественно имеющие неспаренные нуклеотиды на 3'-концах [30, 31]. На заключительном этапе образования siРНК подвергается метилированию концевых рибонуклеотидов по 2'-ОН группе рибозы в результате действия РНК-метилтрансферазы HEN1 [32].

В неканоническом пути RdDM транскрипция одноцепочечных коротких некодирующих РНК из геномных локусов осуществляется Pol II [33]. Далее, на матрице образованных транскриптов происходит синтез второй цепи РНК с помощью другой RdRP у *A. thaliana* – RDR6 [33]. Затем активность Dicer-подобных белков DCL1, DCL2 и DCL4 приводит к образованию более коротких siРНК длиной 21–22 нт. из дцРНК-предшественников [34].

Далее, оба пути RdDM проходят одинаково. Гидовая цепь siРНК загружается в белок Ago и связывается с комплементарной РНК-мишенью (рис. 2). У растений имеются 10 белков семейства Ago (Ago1–Ago10) [35]. Из них только Ago4, Ago6 и Ago9 участвуют в RdDM-пути [35, 36].

Для реализации второго этапа канонического и неканонического путей RdDM необходима транскрипция инактивируемого геномного локуса с помощью другой РНК-полимеразы (Pol V). Ее активность приводит к образованию более длинных транскриптов (~200 нт.). Pol V служит платформой для привлечения всех остальных белковых факторов, участвующих в метилировании ДНК (рис. 2) [37]. При этом белок Ago4, загруженный siРНК, взаимодействует с NRPE1 – самой крупной субъединицей Pol V [36]. Далее, Ago4 привлекает дополнительный фактор SPT5L (Suppressor of Ty insertion 5 – like), который связывается с Ago4 с помощью WG/GW-богатого домена [38]. Наконец, комплекс Pol V–Ago4–SPT5L привлекает в геномный локус метилтрансферазу DRM2 (domains rearranged methyltransferase 2), которая катализирует метилирование ДНК (рис. 2) [17, 39, 40]. Для рекрутирования Pol V необходим комплекс белков, который называется DDR по первым буквам входящих в него белков: DRD1 (Defective in RNA-directed DNA methylation 1) [41], DMS3 (Defective in Meristem Silencing 3) [42] и RDM1 (RNA-directed DNA methylation 1) [43]. Комплекс DDR необходим для ассоциации Pol V со своими мишенями по всему геному [44]. Кроме того, в привлечении Pol V в метилируемые локусы принимают участие дополнительные факторы – белки SUVH2 и SUVH9 [45]. Они привлекают гистоновые метилтрансферазы SUVH4/KYP, SUVH5 и SUVH6, осуществляющие метилирование соседних гистонов (рис. 2) [46]. Важную роль в метилировании ДНК также играет комплекс белков IDN1 (Involved in *de novo* 1), IDN2 (Involved in *de novo* 2) и IDP (IDN paralogue). Эти белки одновременно связывают геномную ДНК и транскрибируемую РНК [47–49]. IDN2 взаимодействует с АТФ-зависимым комплексом ремоделирования хроматина SWI–SNF (SWItch–Sucrose Non-Fermentable). Этот комплекс необходим для изменения положения нуклеосом и облегчения метилирования ДНК (рис. 2) [50]. С помощью описанного механизма у растений осуществляется метилирование ДНК *de novo*. Однако до сих пор неизвестно, как происходит первичное «нацеливание» RdDM-пути на неметилированный парамутабельный аллель и привлечение в локус Pol IV и Pol V [51].

Цис-детерминанты парамутации. Особый интерес представляет разнообразие проявления феномена парамутации. В классическом примере парамутации в локусе гена *b1* у кукурузы проис-

ходит стабильная модификация парамутабельного аллеля, которая наследуется в последующих поколениях и вызывает вторичную парамутацию, как и исходный парамутагенный аллель. Следует отметить, что у растений существуют и другие парамутагенные аллели, которые различаются как в отношении частоты парамутации (от 9 до 100%), так и стабильностью приобретенного парамутагенного состояния [52, 53]. Например, в линии табака *Spr12F*, содержащей ген стрептомицин-фосфотрансферазы (*spt*), парамутация гомологичных локусов происходит с частотой ~60% [52]. Кроме того, существуют нейтральные аллели, устойчивые к воздействию парамутагенного аллеля [54, 55], и аллели, в которых парамутация происходит спонтанно [12, 56]. Например, в классической системе парамутации аллеля *b1* у кукурузы спонтанное преобразование аллеля *B-I* в *B'* может происходить с частотой от 0,1 до 10% [12, 56].

На такое разнообразие в поведении локусов, участвующих в парамутации, могут влиять как различия в генетическом фоне родительских организмов, так и структурные особенности, *цис*-детерминанты, парамутагенных и парамутабельных аллелей. *Цис*-детерминанты парамутации – это тандемные и инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК, а также связанные с этими повторами эпигенетические метки, влияющие на проявление и стабильность парамутагенного эффекта [57–59].

Для осуществления парамутагенного эффекта в локусе *b1* кукурузы необходимы множественные тандемные повторы длиной 853 п.нт., которые находятся на расстоянии ~100 т.п.нт. выше старта транскрипции гена *b1* (рис. 3) [60–62]. В 2006 г. Alleman et al. [26] установили, что с обеих цепей тандемных повторов осуществляется транскрипция, которая приводит к образованию дцРНК. Исследователи показали, что у кукурузы мутация MOP1 (Mediator of paramutation 1), ортолога РНК-зависимой РНК-полимеразы RDR2 у *A. thaliana*, приводит к нарушению образования дцРНК с тандемных повторов и самого локуса *b1* [26, 60]. Таким образом, MOP1 является необходимым фактором для осуществления парамутации. Эффективность парамутагенного эффекта также зависит от количества тандемных повторов и их структуры (рис. 3). Аллель *B'* с пятью или семью копиями повторов обладает 100%-ной парамутагенностью (показано на конструкции *b-5R'*), аллель *B'* с тремя копиями обладает пониженной парамутагенностью (конструкция *b-3R'*), а аллель, несущий одну копию повтора, вообще не вызывает парамутагенный эффект и является нейтральным (конструкция *b-N*; рис. 3) [60–62]. Примечательно, что для парамутагенного эффекта необходима только 5'-концевая GC-богатая последовательность

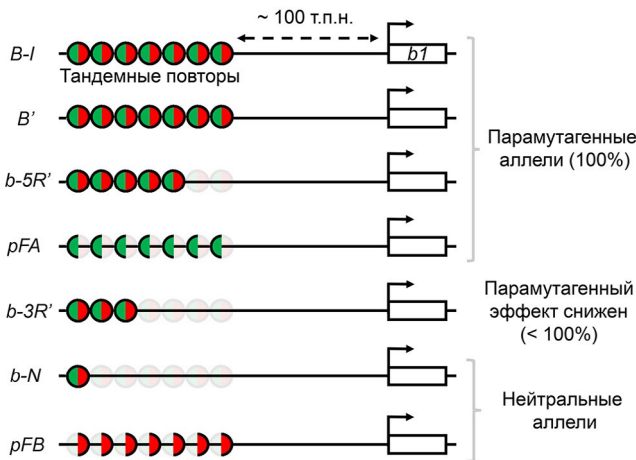


Рис. 3. Сравнительное строение разных типов аллелей локуса *b1* у кукурузы. На расстоянии ~100 т.п.н. от старта транскрипции гена *b1* расположены тандемные повторы длиной 853 п.н. (обозначены красно-зелеными кругами, где красный цвет обозначает 3'-концевую часть повтора, а зеленый цвет – 5'-концевую часть). От количества повторов и их структуры зависит эффективность парамутагенного эффекта в локусе *b1*

повтора (конструкция *pFA*), тогда как 3'-концевая последовательность (*pFB*) вообще не обладает парамутагенным эффектом и является нейтральной (рис. 3) [60–62]. Важно отметить, что для парамутации необходимо присутствие тандемных повторов в обоих аллелях – *B'* (парамутагенном) и *B-I* (парамутабельном) [60]. Тандемные повторы локуса *b1* не только являются *цис*-детерминантой парамутации, но также действуют как энхансер для парамутабельного аллеля и усиливают его транскрипционную активность [57, 60, 63].

Роль RdDM-пути в парамутации. Установлено, что белки MOP1 и MOP2 (Mediator of paramutation 2) являются необходимыми факторами для обеспечения парамутагенного эффекта в локусе *Pl'*, а также образовании коротких РНК длиной 24 нт. [64–69]. Кроме того, уровни H3K9me2 в локусах *b1* и *p1* коррелируют с соответствующими различиями в уровнях пигментации растений [57, 70]. Эти результаты подтверждают то, что парамутация осуществляется с помощью RdDM-пути.

Интересные наблюдения были сделаны при проведении экспериментов с использованием трансгенных конструкций, экспрессирующих siРНК к тандемным повторам (конструкция *b1IR*) и промотору гена *b1* (конструкция *a1pIR*), и растений с мутациями *mor1* и *mor2* [71]. Мутация *mor1* затрагивает первый этап RdDM-пути, когда с помощью Pol IV сначала синтезируется одноцепочечный транскрипт, а затем с помощью MOP1 происходит образование двухцепочечного предшественника siРНК [72]. Ген *mor2* кодирует фактор NRP(D/E)2a – вторую по величине субъ-

единицу, входящую в состав как Pol IV, так и в Pol V [26, 65, 71]. Таким образом, мутация *mor2* нарушает работу всего RdDM-пути, без которого парамутация невозможна. Ранее было показано, что сайленсинг *b1* отсутствует у обоих мутантов – *mor1* и *mor2* [73]. Sloan et al. [71] показали, что у растений, несущих конструкцию *a1pIR*, наблюдается сайленсинг *b1* при мутации *mor1*, но не мутации *mor2*. Получается, что трансген, продуцирующий siРНК к промотору *b1* может заменить работу Pol IV, участвующую в образовании дцРНК, но не заменяет работу Pol V, необходимую для метилирования локуса в пути RdDM.

Однако результаты экспериментов с использованием конструкции *b1IR*, из которой образуются siРНК к тандемным повторам, оказались неожиданными. Введение в геном конструкции *b1IR* приводило к сайленсингу *b1* у гомозиготных мутантов по обоим генам – *mor1* и *mor2*. С одной стороны, этот результат показывает, что образование siРНК из эндогенных тандемных повторов в растениях линии *B'* может не зависеть от активности Pol IV. Ввиду того, что транскрипция тандемных повторов чувствительна к α-аманитину, который ингибирует активность Pol II, но не влияет на активность Pol IV или Pol V, исследователи полагают, что транскрипция тандемных повторов осуществляется именно Pol II [71, 74]. С другой стороны, остается непонятно, каким образом сайленсируется сам ген *b1* при мутации *mor2*, нарушающей путь RdDM. Эти наблюдения привели к появлению гипотезы о том, что для сайленсинга *b1* требуется дополнительная РНК-полимераза, которая не содержит в своем составе субъединицы NRP(D/E)2a. Этой РНК-полимеразой может быть Pol II- или Pol V-подобный комплекс, содержащий другой NRP(D/E)2a-подобный неизвестный белок [69, 71].

При исследовании роли тандемных повторов в механизме парамутации были получены факты, которые не укладываются в предполагаемую классическую картину этого процесса. Так у кукурузы был обнаружен белок СВВР (CXC domain b1-repeat binding protein), который специфично связывался с последовательностью тандемных повторов [75]. При введении в геном кукурузы трансгенной конструкции, содержащей ген СВВР под убиквитинным промотором, парамутабельный аллель *B-I* спонтанно становился парамутагенным, причем эффект сохранялся у потомков, не имеющих исходный трансген [75]. Это исследование позволяет предположить существование еще одного класса белков, которые участвуют в сайленсинге генов. Однако остается неясно, связан ли СВВР с механизмом RdDM или действует независимо от него и не требует участия siРНК-опосредованного сайленсинга.

Эпигенетический сайленсинг локуса *b1* у кукурузы представляет собой классический пример феномена парамутации, в котором сайленсинг определенного локуса является результатом метилирования ДНК и гистона H3 в позиции K9, направленного короткими некодирующими РНК – siРНК. Важным условием для осуществления парамутагенного эффекта служат структурные особенности локусов, а именно *цис*-регуляторные детерминанты, которые, как и последовательность самого гена *b1*, метилированы и являются источником образования siРНК. Однако механика самого процесса, а также взаимосвязь между компонентами биохимического пути RdDM до конца не ясны и требуют дальнейшего изучения.

На какой стадии развития происходит эпигенетическое преобразование парамутабельного локуса точно неизвестно. В процессе сперматогенеза у растений образуются два спермия и одна вегетативная клетка. В спермиях хроматин находится в конденсированном состоянии, и экспрессия генов ограничена. Однако в вегетативной клетке хроматин находится в дерепрессированном состоянии, при котором происходит активное образование siРНК, которые затем передаются в спермии [76, 77]. Тот же процесс происходит между женской яйцеклеткой и двумя синергидными клетками в женском гаметофите [78], а затем – между зародышем и эндоспермом в молодом семени [79, 80]. Предполагается, что изменение эпигенетического статуса парамутабельного аллеля происходит именно на этих стадиях развития молодого растения.

ПАРАМУТАЦИЯ У ЖИВОТНЫХ

Эпигенетические взаимодействия аллелей и характер наследования признаков, подобный классическим примерам парамутации у растений, у животных встречается значительно реже. Подобные случаи были описаны у мышей, а также показаны на моделях беспозвоночных животных – дрозофилах и нематоде *Caenorhabditis elegans*. Механизм эпигенетической трансформации аллелей при парамутации у животных отличается от растений особенностями образования коротких некодирующих РНК, участвующих в этом процессе, а также механизмом метилирования гистонов, но общая модель парамутации сходна между этими двумя царствами живых организмов. Примеры естественных аллелей, которые проявляют парамутагенные свойства у животных, малочисленны. В основном исследования парамутации проводятся на трансгенных животных с искусственно сконструированными парамутагенными локусами.

Молекулярные основы парамутации у дрозофил. В отличие от растений, в основе парамутации у дрозофил лежит биохимический путь образования piРНК (короткие некодирующие РНК, ассоциированные с белком Piwi) и механизм котранскрипционного сайленсинга с помощью комплекса piРНК–Piwi [81]. Продукция piРНК у дрозофил в основном происходит в репродуктивных органах вследствие того, что белки семейства Piwi, необходимые для образования и функционирования piРНК, экспрессируются преимущественно в гонадах [82]. Предшественниками piРНК являются длинные одноцепочечные транскрипты из специальных локусов в геноме – piРНК-кластеров, обогащенных активными и дивергированными копиями различных МЭ [83, 84]. В отличие от образования siРНК, биогенез piРНК происходит без участия эндонуклеазы Dicer [85]. Транскрипты piРНК-кластеров транспортируются в цитоплазму, где «нарезаются» на последовательности длиной 23–29 нт. эндонуклеазой Zuc/MitoPLD, а затем в составе комплекса с белком Piwi перемещаются в ядро и осуществляют котранскрипционный сайленсинг [84].

У *Drosophila melanogaster* один из первых случаев парамутации был описан при изучении эффекта *транс*-сайленсинга, в основе которого лежит piРНК-опосредованное подавление экспрессии гомологичных последовательностей РНК (*Trans-Silencing Effect*, TSE) [86]. Исследователи под руководством Ronsseray [2, 87, 88] получили ряд трансгенных линий, в геном которых внесли повторы *P-lacZ-white* с помощью транспозона *P-element*. Среди полученных линий, несущих одинаковый трансген *P-lacZ-white*, две линии (*T-1* и *BX2*) демонстрировали различное проявление TSE. Линия *T-1* проявляла выраженный эффект TSE гомологичного трансгена *P-lacZ-white*, тогда как линия *BX2* не обладала способностью к репрессии. Кроме того, как оказалось, способность подавлять экспрессию обладает материнским эффектом наследования [87]. Материнское наследование имеет важнейшее значение для приспособленности организма и фертильности потомства у дрозофил [89]. Через цитоплазму ооцита передаются белки и транскрипты, необходимые для раннего эмбрионального развития.

В 2012 г. De Vanssay et al. [90, 91] провели скрещивание гетерозиготных самок линии *T-1* с самцами линии *BX2*. В выведенном потомстве у самок, которые наследовали локус *BX2* и цитоплазму *T-1*, но не сам локус *T-1*, происходило образование piРНК из трансгена *P-lacZ-white* и наблюдался эффект TSE (рис. 4, а). Эффект TSE обладал полной пенетрантностью и сохранялся более чем в 80 поколениях. Кроме того, локус *P-lacZ-white* в линии *BX2**, как и аллель *T-1*, проявляет TSE

и может подавлять экспрессию гомологичных аллелей. Подавление экспрессии *P-lacZ-white* наблюдали также и при скрещивании линии *BX2** с «наивной» линией *BX2* (рис. 4, а). При реципрокном скрещивании, когда не происходит наследования цитоплазмы линии *T-1*, сайленсинга *P-lacZ-white* не наблюдали. Из этого можно заключить, что аллель *BX2** приобрел свойства парамутагенного аллеля после наследования материнских факторов от линии *T-1*. Кроме того, оба аллеля, *T-1* и *BX2**, проявляют парамутагенный эффект исключительно при наследовании по материнской линии [90, 91]. Следует отметить, что линия *T-1* выведена из линии *BX2* после воздействия рентгеновского излучения и содержит множественные хромосомные инверсии и транслокации [87, 90]. При этом обе линии содержат одинаковое число tandemных повторов трансгена *P-lacZ-white*, расположенных в середине хромосомы 2R [88]. Таким образом, линия *T-1* является примером спонтанной трансформации локуса *P-lacZ-white* в piРНК-продуцирующий локус.

У самок *BX2** из локуса *P-lacZ-white* наблюдается продукция не только piРНК длиной 23–28 нт, но также siРНК длиной 21 нт. [90]. Исследователи протестировали влияние гомозиготной мутации белка Dicer-2, необходимого для процессинга siРНК у *D. melanogaster*, а также мутацию белка Aub, участвующего в посттранскрипционном сайленсинге в биохимическом пути piРНК, на TSE в линии *BX2**. Потеря функции Dicer-2 не повлияла на способность к транс-сайленсингу в линии *BX2** после скрещивания с линией *T-1*, тогда как мутация Aub полностью устраняла TSE у самок *BX2** [90, 92]. Таким образом, исследователи доказали, что эффект TSE и парамутагенные свойства локуса *P-lacZ-white* в линии *BX2** зависят от продукции piРНК, но не от продукции siРНК.

Одним из механизмов piРНК-опосредованного сайленсинга МЭ является котранскрипционное подавление их экспрессии, при которой белок Piwi, загруженный антисмысловыми по отношению к последовательности МЭ молекулами piРНК, вызывает метилирование гистона H3 (H3K9me3) на транскрибирующихся последовательностях МЭ [93]. Это приводит к нарушению связывания РНК-полимеразы II и ингибированию транскрипции МЭ [94]. В работах на *D. melanogaster* и *Drosophila virilis* установлено, что piРНК могут являться эпигенетическим сигналом, который передается через ооцит матери и стимулирует образование piРНК у потомства вследствие внесения метки H3K9me3 в гомологичные локусы [95, 96].

Модель парамутации у дрозофил предполагает передачу piРНК по материнской линии, которые затем поступают в примордиальные половые клетки эмбрионов и усиливают продукцию piРНК

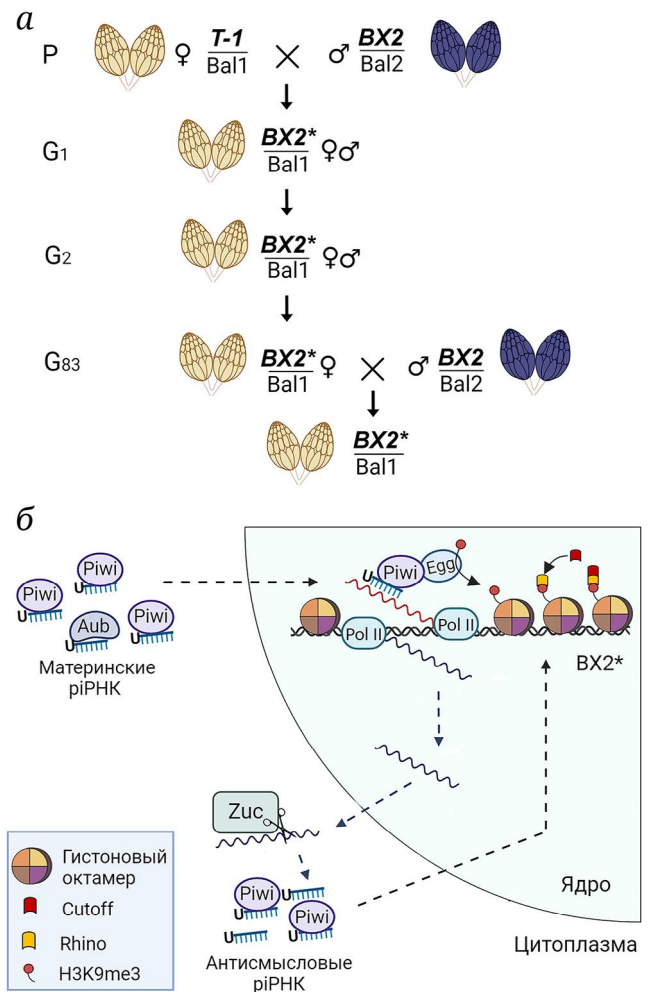


Рис. 4. Парамутация у *D. melanogaster* при скрещивании линий *T-1* и *BX2*. а – Линии *T-1* и *BX2* несут трансгенные конструкции, содержащие по 7 tandemных повторов *P-lacZ*. При этом в линии *BX2* репортерный ген *lacZ* экспрессируется (синий цвет проявляется при инкубации яичников в растворе с X-gal). В линии *T-1* экспрессия трансгена подавлена, поэтому яичники не окрашены. Р – родительские линии; G – поколение; Bal1 и Bal2 – балансерные хромосомы. б – Предполагаемый механизм piРНК-опосредованного преобразования локуса *BX2* в piРНК-кластер при парамутации. PiРНК, происходящие из локуса *T-1*, загружаются в белок Piwi. Затем комплексы Piwi-piРНК наследуются по материнской линии и связываются с новообразующимися транскриптами из локуса *BX2* и привлекают гистонметилтрансферазу SetDB1/Egg, которая метилирует H3K9. В этом заключается котранскрипционный сайленсинг локуса. После эпигенетической модификации локуса с H3K9me3 связывается комплекс Rhino-Cutoff и инициирует образование piРНК-кластера. После экспорта из ядра в цитоплазму транскрипты piРНК-кластеров подвергаются эндонуклеотическому расщеплению с помощью Zuc/MitoPLD. Все piРНК, полученные в результате нуклеазной активности Zuc, характеризуются выраженным нуклеотидным предпочтением в виде уридина на 5'-конце молекул piРНК. Далее, молекулы piРНК загружаются в комплекс с белком Piwi, который осуществляет котранскрипционный сайленсинг локуса *BX2**, а также передается следующему поколению через цитоплазму ооцита

из гомологичных локусов [91, 95, 96]. Предполагали, что комплекс Piwi-рiРНК поступает в ядро, связывается с транскрибирующимися последовательностями локуса и привлекает метилгистонтрансферазу SetDB1/Egg для метилирования H3K9. Затем локус узнается белком Rhino – одним из белков семейства HP1 (Heterochromatin Protein 1), который необходим для активации рiРНК-кластеров в герминативных клетках дрозофил [97]. Эта гипотеза нашла подтверждение в работе Le Thomas et al. [96] в 2014 г. (рис. 4, б). Эксперименты, проведенные исследователями на линиях *BX2** и *BX2*, показали увеличение метилирования H3K9 и связывание Rhino в локусе *P-lacZ-white* при парамутации, а также связывание белка Cutoff, дополнительного фактора транскрипции рiРНК-кластеров в герминативных клетках *D. melanogaster* (рис. 4, б) [96].

В редких случаях в ходе эпигенетического сайленсинга МЭ и формирования рiРНК-кластера *de novo* метилирование гистона H3K9 может распространяться за пределы инсерции МЭ и затрагивать расположенные рядом гены. Это приводит к эпигенетическому сайленсингу генов, а также может приводить к образованию рiРНК-кластеров, в состав которых будут включены белок-кодирующие гены [98–100]. У *D. virilis* рiРНК-опосредованное подавление локуса *cdi* (center divider) является примером подобной «непреднамеренной» регуляции. Впервые генные рiРНК у *D. virilis* были описаны в ходе полногеномного анализа рiРНК-продуцирующих локусов [101]. Несколько обнаруженных рiРНК-кластеров, одним из которых является локус *cdi*, обладают полиморфизмом в отношении экспрессии рiРНК в герминативной ткани. В другой работе Le Thomas et al. [95] были проведены реципрокные скрещивания между линиями, отличающимися по экспрессии *cdi*-гомологичных рiРНК (в данной работе рiРНК-кластер, включающий ген *cdi*, назван «рiРНК-кластер #1»). Это исследование позволило установить, что материнское наследование генных рiРНК приводит к эпигенетической трансформации генного локуса дикого типа и активации экспрессии рiРНК в следующем поколении [95]. Дальнейшие исследования, проведенные Erwin et al. [99], показали, что экспрессия *cdi*-гомологичных рiРНК сохраняется даже в потомстве от возвратного скрещивания с исходной линией, в которой отсутствовал исходный рiРНК-продуцирующий локус *cdi*. Эти наблюдения позволили предположить, что аллель *cdi* является парамутагенным. Чтобы это доказать, Dorador et al. [102] провели скрещивания двух линий *D. virilis*, отличающихся продукцией комплементарных рiРНК к гену *cdi*. В линии *cdi^A* наблюдалось образование рiРНК, комплементарных к *cdi*, а в линии *cdi^I* – образование рiРНК к *cdi* отсут-

ствовало. Важно отметить, что экспрессия самого гена *cdi* в герминативных клетках яичников была подавлена в линии *cdi^A*, но не в линии *cdi^I*. Это позволило определять эффект эпигенетической регуляции локуса *cdi* с помощью оценки экспрессии гена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Исследователи показали, что экспрессия гена *cdi* снижена не только в гетерозиготных гибридах *cdi^A/c di^I* первого поколения, но также в гибридах от возвратного скрещивания с генотипом *c di^I/c di^I*, у которых отсутствует исходный парамутагенный аллель *c di^A* [102]. Таким образом, локус *c di^A* проявляет парамутагенный эффект и на сегодняшний день является единственным известным примером естественного парамутагенного локуса у животных.

Важно отметить, что ген *c di* расположен в субтеломерном районе 2-й хромосомы. У дрозофил структура теломер, как известно, поддерживается ретроэлементами *TART*, *HeT-A* и *TAHRE* [103]. Предыдущие исследования показали, что в герминативных клетках линии *c di^A* экспрессия *TART*, а также рiРНК комплементарных *TART* значительно выше, чем в линии *c di^I* [99]. Можно предположить, что образование рiРНК-кластера, захватывающего область гена *c di*, в линии *c di^A* вызвано повышенной экспрессией молекул рiРНК, комплементарных *TART*. Учитывая, что область гена *c di* фланкирована последовательностями *TART* в обеих линиях [102], трансформация локуса в линии *c di^I* в результате парамутации, вероятно, детерминирована структурой парамутабельного локуса, гомологичного ретроэлементу *TART*. Возможно, что именно локализация повторяющихся элементов генома в структурах парамутагенных и парамутабельных локусов у растений и животных является необходимым условием для эпигенетической трансформации локусов и повышения эффективности парамутации.

Материнское наследование рiРНК и котранскрипционный сайленсинг играют решающую роль в обеспечении парамутагенного эффекта у дрозофил. Кроме того, в результате парамутации инсерции МЭ могут быть преобразованы в рiРНК-кластеры, необходимые для образования дополнительных рiРНК и подавления дальнейшего распространения МЭ в геноме [104, 105]. Однако для приобретения парамутагенных свойств необходимым условием является формирование рiРНК-кластера *de novo* в парамутабельном локусе. Какие факторы детерминируют связывание Rhino и определяют границы рiРНК-кластеров в геноме дрозофил, до сих пор неизвестно.

Пространственные взаимодействия хроматина и парамутация. Недавнее исследование, проведенное на *D. melanogaster*, показывает, что парамутагенный эффект может зависеть от про-

пространственной структуры генома и сближения определенных геномных локусов внутри ядерных компартментов и может происходить без участия коротких некодирующих РНК [106].

У *D. melanogaster* элементы PRE (Polycomb group response elements) представляют собой цис-регуляторные элементы генома, которые привлекают к хроматину белки группы Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG) [107]. По своему действию на структуру хроматина и экспрессию генов белки PcG и TrxG являются антагонистами. Белки PcG поддерживают репрессивное состояние хроматина и обычно связаны с сайленсингом генов, тогда как белки TrxG определяют активную экспрессию генных локусов [107]. Регуляторный мотив *Fab-7*, который включает инсуляторный элемент и PRE, расположен на хромосоме 3R, где он контролирует экспрессию *Abdominal-B* (*Abd-B*), гомеозисного гена, кодирующего один из белков комплекса Bithorax [108]. Ранее обнаружено, что PcG-зависимая репрессия в *Fab-7*-трангенах, содержащих PRE, зависит от присутствия в геноме эндогенного локуса *Fab-7*, даже если этот локус расположен на другой хромосоме [108]. Это наблюдение позволило предположить, что белки PcG и инсуляторные элементы определяют пространственное взаимодействие трангенной и эндогенной копии *Fab-7* и могут модулировать функции репрессии и активации генов [108].

Исследуя взаимодействия *Fab7* и PcG, Ciabrelli et al. [106] получили линию мух *Fab2L*, содержащую трансен в хромосоме 2L. Трансен содержал репортерные гены *lacZ* и *mini-white* под контролем *Fab-7*. У мух линии *Fab2L* окраска глаз отличается среди особей вследствие антагонизма функций PcG и TrxG, связанных с трансенной и эндогенной копиями *Fab7*. Кроме того, фенотипические различия между особями коррелируют с уровнями экспрессии генов *mini-white* и *lacZ*, а также с наличием репрессирующей метки H3K27me3 в районах старта транскрипции генов [106]. Чтобы определить механизм наследования данных «эпиаллелей», исследователи получили две сублинии, *Fab2L^{white}* и *Fab2L^{red}*, демонстрирующие преимущественно белую (репрессированное состояние хроматина) и красную (активированное состояние хроматина) окраску глаз соответственно. Было установлено, что эпиаллели с большей частотой передавались потомству от матери, чем от отца. Кроме того, при скрещивании самок данных сублиний с самцами исходной линии *Fab2L* состояние аллелей *Fab2L^{white}* и *Fab2L^{red}* сохранялось на протяжении десяти поколений [106]. Таким образом, наследование эпиаллелей *Fab2L^{white}* и *Fab2L^{red}* проявляет частичный эффект родительского происхождения (parent-of-origin) и по характеру наследования признаков сходно с парамутацией.

Данный механизм, по всей видимости, не требует образования коротких некодирующих РНК, а метилирование локусов определяется именно пространственной структурой хроматина.

Парамутация у нематоды *C. elegans*. Парамутагенный эффект у нематоды *C. elegans* также основан на функции коротких некодирующих РНК, обеспечивающих узнавание парамутабельного локуса и его эпигенетическую трансформацию путем привлечения гистонметилтрансфераз для метилирования H3K9 [2]. Однако биогенез и механизм действия коротких некодирующих РНК у *C. elegans* имеет ряд важных отличительных особенностей, о которых необходимо упомянуть.

PiРНК у *C. elegans* имеют длину 21 нт. и U на 5'-конце и называются 21U-РНК (рис. 5). С 21U-РНК связывается белок PRG-1 – ортолог белка Piwi *D. melanogaster* [109–112]. Как только происходит узнавание транскрипта с помощью 21U-РНК, связанных с PRG-1, мРНК-мишень сначала разрезается с помощью эндонуклеазы RDE-8, а затем подвергается нематричному присоединению уридинов и гуанинов на 3'-конец мРНК с помощью белка RDE-3 [113, 114]. После добавления поли(U/G) к транскрипту привлекается РНК-зависимая РНК-полимераза RRF-1, которая синтезирует вторичные короткие РНК, называемые 22G-РНК, на матрице мРНК. Далее, 22G-РНК загружаются в белки Argonaute подсемейства WAGO (группа специфичных для нематод белков Ago) и осуществляют котранскрипционный и посттранскрипционный сайленсинг чужеродных последовательностей (рис. 5) [113, 115]. В частности, белок WAGO-9 в комплексе с 22G-РНК связывается с новообразующейся РНК и привлекает в геномный локус гистонметилтрансферазы, которые вносят репрессирующие гистоновые метки H3K9me3, H3K27me3, H3K23me3 [116–118].

Для распознавания мишени с помощью 21U-РНК не требуется их полная комплементарность. Существенной для связывания 21U-РНК является лишь область со 2 по 8 нт. с 5'-конца (seed region) и комплементарность в позиции с 14 по 19 нт., обеспечивающая дополнительную стабильность комплекса 21U-РНК–РНК-мишень [119, 120]. Учитывая, что связывание 21U-РНК с транскриптом-мишенью не требует полной комплементарности, сайленсингу с помощью 21U-РНК могут быть подвержены не только чужеродные последовательности, но и транскрипты собственных генов организма. Защита генов нематод от piРНК-опосредованного сайленсинга также обеспечивается с помощью siРНК, но загруженных в другой Argonaute – CSR-1 (рис. 5) [121, 122]. Подобно PRG-1, белок CSR-1 способен связываться с транскриптами и привлекать к ним RdRP EGO1. В результате активности EGO-1 образуются ком-

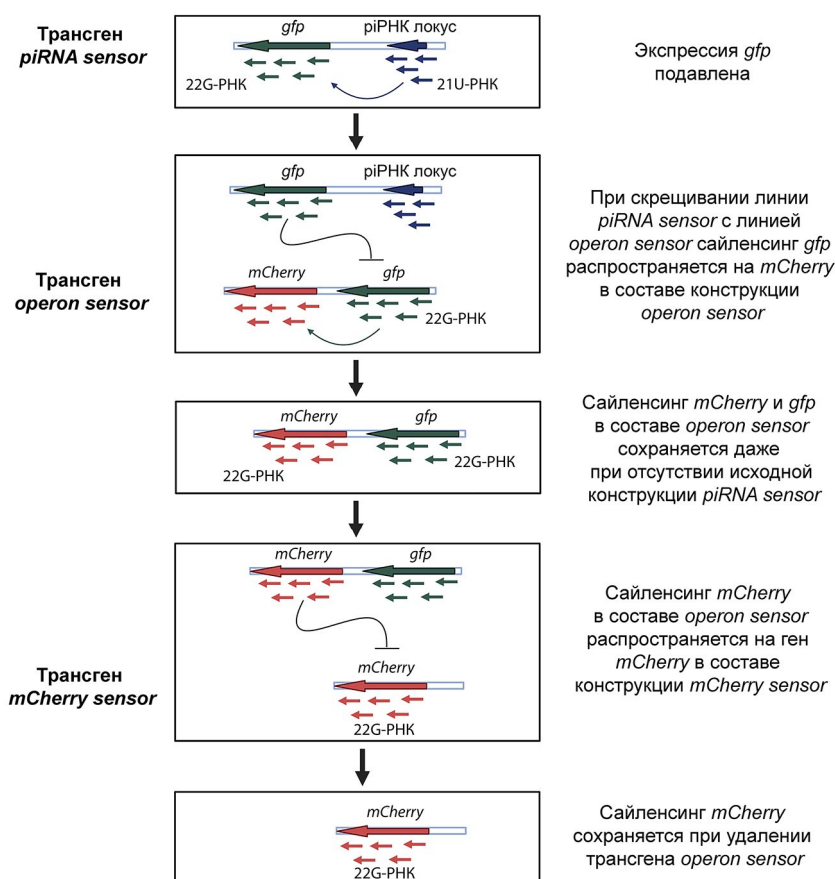


Рис. 6. Пример каскадной парамутации у нематоды *C. elegans*

22G-РНК начинает распространяться в направлении от 3'-к 5'-концу по всей длине транскрипта, сайленсируя *gfp*. Оказалось также, что подавление экспрессии *gfp* коррелирует с количеством комплементарных 22G-РНК. На следующем этапе исследователи скрестили полученную линию *piRNA sensor* с линией, содержащей трансген *operon*, в состав которой входят гены *mCherry* и *gfp*. У гибридного потомства наблюдали не только подавление экспрессии *gfp*, но также и подавление *mCherry*. Эти данные указывают на то, что для сайленсинга *gfp* в составе новой конструкции необходима передача только 22G-РНК, но не 21U-РНК, так как в этой конструкции отсутствует последовательность, гомологичная эндогенным 21U-РНК. Таким образом, piРНК необходимы для инициации сайленсинга, а поддержание эффекта осуществляют только 22G-РНК. Эффект сайленсинга *mCherry* сохраняется более 10 поколений (более длительный эффект исследователи не оценивали), даже если убрать исходный трансген *piRNA sensor*. Далее, исследователи скрестили линию *operon* с линией, содержащей трансген *mCherry::H2A* (*mCherry sensor*). Сайленсинг *mCherry* в составе трансгена *mCherry::H2A* сохранялся даже при отсутствии трансгена *operon* (рис. 6) [128]. Таким образом, стабильно наследуемый сай-

ленсинг трансгенов, продемонстрированный в работе Sapetschnig et al. [128], описывает эпигенетические взаимодействия аллелей, требующие образования двух различных классов коротких некодирующих РНК, и является примером парамутации у *C. elegans*. Общий механизм парамутации у *C. elegans* имеет сходство с механизмами парамутации у растений (локус *b1*) и дрозофил (система *T-1* и *BX2*, а также локус *cdi*). Ключевую роль в эпигенетической регуляции играют короткие некодирующие РНК, но, в отличие от растений, у животных именно piРНК иницируют парамутагенную трансформацию локусов, тогда как у растений эту функцию выполняют siРНК.

Парамутация у мышей. Среди позвоночных животных только для мышей были описаны случаи неменделевского наследования признаков, которые можно объяснить феноменом парамутации. Однако механизмы, лежащие в основе парамутации у мышей, до конца не понятны и имеют ряд существенных расхождений с системами парамутации у растений и беспозвоночных животных.

Парамутация у мышей описана Rassoulzadegan et al. [129] в 2006 г. на примере локуса *Kit* в линии *Kit^{tm1Alf}*. Ген *Kit* кодирует рецептор тирозинкиназы, участвующий в процессах кроветворения, синтеза меланина и дифференцировки

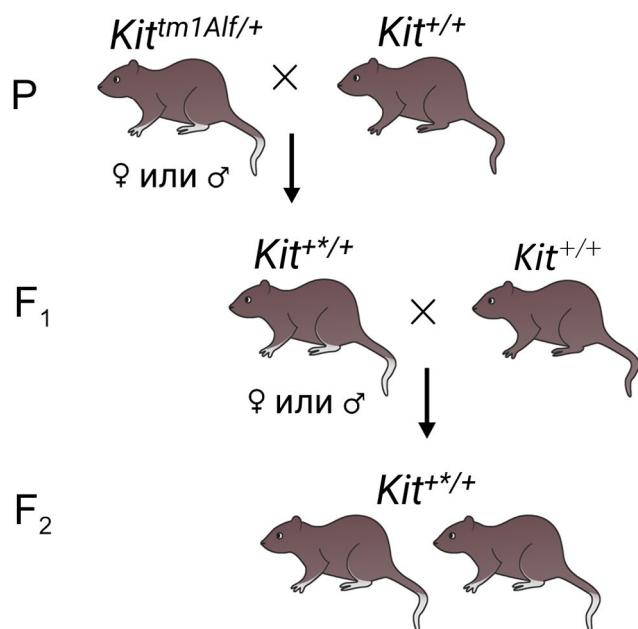


Рис. 7. Парамутация в локусе *Kit* у мышей. Схема скрещивания, демонстрирующая модификацию в аллеле дикого типа и приводящая к фенотипу «белого хвоста»

половых клеток. Нарушающая синтез белка *Kit*, мутация *tm1Alf*, вызванная инсерцией трансгенной конструкции *lacZ-neo* сразу за старт-кодоном, была получена в 1996 г. для изучения функции этого белка в эмбриогенезе [130]. Поскольку наличие белка *Kit* необходимо для кроветворения, гомозиготы *Kit^{tm1Alf}* умирают сразу после рождения. Гетерозиготы выживают, но сниженный уровень белка *Kit* нарушает развитие меланоцитов, и у таких животных появляются белая окраска лапок и кончика хвоста (фенотип «белого хвоста») [129]. При скрещивании таких мышей между собой или с мышами дикого типа в потомстве у большинства особей наблюдали фенотип «белого хвоста» даже при отсутствии аллеля, несущего генетическую конструкцию (рис. 7). Потомство, гомозиготное по дикому аллелю, но демонстрирующее измененный фенотип, было названо *Kit**. Такое наследование наблюдается независимо от пола родительских особей и сохраняется по меньшей мере в шести поколениях от возвратных скрещиваний с мышами дикого типа [129].

Для изучения молекулярной основы парамутации у животных *Kit^{tm1Alf/Kit*}* и *Kit** были исследованы профили метилирования ДНК и гистонов (метки H3K4me2 и H3K9me2) в CpG-богатой области промотора *Kit* [129]. Проведенные эксперименты показали, что между животными дикого типа, гетерозиготными особями *Kit^{tm1Alf/Kit*}*, а также мышами линии *Kit** нет существенных различий ни в метилировании цитозина, ни в метилировании гистонов [129, 131]. Дальнейшие исследования

выявили пониженный уровень полиаденилирования мРНК *Kit* у гетерозиготных мышей *Kit^{tm1Alf/+}* и мышей *Kit**. Кроме того, у мышей *Kit^{tm1Alf/+}* было обнаружено накопление неполиаденилированной мРНК *Kit* аномально коротких размеров в герминативных клетках семенников и сперматозоидах. В сперматозоидах линии *Kit^{tm1Alf/+}* также наблюдали повышенный уровень экспрессии мРНК *Kit* в сравнении с особями дикого типа [129].

Исходя из этих наблюдений, исследователи предположили, что через гаметы могут передаваться молекулы РНК, которые инициируют процесс деградации мРНК *Kit*, и именно это определяет фенотип *Kit**. Чтобы проверить это предположение, они инъецировали РНК, выделенную из спермы гомо- и гетерозиготных мышей, в яйцеклетку и обнаружили, что фенотип «белого хвоста» чаще встречался у особей, которым на эмбриональной стадии вводили РНК от гетерозигот [129]. Хотя фенотип «белого хвоста» также наблюдали после контрольных инъекций РНК от мышей дикого типа, этот фенотип редко передавался потомству. На следующем этапе исследователи решили подтвердить, что именно снижение экспрессии *Kit* определяет фенотип «белого хвоста». Для этого они провели дополнительную серию инъекций двух микроРНК, *miR-221* и *miR-222*, для которых транскрипт гена *Kit* был определен как потенциальная мишень, по данным компьютерного анализа [129, 131]. После инъекции данных микроРНК фенотип «белого хвоста» проявлялся с высокой частотой у мышей дикого типа и, что наиболее важно, наследовался потомками. Таким образом, воздействие микроРНК на мРНК *Kit* в раннем эмбриогенезе является достаточным для индуцирования постоянного и наследуемого эпигенетического изменения экспрессии гена *Kit*. Авторы также подчеркивают, что парамутагенный эффект наблюдался при замене *lacZ-neo* на другие конструкции [129, 31]. Однако остается не ясно, наблюдается ли экспрессия aberrантных транскриптов *Kit* и их накопление в сперматозоидах при замене конструкции. Важно отметить, что фенотип «белого хвоста» никогда не наблюдали при точечной мутации гена *Kit* [132].

Исследователями под руководством Rassoulzadegan [133, 134] были описаны еще два случая парамутации у мышей, вызванные инъекциями микроРНК в эмбрионы, причем в обоих случаях инъекции микроРНК приводили к увеличению экспрессии целевого гена, а не к его подавлению. Так, микроинъекции *miR-1* приводили к повышению экспрессии ее мишени *Cdk9* и гипертрофии сердца [134]. В свою очередь, инъекция *miR-124* приводила к увеличению экспрессии *Sox9*, что сопровождалось развитием близнецов, а новорожденные мышата имели аномально большой вес [133].

Оба фенотипа, полученные при микроинъекциях miR-1 и miR-124, передавались в нескольких поколениях, после чего наблюдалось возвращение фенотипа к исходному состоянию. Позднее эти же исследователи показали, что на фоне мутации метилтрансферазы Dnmt2, которая метилирует преимущественно тРНК у млекопитающих, не наблюдалось фенотипа «белого хвоста» у мышей *Kit^{tm1Alf}* и не развивался соответствующий фенотип после микроинъекций miR-124 [135]. Это наблюдение указывает на важность метилирования РНК в проявлении парамутагенных эффектов у мышей.

По всей видимости, описанные механизмы парамутации у мышей имеют принципиальные отличия от классической системы парамутации, описанной у кукурузы на примере локуса *b1*, и известных моделей парамутации у беспозвоночных. Сайленсинг в данном случае происходит на посттранскрипционном, а не на котранскрипционном уровне и не сопровождается изменением профиля метилирования ДНК и H3K9. С другой стороны, ввиду того, что авторы изучили профиль метилирования только промоторной области гена *Kit*, исключать влияние хроматина полностью нельзя. Важно отметить, что даже если микроРНК способны подавлять экспрессию мРНК *Kit*, взаимосвязь между микроРНК и парамутацией в трансгенных линиях *Kit^{tm1Alf}* не была установлена. Основной функцией микроРНК является подавление экспрессии мРНК вследствие ее прямой дегградации или репрессии на уровне трансляции данной мРНК-мишени [136]. Следует отметить, что, хотя примеры увеличения синтеза белка вследствие связывания микроРНК с мРНК-мишенью описаны для различных типов клеток, в общем они довольно редки [137, 138]. Ввиду того, что даже одна микроРНК может регулировать экспрессию многих мРНК-мишеней, а одна мРНК может являться мишенью одновременно нескольких микроРНК, микроРНК формируют целые регуляторные сети в клетках [136]. Можно предположить, что описанная Rassoulzadegan et al. [129] регуляция экспрессии генов с помощью инъекций микроРНК осуществляется не напрямую, а приводит к изменению ряда сигнальных и регуляторных путей, влияющих на фенотип. Участие микроРНК в осуществлении парамутагенного эффекта имеет огромный интерес и нуждается в дальнейшем изучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Парамутация представляет собой фундаментальный механизм эпигенетической регуляции экспрессии генов и наследственности. Принимая во внимание совокупность *цис*-регуляторных фак-

торов и эффекторных молекулы, осуществляющие парамутацию в различных живых системах, общим эпигенетическим эффектом парамутации можно считать метилирование ДНК и/или гистона H3 парамутабельного аллеля, опосредованные действием различных классов коротких некодирующих РНК. При этом особенности функционирования данных механизмов у разных живых организмов во многом определяют форму передачи наследственной информации при парамутации. Подобная передача эпигенетической информации потомству может играть решающую роль, например, для адаптации организмов к изменившимся условиям окружающей среды. Явления, подобные парамутации, также могут являться причиной наблюдаемой иногда низкой пенетрантности и неменделевского наследования аллелей, ассоциированных с некоторыми заболеваниями человека. Например, развитие ряда наследственных злокачественных новообразований, для которых не было установлено выраженного менделевского наследования, возможно, является результатом эпигенетической модификации, подобной парамутации, передающейся в поколениях [139]. При проведении обширных скрининговых исследований часто удается выявить взаимосвязь между наследуемым геном и родителем, от которого он был унаследован [140–142]. Однако доказать, что подобное наследование произошло в результате эпигенетических процессов, таких как парамутация или геномный импринтинг, крайне трудно без использования модельных систем.

Парамутация тесно связана с сайленсингом генов и, возможно, поэтому в природе встречается редко. Большинство парамутагенных аллелей, описанных до настоящего времени у животных, представляют собой искусственные генетические конструкции. Складывается ощущение, что «естественные» природные аллели каким-то образом защищены от сайленсинга, которому подвержена трансгенная конструкция. С другой стороны, парамутабельные аллели у растений, например, аллель *B-I* у кукурузы, представляют собой пример природного аллеля, который очень чувствителен к сайленсингу. С чем может быть связана столь разная чувствительность природных и искусственно сконструированных аллелей к подавлению экспрессии генов при парамутации? Молекулярные механизмы, предназначенные для поддержания структуры гетерохроматина и регуляции активности эндогенных вирусов, могут «непреднамеренно» воздействовать на структуру эухроматиновых генных локусов и подавлять их экспрессию. Таким образом, парамутагенные и парамутабельные аллели постоянно находятся под давлением естественного отбора и редко сохраняются в популяции. С другой стороны, парамута-

ция может происходить чаще, чем принято считать, но обнаружить парамутагенный эффект не всегда удастся ввиду отсутствия фенотипического проявления многих признаков. Эпигенетическое преобразование генных локусов при парамутации требует кооперативного и последовательного участия сразу нескольких сложных клеточных механизмов, включающих образование коротких некодирующих РНК, котранскрипционный сайленсинг и метилирование ДНК и/или гистонов. Кроме того, у дрозофил преобразование парамутабельного аллеля в парамутагенный, по-видимому, требует образование рiРНК-кластера *de novo* в парамутабельном локусе. Каким образом определенные геномные локусы приобретают способность к парамутагенной трансформации, в том числе к производству рiРНК, остается одним из важных нерешенных вопросов.

Наше понимание механизма парамутации у животных и растений неразрывно связано с исследованиями в области эпигенетической регуляции экспрессии генов, механики процессов поддержания и регуляции структуры хроматина.

Расширение наших знаний в этих областях молекулярной биологии будет являться фундаментом для понимания роли парамутации в эволюции и адаптации живых систем к изменяющимся условиям внешней среды.

Вклад авторов. С.Ф. Фуников – концепция обзора и редактирование; Д.А. Куликова и А.В. Беспалова – написание текста; Е.С. Зеленцова и М.Б. Евгеньев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-74-10050).

Благодарности. Мы выражаем благодарность за информацию из библиотеки Виртуального музея ИБР РАН, поддержанного разделом Государственного задания ИБР РАН 2024 года № 0088-2024-0010.

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

- Hollick, J. B. (2017) Paramutation and related phenomena in diverse species, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 5-23, <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.115>.
- Ronsseray, S. (2015) Paramutation phenomena in non-vertebrate animals, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **44**, 39-46, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.009>.
- Pilu, R. (2015) Paramutation phenomena in plants, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **44**, 2-10, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.015>.
- Chandler, V. L. (2007) Paramutation: from maize to mice, *Cell*, **128**, 641-645, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.007>.
- Bateson, W., and Pellew, C. (1915) On the genetics of "Rogues" among culinary peas (*Pisum sativum*), *J. Genetics*, **5**, 13-36, <https://doi.org/10.1007/BF02982150>.
- Brink, R. A. (1958) Paramutation at the R locus in maize, *Cold Spring Harb. Symp. Quantitat. Biol.*, **23**, 379-391, <https://doi.org/10.1101/sqb.1958.023.01.036>.
- Brink, R. A. (1956) A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible, *Genetics*, **41**, 872-889, <https://doi.org/10.1093/genetics/41.6.872>.
- Hagemann, R. (1969) Somatic conversion (paramutation) at the sulfurea locus of *Lycopersicon esculentum* Mill. III. studies with trisomics, *Can. J. Genet. Cytol.*, **11**, 346-358, <https://doi.org/10.1139/g69-043>.
- Renner, O. (1959) Somatic conversion in the heredity of the *Cruciata* character in *Oenothera*, *Heredity*, **13**, 283-288, <https://doi.org/10.1038/hdy.1959.35>.
- Pilu, R., Panzeri, D., Cassani, E., Cerino Badone, F., Landoni, M., and Nielsen, E. (2009) A paramutation phenomenon is involved in the genetics of maize low phytic acid1-241 (*lpa1-241*) trait, *Heredity (Edinb)*, **102**, 236-245, <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.96>.
- Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J. M., Meeley, R. B., Ertl, D. S., Ranch, J. P., and Glassman, K. (2007) Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 930-937, <https://doi.org/10.1038/nbt1322>.
- Coe, E. H. (1966) The properties, origin, and mechanism of conversion-type inheritance at the B locus in maize, *Genetics*, **53**, 1035-1063, <https://doi.org/10.1093/genetics/53.6.1035>.
- Patterson, G. I., Kubo, K. M., Shroyer, T., and Chandler, V. L. (1995) Sequences required for paramutation of the maize *b* gene map to a region containing the promoter and upstream sequences, *Genetics*, **140**, 1389-1406, <https://doi.org/10.1093/genetics/140.4.1389>.
- Matzke, M. A., and Mosher, R. A. (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 394-408, <https://doi.org/10.1038/nrg3683>.

15. Zhong, X., Du, J., Hale, C. J., Gallego-Bartolome, J., Feng, S., Vashisht, A. A., Chory, J., Wohlschlegel, J. A., Patel, D. J., and Jacobsen, S. E. (2014) Molecular mechanism of action of plant DRM *de novo* DNA methyltransferases, *Cell*, **157**, 1050-1060, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.056>.
16. Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., and Matzke, A. J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA, *EMBO J.*, **19**, 5194-5201, <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5194>.
17. Erdmann, R. M., and Picard, C. L. (2020) RNA-directed DNA methylation, *PLoS Genet.*, **16**, e1009034, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>.
18. Chow, H. T., and Mosher, R. A. (2023) Small RNA-mediated DNA methylation during plant reproduction, *Plant Cell*, **35**, 1787-1800, <https://doi.org/10.1093/plcell/koad010>.
19. Akinmusola, R. Y., Wilkins, C. A., and Doughty, J. (2023) DDM1-mediated TE silencing in plants, *Plants (Basel)*, **12**, <https://doi.org/10.3390/plants12030437>.
20. Cuerda-Gil, D., and Slotkin, R. K. (2016) Non-canonical RNA-directed DNA methylation, *Nat. Plants*, **2**, 16163, <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.163>.
21. Svoboda, P. (2014) Renaissance of mammalian endogenous RNAi, *FEBS Lett.*, **588**, 2550-2556, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.030>.
22. Lahmy, S., Bies-Etheve, N., and Lagrange, T. (2010) Plant-specific multisubunit RNA polymerase in gene silencing, *Epigenetics*, **5**, 4-8, <https://doi.org/10.4161/epi.5.1.10435>.
23. Tucker, S. L., Reece, J., Ream, T. S., and Pikaard, C. S. (2010) Evolutionary history of plant multisubunit RNA polymerases IV and V: subunit origins via genome-wide and segmental gene duplications, retrotransposition, and lineage-specific subfunctionalization, *Cold Spring Harb. Symp. Quantitat. Biol.*, **75**, 285-297, <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.037>.
24. Onodera, Y., Haag, J. R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C. S. (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation, *Cell*, **120**, 613-622, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.007>.
25. Kanno, T., Huettel, B., Mette, M. F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D. P., Matzke, M., and Matzke, A. J. (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation, *Nat. Genet.*, **37**, 761-765, <https://doi.org/10.1038/ng1580>.
26. Alleman, M., Sidorenko, L., McGinnis, K., Seshadri, V., Dorweiler, J. E., White, J., Sikkink, K., and Chandler, V. L. (2006) An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize, *Nature*, **442**, 295-298, <https://doi.org/10.1038/nature04884>.
27. Zhou, M., Palanca, A. M. S., and Law, J. A. (2018) Locus-specific control of the *de novo* DNA methylation pathway in *Arabidopsis* by the CLASSY family, *Nat. Genet.*, **50**, 865-873, <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0115-y>.
28. Law, J. A., Du, J., Hale, C. J., Feng, S., Krajewski, K., Palanca, A. M., Strahl, B. D., Patel, D. J., and Jacobsen, S. E. (2013) Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1, *Nature*, **498**, 385-389, <https://doi.org/10.1038/nature12178>.
29. Zhang, H., He, X., and Zhu, J. K. (2013) RNA-directed DNA methylation in plants: where to start? *RNA Biol.*, **10**, 1593-1596, <https://doi.org/10.4161/rna.26312>.
30. Loffer, A., Singh, J., Fukudome, A., Mishra, V., Wang, F., and Pikaard, C. S. (2022) A DCL3 dicing code within Pol IV-RDR2 transcripts diversifies the siRNA pool guiding RNA-directed DNA methylation, *eLife*, **11**, <https://doi.org/10.7554/eLife.73260>.
31. Wang, Q., Xue, Y., Zhang, L., Zhong, Z., Feng, S., Wang, C., Xiao, L., Yang, Z., Harris, C. J., Wu, Z., Zhai, J., Yang, M., Li, S., Jacobsen, S. E., and Du, J. (2021) Mechanism of siRNA production by a plant Dicer-RNA complex in dicing-competent conformation, *Science*, **374**, 1152-1157, <https://doi.org/10.1126/science.abl4546>.
32. Yang, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., and Chen, X. (2006) HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 667-675, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj474>.
33. Panda, K., and Slotkin, R. K. (2013) Proposed mechanism for the initiation of transposable element silencing by the RDR6-directed DNA methylation pathway, *Plant Signal. Behav.*, **8**, <https://doi.org/10.4161/psb.25206>.
34. Xie, M., and Yu, B. (2015) siRNA-directed DNA methylation in plants, *Curr. Genomics*, **16**, 23-31, <https://doi.org/10.2174/1389202915666141128002211>.
35. Vaucheret, H. (2008) Plant argonautes, *Trends Plant Sci.*, **13**, 350-358, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007>.
36. Havecker, E. R., Wallbridge, L. M., Hardcastle, T. J., Bush, M. S., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Schwach, F., Doonan, J. H., and Baulcombe, D. C. (2010) The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci, *Plant Cell*, **22**, 321-334, <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072199>.

37. Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., and Pikaard, C. S. (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes, *Cell*, **135**, 635-648, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.035>.
38. El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M. A., Jacobsen, S. E., Cooke, R., and Lagrange, T. (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components, *Genes Dev.*, **21**, 2539-2544, <https://doi.org/10.1101/gad.451207>.
39. Köllen, K., Dietz, L., Bies-Etheve, N., Lagrange, T., Grasser, M., and Grasser, K. D. (2015) The zinc-finger protein SPT4 interacts with SPT5L/KTF1 and modulates transcriptional silencing in *Arabidopsis*, *FEBS Lett.*, **589**, 3254-3257, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.017>.
40. Rowley, M. J., Avrutsky, M. I., Sifuentes, C. J., Pereira, L., and Wierzbicki, A. T. (2011) Independent chromatin binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 mediates transcriptional gene silencing, *PLoS Genet.*, **7**, e1002120, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002120>.
41. Kanno, T., Mette, M. F., Kreil, D. P., Aufsatz, W., Matzke, M., and Matzke, A. J. (2004) Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation, *Curr. Biol.*, **14**, 801-805, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.037>.
42. Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., Kreil, D. P., Matzke, M., and Matzke, A. J. (2008) A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation, *Nat. Genet.*, **40**, 670-675, <https://doi.org/10.1038/ng.119>.
43. Law, J. A., Ausin, I., Johnson, L. M., Vashisht, A. A., Zhu, J. K., Wohlschlegel, J. A., and Jacobsen, S. E. (2010) A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*, *Curr. Biol.*, **20**, 951-956, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.062>.
44. Zhong, X., Hale, C. J., Law, J. A., Johnson, L. M., Feng, S., Tu, A., and Jacobsen, S. E. (2012) DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 870-875, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2354>.
45. Kuhlmann, M., and Mette, M. F. (2012) Developmentally non-redundant SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, **79**, 623-633, <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9934-x>.
46. Johnson, L. M., Law, J. A., Khattar, A., Henderson, I. R., and Jacobsen, S. E. (2008) SRA-domain proteins required for DRM2-mediated *de novo* DNA methylation, *PLoS Genet.*, **4**, e1000280, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000280>.
47. Ausin, I., Greenberg, M. V., Simanshu, D. K., Hale, C. J., Vashisht, A. A., Simon, S. A., Lee, T. F., Feng, S., España, S. D., Meyers, B. C., Wohlschlegel, J. A., Patel, D. J., and Jacobsen, S. E. (2012) INVOLVED IN *DE NOVO* 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8374-8381, <https://doi.org/10.1073/pnas.1206638109>.
48. Ausin, I., Mockler, T. C., Chory, J., and Jacobsen, S. E. (2009) IDN1 and IDN2 are required for *de novo* DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1325-1327, <https://doi.org/10.1038/nsmb.1690>.
49. Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Yu, B. (2012) A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4422-4431, <https://doi.org/10.1093/nar/gks034>.
50. Zhu, Y., Rowley, M. J., Böhmendorfer, G., and Wierzbicki, A. T. (2013) A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing, *Mol. Cell*, **49**, 298-309, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.011>.
51. Sigman, M. J., and Slotkin, R. K. (2016) The first rule of plant transposable element silencing: location, location, location, *Plant Cell*, **28**, 304-313, <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00869>.
52. English, J. J., and Jones, J. D. (1998) Epigenetic instability and *trans*-silencing interactions associated with an SPT::Ac T-DNA locus in tobacco, *Genetics*, **148**, 457-469, <https://doi.org/10.1093/genetics/148.1.457>.
53. Gouil, Q., and Baulcombe, D. C. (2018) Paramutation-like features of multiple natural epialleles in tomato, *BMC Genomics*, **19**, 203, <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4590-4>.
54. Chopra, S., Athma, P., Li, X. G., and Peterson, T. (1998) A maize Myb homolog is encoded by a multicopy gene complex, *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 372-380, <https://doi.org/10.1007/s004380050906>.
55. Springer, N. M., and McGinnis, K. M. (2015) Paramutation in evolution, population genetics and breeding, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **44**, 33-38, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.010>.
56. Coe, E. H. (1959) A regular and continuing conversion-type phenomenon at the B locus in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **45**, 828-832, <https://doi.org/10.1073/pnas.45.6.828>.
57. Haring, M., Bader, R., Louwers, M., Schwabe, A., van Driel, R., and Stam, M. (2010) The role of DNA methylation, nucleosome occupancy and histone modifications in paramutation, *Plant J.*, **63**, 366-378, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.04245.x>.
58. Hövel, I., Pearson, N. A., and Stam, M. (2015) *Cis*-acting determinants of paramutation, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **44**, 22-32, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.012>.

59. Walker, E. L., and Panavas, T. (2001) Structural features and methylation patterns associated with paramutation at the *r1* locus of *Zea mays*, *Genetics*, **159**, 1201-1215, <https://doi.org/10.1093/genetics/159.3.1201>.
60. Belele, C. L., Sidorenko, L., Stam, M., Bader, R., Arteaga-Vazquez, M. A., and Chandler, V. L. (2013) Specific tandem repeats are sufficient for paramutation-induced *trans*-generational silencing, *PLoS Genetics*, **9**, e1003773, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003773>.
61. Stam, M., Belele, C., Dorweiler, J. E., and Chandler, V. L. (2002) Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize *b1* locus is associated with paramutation, *Genes Dev.*, **16**, 1906-1918, <https://doi.org/10.1101/gad.1006702>.
62. Stam, M., Belele, C., Ramakrishna, W., Dorweiler, J. E., Bennetzen, J. L., and Chandler, V. L. (2002) The regulatory regions required for B' paramutation and expression are located far upstream of the maize *b1* transcribed sequences, *Genetics*, **162**, 917-930, <https://doi.org/10.1093/genetics/162.2.917>.
63. Louwers, M., Bader, R., Haring, M., van Driel, R., de Laat, W., and Stam, M. (2009) Tissue- and expression level-specific chromatin looping at maize *b1* epialleles, *Plant Cell*, **21**, 832-842, <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064329>.
64. Dorweiler, J. E., Carey, C. C., Kubo, K. M., Hollick, J. B., Kermicle, J. L., and Chandler, V. L. (2000) Mediator of paramutation1 is required for establishment and maintenance of paramutation at multiple maize loci, *Plant Cell*, **12**, 2101-2118, <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2101>.
65. Erhard, K. F., Jr., Stonaker, J. L., Parkinson, S. E., Lim, J. P., Hale, C. J., and Hollick, J. B. (2009) RNA polymerase IV functions in paramutation in *Zea mays*, *Science*, **323**, 1201-1205, <https://doi.org/10.1126/science.1164508>.
66. Hale, C. J., Erhard, K. F., Jr., Lisch, D., and Hollick, J. B. (2009) Production and processing of siRNA precursor transcripts from the highly repetitive maize genome, *PLoS Genet.*, **5**, e1000598, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000598>.
67. Hollick, J. B., and Chandler, V. L. (2001) Genetic factors required to maintain repression of a paramutagenic maize *pl1* allele, *Genetics*, **157**, 369-378, <https://doi.org/10.1093/genetics/157.1.369>.
68. Nobuta, K., Lu, C., Shrivastava, R., Pillay, M., De Paoli, E., Accerbi, M., Arteaga-Vazquez, M., Sidorenko, L., Jeong, D. H., Yen, Y., Green, P. J., Chandler, V. L., and Meyers, B. C. (2008) Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the *mop1-1* mutant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14958-14963, <https://doi.org/10.1073/pnas.0808066105>.
69. Sidorenko, L., Dorweiler, J. E., Cigan, A. M., Arteaga-Vazquez, M., Vyas, M., Kermicle, J., Jurcin, D., Brzeski, J., Cai, Y., and Chandler, V. L. (2009) A dominant mutation in mediator of paramutation2, one of three second-largest subunits of a plant-specific RNA polymerase, disrupts multiple siRNA silencing processes, *PLoS Genet.*, **5**, e1000725, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000725>.
70. Sekhon, R. S., Wang, P. H., Sidorenko, L., Chandler, V. L., and Chopra, S. (2012) Maize Unstable factor for *orange1* is required for maintaining silencing associated with paramutation at the pericarp *color1* and *booster1* loci, *PLoS Genet.*, **8**, e1002980, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002980>.
71. Sloan, A. E., Sidorenko, L., and McGinnis, K. M. (2014) Diverse gene-silencing mechanisms with distinct requirements for RNA polymerase subunits in *Zea mays*, *Genetics*, **198**, 1031-1042, <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168518>.
72. El-Sappah, A. H., Yan, K., Huang, Q., Islam, M. M., Li, Q., Wang, Y., Khan, M. S., Zhao, X., Mir, R. R., Li, J., El-Tarabily, K. A., and Abbas, M. (2021) Comprehensive mechanism of gene silencing and its role in plant growth and development, *Front. Plant Sci.*, **12**, 705249, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.705249>.
73. Arteaga-Vazquez, M., Sidorenko, L., Rabanal, F. A., Shrivastava, R., Nobuta, K., Green, P. J., Meyers, B. C., and Chandler, V. L. (2010) RNA-mediated *trans*-communication can establish paramutation at the *b1* locus in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12986-12991, <https://doi.org/10.1073/pnas.1007972107>.
74. Haag, J. R., Ream, T. S., Marasco, M., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Pasa-Tolic, L., and Pikaard, C. S. (2012) *In vitro* transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing, *Mol. Cell*, **48**, 811-818, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.027>.
75. Brzeska, K., Brzeski, J., Smith, J., and Chandler, V. L. (2010) Transgenic expression of CBBP, a CXC domain protein, establishes paramutation in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5516-5521, <https://doi.org/10.1073/pnas.1001576107>.
76. Creasey, K. M., and Martienssen, R. A. (2010) Germline reprogramming of heterochromatin in plants, *Cold Spring Harbor Symp. Quantitat. Biol.*, **75**, 269-274, <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.064>.
77. Slotkin, R. K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzić, M., Becker, J. D., Feijó, J. A., and Martienssen, R. A. (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen, *Cell*, **136**, 461-472, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.038>.
78. Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., and Vielle-Calzada, J. P. (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*, *Nature*, **464**, 628-632, <https://doi.org/10.1038/nature08828>.

79. Hsieh, T. F., Ibarra, C. A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R. L., and Zilberman, D. (2009) Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm, *Science*, **324**, 1451-1454, <https://doi.org/10.1126/science.1172417>.
80. Mosher, R. A., Melnyk, C. W., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Studholme, D. J., and Baulcombe, D. C. (2009) Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*, *Nature*, **460**, 283-286, <https://doi.org/10.1038/nature08084>.
81. Siomi, H., and Siomi, M. C. (2011) Stress signaling etches heritable marks on chromatin, *Cell*, **145**, 1005-1007, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.009>.
82. Höck, J., and Meister, G. (2008) The Argonaute protein family, *Genome Biol.*, **9**, 210, <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-210>.
83. Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G. J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*, *Cell*, **128**, 1089-1103, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>.
84. Czech, B., Munafò, M., Ciabrelli, F., Eastwood, E. L., Fabry, M. H., Kneuss, E., and Hannon, G. J. (2018) piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 131-157, <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441>.
85. Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., and Zamore, P. D. (2006) A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline, *Science*, **313**, 320-324, <https://doi.org/10.1126/science.1129333>.
86. Roche, S. E., and Rio, D. C. (1998) Trans-silencing by P elements inserted in subtelomeric heterochromatin involves the *Drosophila* Polycomb group gene, Enhancer of zeste, *Genetics*, **149**, 1839-1855, <https://doi.org/10.1093/genetics/149.4.1839>.
87. Josse, T., Teyssset, L., Todeschini, A. L., Sidor, C. M., Anxolabéhère, D., and Ronsseray, S. (2007) Telomeric trans-silencing: an epigenetic repression combining RNA silencing and heterochromatin formation, *PLoS Genet.*, **3**, 1633-1643, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030158>.
88. Ronsseray, S., Boivin, A., and Anxolabéhère, D. (2001) P-Element repression in *Drosophila melanogaster* by variegating clusters of P-lacZ-white transgenes, *Genetics*, **159**, 1631-1642, <https://doi.org/10.1093/genetics/159.4.1631>.
89. Kidwell, M. G., Kidwell, J. F., and Sved, J. A. (1977) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: A syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination, *Genetics*, **86**, 813-833, <https://doi.org/10.1093/genetics/86.4.813>.
90. De Vanssay, A., Bougé, A. L., Boivin, A., Hermant, C., Teyssset, L., Delmarre, V., Antoniewski, C., and Ronsseray, S. (2012) Paramutation in *Drosophila* linked to emergence of a piRNA-producing locus, *Nature*, **490**, 112-115, <https://doi.org/10.1038/nature11416>.
91. De Vanssay, A., Bougé, A. L., Boivin, A., Hermant, C., Teyssset, L., Delmarre, V., Antoniewski, C., and Ronsseray, S. (2013) piRNAs and epigenetic conversion in *Drosophila*, *Fly*, **7**, 237-241, <https://doi.org/10.4161/fly.26522>.
92. Hermant, C., Boivin, A., Teyssset, L., Delmarre, V., Asif-Laidin, A., van den Beek, M., Antoniewski, C., and Ronsseray, S. (2015) Paramutation in *Drosophila* requires both nuclear and cytoplasmic actors of the piRNA pathway and induces cis-spreading of piRNA production, *Genetics*, **201**, 1381-1396, <https://doi.org/10.1534/genetics.115.180307>.
93. Sienski, G., Dönertas, D., and Brennecke, J. (2012) Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression, *Cell*, **151**, 964-980, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.040>.
94. Le Thomas, A., Rogers, A. K., Webster, A., Marinov, G. K., Liao, S. E., Perkins, E. M., Hur, J. K., Aravin, A. A., and Tóth, K. F. (2013) Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state, *Genes Dev.*, **27**, 390-399, <https://doi.org/10.1101/gad.209841.112>.
95. Le Thomas, A., Marinov, G. K., and Aravin, A. A. (2014) A transgenerational process defines piRNA biogenesis in *Drosophila virilis*, *Cell Rep.*, **8**, 1617-1623, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.013>.
96. Le Thomas, A., Stuwe, E., Li, S., Du, J., Marinov, G., Rozhkov, N., Chen, Y. C., Luo, Y., Sachidanandam, R., Toth, K. F., Patel, D., and Aravin, A. A. (2014) Transgenerationally inherited piRNAs trigger piRNA biogenesis by changing the chromatin of piRNA clusters and inducing precursor processing, *Genes Dev.*, **28**, 1667-1680, <https://doi.org/10.1101/gad.245514.114>.
97. Mohn, F., Sienski, G., Handler, D., and Brennecke, J. (2014) The rhino-deadlock-cutoff complex licenses noncanonical transcription of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila*, *Cell*, **157**, 1364-1379, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.031>.
98. Blumenstiel, J. P., Erwin, A. A., and Hemmer, L. W. (2016) What drives positive selection in the *Drosophila* piRNA machinery? The genomic autoimmunity hypothesis, *Yale J. Biol. Med.*, **89**, 499-512.
99. Erwin, A. A., Galdos, M. A., Wickersheim, M. L., Harrison, C. C., Marr, K. D., Colicchio, J. M., and Blumenstiel, J. P. (2015) piRNAs are associated with diverse transgenerational effects on gene and transposon expression in a hybrid dysgenic syndrome of *D. virilis*, *PLoS Genet.*, **11**, e1005332, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005332>.

100. Tsuji, J., Thomson, T., Brown, C., Ghosh, S., Theurkauf, W. E., Weng, Z., and Schwartz, L. M. (2021) Somatic piRNAs and transposons are differentially expressed coincident with skeletal muscle atrophy and programmed cell death, *Front. Genet.*, **12**, 775369, <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.775369>.
101. Rozhkov, N. V., Aravin, A. A., Zelentsova, E. S., Schostak, N. G., Sachidanandam, R., McCombie, W. R., Hannon, G. J., and Evgen'ev, M. B. (2010) Small RNA-based silencing strategies for transposons in the process of invading *Drosophila* species, *RNA*, **16**, 1634-1645, <https://doi.org/10.1261/rna.2217810>.
102. Dorador, A. P., Dalikova, M., Cerbin, S., Stillman, C. M., Zych, M. G., Hawley, R. S., Miller, D. E., Ray, D. A., Funikov, S. Y., Evgen'ev, M. B., and Blumenstiel, J. P. (2022) Paramutation-like epigenetic conversion by piRNA at the telomere of *Drosophila virilis*, *Biology*, **11**, <https://doi.org/10.3390/biology11101480>.
103. Kalmykova, A. I., and Sokolova, O. A. (2023) Retrotransposons and telomeres, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1739-1753, <https://doi.org/10.1134/s0006297923110068>.
104. Scarpa, A., and Kofler, R. (2023) The impact of paramutations on the invasion dynamics of transposable elements, *Genetics*, **225**, <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad181>.
105. Shpiz, S., Ryazansky, S., Olovnikov, I., Abramov, Y., and Kalmykova, A. (2014) Euchromatic transposon insertions trigger production of novel Pi- and endo-siRNAs at the target sites in the drosophila germline, *PLoS Genet.*, **10**, e1004138, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004138>.
106. Ciabrelli, F., Comoglio, F., Fellous, S., Bonev, B., Ninova, M., Szabo, Q., Xuéreb, A., Klopp, C., Aravin, A., Paro, R., Bantignies, F., and Cavalli, G. (2017) Stable polycomb-dependent transgenerational inheritance of chromatin states in *Drosophila*, *Nat. Genet.*, **49**, 876-886, <https://doi.org/10.1038/ng.3848>.
107. Steffen, P. A., and Ringrose, L. (2014) What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 340-356, <https://doi.org/10.1038/nrm3789>.
108. Bantignies, F., Grimaud, C., Lavrov, S., Gabut, M., and Cavalli, G. (2003) Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in *Drosophila*, *Genes Dev.*, **17**, 2406-2420, <https://doi.org/10.1101/gad.269503>.
109. Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E. M., Mitchell, J., Bagijn, M. P., Cording, A. C., Doebley, A. L., Goldstein, L. D., Lehrbach, N. J., Le Pen, J., Pintacuda, G., Sakaguchi, A., Sarkies, P., Ahmed, S., and Miska, E. A. (2012) piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*, *Cell*, **150**, 88-99, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.018>.
110. Bagijn, M. P., Goldstein, L. D., Sapetschnig, A., Weick, E. M., Bouasker, S., Lehrbach, N. J., Simard, M. J., and Miska, E. A. (2012) Function, targets, and evolution of *Caenorhabditis elegans* piRNAs, *Science*, **337**, 574-578, <https://doi.org/10.1126/science.1220952>.
111. Lee, H. C., Gu, W., Shirayama, M., Youngman, E., Conte, D., Jr., and Mello, C. C. (2012) *C. elegans* piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts, *Cell*, **150**, 78-87, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.016>.
112. Shirayama, M., Seth, M., Lee, H. C., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., Jr., and Mello, C. C. (2012) piRNAs initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the *C. elegans* germline, *Cell*, **150**, 65-77, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.015>.
113. Shukla, A., Yan, J., Pagano, D. J., Dodson, A. E., Fei, Y., Gorham, J., Seidman, J. G., Wickens, M., and Kennedy, S. (2020) poly(UG)-tailed RNAs in genome protection and epigenetic inheritance, *Nature*, **582**, 283-288, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2323-8>.
114. Tsai, H. Y., Chen, C. C., Conte, D., Jr., Moresco, J. J., Chaves, D. A., Mitani, S., Yates, J. R., 3rd, Tsai, M. D., and Mello, C. C. (2015) A ribonuclease coordinates siRNA amplification and mRNA cleavage during RNAi, *Cell*, **160**, 407-419, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.010>.
115. Yigit, E., Batista, P. J., Bei, Y., Pang, K. M., Chen, C. C., Tolia, N. H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M. J., and Mello, C. C. (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi, *Cell*, **127**, 747-757, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.033>.
116. Buckley, B. A., Burkhart, K. B., Gu, S. G., Spracklin, G., Kershner, A., Fritz, H., Kimble, J., Fire, A., and Kennedy, S. (2012) A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality, *Nature*, **489**, 447-451, <https://doi.org/10.1038/nature11352>.
117. Mao, H., Zhu, C., Zong, D., Weng, C., Yang, X., Huang, H., Liu, D., Feng, X., and Guang, S. (2015) The Nrde pathway mediates small-RNA-directed histone H3 lysine 27 trimethylation in *Caenorhabditis elegans*, *Curr. Biol.*, **25**, 2398-2403, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.051>.
118. Schwartz-Orbach, L., Zhang, C., Sidoli, S., Amin, R., Kaur, D., Zhebrun, A., Ni, J., and Gu, S. G. (2020) *Caenorhabditis elegans* nuclear RNAi factor SET-32 deposits the transgenerational histone modification, H3K23me3, *eLife*, **9**, e54309, <https://doi.org/10.7554/eLife.54309>.
119. Shen, E. Z., Chen, H., Ozturk, A. R., Tu, S., Shirayama, M., Tang, W., Ding, Y. H., Dai, S. Y., Weng, Z., and Mello, C. C. (2018) Identification of piRNA binding sites reveals the Argonaute regulatory landscape of the *C. elegans* germline, *Cell*, **172**, 937-951.e918, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.002>.

120. Zhang, D., Tu, S., Stubna, M., Wu, W. S., Huang, W. C., Weng, Z., and Lee, H. C. (2018) The piRNA targeting rules and the resistance to piRNA silencing in endogenous genes, *Science*, **359**, 587-592, <https://doi.org/10.1126/science.aao2840>.
121. Seth, M., Shirayama, M., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., Jr., and Mello, C. C. (2013) The *C. elegans* CSR-1 argonaute pathway counteracts epigenetic silencing to promote germline gene expression, *Dev. Cell*, **27**, 656-663, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.014>.
122. Wedeles, C. J., Wu, M. Z., and Claycomb, J. M. (2013) Protection of germline gene expression by the *C. elegans* Argonaute CSR-1, *Dev. Cell*, **27**, 664-671, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.016>.
123. Singh, M., Cornes, E., Li, B., Quarato, P., Bourdon, L., Dingli, F., Loew, D., Proccacia, S., and Cecere, G. (2021) Translation and codon usage regulate Argonaute slicer activity to trigger small RNA biogenesis, *Nat. Commun.*, **12**, 3492, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23615-w>.
124. Gu, W., Shirayama, M., Conte, D., Jr., Vasale, J., Batista, P. J., Claycomb, J. M., Moresco, J. J., Youngman, E. M., Keys, J., Stoltz, M. J., Chen, C. C., Chaves, D. A., Duan, S., Kasschau, K. D., Fahlgren, N., Yates, J. R., 3rd, Mitani, S., Carrington, J. C., and Mello, C. C. (2009) Distinct argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline, *Mol. Cell*, **36**, 231-244, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.020>.
125. Pak, J., and Fire, A. (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*, *Science*, **315**, 241-244, <https://doi.org/10.1126/science.1132839>.
126. Goodwin, E. B., and Ellis, R. E. (2002) Turning clustering loops: sex determination in *Caenorhabditis elegans*, *Curr. Biol.*, **12**, R111-120, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00675-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00675-9).
127. Johnson, C. L., and Spence, A. M. (2011) Epigenetic licensing of germline gene expression by maternal RNA in *C. elegans*, *Science*, **333**, 1311-1314, <https://doi.org/10.1126/science.1208178>.
128. Sapetschnig, A., Sarkies, P., Lehrbach, N. J., and Miska, E. A. (2015) Tertiary siRNAs mediate paramutation in *C. elegans*, *PLoS Genet.*, **11**, e1005078, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005078>.
129. Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006) RNA-mediated non-Mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse, *Nature*, **441**, 469-474, <https://doi.org/10.1038/nature04674>.
130. Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J. J. (1996) Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mouse embryos, *Development*, **122**, 3023-3033, <https://doi.org/10.1242/dev.122.10.3023>.
131. Yuan, S., Oliver, D., Schuster, A., Zheng, H., and Yan, W. (2015) Breeding scheme and maternal small RNAs affect the efficiency of transgenerational inheritance of a paramutation in mice, *Sci. Rep.*, **5**, 9266, <https://doi.org/10.1038/srep09266>.
132. Nocka, K., Tan, J. C., Chiu, E., Chu, T. Y., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. (1990) Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W, *EMBO J.*, **9**, 1805-1813, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08305.x>.
133. Grandjean, V., Gounon, P., Wagner, N., Martin, L., Wagner, K. D., Bernex, F., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (2009) The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth, *Development*, **136**, 3647-3655, <https://doi.org/10.1242/dev.041061>.
134. Wagner, K. D., Wagner, N., Ghanbarian, H., Grandjean, V., Gounon, P., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (2008) RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse, *Dev. Cell*, **14**, 962-969, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.009>.
135. Kiani, J., Grandjean, V., Liebers, R., Tuorto, F., Ghanbarian, H., Lyko, F., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (2013) RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2, *PLoS Genet.*, **9**, e1003498, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003498>.
136. Bartel, D. P. (2018) Metazoan microRNAs, *Cell*, **173**, 20-51, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.
137. Truesdell, S. S., Mortensen, R. D., Seo, M., Schroeder, J. C., Lee, J. H., LeTonqueze, O., and Vasudevan, S. (2012) MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP, *Sci. Rep.*, **2**, 842, <https://doi.org/10.1038/srep00842>.
138. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science*, **318**, 1931-1934, <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.
139. Cuzin, F., Grandjean, V., and Rassoulzadegan, M. (2008) Inherited variation at the epigenetic level: paramutation from the plant to the mouse, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18**, 193-196, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.12.004>.
140. Czene, K., Lichtenstein, P., and Hemminki, K. (2002) Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database, *Int. J. Cancer*, **99**, 260-266, <https://doi.org/10.1002/ijc.10332>.
141. Lesch, B. J., Tothova, Z., Morgan, E. A., Liao, Z., Bronson, R. T., Ebert, B. L., and Page, D. C. (2019) Intergenerational epigenetic inheritance of cancer susceptibility in mammals, *eLife*, **8**, e39380, <https://doi.org/10.7554/eLife.39380>.
142. You, J. S., and Jones, P. A. (2012) Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*, **22**, 9-20, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.008>.

EPIGENETIC PHENOMENON OF PARAMUTATION IN PLANTS AND ANIMALS

Review

**D. A. Kulikova^{1,2}, A. V. Beshpalova¹, E. S. Zelentsova¹,
M. B. Evgen'ev¹, and S. Yu. Funikov^{1*}**

¹ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: sergeifunikov@mail.ru*

² *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

The phenomenon of paramutation describes the interaction between two alleles, in which one allele initiates inherited epigenetic conversion of another allele without affecting the DNA sequence. Epigenetic transformations due to paramutation are accompanied by a change in the DNA and/or histone methylation patterns, affecting gene expression. Studies of paramutation in plants and animals have identified small non-coding RNAs as the main effector molecules required for the initiation of epigenetic changes in gene loci. Due to the fact that small non-coding RNAs can be transmitted across generations, the paramutation effect can be inherited and maintained in a population. In this review, we will systematically analyse the examples of paramutation in different living systems described so far, highlighting common and different molecular and genetic aspects of paramutation between organisms, and consider the role of this phenomenon in evolution.

Keywords: epigenetics, non-Mendelian inheritance, small non-coding RNAs, chromatin, gene expression

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В РАЗРАБОТКЕ АФФИННЫХ И СПЕЦИФИЧНЫХ БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СИСТЕМ

Обзор

© 2024 Ш.Ш. Насаев¹, А.Р. Муканов¹, И.В. Мишкорез^{1,2},
И.И. Кузнецов¹, И.В. Лейбин³, В.А. Долгушева¹, Г.А. Павлюк¹,
А.Л. Манасян¹, А.В. Веселовский^{2*}

¹ ООО «Кселари», отдел исследований и разработок, 121601 Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: veselov@ibmh.msk.su

³ Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.04.2024

После доработки 12.06.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Аффинные и специфические белок-связывающие системы находят широкое применение в различных областях, в частности, в диагностике заболеваний, в терапии как лекарственные препараты и средства их доставки, в научных исследованиях и др. Их разработка требует значительных временных и трудовых затрат. Поэтому в области разработки аффинных агентов активно используют компьютерные методы для их анализа и моделирования на разных этапах разработки. В обзоре описаны основные аффинные и специфические агенты, такие как моноклональные антитела и их фрагменты, антителомиметики, аптамеры и полимерные молекулярные отпечатки. Кратко описаны способы их получения, основные преимущества и недостатки. Отдельное внимание уделено методам молекулярного моделирования, используемым для анализа и разработки аффинных и специфических агентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антитела, антителомиметики, аптамеры, молекулярные отпечатки, молекулярное моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972524080055 EDN: KDYYYY

ВВЕДЕНИЕ

С момента первого упоминания использования антител для распознавания белков в 1968 году наблюдался стремительный рост интереса к разработке аффинных и специфичных систем для диагностики, а затем терапии и других областей [1]. В 70–80-е годы XX века были разработаны технологии получения моноклональных антител, проведены исследования структуры иммуноглобулинов, получены химерные, гуманизированные и,

позднее, полностью человеческие моноклональные антитела, в результате чего антитела стали одной из главных специфичных белок-связывающих систем в современной биологии, медицине и других областях [2]. Антитела применяются в качестве иммобилизирующих и детектирующих реактивов в диагностике, лекарств и средств их доставки, способов маркировки и окрашивания, исследовательских инструментов и др. [3–5].

Тем не менее даже современные моноклональные антитела не лишены недостатков, из-за чего спектр их разнообразия и области применения всё ещё остаются ограниченными. Это способствовало развитию альтернативных систем, способных с высокой эффективностью и специфичностью связываться с белками.

Необходимость оптимизации этих подходов, а также требования к направленной и рацио-

Принятые сокращения: CDRs – Complementarity Determining Regions, переменные петли; MIP – molecularly imprinted polymers, полимерные молекулярные отпечатки; SELEX – систематическая эволюция лиганда путём экспоненциального обогащения.

* Адресат для корреспонденции.

нальной разработке таких систем привели к широкому внедрению методов молекулярного моделирования на разных этапах их создания. Методы моделирования оказываются весьма эффективным способом исследования свойств аффинных белок-связывающих систем, а также способом повышения результативности и удешевления их разработки, улучшения параметров связывания и увеличения стабильности. Отдельные исследования показывают возможность рациональной разработки аффинных связывающих систем на основе структуры мишени. Данные методы используются на разных этапах создания белок-связывающих систем, начиная от этапа создания первичных библиотек мономеров и заканчивая этапами оптимизации систем и выяснения молекулярных механизмов связывания. При этом могут быть использованы как универсальные методы, такие как построение белков по гомологии, молекулярный докинг и молекулярная динамика, так и специализированные методы, оптимизированные для конкретного типа связывающих агентов.

В данном обзоре рассмотрены основные преимущества и недостатки известных белок-связывающих систем, основные экспериментальные подходы для их разработки и ограничения таких подходов. Отдельное внимание уделено применимости современных методов молекулярного моделирования к исследованию, оптимизации, рациональной разработке аффинных белок-связывающих систем как способа обхода ограничений экспериментальных подходов и оценке результатов, получающихся при моделировании.

БЕЛКОВЫЕ АФФИННЫЕ БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Антитела: структура, способы получения и применение антител. Антитела являются глобулярными белками, которые состоят из 4 полипептидных цепей, двух лёгких (50–60 кДа) и двух тяжёлых (100–120 кДа), соединённых дисульфидными связями. Антигенсвязывающие свойства обеспечиваются вариабельным доменом, образованным фрагментом тяжёлой и лёгкой цепей (рис. 1, а). Вариабельный домен имеет консервативные зоны, отвечающие за поддержание структуры сайта связывания, и вариабельные петли, или CDRs (Complementarity Determining Regions), которые обеспечивают взаимодействие с антигеном (рис. 1, б). Антитела вырабатываются плазматическими клетками иммунной системы, а также являются компонентами рецепторов В-лимфоцитов [6].

К первому практическому использованию антител как аффинных и специфичных систем

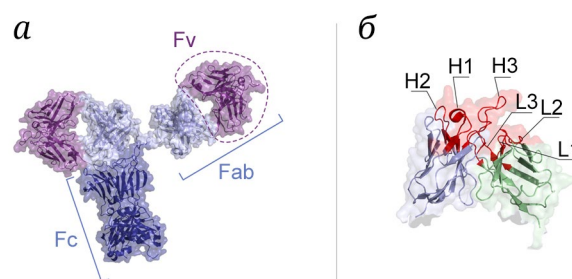


Рис. 1. Структура иммуноглобулина G (PDB: 1HZN) (а) и вариабельных петель (CDRs) в составе Fv-домена (б)

можно отнести применение Э. фон Берингом и С. Китасато в 1890 году сыворотки с поликлональными антителами для лечения дифтерии у животных. Антитела стали наиболее популярными антитоксинами, и поликлональные сыворотки используют по сей день. Огромным толчком в исследованиях и применении антител стало изобретение в 1975 году Ж. Келером и С. Мильштейном гибридной технологии получения моноклональных антител. Моноклональные антитела позволили создавать уникальные воспроизводимые методики выделения, определения наличия и концентрации белков, а также мечения клеток по их антигенному составу. Начиная с 1985 года моноклональные антитела стали использовать в лекарственной терапии. В настоящее время они являются основными аффинными и специфичными системами, связывающимися с белками [7].

Наиболее часто используемым методом разработки моноклональных антител является гибридная технология: метод слияния генетически модифицированных миеломных клеток с В-лимфоцитами, в результате которого получают клетки, способные к постоянному выделению антител, связывающих целевую молекулу белка. С точки зрения затрат на разработку и производство антител гибридная технология является слабоавтоматизируемой и ресурсозатратной, в том числе из-за необходимости постоянного поддержания жизнедеятельности клеточных культур в биореакторах, а также необходимости непрерывного контроля генетических изменений в процессе размножения клеток [8].

Более универсальным и менее затратным является альтернативный способ получения антител с использованием фаговых дисплеев, когда ген вариабельного домена антител встраивается в геном бактериофага (например, M13), после чего производится заражение бактерии, и фрагмент антитела экспрессируется как компонент оболочки вируса. Связываться с антигеном способны только те бактериофаги, в оболочке которых располагается фрагмент антитела, аффинный к белку-мишени. С помощью смеси нецелевых белков

удаляются бактериофаги, которые показывают низкую специфичность. По этим двум принципам происходит отбор искомого варибельного домена, который впоследствии может подвергаться модификациям для увеличения аффинности и специфичности путём направленного мутагенеза и повторного отбора [9].

Несмотря на существование двух методов получения моноклональных антител, экономические затраты на разработку и, что более значимо, на производство антител являются существенными, так как в обоих случаях необходимо использование биореакторов. В связи с этим цены на антитела могут быть высокими, а их применение в различных сферах – ограниченным. В силу высокой сложности контроля воспроизводимости от партии к партии такие характеристики связывания, как аффинность, специфичность и устойчивость, часто отличаются от заявленных производителем [10].

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании антител. В целях оптимизации структуры и направленной разработки антител для повышения аффинности, специфичности и улучшения других свойств в последние годы активно используются методы молекулярного моделирования.

Моделирование структуры антител. В структуре варибельного домена антител пять из шести гиперварибельных участков CDRs имеют ограниченное количество возможных конформаций, то есть имеют структуру, незначительно различающуюся (RMSD около 0,7 Å) между различными по специфичности и аффинности антителами [11, 12]. Анализ известных пространственных структур антител показал, что существует восемь основных шаблонов конформаций их варибельной части: два для структуры лёгкой и тяжёлой цепей, пять для гиперварибельных петель в составе CDRs (L1, L2, L3, H1, H2), и один используется как основа для моделирования H3-петли, которая может значительно варьировать между различными антителами (рис. 1, б). На основе комбинирования этих основных конформаций петель могут быть спрогнозированы структуры большинства варибельных фрагментов антител. Для пяти из шести петель в составе CDRs моделирование в основном происходит путём построения по гомологии. Основной проблемой является моделирование петли H3 и относительной ориентации цепей H и L. Поскольку H3 является частью интерфейса HL, моделирование обеих этих областей является взаимозависимым [13]. Петля H3 строится с использованием методов *ab initio*. В этих методах проводится или поиск похожих петель в известных пространственных структурах белков, или последовательное построение этой петли путём

добавления аминокислотных остатков с последующей оптимизацией структуры построенной петли методами молекулярной механики и динамики. Предложены методы, основанные на стохастических подходах, таких как алгоритм Монте-Карло, в которых создаётся набор различных геометрий, после чего происходит отбор наиболее стабильных с помощью оценки энергии. Далее, происходит минимизация энергии структуры с помощью оптимизации геометрии и выбирается наиболее энергетически выгодная структура [14]. Консервативные части антитела строятся по гомологии с известными пространственными структурами антител с помощью таких программ, как Modeller, I-TASSER и Rosetta [15–18]. На основе данных подходов были разработаны несколько программных продуктов, как коммерческих (продукты компаний «Schrödinger Inc.», «Chemical Computer Group» и «Accelrys Inc.»), так и свободно доступных (PIGS, WAM, SAbPred) [17, 19–21]. Комбинирование методов построения по гомологии и *ab initio* лежит в основе пакета программ RosettaAntibody, который показывал высокую точность соответствия смоделированных и определённых в эксперименте структур [22, 23].

Наиболее значимым следствием разработанных методов для моделирования антигенсвязывающих участков антител стала возможность изменения их аффинности путём внесения точечных замен и быстрой оценки связывания в экспериментах *in silico* [24, 25]. В работе Kiyoshi et al. было смоделировано внесение 1178 точечных мутаций, которые включали поочередную замену каждого из 62 аминокислотных остатков в составе CDRs на соответствующие 19 остатков в структуре антитела 11K2, связывающегося с хемокином MCP-1. В результате отбора *in silico* было показано, что двенадцать из данных замен приводят к повышению аффинности антитела. В последующей проверке с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса было подтверждено, что при внесении пяти из двенадцати отобранных замен аффинность увеличивается. Для одного из мутантов было показано увеличение аффинности в 4,7 раза по сравнению с антителом дикого типа. Авторы данного исследования отметили, что наибольшее значение для повышения аффинности антител имели заряженные остатки во фрагменте лёгкой цепи варибельного домена [25]. Эти методы показали эффективность в выявлении аминокислотных остатков, наиболее важных для связывания.

Моделирование структуры комплекса антиген-антитело. В упомянутой выше работе улучшение было проведено для антитела, в случае которого структура комплекса антитело-антиген была известна [25]. На практике для большинства новых или доступных на рынке

антител пространственная структура комплекса неизвестна [26]. В связи с этим большое значение имеет возможность правильного определения сайта связывания антитела на поверхности белка-мишени. Для решения этой задачи был разработан ряд экспериментальных и компьютерных подходов [27]. В методах *in silico* в качестве входных данных используются как пространственные структуры белков-мишеней, так и их аминокислотные последовательности. Предсказание линейных эпитопов по последовательностям показывает хорошие результаты, но среди всех эпитопов они составляют только 10% [27, 28]. Попытки предсказания конформационных эпитопов при анализе аминокислотных последовательностей показали низкую эффективность, так как трудно учесть пространственное взаимодействие различных участков первичной последовательности белков [29–31]. Поэтому наиболее распространённым является метод высокомолекулярного (белок-белкового) докинга, когда два белка на основе оценки электростатических и стерических соответствий стыкуются между собой в жёсткой форме. Так как в процессе такого взаимодействия должна происходить взаимно индуцированная подстройка поверхностей, жёсткий белок-белковый докинг оказывается малоинформативным. В связи с этим были разработаны подходы к моделированию белковых комплексов с быстрой взаимной оптимизацией геометрии [32, 33]. RosettaFold производит быстрое подстраивание геометрии путём минимизации энергии с помощью алгоритма Монте-Карло. На основе метода RosettaFold и RosettaAntibody был разработан алгоритм SnugDock, специально созданный под моделирование комплексов антитело-антиген и способный производить быструю оптимизацию Монте-Карло для получения более качественных моделей [34]. Было отмечено, что близкий к нативному комплекс антитело-антиген обычно оказывается значительно более энергетически выгодным, в связи с чем возникает довольно явный глобальный энергетический минимум для моделируемой системы и отбор происходит более эффективно [33, 35].

Тем не менее явным недостатком данного подхода остаётся его низкая точность. В моделировании комплексов этап оптимизации является приближённым, а функция оценки энергии – упрощённой, что приводит к низкой корреляции между экспериментально полученными данными и предсказаниями [36]. Поэтому результаты докинга часто дополнительно оценивают методом молекулярной динамики. Так, например, в работе по моделированию комплексов антител с бета-амилоидом после проведения докинга крениума (гуманизированное антитело против 1–40 и 1–42 бета-амилоида, которое разрабатывалось в

качестве лекарства от болезни Альцгеймера) на поверхность бета-амилоида было получено около 200 моделей комплексов, которые были разделены на восемь кластеров. Далее, для представителей кластеров проводилось несколько этапов молекулярной динамики длительностью 200 нс для оптимизации структуры комплекса, анализа формирования связей и расчёта энергии взаимодействия. Было обнаружено два комплекса, которые остаются стабильными и объясняют экспериментальные данные [35].

Метод Монте-Карло является стохастическим, и его предсказательная сила зависит от количества итераций, при увеличении числа которых растёт количество возможных вариантов положений, в результате чего возникает трудно решаемая проблема отбора наиболее вероятных структур. Для этих задач применяются специальные алгоритмы увеличения конформационной выборки для уменьшения случайных энергетических флуктуаций, переоценки энергий комплекса с помощью повышения значимости учёта электростатической энергии и энергии десольватации, а также кластеризация комплексов. Примерами программ, где были реализованы данные алгоритмы, являются FiberDock, ZRANK, pyDock [37–40].

Помимо методов, основанных на Монте-Карло, были разработаны подходы прямого поиска взаимодействующих поверхностей за счёт быстрого преобразования Фурье. Алгоритм может производить поиск соответствий между белковыми поверхностями, переводя их в частотное представление. Таким образом, находится гораздо меньше возможных мест связывания и взаимных конформаций за значительно меньшее время, в том числе благодаря возможности вычислений на графических процессорах. Однако наиболее значимым фактором в данном алгоритме является не физико-химическое соответствие, а геометрическое, что существенно ограничивает метод и требует дополнительных этапов моделирования [41].

Существуют также методы, основанные на предсказании энергии взаимодействия между двумя белками, в том числе комплекса антитело-антиген, которые оптимизированы для поиска связи между структурой взаимодействующих поверхностей и экспериментально определённой аффинностью. Недавно была показана возможность использования метода пертурбации свободной энергии (free energy perturbation, FEP; метод, основанный на вычислении разницы в изменении свободной энергии комплекса при конвертации одной молекулы лиганда (или аминокислотного остатка) в другую за счёт мелких изменений в структуре лиганда с оптимизацией каждой промежуточной структуры комплекса в процессе молекулярной динамики) для предсказания

влияния точечных мутаций на аффинность и стабильность комплекса антиген–антитело [42]. Была также разработана программа DDMut-PPI, которая основана на методах глубокого обучения и позволяет предсказывать изменение свободной энергии при связывании двух белков с большей производительностью [43]. С увеличением количества структур комплексов в базе данных PDB также стала возможной разработка частотных матриц, в которых было определено, что полярные и заряженные аминокислотные остатки на границе взаимодействия являются предпочтительными, и по данному критерию может производиться быстрый отбор потенциальных областей взаимодействия. Таким образом, может происходить дополнительный отбор комплексов по их физико-химическим свойствам, что значительно увеличивает вероятность обнаружения правильной геометрии комплекса [44, 45].

Были разработаны и более универсальные комбинированные подходы. Так, построение структуры антитела по гомологии, оптимизация комплекса и применение сложных физико-химических оценочных функций было использовано в разработанной программе OptMAVE-2.0 в целях *de novo* моделирования переменных фрагментов антител для взаимодействия с конкретным эпитопом на поверхности белкового антигена. В данном методе реализован как белок-белковый докинг, оптимизация позы, оптимизация положения боковых радикалов, так и подбор последовательности, построение статистических матриц и другое [46]. В этом методе был использован подход по имитации природного процесса V(D)J рекомбинации генов путём конструирования антител из структурных блоков MAP (modular Ab parts) с последующей оптимизацией структуры для увеличения аффинности. С его помощью было сконструировано пять антител для пептидов, которые были протестированы экспериментально, показали правильную укладку белковой глобулы и стабильность в растворе. Три из них имели аффинность в наномолярном диапазоне [47]. Этот подход был также использован для конструирования двух антител для связывания эпитопов на оболочечном белке вируса Зика [46].

Интересной перспективой развития методов моделирования антител является возможность полного *de novo* конструирования антител против заданного эпитопа на основе вычислительных моделей. Был разработан подход, в рамках которого была собрана библиотека коротких последовательностей-затравок, способных связываться с участками поверхности белка-мишени. Данные последовательности докировались на поверхность белка по методу «горячих точек» (hot spots, метод докирования библиотеки коротких фрагментов

и выбора структур, вносящих наибольший вклад во взаимодействие с поверхностью белка; также «горячими точками» часто называют аминокислотные остатки, вносящие существенный вклад в энергию связывания), затем подбирались общий каркас антитела, способный связать полученные участки между собой. С использованием достаточно разнородной библиотеки подобный подход может быть использован для направленной разработки антител под целевые эпитопы, однако в оригинальной работе его применение было ограничено эпитопами, для которых уже известны структуры комплексов с антителом [48].

Комбинирование методов анализа статистики взаимодействия комплексов и построения по гомологии особенно применимо в методах моделирования, основанных на глубоком обучении. Основанная на модели трансформера нейронная сеть AlphaFold2, а также её дополнение в виде AlphaFold-Multimer были применены для моделирования комплексов антитело–антиген из первичной последовательности. Тем не менее результат моделирования всё ещё оставался на уровне 30% успешного воспроизведения геометрии комплекса, полученного из экспериментов [49].

Различные модели глубокого обучения, основанные на графовых нейронных сетях, языковых моделях и др., применялись для моделирования антител под конкретный эпитоп [50–52]. Тем не менее ограничениями данных методов оставались обучающие выборки, полученные из PDB, в связи с чем они рассматривали очень ограниченное количество как структур эпитопов, так и структур самих антигенсвязывающих доменов.

Методы, основанные на глубоком обучении, в настоящее время активно развиваются. Они хорошо аппроксимируют скрытые закономерности, поэтому могут показывать высокую точность построения моделей, превосходя методы построения по гомологии, такие как Modeller и I-Tasser [53]. Однако для качественного обучения таких систем требуется большая обучающая выборка, что пока труднодостижимо. Малое количество экспериментально определённых структур обуславливает то, что данные методы показывают всё ещё не очень высокую точность [49].

Схема используемых методов разработки и оптимизации моноклональных антител показана на рис. 2.

В дополнение к методам конструирования структуры антитела и его комплекса с антигеном были разработаны разнообразные подходы для предсказания склонности антител к агрегации, иммуногенности антител, фармакокинетического клиренса [54–56].

Несмотря на значительное количество разнообразных методов моделирования взаимодей-

Моделирование переменных доменов Моделирование комплекса *de novo* конструирование переменных доменов

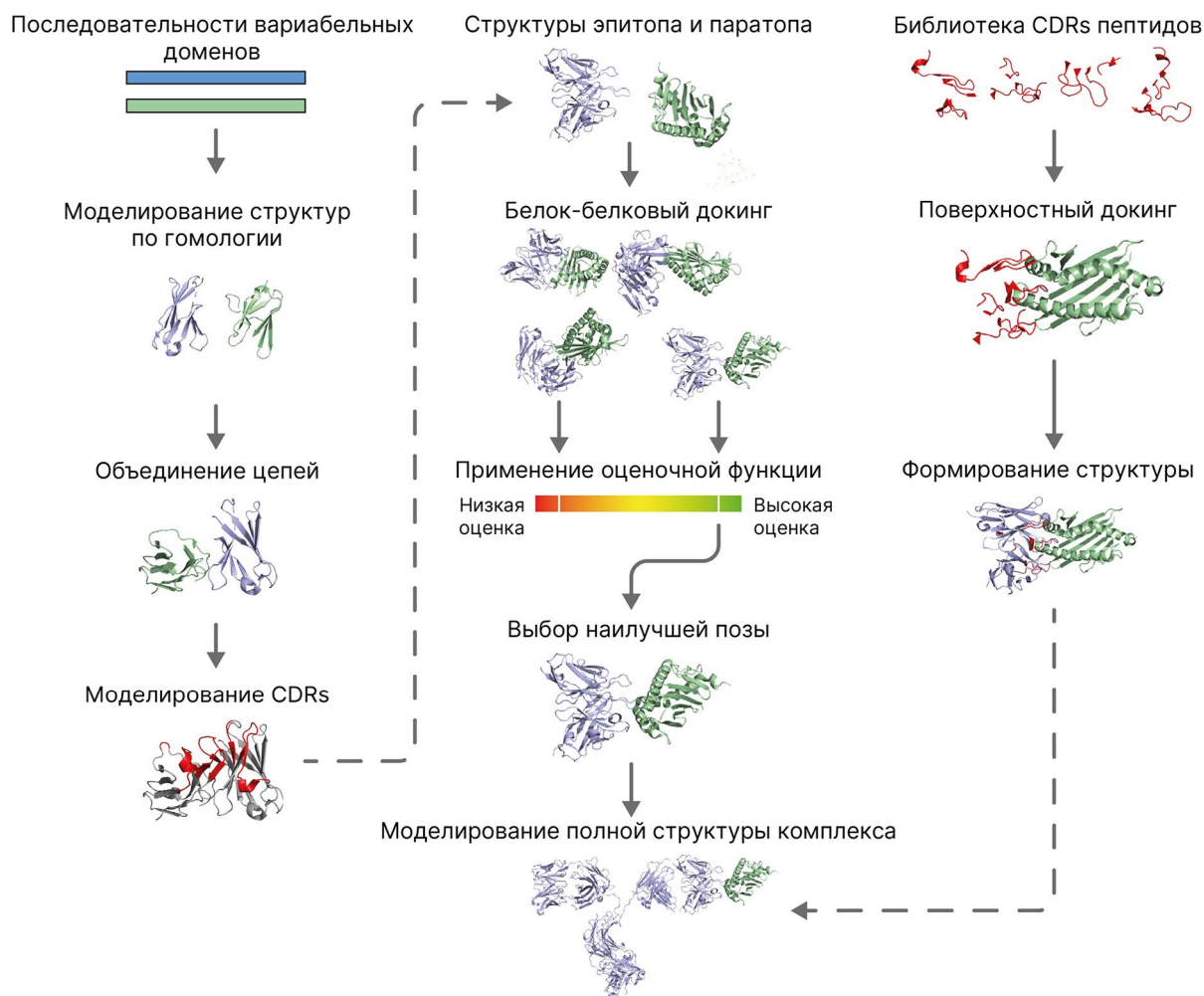


Рис. 2. Стратегии применения методов молекулярного моделирования в разработке и оптимизации моноклональных антител

ствия комплексов антитело–антиген, большинство из них имеют серьёзное ограничение, связанное с отсутствием учёта растворителя, играющего важную роль во взаимодействии антител с антигенами. Для решения этой проблемы наиболее эффективным методом всё ещё остаётся длительная молекулярная динамика в условиях явного растворителя, требующая большого количества вычислений. Возможным вариантом решения этой проблемы может быть применение методов ускоренной динамики, в том числе основанных на методах глубокого обучения [57].

Фрагменты антител. Структура и методы разработки фрагментов антител. Как отмечалось выше, разработка и производство антител является дорогостоящим процессом, требующим постоянного контроля. В связывании антител с мишенью задействован только переменный домен антитела, поэтому были разработаны ук-

роченные варианты антител, сохраняющие способность связываться с мишенью. С помощью методов генной инженерии были получены разнообразные формы белок-связывающих фрагментов антител, такие как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), отдельный антигенсвязывающий фрагмент (Fab'), минитела, нанотела и др. [58–60]. Сравнение структуры антител и их гомологов показано на рис. 3.

В основе разработки каждого из перечисленных производных моноклональных антител лежат технологии гибридомы или фагового дисплея, позволяющие получать аффинные и специфичные системы и увеличивать аффинность в процессе отбора [61, 62]. С помощью методов генной инженерии из участков генов вырезаются области, кодирующие стабильные домены антитела, отвечающие за удержание структуры и связывание с Fc-рецепторами иммунной системы,

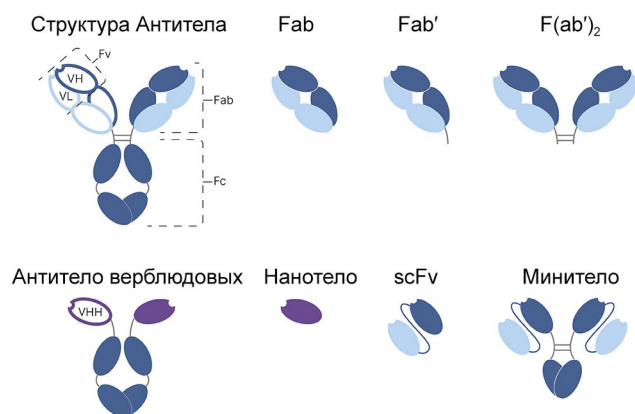


Рис. 3. Сравнение структуры антител и примеров фрагментов антител

и создаются линкеры, соединяющие отдельные участки лёгкой и тяжёлой цепи переменного фрагмента иммуноглобулинов.

В случае нанотел основой являются иммуноглобулины, которые имеют только тяжёлую цепь в переменном домене, за счёт чего антигенсвязывающий участок оказывается более простым. Подобные антитела встречаются у животных, относящихся к семейству верблюдовых (*Camelidae*). С уменьшением размера структуры уменьшается стоимость и сложность её производства, возрастает проницаемость в ткани, что особенно важно для терапевтического применения данных систем, но при этом существенно снижается стабильность антигенсвязывающего участка, что влечёт за собой ухудшение параметров связывания [58].

Для решения проблем, связанных со снижением аффинности и специфичности, были разработаны методы созревания на фаговом или дрожжевом дисплее. В этих методах в последовательности, кодирующие антигенсвязывающие участки, вносятся одиночные замены, за счёт чего получается разнообразная выборка, из которой затем отбираются наиболее аффинные и специфичные структуры. В силу меньшей стоимости и трудоёмкости работы с фрагментами антител данный подход оказывается весьма эффективным [63].

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании фрагментов антител. В силу меньших размеров фрагментов методы молекулярного моделирования, применяемые к разработке и оптимизации целых антител, оказываются более эффективными [64, 65].

Использование небольших участков антител позволяет разрабатывать биспецифические связывающие системы, состоящие из фрагментов двух разных антител, соединённых линкером. Методы молекулярного моделирования были успешно

применены для создания биспецифических одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), ингибирующих образование комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) с главным комплексом гистосовместимости (МНС-II) в присутствии стафилококкового энтеротоксина В (SEB). Важнейшим инструментом моделирования в данной работе оказалась молекулярная динамика, в которой на микросекундной траектории был показан механизм аллостерического ингибирования образования комплекса SEB-TCR [66].

В данной работе были использованы переменные домены известных антител для формирования биспецифической системы, однако для моделирования новых белок-связывающих фрагментов антител необходимы методы предсказания их структуры. Инструменты, используемые для моделирования полных антител, оказываются малоэффективными в данной задаче, так как подвижность фрагментов антител из-за отсутствия стабильных доменов изменяется [67]. Для подобных задач были разработаны специальные программы, такие как NanoNet. Данная модель глубокого обучения способна с высокой точностью и производительностью (примерно 1 млн структур за четыре часа на стандартном центральном процессорном устройстве) моделировать структуры нанотел, имея на входе информацию только об их аминокислотной последовательности. Подобные модели в сочетании с гибким белок-белковым докинг-моделем могут выступать в качестве инструментов виртуального скрининга для поиска новых белок-связывающих аффинных и специфичных систем [68].

Таким образом, несмотря на меньшие размеры фрагментов антител в сравнении с полными моноклональными антителами, их моделирование сталкивается с теми же трудностями и требует значительного количества вычислений.

Антителомиметики. Структуры и методы разработки белковых антителомиметиков. Антитела и их фрагменты являются наиболее широко используемыми белковыми аффинными и специфичными белок-связывающими системами. Однако они имеют ряд свойств, ограничивающих их применение. Так, высокая стоимость производства и низкая стабильность, которая влечёт за собой проблемы с агрегацией, иммуногенностью, высокой стоимостью хранения и логистикой, оказываются основными лимитирующими факторами для расширения сфер применения антител. Во многом это связано с нативной структурой антител, не предназначенной изначально для существования вне живых систем. Несмотря на малые размеры фрагментов антител, их структура всё ещё не является оптимальной и включает достаточно большие участки, функция которых

ограничена только в поддержании структуры сайта связывания [69].

По этой причине возникла идея разработки белок-связывающих систем негомологичных антител, которые принято называть антителомиметиками (другое используемое название – Non-Immunoglobulin Epitope Binders). Конструирование более простых белковых структур, обладающих повышенной аффинностью и специфичностью, позволяет избавиться от ограничений антител, в то же время сохранив их полезные качества.

Антителомиметики белковой природы в своей структуре содержат простые жёсткие каркасы из альфа-спиралей или бета-слоёв, в то время как их белок-связывающие участки обычно являются свободными петлями [70]. Примеры белковых каркасов для антителомиметиков показаны на рис. 4. Для их разработки обычно используются методы сайт-направленного или случайного мутагенеза, а производятся они с использованием простых бактериальных реакторов, показывающих более высокий выход продукта в сравнении с антителами [63].

Наиболее общим способом разработки антителомиметиков является цикл направленной эволюции с последующим отбором кандидатов. Так, первичная библиотека ДНК, кодирующая гомологичные белковые структуры, подвергается ПЦР с высокой вероятностью ошибок чтения, что достигается путём введения солей марганца в реакционную систему. В результате значительно возрастает разнообразие аминокислотных последовательностей относительно исходной библиотеки. Далее, с использованием метода фагового дисплея производится отбор наиболее перспективных последовательностей, имеющих повышенную аффинность и специфичность, после чего процесс повторяется [71]. Таким образом, за ограниченное число циклов может быть получена высокоаффинная и специфичная белок-связывающая система с высокой стабильностью.

Однако у данного метода существуют ограничения, которые препятствуют масштабному выходу на рынок антителомиметиков. Так, при создании антителомиметиков белковой природы возникает сложность в поиске белкового каркаса. Несмотря на большое разнообразие уже известных каркасов, таких как аффитела (В-домен стафилококкового белка А), аднектины (внеклеточный домен человеческого фибронектина III), аффитины (варианты ДНК-связывающего белка Sac7d) и др., каждый белковый каркас имеет свои недостатки, а поиск новых ограничен возможностью расшифровки пространственной структуры белков. Поскольку большинство данных белков имеет чужеродную для организма структуру, они оказываются иммуногенными, что ограничивает

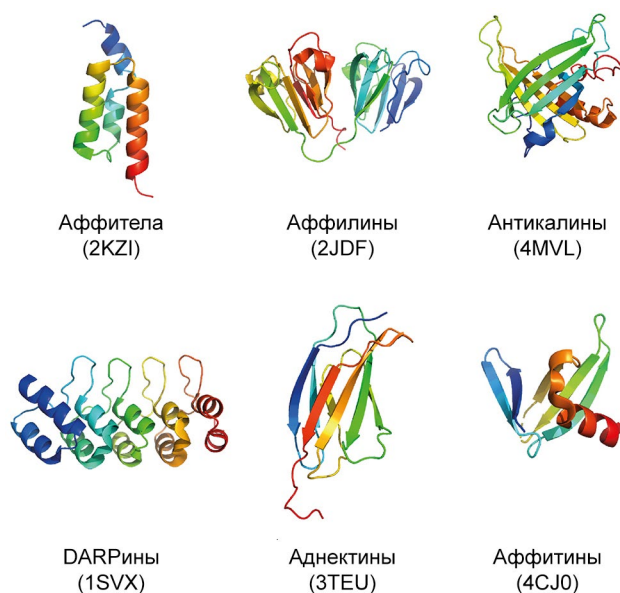


Рис. 4. Примеры белковых каркасов антителомиметиков белковой природы. В скобках приведены коды PDB

их применение *in vivo*. Также из-за отсутствия Fc-фрагментов они не имеют эффекторных функций [63]. Таким образом, хотя антителомиметики белковой природы лишены большинства недостатков антител, их количество и области применения на данный момент ограничены.

Методы молекулярного моделирования в исследовании и разработке белковых антителомиметиков. Использование методов молекулярного моделирования позволяет решать ряд наиболее важных проблем при разработке белковых антителомиметиков. Каркасная структура антителомиметиков обычно представляет собой стабильный водорастворимый фрагмент известных белков, которые могут принимать правильную конформацию в бактериальных клетках. Это упрощает их поиск, так как данные фрагменты преимущественно состоят из гидрофильных аминокислотных остатков с низким содержанием цистеинов и др. [72]. Можно статистически выделить ограниченный состав аминокислот, которые могут быть использованы для формирования структуры, обладающей заданными свойствами растворимости, pH-чувствительности и т.д. без ухудшения параметров связывания. В результате могут быть получены белки, структура которых является стабильной в широком диапазоне температур и кислотности. Для предсказания пространственной структуры таких белков могут использоваться программы AlphaFold2 и RosettaFold. Однако при этом остаётся неясной точность предсказания этими программами, поскольку они в большей степени обучены на гомологичных структурах [73]. Возможным решением этой

проблемы может быть применение диффузионных моделей глубокого обучения, таких как AlphaFold3 и Chroma, способных предсказывать структуру белков на основе желаемых параметров [74, 75]. Благодаря свойству диффузионных моделей производить маленькие шаги в процессе генерации, вводимые ограничения могут в конечном итоге направлять моделирование в сторону нужных свойств. Результаты предсказаний Chroma, проверенные в эксперименте, показали незначительное различие в структурах (RMSD около 1 Å). Так как Chroma обладает субквадратичной вычислительной сложностью от $O(N)$ до $O(N\log N)$, данный инструмент может оказаться очень полезным для разработки каркасных структур для антителомиметиков белковой природы [75]. Серьёзным ограничением диффузионных моделей являются так называемые «галлюцинации», то есть способность данных методов создавать нереалистичные структуры и связи, противоречащие физическим свойствам [76]. По этой причине требуется серьёзная экспертная оценка результатов моделирования.

Однако методы моделирования структуры не решают проблему потенциального иммунного ответа на полученные белковые структуры. На основе данных протеомики были созданы базы данных, такие как SEDB, Epitome, IEDB, AntiJen и VsiPer, в которых хранится информация об эпитопах, распознаваемых T-, B-клеточными рецепторами и антителами, а также встраивающихся в МНС [77–81]. Данная информация может помочь в установлении потенциальных эпитопов и их замене на этапе проектирования белковых каркасов, что может снизить их потенциальную иммуногенность.

Несмотря на меньший размер и низкую структурную сложность антителомиметиков по сравнению с антителами, в настоящее время существует мало примеров применения методов молекулярного моделирования для их разработки. Основным подходом при *de novo* дизайне белковых антителомиметиков является метод «горячих точек», сочетающий в себе докинг потенциально связывающихся пептидов и последующий подбор каркасов [82]. На основе данного метода были разработаны системы, аффинно связывающие консервативные участки гемагглютинина вируса гриппа (HA). В результате моделирования были сконструированы два высокоаффинных белка, после чего с помощью рентгеноструктурного анализа была проанализирована структура комплекса гемагглютинина с антителомиметиком, имеющим наилучшие показатели аффинности. В результате было показано, что предсказанная структура комплекса очень близка к экспериментально определённой [83].

Комбинация различных подходов, в том числе высокомолекулярного гибкого докинга, производительной молекулярной динамики, методов глубокого обучения в предсказании пространственных структур и методов вычисления иммуногенности способна в значительной степени усовершенствовать существующие и привести к разработке новых белковых антителомиметиков, имеющих ряд преимуществ и лишённых недостатков моноклональных антител и их производных.

НЕБЕЛКОВЫЕ АФФИННЫЕ БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Аптамеры. Структура и применение аптамеров. Аффинные системы белковой природы имеют недостатки, связанные со стоимостью производства, сложностью хранения и логистики, иммуногенностью и др. Это стимулировало поиск белок-связывающих систем небелковой природы. Одними из наиболее перспективных из них оказались аптамеры.

Аптамеры – это короткие одноцепочечные молекулы ДНК, РНК или синтетических нуклеиновых кислот обычно длиной от 20 до 60 нуклеотидов, обладающие высокой аффинностью и специфичностью для взаимодействия с высоко- и низкомолекулярными мишенями [84]. Аптамеры были независимо открыты двумя группами в 1990 году как результат процесса, который получил название SELEX (систематическая эволюция лиганда путём экспоненциального обогащения) [84, 85]. Позднее аптамеры были найдены в природе в составе рибопереключателей бактерий [86].

Идея использовать нуклеиновые кислоты для распознавания белковых мишеней возникла в результате исследований вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Было показано, что трансактивационный регулирующий элемент (TAR), содержащий последовательности РНК, может ингибировать репликацию ВИЧ за счёт связывания с вирусным белком Tat с высокой аффинностью и специфичностью [87]. Несмотря на то что аптамеры совершенно не похожи на антитела, считается, что они могут конкурировать с антителами как в диагностическом, так и в терапевтическом применении [88]. Хотя аптамеры распознают и связывают мишени так же, как и антитела, они имеют ряд преимуществ, таких как более короткое время и низкая стоимость производства, более лёгкая модифицируемость, лучшая термическая и химическая стабильность, меньший размер и низкая иммуногенность [89].

Благодаря конкурентным преимуществам в отношении антител аптамеры нашли применение

в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии, а также диагностики и терапии. Одной из перспективных областей исследований, основанных на аптамерах, является область оптических сенсоров. Многочисленные исследования показали, что флуоресцентные красители, присоединённые к конформационно гибким областям аптамера, могут давать оптический сигнал в ответ на связывание с лигандом [90]. На рынке тем не менее аптамеры представлены в незначительном количестве в сравнении с антителами, что связано в первую очередь с отсутствием острой необходимости в перестройке инфраструктуры, которая является экономически затратным и на данный момент нецелесообразным процессом для большинства направлений [91].

Множество аптамеров, созданных для терапевтических целей, проходят клинические испытания или уже выведены на рынок. Среди них препараты для лечения возрастной макулодистрофии, нарушения свёртываемости крови, рака, воспалительных процессов и др. [89, 92].

Помимо использования в качестве лекарственных средств, аптамеры могут быть использованы для адресной доставки лекарств в клетки человека для повышения эффективности препарата и снижения побочных эффектов [93]. Человеческий простатический специфический мембранный антиген (PSMA), трансмембранный белок, ассоциированный с раком простаты, который сверхэкспрессируется на поверхности опухолей, стал первой модельной системой для доставки лекарств на основе аптамеров [94]. Биспецифические аптамеры против gp120 и рецептора CD4 доставляют действующее вещество на основе малой интерферирующей РНК, подавляя активность ВИЧ *in vitro* [95].

Способы разработки и получения аптамеров. Стандартный метод создания аптамеров, SELEX, является аналогом цикла направленной эволюции с последующим отбором кандидатов, способных связываться с белками, но вместо фагового дисплея и экспрессии внутри бактериальных клеток используется инкубация *in vitro* и ПЦР. В процессе SELEX интересующая мишень сначала инкубируется с набором из $\sim 10^9$ – 10^{11} одноцепочечных случайных олигонуклеотидов, называемым первичной библиотекой. Олигонуклеотиды в библиотеке SELEX обычно состоят из 40–100 нуклеотидов, что обусловлено ограничениями химического синтеза, имеют случайную область в середине и общие последовательности на обоих концах для посадки праймеров. После инкубации первичной библиотеки с мишенью несвязанные олигонуклеотиды удаляются, а комплекс аптамер–белок разделяется. Освободившиеся последовательности ДНК амплифицируют

методом ПЦР с повышенным мутагенезом за счёт введения солей марганца. В зависимости от задачи в ходе стандартного SELEX обычно проводится несколько циклов (повторов) процедуры [85]. Потенциальные аптамеры, полученные в результате нескольких раундов отбора, секвенируются, а параметры их связывания с мишенью оцениваются такими методами, как поверхностный плазмонный резонанс или изотермальная калориметрия. Для обогащения аптамеров с высоким сродством к мишени обычно проводится до двадцати раундов отбора [96].

Традиционный SELEX – это основной инструмент генерации аптамеров, однако он не лишён недостатков. Первичная библиотека должна содержать как можно большее разнообразие структур, в то же время в ней должны отсутствовать двухцепочечные нуклеиновые кислоты, а также одноцепочечные линейные структуры, не способные обеспечить надёжную пространственную укладку. Задача поиска оптимальной первичной библиотеки до сих пор не решена [97]. Обычно для повышения её разнообразия вводится большее количество структур с высокой долей GC-пар. Было показано, что повышение доли GC-пар первичной библиотеки приводит к большей сложности пространственных структур, вследствие чего наблюдается большее разнообразие потенциальных аптамеров, а также повышается их средняя аффинность [98].

Другим подходом для увеличения разнообразия первичной библиотеки является подход компании «Soma Logic» (дочерняя компания «Standard BioTools»). В первичной библиотеке компании, используемой для производства специальных модифицированных аптамеров, называемых SOMАмерами, содержится большое количество структур, в составе которых тимины заменены на C5'-этинил-2'-дезоксинуридины. В процессе SELEX к данным остаткам присоединяются боковые радикалы аминокислот или другие модификации, расширяющие свойства получаемых аптамеров [99]. Тем не менее явными ограничениями данного метода являются повышенная стоимость и возможность введения только одной химической модификации в структуру SOMАмера.

Процесс ПЦР, с помощью которого происходит обогащение при SELEX, является неидеальным. В силу большого разнообразия вторичных структур в первичной библиотеке и большей скорости синтеза коротких последовательностей происходит сдвиг, который может приводить к чрезмерному обогащению библиотеки структурами не с максимальным соответствием требуемым параметрам, а максимально выгодными для реакции полимеризации. Для решения данных проблем обычно применяется эмульсионная ПЦР,

в которой каждая отдельная структура копируется в микросомах, таким образом, не конкурируя за активный центр полимеразы [100].

Существует большое количество вариаций оптимизации процесса SELEX, однако в настоящее время его эффективность всё ещё остаётся на уровне 30% вероятности обнаружения требуемого аптамера [101].

Одним из важных ограничений аптамеров в сравнении с антителами является отсутствие гидрофобных свойств в структурах природных нуклеиновых кислот. Одним из решений являются упомянутые выше SOMАмеры, к которым, в частности, могут быть добавлены боковые радикалы гидрофобных аминокислот, например, бензильный радикал (рис. 5, а). Однако данная модификация является трудоёмкой и не универсальной, так как полученные аптамеры не копируются напрямую в ПЦР, и требуются дополнительные стадии. Более перспективной является возможность добавления синтетической пары оснований, такой как dNaM-d5SICS (рис. 5, а). За счёт полиароматической углеводородной группы данная пара оснований оказывается гидрофобной, в то же время сохраняется способность её комплементарного воспроизведения в ПЦР за счёт использования модифицированных ДНК-полимераз [102]. Тем не менее добавление новой пары оснований в первичную библиотеку для SELEX требует повышения разнообразия и значительно увеличивает стоимость процесса.

Другим ограничением аптамеров при их использовании в качестве терапевтических средств, в отличие от антител, является отсутствие у них эффекторной функции. Был предложен метод последовательного сшивания свободных концов двух аптамеров, один из которых связывается с целевым белком, а второй связывается с FcRγIII. Таким образом, был получен эффекторный аптамер, способный вызывать иммунный ответ в результате связывания с белком-мишенью [103].

Так как аптамеры являются короткими олигонуклеотидами, они подвержены деградации под действием различных факторов. Аптамеры на основе молекул РНК являются крайне нестабильными, так как подвержены аутодеградации за счёт образования промежуточных связей 2'-гидроксильной группы с фосфатом, а также из-за высокой степени контаминации окружающей среды рибонуклеазами, катализирующими расщепление РНК [104, 105]. С точки зрения стабильности ДНК-аптамеры оказываются более практичными, тем не менее они также могут деградировать под действием дезоксирибонуклеаз *in vivo*. Было разработано множество модификаций аптамеров, способных препятствовать и аутодеградации, и действию различных нуклеаз (рис. 5, б).

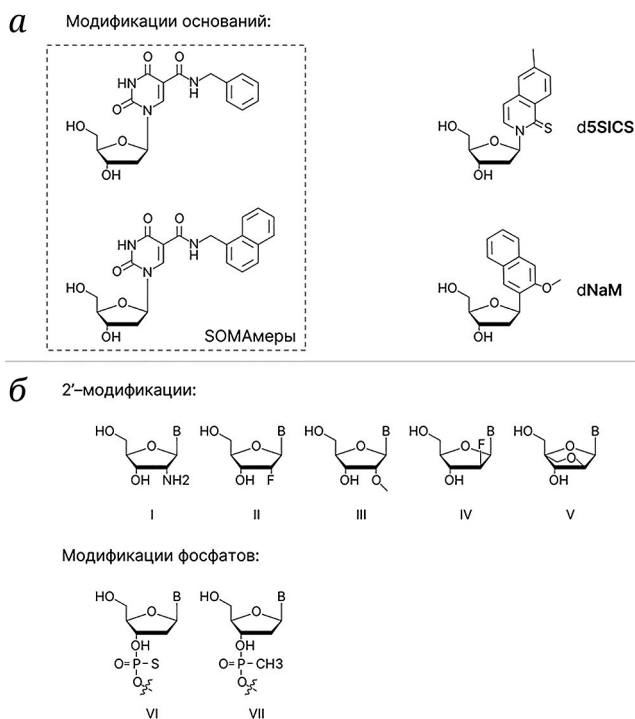


Рис. 5. Модификации нуклеиновых кислот для увеличения аффинности аптамеров и их устойчивости к действию нуклеаз. **а** – Модификации оснований для добавления свойства гидрофобности. **б** – Модификации для увеличения устойчивости к аутодеградации и действию нуклеаз. Буква В отражает любое из оснований. 2'-амино-(I), 2'-фтор-(II), 2'-О-метил-дезоксирибоза (III), 2'-дезоксид-2'-фтор-D-арабинонуклеиновая кислота (IV), закрытая нуклеиновая кислота (Locked Nucleic acid, LNA) (V) и модификации фосфатов (VI, VII)

Изменение 2'-группы на amino-(I), фтор-(II) или О-метильную группу (III) препятствует аутодеградации, а также не позволяет нуклеазам производить расщепление. Однако данная модификация значительно повышает подвижность нуклеиновых кислот, сопоставимую с подвижностью РНК, и, следовательно, может влиять на структуру получаемой молекулы. 2'-дезоксид-2'-фтор-D-арабинонуклеиновая кислота (IV) и закрытая нуклеиновая кислота (Locked Nucleic acid, LNA) (V) используются в аптамерах, так как значительно повышают устойчивость к нуклеазам, имея подвижность молекулы ДНК [106]. Более эффективным в данном случае оказывается замещение кислорода в остатке фосфорной кислоты на серу или метильную группу, которые не влияют на структуру дезоксирибозы. В этих случаях аптамер оказывается устойчивым к действию нуклеаз, однако изменение суммарного заряда молекулы повышает её склонность к неспецифическому связыванию с мишенью [106, 107]. Разработанные модификации, вносимые для увеличения устойчивости к действию нуклеаз или увеличения аффинности,

препятствуют протеканию полимеризации в процессе ПЦР, что усложняет процесс SELEX [108].

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании аптамеров. Метод отбора аптамеров из библиотеки первичных последовательностей. Для оптимизации разработки аптамеров были предложены многочисленные методы, основанные на молекулярном моделировании. Основными вычислительными подходами стали докинг и молекулярная динамика, позволяющие симулировать взаимодействие аптамера и мишени. Иногда данные методы дополняют квантово-механическими или гибридными методами вычисления энергии для более точной оценки связывания [109]. Методы предсказания вторичной и третичной структуры РНК и ДНК играют важную роль в разработке молекул, поскольку для проведения моделирования комплексов белок-аптамер необходима их третичная структура [110]. Современные инструменты *in silico* дают возможность моделировать аптамеры как под малые молекулы, так и под сложные биополимеры. Единственное их ограничение, в отличие от метода SELEX – невозможность использовать клетки в качестве мишени. Типичный цикл моделирования аптамера в исследовании *in silico* начинается с прогнозирования вторичной структуры с последующим предсказанием и оптимизацией третичной структуры. Далее производится жёсткий или гибкий докинг мишени и аптамера, при этом отбираются комплексы с наибольшими оценками связывания. Следующим важным, но не обязательным шагом является этап молекулярной динамики, позволяющий оценить стабильность комплекса и определить энергию связи с более высокой точностью [111]. Анализ взаимодействия аптамера с мишенью позволяет исследователям проводить замены нуклеотидов или их химические модификации, после чего предыдущие шаги можно повторить с новыми кандидатами [112]. Помимо методов моделирования структур и их взаимодействия, модели взаимосвязи структура-активность (QSAR) начали применять в разработке аптамеров для быстрого предсказания требуемой характеристики и сканирования пространства последовательностей [113–115].

Все вышеперечисленные вычислительные методы могут быть использованы вместе с экспериментальными, дополняя друг друга и повышая эффективность. К примеру, для повышения разнообразия первичной библиотеки SELEX было предложено использовать методы предсказания вторичных структур, которые позволяют оценивать их сложность и отбирать последовательно с наибольшим потенциалом. Такие методы также могут быть применены для подбора пра-

вильного соотношения структур в первичной библиотеке для устранения неравномерного течения ПЦР [116]. Тем не менее методы предсказания вторичной структуры в основном низкопроизводительны и не способны предсказать большое количество различных структур за ограниченное время. В то же время они обычно применимы к РНК, в то время как аптамеры преимущественно делаются на основе ДНК в силу их большей структурной стабильности и экономической эффективности. Также большинство методов предсказания вторичных структур игнорируют распространённую структуру псевдоузла из-за высокой вычислительной стоимости её предсказания [116, 117]. Поэтому было предложено использовать методы глубокого обучения, благодаря чему были разработаны модели, способные с высокой скоростью и точностью предсказывать структуры нуклеиновых кислот [118]. Однако в настоящее время экспериментальных данных о структурах одноцепочечных ДНК ещё недостаточно для качественного обучения моделей.

Библиотека первичных последовательностей SELEX содержит большое число разнообразных последовательностей, однако финальный аптамер, выбранный для данной мишени, может быть всё ещё не оптимальным, то есть обладать низкой стабильностью пространственной структуры или аффинностью. При разработке аптамера, связывающего антибиотик сульфадиметоксин, был применён многостадийный подход по внесению точечных замен в аптамер с последующей молекулярной динамикой [119]. За основу авторами был взят аптамер, созданный с помощью SELEX. Его взаимодействие с мишенью было смоделировано с помощью молекулярной динамики, аффинность взаимодействия оценивалась как изменение свободной энергии Гиббса при взаимодействии между аптамером и целевой молекулой. В структуру аптамера вносились точечные замены, после чего снова производилась молекулярная динамика и оценка связывания. Авторы выбирали лучшие последовательности на каждом шаге, благодаря чему смогли увеличить аффинность аптамера, не прибегая к дополнительным экспериментам с помощью SELEX.

Другой пример подобного подхода – разработка аптамера против простатического специфического антигена (PSA) [120]. Авторы работы использовали пять последовательностей, полученных с помощью SELEX, в качестве стартовой точки для моделирования. Данные последовательности были размножены путём скрещивания последовательностей с использованием генетического алгоритма, после чего взаимодействие с мишенью оценивалось с использованием белок-белкового докинга. Лучшие кандидаты были синтезированы,

а их взаимодействие с мишенью измерено с помощью кварцевых микровесов, что позволило снова отобрать лучших кандидатов. Таким образом, последовательности итеративно оптимизировались под мишень, при этом использовались как реальные эксперименты, так и более простые и производительные компьютерные модели. В результате был получен аптамер, который показал в три раза более эффективное связывание по сравнению с исходными аптамерами, полученными по методу SELEX.

Метод направленного моделирования аптамеров на основе информации о структурах мишеней. В работах, описанных выше, использовали методы компьютерного моделирования преимущественно для усовершенствования существующих аптамеров, полученных экспериментально. Однако были предложены и подходы к *de novo* моделированию аптамеров на основе информации о структуре мишени. В исследовании по разработке аптамера для цитохрома P450 использовался метод «горячих точек» и подход по разделению нуклеотидной цепи на два типа участков. Первый участвует в образовании связей с белком за счёт свободных нуклеотидов, которые вносят основной вклад в аффинность и специфичность молекулы. Вторая же часть ответственна за поддержание пространственной структуры аптамера. После определения на поверхности белка участков, имеющих положительно заряженные аминокислоты, с помощью алгоритмов низкомолекулярного докинга и молекулярной динамики были получены структуры тринуклеотидов, связывающихся с поверхностью белка. К наиболее аффинным участкам были добавлены спиральные комплементарные участки для образования структуры шпильки. Синтезированные аптамеры показали высокую специфичность, не связываясь с белками других семейств, а экспериментально определённые энергии связывания имели высокую корреляцию с расчётными [121].

В процессе моделирования молекул, как правило, создаётся набор кандидатов, требующий оценки их эффективности для дальнейшего отбора. Проведение эксперимента для оценки связывания с мишенью будет самым точным, но в то же время самым затратным подходом. Поэтому часто используют методы молекулярного докинга и динамики. Однако длительные симуляции для большого числа кандидатов затратны по времени. Решением может быть использование методов машинного обучения для предсказания требуемой характеристики. Такой подход использовался для разработки аптамера против аминоксипептидазы CD13. Последовательности аптамеров генерировались итеративно с использованием генетического алгоритма. Отбор новых последо-

вательностей для следующего поколения производился оценочной функцией на основе модели машинного обучения, предварительно обученной на характеристиках первичной и вторичной структур РНК и белка [114]. В другой работе для разработки аптамеров против нейтрофильного желатиназа-ассоциированного липокалина использовали модель нейронной сети, обученной на экспериментальных данных, для изучения пространства последовательностей. Авторам удалось не только разработать и синтезировать аптамеры с высокой аффинностью, но и найти более короткие последовательности нуклеиновых кислот с сопоставимой аффинностью и большей стабильностью [115]. Однако подобные нейронные сети могут выявлять зависимости и совершенствовать уже известные структуры, но при поиске новых соединений исключать перспективные структуры из рассмотрения. По этой причине они нуждаются в тщательном тестировании и должны быть хорошо интерпретируемыми.

Наиболее перспективными методы молекулярного моделирования оказываются в разработке модифицированных аптамеров, более пригодных для применения в терапии. Так, с помощью *in silico* подходов к разработке аптамеров может быть выбрана оптимальная комбинация модификаций, способная увеличить аффинность, предотвратить деградацию под действием нуклеаз, но при этом не повлиять на специфичность. Был предложен подход, в котором последовательное применение различного программного обеспечения позволяло моделировать модифицированные аптамеры и их взаимодействие с белками-мишенями [122]. В этой работе использовали классический путь предсказания третичной структуры аптамеров, за которым следовало внесение модификаций, после чего производился высокомолекулярный докинг и выявлялись взаимодействующие основания. В работе использовали программы Mfold и 3dRNA для предсказания пространственных структур нуклеиновых кислот. Однако метод Mfold не способен предсказывать псевдоузлы, к тому же является низкопроизводительным [123]. Метод 3dRNA также является низкопроизводительным и показывает значительное расхождение между экспериментальными и предсказанными структурами (RMSD около 4 Å) [124]. Таким образом, из-за невысокой точности предсказания и низкой производительности данный метод ограничен в использовании для моделирования новых аптамеров для заданной мишени.

Другим очевидным ограничением метода стало отсутствие этапа молекулярной динамики, которая могла бы оптимизировать структуру комплекса. Внесение даже единичных модификаций может значительно влиять на пространственную

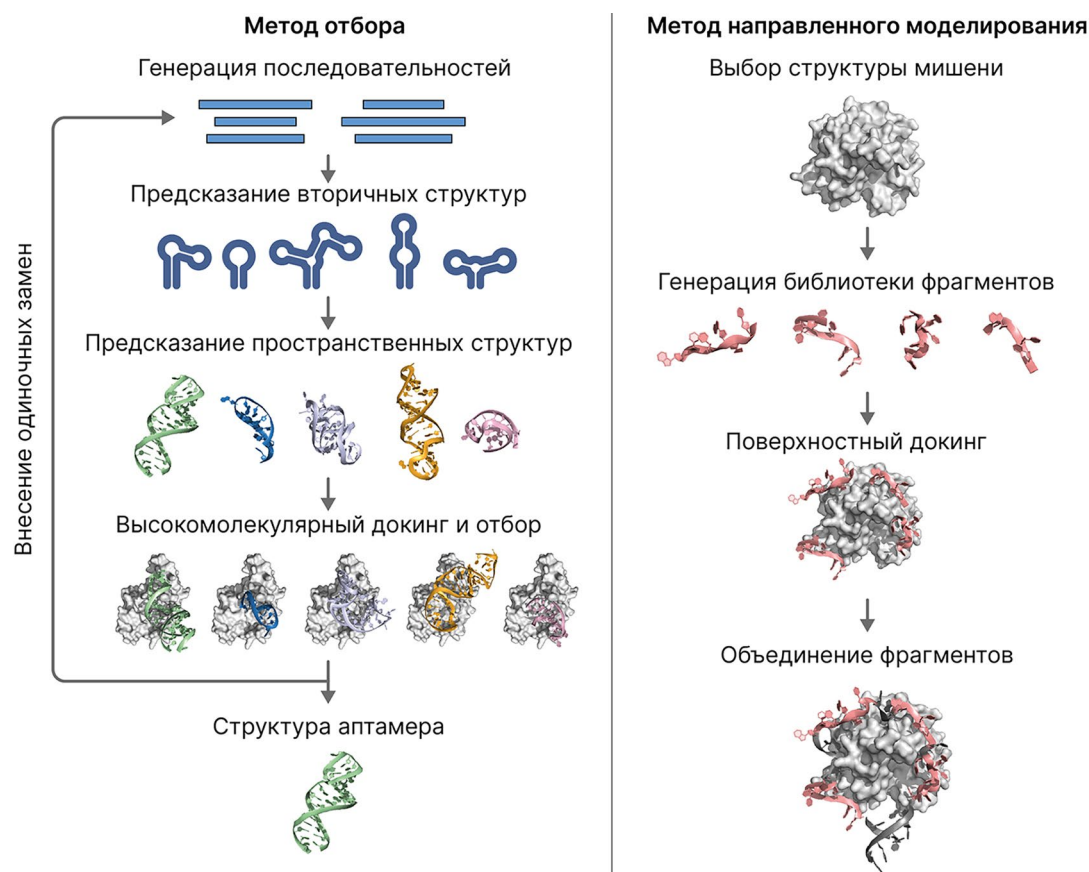


Рис. 6. Схема применения методов молекулярного моделирования в разработке и оптимизации аптамеров

структуру нуклеиновой кислоты [125]. По этой причине после внесения модификаций структуру необходимо подвергать длительной молекулярной динамике для исследования конформационных изменений. Однако стандартные силовые поля для моделирования нуклеиновых кислот не могут быть применены для симуляции модифицированных нуклеиновых кислот. В работе Galindo-Murillo et al. была проведена параметризация модифицированных нуклеотидов, которая позволила проводить молекулярную динамику нетипичных оснований и показала хорошее соответствие полученных результатов моделирования и эксперимента. Однако спектр параметризованных модификаций был ограниченным [126]. Существующие универсальные силовые поля способны производить симуляцию молекул с множеством различных модификаций, но для биополимеров данные силовые поля плохо согласуются с экспериментами [127].

Таким образом, существует два перспективных направления развития методов молекулярного моделирования аптамеров на основе структуры мишени. Одна группа методов имитирует процесс отбора, характерного для SELEX, с использованием предсказания пространственной структуры, докинга и молекулярной динамики, вторая

производит направленную разработку структуры нуклеиновой кислоты, способную связываться с эпитопом на поверхности белка. Общая схема применения данных подходов показана на рис. 6. Оба подхода требуют качественного предсказания вторичной и третичной структуры, а также использования методов молекулярной динамики. Развитие данных методов является наиболее важным для успешного прогнозирования новых аптамеров.

Молекулярные отпечатки. Структура и способы получения молекулярных отпечатков. Для получения ещё более простых в производстве аналогов антител в 1973 году был предложен метод полимерных молекулярных отпечатков (molecularly imprinted polymers, MIP) [128]. MIP представляют собой пористые материалы, способные селективно узнавать шаблон (молекулы, на узнавание которых разрабатывается MIP). Они получают путём самосборки функциональных мономеров вокруг молекулы шаблона в порогене (растворитель для образования пор), после чего инициируется полимеризация в присутствии сшивающего реагента [129]. MIP находят множество применений в таких областях, как диагностика (включая аналоги иммуноферментного анализа), аффинное разделение, доставка лекарств и др. [130–135].

Исходно МІР были созданы для низкомолекулярных соединений, но в настоящее время их начинают использовать и для белковых молекул.

Основной подход к получению молекулярных отпечатков заключается в направленном создании поверхности с геометрическим и физико-химическим соответствием шаблону. На первом этапе добавляют функциональные мономеры, которые взаимодействуют с шаблоном и образуют прочный комплекс. На втором этапе проводят полимеризацию полученного комплекса в присутствии избыточного количества сшивающих мономеров и порогена. На последнем этапе происходит вымывание шаблона из молекулярного отпечатка, за счёт чего образуется полость для специфического связывания белка-мишени [136, 137].

Существует два основных подхода к получению молекулярных отпечатков. Первый включает использование ковалентных функциональных мономеров, которые создают химическую связь с молекулой шаблона, а после этапа полимеризации ковалентные связи расщепляются. В силу сложности данной процедуры и необходимости дополнительных этапов расщепления данный подход практически не используется в отношении белков.

Второй подход основан на образовании относительно слабых нековалентных взаимодействий между шаблоном и функциональными мономерами, таких как водородные связи, ионные взаимодействия, силы Ван-дер-Ваальса, диполь-дипольные и гидрофобные взаимодействия. В силу простоты данный подход в настоящее время является наиболее распространённым. Однако подход с нековалентным связыванием требует более тщательного подбора состава и количества функциональных мономеров [138].

Процедура получения МІР всегда связана с тщательным подбором состава смеси и условий реакции в зависимости от структуры шаблона и выбранного полимера, что является одним из основных недостатков этого метода. Кроме необходимости случайного перебора возможных компонентов, функциональных и сшивающих мономеров, порогенов и условий протекания реакции, данный процесс также является слабо воспроизводимым. Кроме того, для получения каждой новой партии молекулярного отпечатка требуется использование шаблона, что отрицательно сказывается на масштабируемости производства [139].

Для решения проблемы перебора компонентов был предложен метод комбинаторной химии, в котором создаётся большое разнообразие возможных составов, и эксперименты по получению молекулярных отпечатков происходят параллельно [140, 141].

Дополнительные сложности при создании МІР для белков создают условия полимеризации: повышенная температура, неестественная для белков величина рН, органические растворители, что может привести к изменению структуры шаблона [132]. В качестве альтернативы использования целого белка был предложен метод эпиглобального импринтинга. У большинства белков на поверхности есть участки с большим количеством полярных и заряженных аминокислот, которые наиболее часто участвуют в связывании. Вместо попытки полимеризации вокруг целого белка, что связано с большими трудностями в подборе условий, в которых полимеризация не будет нарушать структуру белка, могут быть использованы только фрагменты, включающие данный эпитоп. В силу меньшего размера и часто более стабильной структуры таких эпитопов данный подход повышает диапазон допустимых условий для протекания реакции полимеризации. Тем не менее для достижения полного соответствия данного эпитопа нативной структуре требуется проводить сложные работы, связанные с искусственным созданием меньших по размеру белков, сохраняющих структуру эпитопа [142].

Несмотря на возможность перебора большого количества компонентов смеси для получения структуры молекулярного отпечатка, сила взаимодействия функциональных мономеров с шаблоном обычно низкая, из-за чего мономеры добавляются в избытке. В результате часто возникает широкий спектр равновесных состояний комплекса мономеры-шаблон, что даёт широкий диапазон аффинности и специфичности у МІР [143].

Полимеризация вокруг матрицы должна происходить с возможностью последующего беспрепятственного удаления белка из сайта связывания и доступа для нового белка. Поэтому плотно полимеризующиеся сшивающие мономеры, используемые для разработки молекулярных отпечатков для малых молекул, для белков не подходят. Были предложены методы, позволяющие использовать изменение условий для регулирования размера пор, что позволяет контролировать процесс связывания и высвобождения белков. Для этого, в частности, было предложено проводить полимеризацию с добавлением рН-чувствительных сшивающих элементов пептидной природы, из-за чего при повышении рН поры и сайт связывания увеличиваются в размерах, и появляется возможность выхода белка [144].

Однако более популярным подходом стал метод поверхностных отпечатков, в котором шаблон покрывают тонким слоем полимера, не способным полностью погрузить белок в толщу и не препятствующим высвобождению и связыванию.

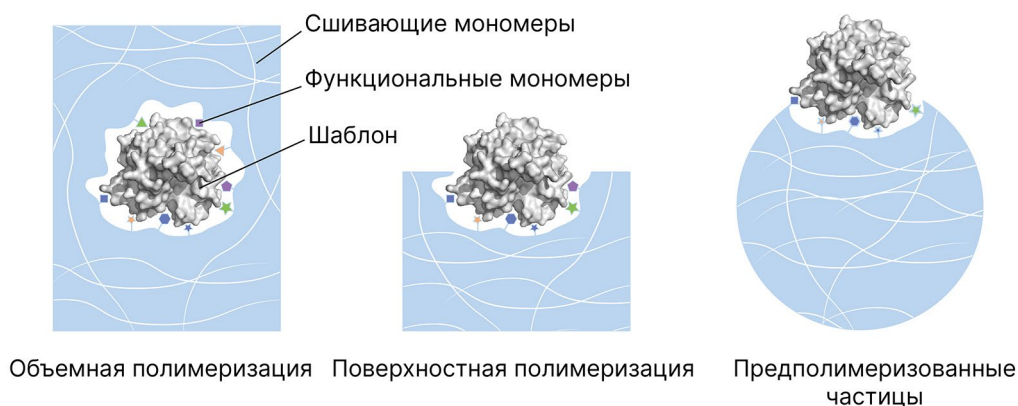


Рис. 7. Варианты белок-связывающих полимерных молекулярных отпечатков

Развитием данного метода является предполимеризация наночастиц, при которой функциональные мономеры связываются с заранее подготовленными наночастицами из сшивающего полимера, а после взаимодействия с белком-мишенью происходит полноценная полимеризация. Тем не менее независимо от метода данные подходы обычно значительно снижают специфичность связывания в сравнении с полимеризацией в объёме [145].

Сравнение вариантов белок-связывающих полимерных молекулярных отпечатков показано на рис. 7.

Методы молекулярного моделирования в разработке и исследовании молекулярных отпечатков. Разработка MIP – это длительный и дорогостоящий процесс. Он требует выбора оптимальных мономеров, подбора соотношения компонентов в реакционной смеси, оптимальных условий проведения реакции. Это затрудняет задачу и увеличивает время по разработке MIP, что ограничивает возможности для их широкого применения. Компьютерное моделирование может значительно оптимизировать этот процесс.

К настоящему времени основные работы по молекулярному моделированию MIP были проведены для низкомолекулярных соединений [146–149]. Основные усилия при этом были направлены на предполимеризационную стадию. Для этого использовались как методы квантовой механики, так и молекулярной динамики. Целью применения данных методов является поиск наиболее подходящего функционального мономера, оценка характера связывания и подбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси [150–157].

Для разработки MIP, связывающихся с белками, было предложено несколько вычислительных подходов [158–160]. Основными методами при этом являются молекулярный докинг и молекулярная динамика.

Одной из сложностей при создании MIP является его возможное влияние на структуру белка-шаблона. Так, было показано, что в процессе приготовления MIP происходит ингибирование рибонуклеазы А. Моделирование (с помощью метода молекулярной динамики) формирования комплекса белка с функциональными мономерами на основе стирена и сшивающего полимера, диметилакрилата полиэтиленгликоля 400, показало возможные конформационные изменения в белке, которые приводили к его инактивации [161]. В то же время исследование методом молекулярной динамики не выявило возможного влияния функциональных мономеров на структуру белка PSA [162].

В работе Kryscio et al. были изучены механизмы влияния условий процесса получения молекулярных отпечатков на конформацию альбумина. Для этого был применён докинг различных функциональных и сшивающих мономеров на поверхность белка. Были определены сайты преимущественного положения мономеров. В каждом из полученных участков наблюдалось серьёзное влияние на пространственную структуру. В то же время было показано, что различные функциональные мономеры конкурируют за одни и те же боковые радикалы аминокислотных остатков [158].

Методы молекулярного моделирования активно используются для подбора мономеров и поиска оптимальных соотношений реагентов в разработке MIP для белков [158, 163, 164]. В работе Rajpal et al. докинг применялся для анализа состава смеси функциональных мономеров, позволив подобрать оптимальный состав смеси для нескольких пептидов до проведения лабораторных экспериментов [165]. Докинг с последующей молекулярной динамикой были использованы для подбора концентраций функциональных и сшивающих мономеров для оптимального связывания миоглобина [159].

Помимо прогнозирования состава функциональных и сшивающих мономеров, важность представляет и прогнозирование аффинности молекулярных отпечатков к их мишени [166]. Была оценена применимость методов, основанных на глубоком обучении, в оценке аффинности молекулярных отпечатков к малым молекулам. Было показано, что использование различных моделей глубокого обучения позволяет хорошо предсказывать параметры связывания молекулярных отпечатков с 2-метоксифенидином. Подобный подход может быть применён и к анализу связывания с белком, что может в значительной степени упростить подбор компонентов и условий полимеризации при получении молекулярных отпечатков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Область применения аффинных и специфичных систем явно развивается в сторону более простых, дешёвых и технологических решений. Первоначально это были моноклональные антитела, в том числе их производные: химерные, гуманизированные и человеческие моноклональные антитела. Желание упростить и удешевить производство и разработку антител привело к использованию их фрагментов, таких как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), отдельный антиген-связывающий фрагмент (Fab'), минитела, нанотела и др. Развитием систем белковой природы стало получение антителомиметиков. Из-за сложности в хранении и применении белковых систем следующим этапом разработки стало получение систем небелковой природы, основными из которых являются аптамеры и полимерные молекулярные отпечатки. Каждая из разрабатываемых аффинных систем имеет как свои преимущества, так и недостатки. Можно ожидать, что и в дальнейшем эти технологии будут развиваться параллельно друг другу, и у разработчиков будет иметься широкий набор решений для выбора наиболее подходящей системы в каждом конкретном случае в зависимости от поставленных задач.

В последние годы на этапах разработки аффинных систем начали активно использовать методы молекулярного моделирования. Их применение во многом позволяет отказаться от традиционного подхода «проб и ошибок». Моделирование взаимодействия аффинной системы со своей мишенью позволяет более детально понять молекулярные механизмы, лежащие в основе высокоаффинного и специфичного связывания, и на этой основе подобрать оптимальную структуру системы, а также условия её получения. Молекулярное моделирование становится неотъемлемой частью таких разработок.

Основными методами выступают:

1. Моделирование по гомологии для построения структур антител и их фрагментов, известных антителомиметиков, а также структуры мишени;
2. *Ab initio* методы для прогнозирования переменных связывающих частей антител, их фрагментов и антителомиметиков;
3. Низкомолекулярный докинг для подбора позы взаимодействующих оснований в задаче проектирования белковых связывающих систем и аптамеров (например, метод «горячих точек»), а также в подборе состава для разработки молекулярных отпечатков;
4. Высокомолекулярный докинг для предсказания структур комплексов белок–белок или белок–нуклеиновая кислота;
5. Методы молекулярной механики, квантовой химии и статистики для оценки энергии взаимодействия, что является основой отбора более аффинных связывающих систем;
6. Молекулярная динамика, позволяющая моделировать поведение молекулярных систем в естественных условиях, оценивать стабильность моделируемых структур и их комплексов.

Классические методы моделирования продолжают совершенствоваться, но в последние годы наблюдается резкое увеличение интереса к системам предсказания, основанным на глубоком обучении. Способность нейронных сетей улавливать скрытые закономерности позволяет создавать программы, обладающие высокой предсказательной силой. Системы на основе глубокого обучения используются при моделировании или *de novo* проектировании структур белков и белок–белковых комплексов (в том числе антител и комплексов антиген–антитело), нуклеиновых кислот, позволяют аппроксимировать физико-химические характеристики, ускорять вычислительно дорогие процессы симуляций и другое. Тем не менее серьёзным недостатком методов, основанных на глубоком обучении, является ограниченность обучающих данных. В связи с этим часто возникают проблемы снижения точности или «галлюцинации», которые мешают данным методам полностью вытеснить классические.

Современные пакеты программного обеспечения, в том числе свободно распространяемые и веб-сервисы, позволяют проводить весь цикл вычислений при разработке всех типов аффинных систем, однако требуется наработка большего количества данных, совершенствование алгоритмов и сравнительные исследования применимости разных методов для увеличения их точности, производительности и результативности.

Вклад авторов. Насаев Ш.Ш., Муканов А.Р., Мишкорез И.В., Долгушева В.А. – концепция, написание текста, иллюстрирование; Кузнецов И.И., Лейбин И.В., Павлюк Г.А., Манасян А.Л. – написание текста, редактирование статьи; Веселовский А.В. – руководство работой, редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных иссле-

дований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг., № 122030100170-).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berson, S. A., and Yalow, R. S. (1968) General principles of radioimmunoassay, *Clin. Chim. Acta*, **22**, 51-69, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(68\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(68)90247-7).
2. Rhiel, L., and Becker, S. (2021) *Applications of Antibodies in Therapy, Diagnosis, and Science*, Springer International Publishing, Cham.
3. Vengesai, A., Midzi, H., Kasambala, M., Mutandadzi, H., Mduluzza-Jokonya, T. L., Rusakaniko, S., Mutapi, F., Naicker, T., and Mduluzza, T. (2021) A systematic and meta-analysis review on the diagnostic accuracy of antibodies in the serological diagnosis of COVID-19, *Syst. Rev.*, **10**, 155, <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01689-3>.
4. Stern, M., and Herrmann, R. (2005) Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **54**, 11-29, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.10.011>.
5. Bekes, M., Langley, D. R., and Crews, C. M. (2022) PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **21**, 181-200, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>.
6. Rees, A. R. (2020) Understanding the human antibody repertoire, *MAbs*, **12**, 1729683, <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1729683>.
7. Liu, J. K. (2014) The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations, *Ann. Med. Surg. (Lond)*, **3**, 113-116, <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>.
8. Yang, O., Prabhu, S., and Ierapetritou, M. (2019) Comparison between batch and continuous monoclonal antibody production and economic analysis, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**, 5851-5863, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b04717>.
9. Alfaleh, M. A., Alsaab, H. O., Mahmoud, A. B., Alkayyal, A. A., Jones, M. L., Mahler, S. M., and Hashem, A. M. (2020) Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside, *Front. Immunol.*, **11**, 1986, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01986>.
10. Bradbury, A., and Pluckthun, A. (2015) Reproducibility: standardize antibodies used in research, *Nature*, **518**, 27-29, <https://doi.org/10.1038/518027a>.
11. Chothia, C., and Lesk, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, **196**, 901-917, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90412-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90412-8).
12. Sircar, A., Sanni, K. A., Shi, J., and Gray, J. J. (2011) Analysis and modeling of the variable region of camelid single-domain antibodies, *J. Immunol.*, **186**, 6357-6367, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100116>.
13. Almagro, J. C., Teplyakov, A., Luo, J., Sweet, R. W., Kodangattil, S., Hernandez-Guzman, F., and Gilliland, G. L. (2014) Second antibody modeling assessment (AMA-II), *Proteins*, **82**, 1553-1562, <https://doi.org/10.1002/prot.24567>.
14. Zhu, K., and Day, T. (2013) *Ab initio* structure prediction of the antibody hypervariable H3 loop, *Proteins*, **81**, 1081-1089, <https://doi.org/10.1002/prot.24240>.
15. Leem, J., Dunbar, J., Georges, G., Shi, J., and Deane, C. M. (2016) ABodyBuilder: Automated antibody structure prediction with data-driven accuracy estimation, *MAbs*, **8**, 1259-1268, <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1205773>.
16. Schoeder, C. T., Schmitz, S., Adolf-Bryfogle, J., Sevy, A. M., Finn, J. A., Sauer, M. F., Bozhanova, N. G., Mueller, B. K., Sangha, A. K., Bonet, J., Sheehan, J. H., Kuenze, G., Marlow, B., Smith, S. T., Woods, H., Bender, B. J., Martina, C. E., del Alamo, D., Kodali, P., Gulsevin, A., et al. (2021) Modeling immunity with Rosetta: methods for antibody and antigen design, *Biochemistry*, **60**, 825-846, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00912>.
17. Marcatili, P., Rosi, A., and Tramontano, A. (2008) PIGS: automatic prediction of antibody structures, *Bioinformatics*, **24**, 1953-1954, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn341>.
18. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.*, **5**, 725-738, <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
19. Zhu, K., Day, T., Warshaviak, D., Murrett, C., Friesner, R., and Pearlman, D. (2014) Antibody structure determination using a combination of homology modeling, energy-based refinement, and loop prediction, *Proteins*, **82**, 1646-1655, <https://doi.org/10.1002/prot.24551>.

20. Whitelegg, N. R., and Rees, A. R. (2000) WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB, *Protein Eng.*, **13**, 819-824, <https://doi.org/10.1093/protein/13.12.819>.
21. Dunbar, J., Krawczyk, K., Leem, J., Marks, C., Nowak, J., Regep, C., Georges, G., Kelm, S., Popovic, B., and Deane, C. M. (2016) SAbPred: a structure-based antibody prediction server, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W474-W478, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw361>.
22. Sircar, A., Kim, E. T., and Gray, J. J. (2009) RosettaAntibody: antibody variable region homology modeling server, *Nucleic Acids Res.*, **37**, W474-479, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp387>.
23. Weitzner, B. D., Kuroda, D., Marze, N., Xu, J., and Gray, J. J. (2014) Blind prediction performance of RosettaAntibody 3.0: grafting, relaxation, kinematic loop modeling, and full CDR optimization, *Proteins*, **82**, 1611-1623, <https://doi.org/10.1002/prot.24534>.
24. Su, Z. Y. (2014) Ibalizumab-human CD4 receptor interaction: computational alanine scanning molecular dynamics studies, *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **10**, 217-225, <https://doi.org/10.2174/157340991003150302230124>.
25. Kiyoshi, M., Caaveiro, J. M., Miura, E., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Soga, S., Shirai, H., Kawabata, S., and Tsumoto, K. (2014) Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex, *PLoS One*, **9**, e87099, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087099>.
26. Ferdous, S., and Martin, A. C. R. (2018) AbDb: antibody structure database-a database of PDB-derived antibody structures, *Database (Oxford)*, **2018**, <https://doi.org/10.1093/database/bay040>.
27. Kumar, N., Bajiya, N., Patiyl, S., and Raghava, G. P. S. (2023) Multi-perspectives and challenges in identifying B-cell epitopes, *Protein Sci.*, **32**, e4785, <https://doi.org/10.1002/pro.4785>.
28. Zeng, X., Bai, G., Sun, C., and Ma, B. (2023) Recent Progress in Antibody Epitope Prediction, *Antibodies*, **12**, 52, <https://doi.org/10.3390/antib12030052>.
29. Dai, B., and Bailey-Kellogg, C. (2021) Protein interaction interface region prediction by geometric deep learning, *Bioinformatics*, **37**, 2580-2588, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab154>.
30. Da Silva, B. M., Myung, Y., Ascher, D. B., and Pires, D. E. V. (2022) epitope3D: a machine learning method for conformational B-cell epitope prediction, *Brief. Bioinform.*, **23**, <https://doi.org/10.1093/bib/bbab423>.
31. Cia, G., Pucci, F., and Rومان, M. (2023) Critical review of conformational B-cell epitope prediction methods, *Brief. Bioinform.*, **24**, <https://doi.org/10.1093/bib/bbac567>.
32. Chu, L. S., Ruffolo, J. A., Harmalkar, A., and Gray, J. J. (2024) Flexible protein-protein docking with a multitask iterative transformer, *Protein Sci.*, **33**, e4862, <https://doi.org/10.1002/pro.4862>.
33. Gray, J. J., Moughon, S., Wang, C., Schueler-Furman, O., Kuhlman, B., Rohl, C. A., and Baker, D. (2003) Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations, *J. Mol. Biol.*, **331**, 281-299, [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00670-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3).
34. Sircar, A., and Gray, J. J. (2010) SnugDock: paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models, *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000644, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000644>.
35. Zhao, J., Nussinov, R., and Ma, B. (2017) Mechanisms of recognition of amyloid-beta (Abeta) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies, *J. Biol. Chem.*, **292**, 18325-18343, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.801514>.
36. Guest, J. D., Vreven, T., Zhou, J., Moal, I., Jeliaskov, J. R., Gray, J. J., Weng, Z., and Pierce, B. G. (2021) An expanded benchmark for antibody-antigen docking and affinity prediction reveals insights into antibody recognition determinants, *Structure*, **29**, 606-621.e605, <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.01.005>.
37. Mashlach, E., Nussinov, R., and Wolfson, H. J. (2010) FiberDock: a web server for flexible induced-fit backbone refinement in molecular docking, *Nucleic Acids Res.*, **38**, W457-461, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq373>.
38. Pierce, B., and Weng, Z. (2007) ZRANK: reranking protein docking predictions with an optimized energy function, *Proteins*, **67**, 1078-1086, <https://doi.org/10.1002/prot.21373>.
39. Cheng, T. M., Blundell, T. L., and Fernandez-Recio, J. (2007) pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking, *Proteins*, **68**, 503-515, <https://doi.org/10.1002/prot.21419>.
40. Lorenzen, S., and Zhang, Y. (2007) Identification of near-native structures by clustering protein docking conformations, *Proteins*, **68**, 187-194, <https://doi.org/10.1002/prot.21442>.
41. Ritchie, D. W., and Venkatraman, V. (2010) Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors, *Bioinformatics*, **26**, 2398-2405, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq444>.
42. Zhu, F., Bourguet, F. A., Bennett, W. F. D., Lau, E. Y., Arrildt, K. T., Segelke, B. W., Zemla, A. T., Desautels, T. A., and Faissol, D. M. (2022) Large-scale application of free energy perturbation calculations for antibody design, *Sci. Rep.*, **12**, 12489, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14443-z>.
43. Zhou, Y., Myung, Y., Rodrigues, C. H. M., and Ascher, D. B. (2024) DDMut-PPI: predicting effects of mutations on protein-protein interactions using graph-based deep learning, *Nucleic Acids Res.*, **52**, W207-W214, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae412>.

44. Wang, M., Zhu, D., Zhu, J., Nussinov, R., and Ma, B. (2018) Local and global anatomy of antibody-protein antigen recognition, *J. Mol. Recognit.*, **31**, e2693, <https://doi.org/10.1002/jmr.2693>.
45. Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastiris, P. L., Bonvin, A. M., and Vangone, A. (2016) PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes, *Bioinformatics*, **32**, 3676-3678, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514>.
46. Chowdhury, R., Allan, M. F., and Maranas, C. D. (2018) OptMAVEN-2.0: *de novo* design of variable antibody regions against targeted antigen epitopes, *Antibodies (Basel)*, **7**, 23, <https://doi.org/10.3390/antib7030023>.
47. Poosarla, V. G., Li, T., Goh, B. C., Schulten, K., Wood, T. K., and Maranas, C. D. (2017) Computational *de novo* design of antibodies binding to a peptide with high affinity, *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 1331-1342, <https://doi.org/10.1002/bit.26244>.
48. Hummer, A. M., Abanades, B., and Deane, C. M. (2022) Advances in computational structure-based antibody design, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **74**, 102379, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102379>.
49. Yin, R., and Pierce, B. G. (2023) Evaluation of AlphaFold antibody-antigen modeling with implications for improving predictive accuracy, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.07.05.547832>.
50. Olsen, T. H., Moal, I. H., and Deane, C. M. (2022) AbLang: an antibody language model for completing antibody sequences, *Bioinform. Adv.*, **2**, vbac046, <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbac046>.
51. Shuai, R. W., Ruffolo, J. A., and Gray, J. J. (2023) IgLM: Infilling language modeling for antibody sequence design, *Cell Syst.*, **14**, 979-989 e974, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2023.10.001>.
52. Akbar, R., Robert, P. A., Pavlovic, M., Jeliakov, J. R., Snapkov, I., Slabodkin, A., Weber, C. R., Scheffer, L., Miho, E., Haff, I. H., Haug, D. T. T., Lund-Johansen, F., Safonova, Y., Sandve, G. K., and Greiff, V. (2021) A compact vocabulary of paratope-epitope interactions enables predictability of antibody-antigen binding, *Cell Rep.*, **34**, 108856, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108856>.
53. Bertoline, L. M. F., Lima, A. N., Krieger, J. E., and Teixeira, S. K. (2023/02/28) Before and after AlphaFold2: an overview of protein structure prediction, *Front. Bioinform.*, **3**, <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1120370>.
54. Lai, P. K., Gallegos, A., Mody, N., Sathish, H. A., and Trout, B. L. (2022) Machine learning prediction of antibody aggregation and viscosity for high concentration formulation development of protein therapeutics, *MAbs*, **14**, 2026208, <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2026208>.
55. Marks, C., Hummer, A. M., Chin, M., and Deane, C. M. (2021) Humanization of antibodies using a machine learning approach on large-scale repertoire data, *Bioinformatics*, **37**, 4041-4047, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab434>.
56. Grinshpun, B., Thorsteinson, N., Pereira, J. N., Rippmann, F., Nannemann, D., Sood, V. D., and Fomekong Nanfack, Y. (2021) Identifying biophysical assays and *in silico* properties that enrich for slow clearance in clinical-stage therapeutic antibodies, *MAbs*, **13**, 1932230, <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1932230>.
57. Reis, P., Barletta, G. P., Gagliardi, L., Fortuna, S., Soler, M. A., and Rocchia, W. (2022) Antibody-antigen binding interface analysis in the big data era, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 945808, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.945808>.
58. Crivianu-Gaita, V., and Thompson, M. (2016) Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements, *Biosens. Bioelectron.*, **85**, 32-45, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>.
59. De Marco, A. (2020) Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents, *Protein Expr. Purif.*, **172**, 105645, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105645>.
60. Zelenovic, N., Filipovic, L., and Popovic, M. (2023) Recent developments in bioprocessing of recombinant antibody fragments, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1191-1204, <https://doi.org/10.1134/S0006297923090018>.
61. Fink, M., Schimek, C., Cserjan-Puschmann, M., Reinisch, D., Brocard, C., Hahn, R., and Striedner, G. (2021) Integrated process development: the key to improve Fab production in *E. coli*, *Biotechnol. J.*, **16**, e2000562, <https://doi.org/10.1002/biot.202000562>.
62. Mei, Y., Chen, Y., Sivaccumar, J. P., An, Z., Xia, N., and Luo, W. (2022) Research progress and applications of nanobody in human infectious diseases, *Front. Pharmacol.*, **13**, 963978, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.963978>.
63. Yu, X., Yang, Y. P., Dikici, E., Deo, S. K., and Daunert, S. (2017) Beyond antibodies as binding partners: the role of antibody mimetics in bioanalysis, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.)*, **10**, 293-320, <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045205>.
64. Tang, J., Zhang, C., Castillo, N. C., Lalaurie, C. J., Gao, X., Dalby, P. A., and Kozielski, F. (2023) Crystal structures and molecular dynamics simulations of a humanised antibody fragment at acidic to basic pH, *Sci. Rep.*, **13**, 16281, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42698-7>.
65. Paloni, M., and Cavallotti, C. (2017) Molecular modeling of the interaction of protein L with antibodies, *ACS Omega*, **2**, 6464-6472, <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01123>.

66. Bai, G., Ge, Y., Su, Y., Chen, S., Zeng, X., Lu, H., and Ma, B. (2021) Computational construction of a single-chain bi-paratopic antibody allosterically inhibiting TCR-staphylococcal enterotoxin b binding, *Front. Immunol.*, **12**, 732938, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732938>.
67. Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins, *Science*, **242**, 423-426, <https://doi.org/10.1126/science.3140379>.
68. Cohen, T., Halfon, M., and Schneidman-Duhovny, D. (2022) NanoNet: rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning, *Front. Immunol.*, **13**, 958584, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.958584>.
69. Harmsen, M. M., and De Haard, H. J. (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 13-22, <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1142-2>.
70. David, T. I., Pestov, N. B., Korneenko, T. V., and Barlev, N. A. (2023) Non-immunoglobulin synthetic binding proteins for oncology, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1232-1247, <https://doi.org/10.1134/S0006297923090043>.
71. Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition, *J. Mol. Recognit.*, **13**, 167-187, [https://doi.org/10.1002/1099-1352\(200007/08\)13:4<167::AID-JMR502>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1099-1352(200007/08)13:4<167::AID-JMR502>3.0.CO;2-9).
72. Moody, P., Chudasama, V., Nathani, R. I., Maruani, A., Martin, S., Smith, M. E., and Caddick, S. (2014) A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARpins, *Chem. Commun. (Camb.)*, **50**, 4898-4900, <https://doi.org/10.1039/c4cc00053f>.
73. Liu, S., Wu, K., and Chen, C. (2022) Obtaining protein foldability information from computational models of AlphaFold2 and RoseTTAFold, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **20**, 4481-4489, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.034>.
74. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., Beattie, C., et al. (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature*, **630**, 493-500, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
75. Ingraham, J. B., Baranov, M., Costello, Z., Barber, K. W., Wang, W., Ismail, A., Frappier, V., Lord, D. M., Ng-Thow-Hing, C., Van Vlack, E. R., Tie, S., Xue, V., Cowles, S. C., Leung, A., Rodrigues, J. V., Morales-Perez, C. L., Ayoub, A. M., Green, R., Puentes, K., Oplinger, F., et al. (2023) Illuminating protein space with a programmable generative model, *Nature*, **623**, 1070-1078, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06728-8>.
76. Anishchenko, I., Pellock, S. J., Chidyausiku, T. M., Ramelot, T. A., Ovchinnikov, S., Hao, J., Bafna, K., Norn, C., Kang, A., Bera, A. K., DiMaio, F., Carter, L., Chow, C. M., Montelione, G. T., Baker, D., Anishchenko, I., Pellock, S. J., Chidyausiku, T. M., Ramelot, T. A., Ovchinnikov, S., et al. (2021) *De novo* protein design by deep network hallucination, *Nature*, **600**, 7889, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04184-w>.
77. Ponomarenko, J., Papangelopoulos, N., Zajonc, D. M., Peters, B., Sette, A., and Bourne, P. E. (2011) IEDB-3D: structural data within the immune epitope database, *Nucleic Acids Res.*, **39**, D1164-1170, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq888>.
78. Schlessinger, A., Ofran, Y., Yachdav, G., and Rost, B. (2006) Epitome: database of structure-inferred antigenic epitopes, *Nucleic Acids Res.*, **34**, D777-780, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj053>.
79. Saha, S., Bhasin, M., and Raghava, G. P. (2005) Bcipep: a database of B-cell epitopes, *BMC Genomics*, **6**, 79, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-79>.
80. Toseland, C. P., Clayton, D. J., McSparron, H., Hemsley, S. L., Blythe, M. J., Paine, K., Doytchinova, I. A., Guan, P., Hattotuwigama, C. K., and Flower, D. R. (2005) Antijen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data, *Immunome Res.*, **1**, 4, <https://doi.org/10.1186/1745-7580-1-4>.
81. Peters, B., Sidney, J., Bourne, P., Bui, H. H., Buus, S., Doh, G., Fleri, W., Kronenberg, M., Kubo, R., Lund, O., Nemazee, D., Ponomarenko, J. V., Sathiamurthy, M., Schoenberger, S., Stewart, S., Surko, P., Way, S., Wilson, S., and Sette, A. (2005) The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint, *PLoS Biol.*, **3**, e91, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030091>.
82. Fleishman, S. J., Corn, J. E., Strauch, E. M., Whitehead, T. A., Karanicolas, J., and Baker, D. (2011) Hotspot-centric *de novo* design of protein binders, *J. Mol. Biol.*, **413**, 1047-1062, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.001>.
83. Fleishman, S. J., Whitehead, T. A., Ekiert, D. C., Dreyfus, C., Corn, J. E., Strauch, E. M., Wilson, I. A., and Baker, D. (2011) Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin, *Science*, **332**, 816-821, <https://doi.org/10.1126/science.1202617>.
84. Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818-822, <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
85. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510, <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.

86. Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A., and Nudler, E. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria, *Cell*, **111**, 747-756, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01134-0).
87. Sullenger, B. A., Gallardo, H. F., Ungers, G. E., and Gilboa, E. (1991) Analysis of trans-acting response decoy RNA-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transactivation, *J. Virol.*, **65**, 6811-6816, <https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6811-6816.1991>.
88. Chen, A., and Yang, S. (2015) Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay, *Biosens. Bioelectron.*, **71**, 230-242, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.041>.
89. Zhou, J., and Rossi, J. (2017) Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 181-202, <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
90. Cho, E. J., Lee, J. W., and Ellington, A. D. (2009) Applications of aptamers as sensors, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.)*, **2**, 241-264, <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112851>.
91. Mahmoud, M., Deigner, H.-P., Mahmoud, M., and Deigner, H.-P. (2015/12/15) Aptamers in diagnostics: replacing or complementing antibodies? *J. Bioeng. Bioelectron.*, **5**, <https://doi.org/10.4172/2153-0777.1000e129>.
92. Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Jr., Guyer, D. R., and Adamis, A. P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 123-132, <https://doi.org/10.1038/nrd1955>.
93. Kruspe, S., Mittelberger, F., Szameit, K., and Hahn, U. (2014) Aptamers as drug delivery vehicles, *ChemMedChem*, **9**, 1998-2011, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402163>.
94. Olson, W. C., Heston, W. D., and Rajasekaran, A. K. (2007) Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen, *Rev. Recent Clin. Trials*, **2**, 182-190, <https://doi.org/10.2174/157488707781662724>.
95. Zhou, J., Swiderski, P., Li, H., Zhang, J., Neff, C. P., Akkina, R., and Rossi, J. J. (2009) Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3094-3109, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp185>.
96. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., and Ruml, T. (2015) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology, *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1141-1161, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>.
97. Luo, X., McKeague, M., Pitre, S., Dumontier, M., Green, J., Golshani, A., Derosa, M. C., and Dehne, F. (2010) Computational approaches toward the design of pools for the *in vitro* selection of complex aptamers, *RNA*, **16**, 2252-2262, <https://doi.org/10.1261/rna.2102210>.
98. Gevertz, J., Gan, H. H., and Schlick, T. (2005) In vitro RNA random pools are not structurally diverse: a computational analysis, *RNA*, **11**, 853-863, <https://doi.org/10.1261/rna.7271405>.
99. Lipi, F., Chen, S., Chakravarthy, M., Rakesh, S., and Veedu, R. N. (2016) *In vitro* evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies, *RNA Biol.*, **13**, 1232-1245, <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236173>.
100. Verma, V., Gupta, A., and Chaudhary, V. K. (2020) Emulsion PCR made easy, *BioTechniques*, **69**, 421-426, <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0161>.
101. Kohlberger, M., and Gadermaier, G. (2022) SELEX: critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **69**, 1771-1792, <https://doi.org/10.1002/bab.2244>.
102. Betz, K., Malyshev, D. A., Lavergne, T., Welte, W., Diederichs, K., Dwyer, T. J., Ordoukhanian, P., Romesberg, F. E., and Marx, A. (2012) KlenTaq polymerase replicates unnatural base pairs by inducing a Watson-Crick geometry, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 612-614, <https://doi.org/10.1038/nchembio.966>.
103. Boltz, A., Piater, B., Toleikis, L., Guenther, R., Kolmar, H., and Hock, B. (2011) Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21896-21905, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238261>.
104. Li, Y., and Breaker, R. R. (1999) Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5364-5372, <https://doi.org/10.1021/ja990592p>.
105. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2007) General procedures for avoiding contamination with RNase, *CSH Protoc.*, **2007**, pdb ip43, <https://doi.org/10.1101/pdb.ip43>.
106. Darfeuille, F. (2004) LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3101-3107, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh636>.
107. Odeh, F., Nsairat, H., Alshaer, W., Ismail, M. A., Esawi, E., Qaqish, B., Bawab, A. A., and Ismail, S. I. (2019) Aptamers chemistry: chemical modifications and conjugation strategies, *Molecules*, **25**, 3, <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>.
108. Chen, Z., Luo, H., Gubu, A., Yu, S., Zhang, H., Dai, H., Zhang, Y., Zhang, B., Ma, Y., Lu, A., and Zhang, G. (2023) Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins via enhanced non-covalent bonding, *Front. Cell Dev. Biol.*, **11**, 1091809, <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1091809>.

109. Li, X., Chung, L. W., and Li, G. (2016) Multiscale simulations on spectral tuning and the photoisomerization mechanism in fluorescent RNA spinach, *J. Chem. Theory Comput.*, **12**, 5453-5464, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00578>.
110. Sato, R., Suzuki, K., Yasuda, Y., Suenaga, A., and Fukui, K. (2022) RNAapt3D: RNA aptamer 3D-structural modeling database, *Biophys. J.*, **121**, 4770-4776, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.09.023>.
111. Ahmad, N. A., Mohamed Zulkifli, R., Hussin, H., and Nadri, M. H. (2021) *In silico* approach for Post-SELEX DNA aptamers: a mini-review, *J. Mol. Graph. Model.*, **105**, 107872, <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2021.107872>.
112. Buglak, A. A., Samokhvalov, A. V., Zherdev, A. V., and Dzantiev, B. B. (2020) Methods and Applications of In Silico Aptamer Design and Modeling, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, <https://doi.org/10.3390/ijms21228420>.
113. Kumar, P., and Kumar, A. (2020) Nucleobase sequence based building up of reliable QSAR models with the index of ideality correlation using Monte Carlo method, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **38**, 3296-3306, <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1656109>.
114. Torkamanian-Afshar, M., Nematzadeh, S., Tabarzad, M., Najafi, A., Lanjanian, H., and Masoudi-Nejad, A. (2021) *In silico* design of novel aptamers utilizing a hybrid method of machine learning and genetic algorithm, *Mol. Divers.*, **25**, 1395-1407, <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10192-9>.
115. Bashir, A., Yang, Q., Wang, J., Hoyer, S., Chou, W., McLean, C., Davis, G., Gong, Q., Armstrong, Z., Jang, J., Kang, H., Pawlosky, A., Scott, A., Dahl, G. E., Berndt, M., Dimon, M., and Ferguson, B. S. (2021) Machine learning guided aptamer refinement and discovery, *Nat. Commun.*, **12**, 2366, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22555-9>.
116. Matarrese, M. A. G., Loppini, A., Nicoletti, M., Filippi, S., and Chiodo, L. (2023) Assessment of tools for RNA secondary structure prediction and extraction: a final-user perspective, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **41**, 6917-6936, <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2116110>.
117. Sato, K., Akiyama, M., and Sakakibara, Y. (2021) RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration, *Nat. Commun.*, **12**, 941, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21194-4>.
118. Nasaev, S. S., Mukanov, A. R., Kuznetsov, I. I., and Veselovsky, A. V. (2023) AliNA – a deep learning program for RNA secondary structure prediction, *Mol. Inform.*, **42**, e202300113, <https://doi.org/10.1002/minf.202300113>.
119. Khoshbin, Z., and Housaindokht, M. R. (2021) Computer-aided aptamer design for sulfadimethoxine antibiotic: step by step mutation based on MD simulation approach, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, 3071-3079, <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1760133>.
120. Hsieh, P. C., Lin, H. T., Chen, W. Y., Tsai, J. J. P., and Hu, W. P. (2017) The combination of computational and biosensing technologies for selecting aptamer against prostate specific antigen, *Biomed. Res. Int.*, **2017**, 5041683, <https://doi.org/10.1155/2017/5041683>.
121. Shcherbinin, D. S., Gnedenko, O. V., Khmeleva, S. A., Usanov, S. A., Gilep, A. A., Yantsevich, A. V., Shkel, T. V., Yushkevich, I. V., Radko, S. P., Ivanov, A. S., Veselovsky, A. V., and Archakov, A. I. (2015) Computer-aided design of aptamers for cytochrome p450, *J. Struct. Biol.*, **191**, 112-119, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.003>.
122. Oliveira, R., Pinho, E., Sousa, A. L., Dias, O., Azevedo, N. F., and Almeida, C. (2022) Modelling aptamers with nucleic acid mimics (NAM): from sequence to three-dimensional docking, *PLoS One*, **17**, e0264701, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264701>.
123. Binet, T., Padiolleau-Lefevre, S., Octave, S., Avallé, B., and Maffucci, I. (2023) Comparative study of single-stranded oligonucleotides secondary structure prediction tools, *BMC Bioinformatics*, **24**, 422, <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05532-5>.
124. Zhao, Y., Huang, Y., Gong, Z., Wang, Y., Man, J., and Xiao, Y. (2012) Automated and fast building of three-dimensional RNA structures, *Sci. Rep.*, **2**, 734, <https://doi.org/10.1038/srep00734>.
125. Adler, A., Forster, N., Homann, M., and Goring, H. U. (2008) Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **11**, 16-23, <https://doi.org/10.2174/138620708783398331>.
126. Galindo-Murillo, R., Cohen, J. S., and Akabayov, B. (2021) Molecular dynamics simulations of acyclic analogs of nucleic acids for antisense inhibition, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **23**, 527-535, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.11.023>.
127. Sponer, J., Banas, P., Jurecka, P., Zgarbova, M., Kuhrova, P., Havrila, M., Krepl, M., Stadlbauer, P., and Otyepka, M. (2014) molecular dynamics simulations of nucleic acids. From tetranucleotides to the ribosome, *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 1771-1782, <https://doi.org/10.1021/jz500557y>.
128. Wulff, G., Sarhan, A., and Zabrocki, K. (1973) Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Lett.*, **14**, 4329-4332, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)87213-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)87213-0).
129. Haupt, K., Medina Rangel, P. X., and Bui, B. T. S. (2020) Molecularly imprinted polymers: antibody mimics for bioimaging and therapy, *Chem. Rev.*, **120**, 9554-9582, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00428>.
130. Шумянцева В. В., Булко Т. В., Байчоров И. Х., Арчаков А. И. (2015) Полимерные антитела (МИП) в электроанализе белков, *Биомедицинская химия*, **61**, 325-331, <https://doi.org/10.18097/PBMC20156103325>.

131. Peeters, M., Eersels, K., Junkers, T., and Wagner, P. (2016) *Molecularly Imprinted Polymers: Synthetic Receptors for Diagnostic Medical Devices*, Elsevier, Amsterdam
132. Bossi, A., Bonini, F., Turner, A. P., and Piletsky, S. A. (2007) Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1131-1137, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.023>.
133. Scorrano, S., Mergola, L., Del Sole, R., and Vasapollo, G. (2011) Synthesis of molecularly imprinted polymers for amino acid derivatives by using different functional monomers, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 1735-1743, <https://doi.org/10.3390/ijms12031735>.
134. Piletsky, S. A., Turner, N. W., and Laitenberger, P. (2006) Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics – future potential and existing problems, *Med. Eng. Phys.*, **28**, 971-977, <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2006.05.004>.
135. Puoci, F., Iemma, F., and Picci, N. (2008) Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: a review, *Curr. Drug Deliv.*, **5**, 85-96, <https://doi.org/10.2174/156720108783954888>.
136. Emi Shagiza, A., Mohd Noor, A., Islam, A. K. M. S., Dahyar, A., and Iqmal, T. (2011) Porogen effect towards the quality of curcumin imprinted polymer, *Indones. J. Chem.*, **11**, 207-211, <https://doi.org/10.22146/ijc.21381>.
137. Ramstrom, O., and Mosbach, K. (1999) Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 759-764, [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00037-x](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00037-x).
138. Parisi, O. I., Francomano, F., Dattilo, M., Patitucci, F., Prete, S., Amone, F., and Puoci, F. (2022) The evolution of molecular recognition: from antibodies to molecularly imprinted polymers (MIPs) as artificial counterpart, *J. Funct. Biomater.*, **13**, 12, <https://doi.org/10.3390/jfb13010012>.
139. Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., and Mele, G. (2011) Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 5908-5945, <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>.
140. Dirion, B., Cobb, Z., Schillinger, E., Andersson, L. I., and Sellergren, B. (2003) Water-compatible molecularly imprinted polymers obtained via high-throughput synthesis and experimental design, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15101-15109, <https://doi.org/10.1021/ja0355473>.
141. Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., and Shea, K. J. (2008) Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 15242-15243, <https://doi.org/10.1021/ja8062875>.
142. Lee, M.-H., Thomas, J. L., Liao, C.-L., Jurcevic, S., Crnogorac-Jurcevic, T., and Lin, H.-Y. (2017) Polymers imprinted with three REG1B peptides for electrochemical determination of Regenerating Protein 1B, a urinary biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma, *Microchim. Acta*, **184**, 1773-1780, <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2169-4>.
143. Urraca, J. L., Hall, A. J., Moreno-Bondi, M. C., and Sellergren, B. (2006) A stoichiometric molecularly imprinted polymer for the class-selective recognition of antibiotics in aqueous media, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45**, 5158-5161, <https://doi.org/10.1002/anie.200601636>.
144. Xu, R., Tian, J., Guan, Y., and Zhang, Y. (2019) Peptide-cross-linked protein-imprinted polymers: easy template removal and excellent imprinting effect, *CCS Chem.*, **1**, 544-552, <https://doi.org/10.31635/ccschem.019.20190030>.
145. Ansari, S., and Masoum, S. (2019) Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: current progress and future implications, *Trends Anal. Chem.*, **114**, 29-47, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.008>.
146. Rajpal, S., Mishra, P., and Mizaikoff, B. (2023) Rational *in silico* design of molecularly imprinted polymers: current challenges and future potential, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 6785, <https://doi.org/10.3390/ijms24076785>.
147. Nicholls, I. A., Golker, K., Olsson, G. D., Suriyanarayanan, S., and Wiklander, J. G. (2021) The use of computational methods for the development of molecularly imprinted polymers, *Polymers (Basel)*, **13**, 2841, <https://doi.org/10.3390/polym13172841>.
148. Liu, Z., Xu, Z., Wang, D., Yang, Y., Duan, Y., Ma, L., Lin, T., and Liu, H. (2021) A review on molecularly imprinted polymers preparation by computational simulation-aided methods, *Polymers (Basel)*, **13**, 2657, <https://doi.org/10.3390/polym13162657>.
149. Olsson, G. D., Wiklander, J. G., and Nicholls, I. A. (2021) Using molecular dynamics in the study of molecularly imprinted polymers, *Methods Mol. Biol.*, **2359**, 241-268, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1629-1_21.
150. Douykhunlaw, C., and Sutthibutpong, T. (2022) A molecular dynamics study on the diffusion and imprint ability of spectinomycin under different sizes of aniline oligomers, *J. Mol. Model.*, **28**, 387, <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05371-w>.
151. Suryana, S., Mutakin, M., Rosandi, Y., and Hasanah, A. N. (2022) Molecular dynamic study of mechanism underlying nature of molecular recognition and the role of crosslinker in the synthesis of salmeterol-targeting molecularly imprinted polymer for analysis of salmeterol xinafoate in biological fluid, *Molecules*, **27**, 3619, <https://doi.org/10.3390/molecules27113619>.
152. Rebelo, P., Pacheco, J. G., Voroshylova, I. V., Seguro, I., Cordeiro, M., and Delerue-Matos, C. (2022) Computational modelling and sustainable synthesis of a highly selective electrochemical MIP-based sensor for citalopram detection, *Molecules*, **27**, 3315, <https://doi.org/10.3390/molecules27103315>.

153. Daniels, E., Mustafa, Y. L., Herdes, C., and Leese, H. S. (2021) Optimization of cortisol-selective molecularly imprinted polymers enabled by molecular dynamics simulations, *ACS Appl. Bio Mater.*, **4**, 7243-7253, <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00774>.
154. Garcia, Y., Usuga, B. A., Campos, C. H., Alderete, J. B., and Jimenez, V. A. (2021) NanoMIPs design for fucose and mannose recognition: a molecular dynamics approach, *J. Chem. Inf. Model.*, **61**, 2048-2061, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01446>.
155. Chianella, I., Lotierzo, M., Piletsky, S. A., Tothill, I. E., Chen, B., Karim, K., and Turner, A. P. (2002) Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach, *Anal. Chem.*, **74**, 1288-1293, <https://doi.org/10.1021/ac010840b>.
156. Karlsson, B. C., O'Mahony, J., Karlsson, J. G., Bengtsson, H., Eriksson, L. A., and Nicholls, I. A. (2009) Structure and dynamics of monomer-template complexation: an explanation for molecularly imprinted polymer recognition site heterogeneity, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13297-13304, <https://doi.org/10.1021/ja902087t>.
157. Nicholls, I. A., Andersson, H. S., Charlton, C., Henschel, H., Karlsson, B. C., Karlsson, J. G., O'Mahony, J., Rosengren, A. M., Rosengren, K. J., and Wikman, S. (2009) Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 543-552, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.03.038>.
158. Kryscio, D. R., Shi, Y., Ren, P., and Peppas, N. A. (2011) Molecular docking simulations for macromolecularly imprinted polymers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **50**, 13877-13884, <https://doi.org/10.1021/ie201858n>.
159. Sullivan, M. V., Dennison, S. R., Archontis, G., Reddy, S. M., and Hayes, J. M. (2019) Toward rational design of selective molecularly imprinted polymers (MIPs) for proteins: computational and experimental studies of acrylamide based polymers for myoglobin, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 5432-5443, <https://doi.org/10.1021/acs.jpbc.9b03091>.
160. Boroznjak, R., Reut, J., Tretjakov, A., Lomaka, A., Opik, A., and Syritski, V. (2017) A computational approach to study functional monomer-protein molecular interactions to optimize protein molecular imprinting, *J. Mol. Recognit.*, **30**, <https://doi.org/10.1002/jmr.2635>.
161. Hsu, C. Y., Lin, H. Y., Thomas, J. L., Wu, B. T., and Chou, T. C. (2006) Incorporation of styrene enhances recognition of ribonuclease A by molecularly imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 355-363, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.05.008>.
162. Mazouz, Z., Mokni, M., Fourati, N., Zerrouki, C., Barbault, F., Seydou, M., Kalfat, R., Yaakoubi, N., Omezzine, A., Bouslema, A., and Othmane, A. (2020) Computational approach and electrochemical measurements for protein detection with MIP-based sensor, *Biosens. Bioelectron.*, **151**, 111978, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111978>.
163. Dhinesh Kumar, M., Karthikeyan, M., Kaniraja, G., Muthukumar, K., Muneeswaran, G., and Karunakaran, C. (2024) Computational modelling and optimization studies of electropentamer for molecular imprinting of DJ-1, *J. Mol. Graph. Model.*, **128**, 108715, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2024.108715>.
164. Cubuk, H., Ozbil, M., and Cakir Hatir, P. (2021) Computational analysis of functional monomers used in molecular imprinting for promising COVID-19 detection, *Comput. Theor. Chem.*, **1199**, 113215, <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2021.113215>.
165. Rajpal, S., and Mizaikoff, B. (2022) An *in silico* predictive method to select multi-monomer combinations for peptide imprinting, *J. Mater. Chem. B*, **10**, 6618-6626, <https://doi.org/10.1039/d2tb00418f>.
166. Lowdon, J. W., Ishikura, H., Kvernenes, M. K., Caldara, M., Cleij, T. J., van Grinsven, B., Eersels, K., and Diliën, H. (2021) Identifying potential machine learning algorithms for the simulation of binding affinities to molecularly imprinted polymers, *Computation*, **9**, 103, <https://doi.org/10.3390/computation9100103>.

CURRENT METHODS OF MOLECULAR MODELING IN THE DEVELOPMENT OF AFFINE AND SPECIFIC AGENTS BINDING PROTEINS

Review

Sh. S. Nasaev¹, A. R. Mukanov¹, I. V. Mishkorez^{1,2}, I. I. Kuznetsov¹, I. V. Leibin³,
V. A. Dolgusheva¹, G. A. Pavlyuk¹, A. L. Manasyan¹, and A. V. Veselovsky^{2*}

¹ R&D Department, Xelari Ltd., 121601 Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; e-mail: veselov@ibmh.msk.su

³ Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia

High-affinity and specific agents are widely applied in various areas, including diagnostics, scientific research, and disease therapy (as drugs and drug delivery systems). It takes significant time to develop them. For this reason, development of high-affinity agents extensively utilizes computer methods at various stages for the analysis and modeling of these molecules. The review describes the main affinity and specific agents, such as monoclonal antibodies and their fragments, antibody mimetics, aptamers, and molecularly imprinted polymers. The methods of their obtaining as well as their main advantages and disadvantages are briefly described, with special attention focused on the molecular modeling methods used for their analysis and development.

Keywords: antibody, antibody mimetics, aptamers, molecularly imprinted polymers, molecular modeling

РНК-РЕДАКТИРОВАНИЕ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ ADAR В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНЕЙ ЭКСПАНСИИ CAG-ПОВТОРОВ: ЗНАЧИМЫЙ ЭФФЕКТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНОИДЫ МОЗГА ПРИ ОТСУТСТВИИ СУЩЕСТВЕННОГО ВЛИЯНИЯ ЧИСЛА ПОВТОРОВ НА УРОВЕНЬ РЕДАКТИРОВАНИЯ

© 2024 В.В. Кудрявский^{1,2*}, А.О. Гончаров^{1,2}, А.В. Еремеев², Е.С. Ручко²,
В.А. Веселовский², К.М. Климина², А.Н. Богомазова², М.А. Лагарькова²,
С.А. Мошковский^{1,2*}, А.А. Ключникова^{1,2,3}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия;
электронная почта: wkudriavskii@gmail.com; moshrrfi@gmail.com

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия

³ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.04.2024

После доработки 24.06.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Экспансия CAG-повторов в некоторых генах представляет собой установленную причину нескольких нейродегенеративных заболеваний, механизм патогенеза которых при этом остается неясным. Предполагается, что двухцепочечные регионы РНК, формируемые CAG-повторами, имеют токсические для клетки свойства. В работе проверяется гипотеза, согласно которой такие регионы РНК гипотетически могут отвлекать на себя ферменты редактирования РНК ADAR, тем самым снижая А→I редактирование РНК в клетке, что приводит к активации интерферонового ответа. Исследовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные из фибробластов пациентов, страдающих болезнью Гентингтона или атаксией типа 17, и дифференцированные из них органоиды среднего мозга. Для оценки редактирования в выбранных участках РНК разработали таргетную панель для секвенирования нового поколения. Дифференцировка ИПСК в органоиды мозга сопровождалась повышением экспрессии гена, кодирующего ADAR2, при снижении экспрессии белков-ингибиторов редактирования РНК. Как следствие, отмечали рост редактирования соответствующих субстратов ADAR2, тем самым имея возможность идентифицировать дифференциальные субстраты изоформ ADAR. При этом на уровне ИПСК сравнение групп патологии и контроля не выявило различий по уровню редактирования. В органоидах мозга, содержащих 42–46 CAG-повторов, также не наблюдали глобальных изменений. Однако органоиды мозга в образце, характеризуемом наибольшим количеством CAG-повторов в гене гентингтина (76), выделялись резким снижением уровня редактирования РНК отдельных транскриптов, в редактировании которых, предположительно, участвует ADAR1. В частности, в этом образце практически отсутствовало редактирование длинной некодирующей РНК PWAR5. В итоге показано, что в большинстве культур с экспансией повторов гипотеза о ее влиянии на редактирование РНК не подтвердилась.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: редактирование РНК, РНК-зависимая аденозиндезаминаза, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, болезнь Гентингтона, атаксия типа 17, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органоиды среднего мозга.

DOI: 10.31857/S0320972524080063 EDN: KDYCQE

Принятые сокращения: днРНК – длинная некодирующая РНК; дцРНК – двухцепочечный участок РНК; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ADAR – РНК-зависимая аденозиндезаминаза; HD – болезнь Гентингтона; PKR – протеинкиназа R; PWAR – РНК регион, ассоциированный с синдромом Прадера-Вилли и Ангельмана; SCA17 – спиноцеребеллярная атаксия типа 17.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Тринуклеотидные повторы располагаются в генах с различными функциями, которые экспрессируются в различных тканях, однако патологические состояния, связанные с экспансией повторов, в первую очередь влияют на определенные популяции нейронов. Например, атакия типа 17 (SCA17) вызвана повторами CAG в ТАТА-связывающем белке (ген *TBP*), который при этом является широко распространенным фактором транскрипции, экспрессируемым во всех клетках. Гентингтин (*HTT*) – еще один пример гена, содержащего CAG-повторы, также экспрессируется повсеместно и обладает плеiotропной функцией [1]. Несмотря на то что повторы CAG возникают в разных генах, фенотипы заболеваний, которые они вызывают, обладают некоторым сходством. Из этого предполагают общий механизм, лежащий в основе нейродегенерации, вызванной экспансией тринуклеотидных повторов. Однако на сегодняшний день этот механизм остается предметом дискуссий. Обсуждается как вклад мутантного белка, так и мутантной РНК в процессы нейродегенерации [2]. Также неясно, почему для проявления заболевания необходимо различное количество повторов. Например, 36–40 повторов CAG в гене *HTT* приводят к неполной пенетрантности болезни Гентингтона (HD) [3], в то время как 41–48 повторов в гене *TBP* вызывают атакию типа 17 со сниженной пенетрантностью. Стоит отметить, что пониженная пенетрантность SCA17 в случаях с количеством повторов менее 48 ассоциирована с наличием конкретного варианта в гене *STUB1* для полного проявления [4].

Ранние исследования болезней экспансии CAG-повторов были сосредоточены на изучении вклада полиглутаминового тракта, кодируемого триплетами CAG, в патогенез заболевания [5]. Предполагалось, что полиглутаминовый тракт запускает агрегацию белка и последующую гибель клеток [6]. Однако существуют доказательства того, что РНК, содержащая CAG-повторы, нейротоксична, то есть патологический процесс индуцирует непосредственно РНК. Это доказывается теми случаями, когда повторы CAG, даже находясь в нетранслируемых регионах, все равно приводят к заболеваниям, как в случае атаксии типа 12 (SCA12) [7]. Также примечательно, что прерывание CAG-тракта триплетом CAA, также кодирующим глутамин, задерживает манифестацию заболевания [8]. Следовательно, CAG-тракт в РНК должен играть первостепенную роль в патогенезе заболеваний, связанных с экспансией повторов, хотя полиглутаминовые тракты, несомненно, влияют на протекание патогенеза.

В результате провели исследования токсичности РНК, содержащей повторы CAG. Например, доказательства патогенности таких РНК уже наблюдали у плодовых мушек [9], *Caenorhabditis elegans* [10], а также у мышей [11].

Редактирование РНК – это естественный процесс ферментативной модификации транскриптов. Этот процесс может привести к перекодированию белка – несинонимичной замене аминокислот в результате редактирования экзон [12], к сдвигу рамки считывания за счет появления нового старт-кодона [13], к изменению длины белок-кодирующей области мРНК при образовании новых или модификации старых стоп-кодонов [14] и к альтернативному сплайсингу в случае дезаминирования аденозина [15]. У человека известны только два типа редактирования РНК: дезаминирование цитозина и аденозина. Последний является преобладающим и приводит к замене аденозина на инозин (A→I). Этот процесс катализируется аденозиндеаминазами, действующими на РНК (ADAR), и происходит только в двухцепочечных участках РНК (дцРНК) [16, 17]. В результате такого дезаминирования происходит дестабилизация и расплетение РНК-дуплекса, поскольку пара тимидина с инозином менее стабильная, чем с аденозином. Стоит отметить, что редактирование РНК – это конститутивный процесс посттранскрипционной модификации, происходящий в большинстве клеток человека и предотвращающий чрезмерное производство интерферона типа I в ответ на присутствие избыточного эндогенного количества дцРНК, которое имитирует соответствующие вирусные геномы, тем самым запуская противовирусный иммунный ответ [18]. Таким образом, активность ADAR1 предотвращает спонтанную активацию сенсоров дцРНК в ответ на эндогенную дцРНК [19, 20]. A→I редактирование РНК в конкретном остатке обычно не имеет стопроцентного выхода реакции, поэтому существует доля отредактированных аденозинов, то есть уровень редактирования. Корректное редактирование РНК необходимо для обеспечения нормальной жизнедеятельности и правильного функционирования нейронов [21]. Так, соотношение перекодированных и исходных протеоформ может влиять на дифференцировку клеток и развитие нервной системы [22, 23]. Из этого следует, что изменения профиля редактирования РНК могут быть вовлечены в различные заболевания нервной системы. Например, геномные мутации ADAR у человека вызывают синдром Айкарди-Гутьереса – воспалительное заболевание, поражающее мозг и кожу [24]. Кроме того, мутации в домене Zα ADAR вызывают двусторонний некроз полосатого тела [25]. Помимо этого, инозин распознается как гуанозин при трансля-

ции матричной РНК. Изоформа ADAR2 (*ADARB1*), как показано, вызывает большую часть таких, кодирующих аминокислотные замены, событий редактирования. Более 10% замен А→І в РНК приводят к перекодированию белка [26, 27]. Сформулированы гипотезы, что изменения в редактировании, опосредованном ADAR2, способствовали развитию неврологических заболеваний, таких как эпилепсия [28], аффективное расстройство и шизофрения [29]. Кроме того, в гиппокампе пациентов с эпилепсией [30] наблюдались изменения профиля ADAR2-опосредованного редактирования РНК.

Молекулярные механизмы, вовлеченные в патогенез болезней экспансии CAG-повторов, пересекаются с механизмами, в которых участвует редактирование РНК. Например, сенсор дцРНК PKR активируется в клетках, пораженных патологическим количеством повторов, причем уровень активации PKR коррелирует с количеством повторов [31]. ADAR1, как было упомянуто выше, вовлечен в модуляцию этого пути иммунного ответа. Кроме того, шпильковые структуры, состоящие из повторов CXG, могут использоваться в качестве субстрата для рибонуклеазы Dicer, что приводит к инактивации РНК посредством РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC) [32]. Мономер ADAR1, в свою очередь, образует комплекс с Dicer, чтобы направить его к дцРНК и тем самым усилить выключение генов [33]. Более того, достаточно длинные повторы CXG образуют шпильку двухцепочечной РНК, а также Z-структуры в ДНК [34]. Таким образом, РНК-связывающие белки (RBP) могут участвовать в патогенезе болезней экспансии повторов путем секвестрации на дцРНК, образуемой повторами [35]. Ферменты ADAR, в свою очередь, имеют домен связывания дцРНК (RBD), а ADAR1 p150 имеет также домен связывания Z-ДНК, так что эти ферменты потенциально могут связываться со шпильками, состоящими из повторов CXG. Например, повторы GGGGCC ассоциированы с патогенезом бокового амиотрофического склероза (БАС). Недавно было продемонстрировано, что РНК, содержащая повторы GGGGCC, может секвестрировать ADAR3 (ген *ADARB2*). При этом нокаун гена *ADARB2* значительно снижал количество нейронов с ядерными включениями РНК, образующимися при дифференцировке нейронов из плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с БАС [36]. Кроме того, в этой же работе исследователи отметили чувствительность нейронов, экспрессирующих патологическое количество повторов GGGGCC, к глутамат-опосредованной эксайтотоксичности. Это согласуется с предыдущими исследованиями относительно эксайтотоксических эффектов, возникающих в результате недостаточного редакти-

рования РНК субъединицы глутаматного рецептора GluR2 (*GRIA2*) [37, 38]. В другом исследовании продемонстрировали изменения редактирования РНК, вызванные aberrантной локализацией ADAR2 в цитоплазме клеток, экспрессирующих патологическое количество GGGGCC-повторов [39]. Помимо этого, триплеты CAG представляют собой один из самых предпочтительных субстратов ферментов ADAR [40]. Шпильки РНК длиной 15 спаренных нуклеотидов достаточно для ADAR-опосредованного редактирования, а длина этой шпильки коррелирует с уровнем редактирования [41]. Таким образом, дополнительные остатки аденозина в двухцепочечных участках РНК, образованных вследствие экспансии повторов, могут служить дополнительным субстратом для конститутивной формы ADAR1 (ADAR1 p110) в ядре, а также для интерферон-индуцируемой изоформы ADAR1 p150 и ADAR2 в цитоплазме. Интересно, что аномальное функционирование ADAR в контексте обратной транскрипции уже было предложено в качестве механизма, участвующего в патогенезе экспансии повторов в нейронах [42].

Принимая во внимание все вышесказанное, можно предположить, что нарушение редактирования РНК может быть вовлечено в патогенез заболеваний, связанных с экспансией CAG-повторов. В этом исследовании мы провели таргетный анализ дифференциального А→І редактирования в выбранных участках различных РНК с использованием клеточных моделей болезней экспансии CAG-повторов на примере индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов, страдающих болезнью Гентингтона или атаксией типа 17, и органоидов среднего мозга, дифференцированных из ИПСК. Целью этого анализа было сравнение уровня редактирования в патологических и нормальных клеточных моделях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Перечень использованных линий ИПСК и соответствующих заболеваний с указанием количества CAG-повторов представлен в табл. П1 в Приложении.

В работе по получению нейрональных предшественников и органоидов среднего мозга использовались линии ИПСК, полученные репрограммированием фибробластов кожи пациентов со спиноцеребеллярной атаксией типа 17 (линии SCA17.9L и SCA17S5S, SCA17.4sev и SCA17.8sev) и с болезнью Гентингтона (линии HD76.1S, HD42.1.2, HD46.5S). Данные клеточные линии были охарактеризованы согласно протоколам,

изложенным ранее [43]. В качестве контроля использовали линии ИПСК, RG4S, FF1S и Huv4S5, полученные репрограммированием из фибробластов здоровых доноров без избыточного числа CAG-повторов [44].

Дифференцировку ИПСК в органоиды среднего мозга проводили с использованием метода, описанного Ereemeev et al. [45].

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного окрашивания органоиды промывали 1× фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде в PBS, затем заливали жидкостью для заморозки ткани («Leica», Германия), замораживали в парах жидкого азота в течение 5 мин, после чего делали срезы толщиной 5–10 мкм на криотоме Thermo («Thermo Fisher Scientific», США). Срезы фиксировали на предметном стекле охлажденным до –20 °C ацетоном в течение 5 мин, промывали дважды по 5 мин PBS. Инкубировали в блокирующем буфере с первичными антителами на нейрональные маркеры MAP2 («ELK Biotechnology», США) и GFAP («Dako», Дания) в течение ночи во влажной камере при 4 °C. Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS с 0,1% (v/v) Tween 20, содержащем 5% эмбриональной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) и 2% сыворотки козы, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% (v/v) Tween 20. Вторичные антитела («Invitrogen», США), конъюгированные с флуоресцентными метками (Alexa 488, Alexa 555), наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% (v/v) Tween 20. Затем препараты инкубировали в течение 10 мин с 4',6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI) в концентрации 0,1 мкг/мл в PBS для визуализации ядер; отмывали 2 раза PBS. Полученные препараты исследовали под флуоресцентным микроскопом Olympus IX53 («Olympus», Япония).

Сайты редактирования РНК для таргетной оценки. Основываясь на работах по протеогеномному поиску перекодируемых пептидов [46, 47], мы выбрали общие для человека и мыши сайты редактирования РНК, которые наблюдались как в транскриптомных, так и в протеомных наборах данных. Кроме того, мы добавили в наш список заслуживающие внимания сайты РНК, подвергающиеся редактированию в клеточных линиях глиобластомы [48]. К ним относятся сайты редактирования генов *HTR2C*, *PWAR5*, *BLCAP* и *ZNF669*. Все выбранные сайты представлены в табл. П2А в Приложении.

Дизайн праймеров. Праймеры для секвенирования РНК были разработаны, используя следующие параметры: длина праймера – 15–25 нуклеотидов; GC-состав – 40–75%; температура плавления – 58–65 °C. Размер ампликона должен быть в диапазоне 260–450 п.н., а сайт редактирования должен быть расположен в диапазоне 70–115 п.н. от конца ампликона. Праймеры для количественной ПЦР (кПЦР) были разработаны, используя следующие параметры: длина ампликона – 50–200 п.н.; длина праймеров – 15–20 нуклеотидов; температура плавления – 62 °C. Все праймеры были разработаны с использованием Primer-BLAST [49] и последовательности комплементарной ДНК (кДНК) из базы данных эталонных последовательностей NCBI [50]. Каждую сконструированную пару праймеров тестировали на неспецифическую амплификацию с использованием Primer-BLAST. Было подтверждено, что каждая пара соответствует одному ампликону ПЦР с известной ожидаемой длиной в запланированных условиях постановки ПЦР. Отсутствие образования шпилечных структур и димеров у подобранных праймеров проверяли с помощью OligoAnalyzer [51]. Пары праймеров для таргетного секвенирования РНК и кПЦР представлены в табл. П2А и П3А соответственно в Приложении. Синтез праймеров проведен компанией «Евроген» (Россия).

Пробоподготовка РНК. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy plus mini kit («QIAGEN», Германия), согласно протоколу производителя. Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле. Концентрацию тотальной РНК определяли на флуориметре Qubit 4 («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора Qubit RNA BR Assay Kit («Thermo Fisher Scientific»). Выделенную РНК в количестве 5–10 мкг очищали от примесей геномной ДНК с помощью набора TURBO DNA-free Kit («Thermo Fisher Scientific»), после чего снова измеряли концентрацию. кДНК синтезировали из 1 мкг очищенной РНК с использованием набора MINT Universal kit («Евроген»). Обратная транскрипция осуществлялась по протоколу производителя с использованием термоциклера MiniAmp Plus («Thermo Fisher Scientific»). Полученную кДНК разводили в 10 раз и использовали для определения уровня редактирования РНК и кПЦР.

Количественная ПЦР. Экспрессию генов определяли методом кПЦР на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США) в 96-луночных планшетах («Bio-Rad»). Реакции ставили с использованием коммерческого набора для ПЦР в реальном времени qPCRMix-HS SYBR («Евроген») в соответствии с протоколом производителя, финальный объем реакции составлял 25 мкл.

ПЦР проводили в трех технических повторах при следующих условиях: 95 °C – 3 мин; 94 °C – 15 с, 61 °C – 10 с, 72 °C – 15 с, 39 циклов. Проводили нормализацию средним геометрическим по двум генам (*TBP* и *ACTB*), поскольку такой метод был показан как более стабильный при оценке изменений экспрессии при дифференцировке нейронов, чем использование одного гена.

Таргетная амплификация РНК. Амплификацию регионов, содержащих сайты редактирования, проводили на ПЦР-системе ProFlex 3 × 32-well («Thermo Fisher Scientific») с использованием ПЦР-набора Tersus Plus («Евроген»). Реакционную смесь готовили в соответствии с протоколом производителя до финального объема 15 мкл. Для каждого фрагмента эмпирически подбирались оптимальные условия ПЦР, позволяющие повысить выход целевых ПЦР-фрагментов и избежать образования неспецифического продукта в реакциях. Все реакции амплифицировали в следующих условиях, если не указано иное: 95 °C – 2 мин; 95 °C – 30 с, X °C – 30 с, 72 °C – 30 с, 39 циклов, где X – температура отжига, специфичная для каждой отдельной пары праймеров. Условия для каждой пары праймеров представлены в табл. П2А в Приложении. Полученные ампликоны разделяли, визуализировали и анализировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. Состав геля: агароза – 2%, 1× Tris-ацетатный (ТАЕ) буфер («Литех», Россия), ДНК-маркер 1кб («Евроген»), бромистый этидий 10 мг/мл («Геликон», Россия). Образцы загружали в лунки геля с помощью загрузочного буфера 4× Gel Loading Dye, Blue («Евроген»). Электрофорез проводили в 1× ТАЕ-буфере при напряжении 180 В в течение часа с использованием источника питания «Эльф-8» («ДНК-технология», Россия). Когда амплификация приводила к появлению неспецифических продуктов, требовалась гель-экстракция (табл. П2А в Приложении). Множественные ампликоны разделяли в 1,5%-ном агарозном геле, вырезали и очищали с помощью коммерческого набора Cleanup S-Cap («Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Целевые продукты ПЦР вырезали с помощью скальпеля и пинцета. Для элюирования образцов из колонки использовали 20 мкл элюирующего раствора с целью получения растворов с высокой концентрацией ампликонов.

Подготовка библиотек. Ампликоны для каждого образца смешивали в эквимольной концентрации, а затем присваивали уникальный индекс для идентификации. Для этого концентрацию каждого ампликата измеряли на флуориметре Qubit Flex («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора Qubit™ dsDNA BR Assay Kit («Thermo Fisher Scientific»). Смеси ампликонов очищали с использованием набора Agencourt AMPure XP

(«Beckman Coulter Inc.», США) по стандартному протоколу. Очищенную кДНК использовали для создания библиотек с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext® Ultra II for Illumina («Illumina», США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК в библиотеках определяли с помощью флуориметра Qubit 2.0 («Invitrogen») с использованием набора Quant-iT dsDNA HS Assay Kit («Invitrogen»), согласно рекомендациям производителя. Качество приготовленных библиотек оценивали с помощью микрофлюидного анализатора BioAnalyzer 2100 («Agilent», США) с использованием набора Agilent DNA High Sensitivity Kit («Agilent»), согласно инструкции производителя.

Секвенирование РНК. Библиотеки смешивали в эквимольных соотношениях для приготовления 4 нМ раствора библиотеки. Для секвенирования полученной библиотеки, разбавленной до 10 пМ, использовали набор MiSeq Nano Reagent Kit v2 (500 циклов) («Illumina») в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование проводили на платформе MiSeq («Illumina») с использованием набора парных прочтений 2 × 250 п.н. с добавлением 20% PhiX в качестве контроля.

Анализ дифференциального редактирования РНК. Качество необработанных данных секвенирования оценивалось с помощью fastQC (версия 0.11.8) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) с последующим препроцессингом с помощью fastp (версия 0.22.0) [52]. Затем чтения были выровнены на референсный геном человека GRCh38.p14 с помощью STAR (версия 2.7.10b) [53], используя параметры по умолчанию, и отфильтрованы с помощью samtools [54]. Далее, используя сгенерированные bam-файлы, детектировали сайты редактирования РНК, используя REDIttools [55]. Выходные данные REDIttools были отфильтрованы следующим образом: эталонный аллель – А (Т); альтернативный аллель – G (С); сайт представлен в базе данных REDItportal [56]; генерируемое REDIttools *p*-value ниже 0,05; уровень редактирования сайта – более 0,01%. Кроме того, каждый сайт редактирования РНК должен быть представлен в не менее чем двух образцах каждой группы (HD, SCA17, контроль), иначе он исключался из анализа. Анализ дифференциального редактирования между ИПСК и органоидами мозга проводили с использованием парного критерия Уилкоксона. Для сравнения редактирования РНК между патологиями и контролем использовали REDIT LLR – основанный на бета-биномиальных моделях инструмент для анализа дифференциального редактирования РНК [57]. Последующий анализ проводился с использованием языка программирования R 4.2.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Таргетная панель для анализа выбранных участков А→І редактирования РНК. ИПСК получали из фибробластов, взятых от 3-х здоровых доноров, 3-х пациентов с болезнью Гентингтона (HD) с различной длиной CAG-повторов (42, 46 и 76) в гене *HTT* и 2-х пациентов со спиноцереbellарной атаксией типа 17 (SCA17), содержащих 45 повторов CAG в гене *TBP*. Среди последних один пробанд (женщина) содержал 45 CAG-повторов в гене *TBP*, однако не имел клинических симптомов заболевания. Затем полученные ИПСК дифференцировали в органоиды среднего мозга, согласно методике, описанной Ereminov et al. [45]. Полученные органоиды характеризовали, используя фазово-контрастную микроскопию и иммунофлуоресцентное окрашивание на нейрональные маркеры MAP2 и GFAP. Все органоиды экспрессировали исследуемые маркеры (рис. 1).

Для проведения таргетного анализа редактирования РНК выбрали сайты редактирования РНК, которые были идентифицированы нами ранее как в транскрипте, так и в протеоме человека и мыши [46, 47], а также в клеточных линиях глиобластомы [48]. Кодрующие аминокислотные замены сайты, обнаруженные при анализе протеома, располагались внутри мРНК следующих генов: *CADPS*, *COPA*, *CYFIP2*, *FLNA*,

FLAB, *GRIA2*, *GRIA3*, *GRIA4* и *IGFBP7*. Дополнительно в исследование включали сайты редактирования РНК генов *HTR2C*, *BLCAP*, *EEF1AKMT2*, *FLNB*, *CCNI*, *SRP9*, *TROAP*, *ZNF669*, а также длинной некодирующей РНК (днРНК) *PWAR5* (все отобранные сайты представлены в табл. П2А в Приложении).

Таким образом, мы провели таргетное секвенирование РНК 23 ампликонов, полученных из ИПСК и органоидов среднего мозга, чтобы получить данные с высоким покрытием для каждого выбранного сайта редактирования РНК. При секвенировании всего транскриптома дифференциальная экспрессия транскриптов приводит к неравномерному покрытию сайтов редактирования, что влияет на обнаружение и статистический анализ событий редактирования [58]. При этом профили редактирования не зависят от количества циклов амплификации в диапазоне от 19 до 34 циклов [59]. Другими словами, таргетное секвенирование РНК увеличивает покрытие участка считываниями и повышает достоверность анализа уровня редактирования РНК.

В итоге покрытие РНК интересующих нас участков составляло до 16 000 прочтений, а в среднем – 3508 (табл. П4А–П4В в Приложении). В результате фильтрации из 23 изначально выбранных сайтов 3 были исключены из анализа, поскольку их прочтения не были представлены во всех группах выборки (табл. П2А в Приложении).

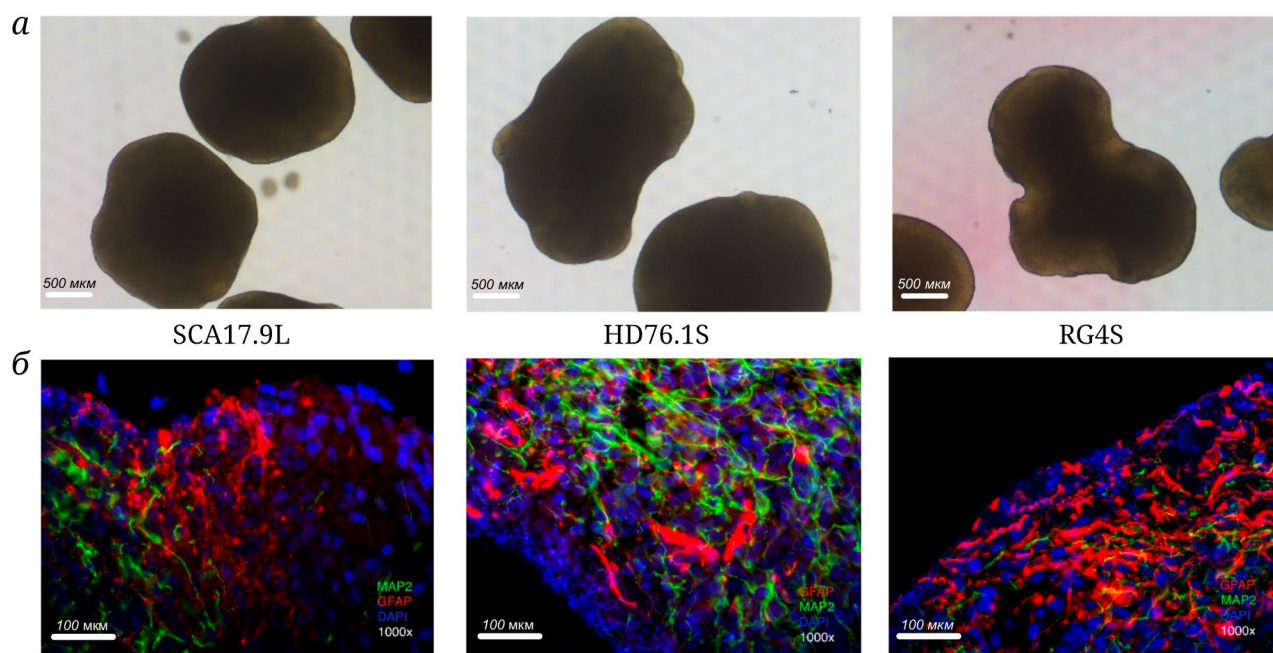


Рис. 1. Характеристики органоидов среднего мозга. а – Микрофотографии органоидов мозга с зонами морфогенеза после культивирования в среде для дифференцировки в миниреакторах в течение 45 дней; фазово-контрастная микроскопия (увеличение – 200×). б – Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов органоидов мозга, полученных из дифференцированных производных различных линий ИПСК. Окрашка антителами на MAP (зеленый); окрашка антителами GFAP (красный). Ядра клеток окрашены DAPI (синий); увеличение – 1000×. SCA17.9L – клеточная линия, содержащая 45 CAG-повторов в *TBP*; HD76.1S – клеточная линия, содержащая 76 CAG-повторов в *HTT*; RG4S – контрольная клеточная линия

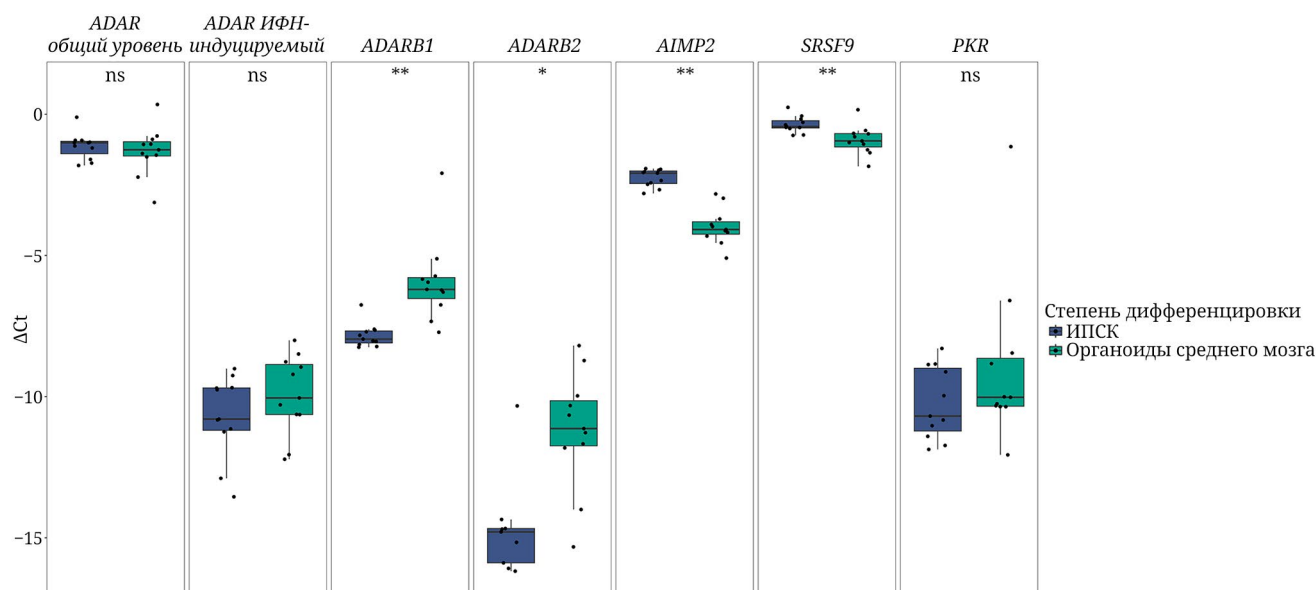


Рис. 2. Анализ дифференциальной экспрессии связанных с системой ADAR генов при сравнении ИПСК и органоидов среднего мозга. ΔC_t – разница между пороговым циклом исследуемого гена и средним геометрическим пороговых циклов *ACTB* и *TBP*; ИФН – интерферон; * p -value < 0,05; ** p -value < 0,01; ns – p -value > 0,05. Более подробно данные представлены в табл. ПЗБ в Приложении

Помимо этих сайтов, в данных также обнаружили дополнительные 44 сайта редактирования, отвечавшие использованным критериям фильтрации. Таким образом, после отбора анализировали 55 сайтов редактирования для ИПСК и 57 сайтов – для органоидов среднего мозга, при этом 48 сайтов были общими для обеих групп. Исследуемые сайты включали позиции РНК, редактируемые как отдельно ферментами ADAR1 или ADAR2, так и обоими совместно (табл. ПЗБ в Приложении). Для ряда тестируемых сайтов на данный момент не известны изоформы ADAR, которые их редактируют. Однако эти сайты расположены в Alu-повторах, из чего можно предположить, что их редактирует ADAR1 [27].

Изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты и регуляторы А→I редактирования РНК, и сопутствующий рост уровня редактирования при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в органоиды мозга. Дифференцировка ИПСК с образованием органоидов мозга моделирует процесс образования нервной ткани у эмбриона. В соответствии с этим следовало ожидать усиления А→I редактирования РНК за счет изоформы ADAR2 (ген *ADARB1*) [27]. Для интерпретации изменений в редактировании РНК, наблюдаемых посредством таргетной панели, оценивали экспрессию нескольких генов, имеющих прямое отношение к А→I редактированию, в рассматриваемых состояниях клеточных культур. Изменения в генной экспрессии оценивали во всех 10 обследуемых культурах независимо от патологии или ее от-

сутствия, поскольку все они претерпевали дифференцировку на морфологическом уровне.

Так, с дифференцировкой значительно возросла экспрессия генов *ADARB1* (фермент ADAR2) и *ADARB2* (неактивная каталитически изоформа ADAR3), что согласуется с представлениями о том, что экспрессия этих генов повышена в нейрональных тканях (рис. 2). Также наблюдали снижение экспрессии генов *AIMP2* и *SRSF9*, которые описаны как негативные регуляторы редактирования РНК [27, 60]. Предполагается, что продукт *AIMP2* снижает редактирование обоих ферментов ADAR, в то время как *SRSF9* подавляет ADAR2-опосредованное редактирование. Оценивали представленность мРНК гена *ADAR*, кодирующей как все изоформы (общий уровень), так и интерферон-индуцируемые изоформы. Как и ожидалось, количество мРНК ADAR (фермент ADAR1) оставалось на одном и том же уровне как в стволовых клетках, так и в органоидах (рис. 2; табл. ПЗБ в Приложении).

Затем сравнивали уровни редактирования каждого из исследованных сайтов РНК между ИПСК и органоидами мозга для всех 10 образцов безотносительно патологии для независимой оценки влияния дифференцировки (табл. ПЗ в Приложении). В соответствии с наблюдаемым увеличением экспрессии *ADARB1* и сниженной экспрессией *AIMP2* и *SRSF9* следовало ожидать повышение уровня редактирования сайтов, редактируемых ADAR2. Участки, редактируемые ADAR1, должны были оставаться на неизменном уровне редактирования. Большинство диф-

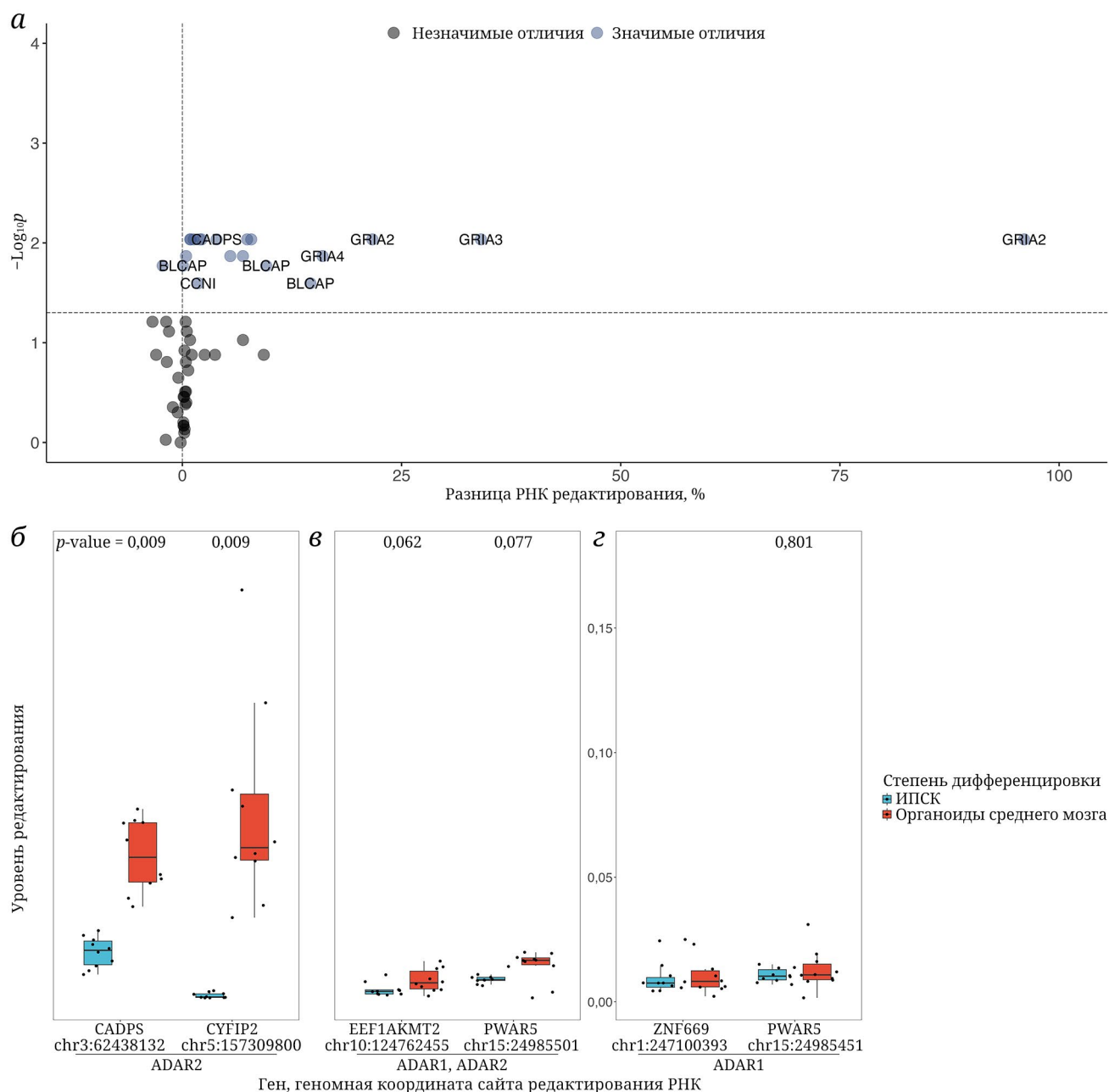


Рис. 3. Изменение уровня редактирования РНК после дифференцировки ИПСК в органоиды среднего мозга. *а* – Вулканная диаграмма анализа дифференциального редактирования между ИПСК и органоидами мозга; *б* – значимых изменений нет: сайты, предположительно, редактируемые ADAR1; *в* – рост на граничном уровне значимости: сайты, предположительно, редактируемые обоими ферментами ADAR; *г* – значимый рост: сайты-субстраты ADAR2, подтвержденные по независимым данным

ференциально редактируемых сайтов (с уровнем значимости $< 0,05$ по критерию Уилкоксона), по литературным данным, относилось к субстратам ADAR2 (рис. 3, *а*). Например, увеличивалось редактирование хорошо известных сайтов редактирования ADAR2 в составе мРНК кальций-зависимого активатора секреции 2 (*CADPS*) и взаимодействующего с FMR1 цитоплазматического белка 2 (*CYFIP2*) (рис. 3, *б*). Также наблюдали увеличение редактирования сайтов мРНК *BLCAP*, которые, по разным данным, редактиру-

ются обоими ферментами ADAR (подробную информацию по отдельным участкам см. в табл. 5 в Приложении).

Исследование дифференциального редактирования в модели дифференцировки ИПСК с образованием органоидов мозга может с некоторой долей уверенности определить, каким ферментом из двух активных изоформ редактируются те или иные сайты. Участки с выраженным повышением уровня редактирования ($p < 0,05$) представляют собой субстраты ADAR2 (рис. 3, *б*),

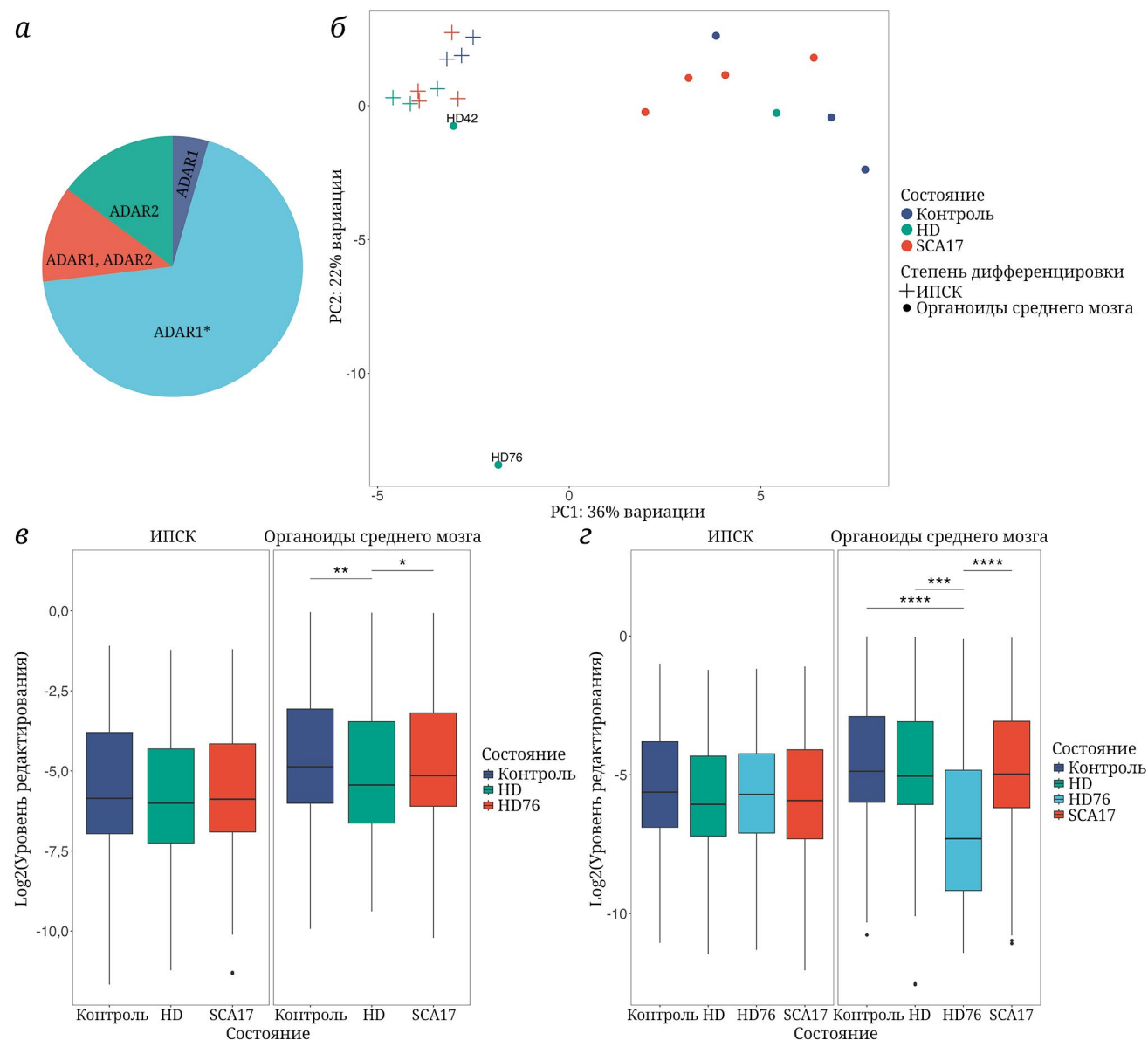


Рис. 4. Обзорный анализ редактирования РНК в исследованных образцах ИПСК и дифференцированных из них органоидах среднего мозга. **а** – Распределение сайтов, редактируемых разными ферментами ADAR (подробнее см. в табл. П2Б в Приложении); ADAR1* – сайты РНК в Alu- и SINE-повторах, предположительно, редактируемые ферментом ADAR1; **б** – анализ главных компонент, интегрирующий переменные – уровни редактирования исследуемых сайтов в патологии и контроле. Все образцы были разделены на две отдельные группы, включающие ИПСК и органоиды среднего мозга. Две культуры органоидов HD, содержащие 42 и 76 CAG-повторов, представляли собой выбросы; **в** и **г** – коробчатые диаграммы уровней редактирования РНК с включением HD76 в группу HD и с обособлением этого образца. ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; HD – болезнь Гентингтона; SCA17 – атаксия типа 17; HD76 – болезнь Гентингтона с 76 CAG-повторами в гене *HTT*; * p -value < 0,05; ** p -value < 0,01; *** p -value < 0,001; **** p -value < 0,0001

тогда как участки с тенденцией к повышению этого уровня (с уровнями значимости чуть ниже граничного значения), вероятно, редактируются одновременно двумя ферментами (рис. 3, в). Стабильно редактируемые сайты относятся к субстратам первой изоформы (рис. 3, г). Примечательно, что включенные в исследование РНК с Alu- и SINE-повторами, например днРНК *PWAR5* и *TROAP-AS1*, в основном аннотированы нами как субстраты

ADAR1. В литературе описано, что повторы такого типа с протяженными участками дцРНК как раз редактируются именно этой изоформой [17].

Таким образом, дифференцировка стволовых клеток в органоиды мозга представляла интересный альтернативный способ аннотации субстратов ADAR1 и ADAR2 в дополнение к экспериментам с нокаутами и нокдаунами соответствующих генов, что при расширении исследования

в масштабах транскриптома может использоваться в дальнейших работах.

A→I редактирование РНК в органоидах среднего мозга, полученных от пациентов, страдающих болезнями экспансии тринуклеотидных повторов. Анализ данных обеспечил разделение ИПСК и органоидов среднего мозга на основе их профилей редактирования РНК, включающих уровни редактирования всех сайтов, среди которых были субстраты ADAR1, ADAR2 и обоих ферментов (рис. 4, а и б; рис. П1 в Приложении). Метод главных компонент (PCA) более или менее четко разграничил ИПСК и органоиды на две отдельные группы. Исключением стали два образца мозговых органоидов, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона. Один образец, содержащий 76 CAG-повторов в гене *HTT* (HD76), оказался в стороне среди всех остальных, тогда как другой образец, содержащий 42 CAG-повтора в гене *HTT* (HD42), демонстрировал большее сходство с группой из ИПСК. Следует предполагать, что последний образец органоидов характеризовался неполной дифференцировкой и сохранял ряд черт ИПСК, из которых он происходил.

Mehta et al. [61] ранее сообщали об изменениях в транскриптомах и морфологических особенностях нейронов коры головного мозга, полученных из ИПСК пациентов с HD. В соответствии с этим мы наблюдали более низкий уровень редактирования РНК, выраженный в виде медианы редактирования всех исследованных сайтов, и более узкие межквартильные интервалы в ИПСК и органоидах, полученных от пациентов с HD и SCA17, по сравнению с контролем (рис. 4, в). Редактирование РНК органоидов среднего мозга у пациентов с HD значительно отличалось от такового у пациентов с SCA17 и здоровых доноров (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$).

Данные также проанализировали, вынеся в отдельную группу образец органоидов среднего мозга, содержащий 76 CAG-повторов в гене *HTT*. Редактирование РНК HD76 значительно отличалось от органоидов среднего мозга, полученных от здоровых доноров, пациентов с SCA17 и остальных пациентов с HD (рис. 4, г; U-критерий Манна–Уитни; значение $p < 0,05$). Образец с такой значительной экспансией повторов выделялся не только по уровню редактирования РНК. Анализ экспрессии генов, связанных с системой ферментов ADAR, выявил, в частности, более чем 1000-кратное увеличение экспрессии протеинкиназы R (PKR) в образце органоидов HD76 по сравнению с соответствующими ИПСК. Другие образцы не характеризовались такими существенными отличиями в экспрессии каких-либо генов из проанализированного списка (табл. ПЗВ в Приложении). Этот результат согласуется с предыдущими

исследованиями, которые выявили наличие воспаления и высокую экспрессию PKR при CAG-заболеваниях и заболеваниях, связанных с экспансией повторов CUG [62]. Кроме того, PKR может связываться с CAG-трактом, и эта способность становится более выраженной по мере увеличения длины тракта [31]. Примечательно, что аномалии альтернативного сплайсинга были обнаружены в клетках, содержащих 69 и 74 повтора CAG в гентингтине, но отсутствовали в образцах с 44–46 такими повторами [63]. Нарушения сплайсинга, в свою очередь, могут напрямую вызывать активацию PKR за счет участков дцРНК, образующихся за счет удержанных интронов [64]. Помимо PKR, в образце HD76 также наблюдали 72-кратное увеличение экспрессии гена *ADARB1*, кодирующего изоформу ADAR2. В свете высказанной гипотезы о влиянии дополнительных повторов на активность ADAR это увеличение может иметь компенсаторный характер, поскольку нормальное количество фермента ингибировано избытком двухцепочечной РНК в транскриптах гентингтина.

В совокупности эти данные подтверждают представление о том, что после дифференцировки ИПСК в органоиды мозга значимо меняется профиль редактирования РНК [65]. Также отметим значительное снижение уровня редактирования РНК в органоидах среднего мозга от пациента с 76 CAG-повторами в гене *HTT*.

Длинная некодирующая РНК PWAR5 обогащена сайтами, редактирование которых снижено в патологии. После анализа изменений редактирования РНК, сопровождающих дифференцировку ИПСК в органоиды среднего мозга, идентифицировали дифференциально редактируемые сайты РНК между клетками, несущими нормальное количество CAG-повторов, и клетками с патологическим количеством повторов. Сайты РНК проверяли на дифференциальное редактирование попарно для каждого заболевания, отдельно в ИПСК и в органоидах мозга, с использованием функции REDIT LLR [57]. В ИПСК не наблюдали дифференциально редактируемых сайтов ни в одной из групп (табл. 1; подробнее – рис. П2 и табл. П6А–П6В в Приложении). Напротив, мы наблюдали, что органоиды среднего мозга HD76 в соответствии с указанными выше результатами оказались обогащены дифференциально отредактированными сайтами (табл. 1; рис. 5; подробнее – табл. П6Г–П6Е в Приложении). Мы обнаружили 25, 28 и 16 дифференциально редактируемых сайтов, когда сравнивали органоиды среднего мозга HD76 с контролем, SCA17 и другими образцами HD соответственно. Кроме того, мы обнаружили по 5 дифференциально редактируемых сайтов при сравнении органоидов, содержащих менее 47 CAG-повторов в гене *HTT*,

с контролем и SCA17 (табл. 1; подробнее – рис. ПЗ и табл. П6Ж–П6З в Приложении). В то же время редактирование РНК в органоидах пациентов с атаксией типа 17 не отличалось от контроля (рис. ПЗВ и табл. П6И в Приложении). Важно отметить, что редактирование РНК большинства дифференциально редактируемых сайтов в патологии было снижено.

Большинство дифференциально редактируемых сайтов были расположены в некодирующих областях (рис. П4А в Приложении), а длинная некодирующая РНК (днРНК) *PWAR5* была обогащена сайтами со значительно пониженным редактированием (рис. П4Б). *PWAR5* представляет собой днРНК, связанную с тяжелым воспалительным синдромом Прадера–Вилли и Ангельмана. Эта РНК располагается в гене *SNHG14*, который содержит более 1000 сайтов А→I редактирования [66]. Ген *SNHG14* содержит кластеры малых ядрышковых РНК бокса C/D (snoRNA) и перекрывается с несколькими днРНК, ассоциированными с синдромом Прадера–Вилли и Ангельмана (*PWAR*) [67]. Более того, повышенная экспрессия этого гена связана с болезнью Паркинсона [68], и высокая плотность сайтов редактирования была зарегистрирована для *SNHG14* при шизофрении [69]. Другой ген, расположенный в этой области, *SNORD115*, связан с синдромом Прадера–Вилли и Ангельмана и, как было показано, уменьшает редактирование, опосредованное ADAR2 [70], в частности, в сайтах глутаматного рецептора *GRIA2* – канонической мишени этой изоформы фермента.

В соответствии с уже описанными свойствами образца HD76 его органоиды демонстрировали значительное снижение редактирования РНК. Более того, большинство сайтов *PWAR5* в этих

Таблица 1. Число дифференциально редактируемых сайтов РНК в группах патологии в исследованных генах

Гены	Органоиды среднего мозга				
	HD76/ контроль	HD76/ SCA17	HD76/ HD	HD/ контроль	HD/ SCA17
<i>BLCAP</i>	3	3	3	0	0
<i>FLNB</i>	1	1	0	0	0
<i>GRIA2</i>	0	0	1	0	1
<i>GRIA3</i>	0	1	1	0	0
<i>PWAR5</i>	19	20	9	5	4
<i>ZNF669</i>	2	3	2	0	0
Всего	25	28	16	5	9

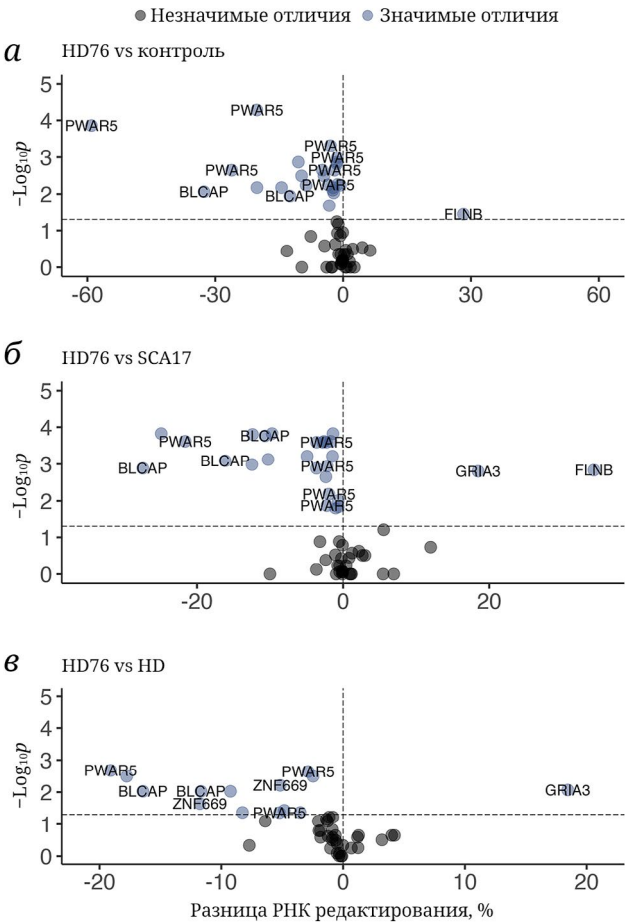


Рис. 5. Вулканские диаграммы анализа дифференциального редактирования органоидов среднего мозга, содержащих 76 повторов CAG в гене *HTT* (HD76). Сравнение органоидов HD76 с органоидами от здоровых доноров (а), от пациентов с SCA17 (б) и с другими двумя случаями болезни Гентингтона. Синими точками отмечены сайты со значимыми (скорректированное p -value < 0,05) изменениями уровня редактирования. Ось X представляет разницу в уровне редактирования РНК (%); ось Y отражает $\log_{10}p$ -value (скорректированное)

органоидах среднего мозга не редактировалось (рис. 6). В то же время эта тенденция не наблюдалась в соответствующих ИПСК (рис. 4, г; рис. 6). Сниженное редактирование РНК в наших экспериментах нельзя объяснить дифференциальной экспрессией ферментов ADAR, поскольку мы не наблюдали каких-либо различий в экспрессиях ADAR1, ADAR2 и ADAR3, а также SRSF9 и AIMP2 между патологиями (табл. ПЗВ в Приложении).

Помимо днРНК *PWAR5*, несколько дифференциально редактируемых сайтов находились в мРНК генов *BLCAP* и *ZNF669* (рис. П4Б в Приложении). Известно, что мРНК *BLCAP* является мишенью как для ADAR1, так и для ADAR2 [71]. До настоящего времени не было известно, субстратом какого фермента служат мРНК *ZNF669* и днРНК *PWAR5*. По нашим предположениям,

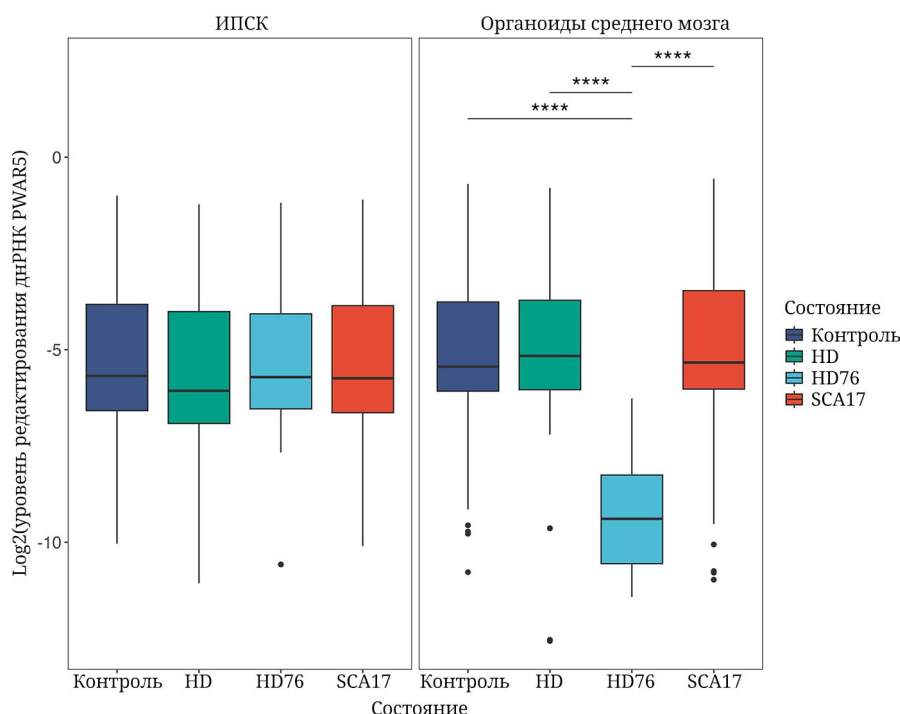


Рис. 6. Уровни редактирования сайтов длинной некодирующей РНК *PWAR5*; HD – болезнь Гентингтона; SCA17 – атаксия типа 17; HD76 – болезнь Гентингтона с 76 CAG-повторами в гене *HTT*; **** p -value < 0,0001

некоторые участки на этих РНК могут редактироваться обеими изоформами, а некоторые – только ADAR1 (табл. П5 в Приложении). Из этих данных можно предполагать, что избыточные CAG-повторы в образце HD76 способны снижать активность обеих изоформ ADAR.

Редактирование сайта мРНК *GRIA2*, кодирующее аминокислотную замену Q607R, превышало 95% практически во всех выборках, что согласуется с предыдущими данными о редактировании этого канонического участка [72]. Однако небольшое снижение редактирования этого сайта опять же наблюдали в органоидах HD76 (92,7%). Подобное снижение редактирования этого сайта ранее описано в полосатом теле и префронтальной коре пациентов с HD, а также в префронтальной коре пациентов с болезнью Альцгеймера [73], в мотонейронах при боковом амиотрофическом склерозе [74]. Понижение уровня регуляции этого сайта редактирования *GRIA2* приводит к эксайто-токсичности, опосредованной глутаматом [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование A→I редактирования выбранных участков некоторых описанных ранее в этом контексте РНК в клеточных моделях болезней экспансии тринуклеотидных CAG-повторов (спиноцереbellарной атаксии 17 и болезни Гентингтона) было направлено на проверку гипотезы о

том, что такие повторы, склонные к образованию двухцепочечных структур, могут отвлекать на себя ферменты ADAR, понижая общий уровень редактирования РНК. Потенциально, в частности, в случае снижения активности ADAR1, имеющей в целом противовоспалительный эффект, это могло бы вносить вклад в патогенез заболеваний.

Помимо сравнения между собой клеточных линий от пациентов с патологиями, A→I редактирование РНК оценивали в модели дифференцировки из ИПСК в органоиды среднего мозга. Таким образом, имелись группы контроля и патологии в двух вариантах – ИПСК и органоидов. В соответствии с имеющимися представлениями во всех образцах, кроме одного, дифференцировка в органоиды приводила к повышению уровня редактирования РНК на имеющейся выборке. Анализ экспрессии относящихся к системе A→I редактирования РНК генов показал, что изоформы ADAR1 сохраняют стабильный уровень экспрессии при дифференцировке от стволовых клеток в мозговые органоиды, а ADAR2 демонстрирует значительное повышение уровня. Это означает, что дифференцировка в культуре предоставляет неплохой инструмент для оценки, каким из ферментов, ADAR1 или ADAR2, редактируется тот или иной сайт. Если по результатам анализа в предложенной здесь таргетной панели уровень редактирования значимо возрастал с дифференцировкой, то эти сайты, очевидно, редактировались ферментом ADAR2. Результаты такого анализа

в целом совпадали с литературными данными, что подтверждает уместность представленного подхода.

В ИПСК значимых различий между нормой и патологией в каких-либо из исследованных сайтов не обнаружили. В органоидах среднего мозга глобальных изменений редактирования РНК также не наблюдали. На общем фоне одна культура представляла собой существенный выброс. Она была получена от пациента с болезнью Гентингтона при высоком уровне CAG-повторов в гене гентингтина (76 по сравнению с 42–46 CAG-повторами в остальных образцах патологии). Именно этот образец в некоторой мере подтверждал сделанное нами предположение, поскольку характеризовался значительно сниженным уровнем A→I редактирования в исследуемых участках. Разумеется, наличие всего одного подобного образца ограничивает универсальность сделанных нами выводов, при том что пациенты с таким значительным числом повторов доступны крайне редко. Несмотря на то что на большей части образцов гипотеза не подтвердилась, полученный результат указывает направление дальнейших исследований, а именно более четкое определение числа CAG-повторов, способного прямо или косвенно повлиять на A→I редактирование, а также выяснение роли этого процесса в развитии нейропатологии. Такие результаты могут лечь в основу подходов к модулированию редактирования РНК для лечения болезней экспансии повторов.

Вклад авторов. М.А. Лагарькова, С.А. Мошковский, А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, В.В. Кудрявский – концепция и управление работой;

А.В. Еремеев, Е.С. Ручко, М.А. Лагарькова, А.Н. Богомазова – получение ИПСК и органоидов среднего мозга; В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров – ПЦР и количественная ПЦР; В.В. Кудрявский, В.А. Веселовский – подготовка библиотек для секвенирования РНК; В.А. Веселовский, К.М. Климина – секвенирование РНК; В.В. Кудрявский – анализ данных, подготовка иллюстраций; В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, С.А. Мошковский – обсуждение результатов исследования; В.В. Кудрявский – подготовка текста; С.А. Мошковский, В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, М.А. Лагарькова, А.Н. Богомазова, К.М. Климина – редактирование текста статьи. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Благодарности. Авторы благодарны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, который предоставил оборудование для выполнения секвенирования РНК.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00105).

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. Saudou, F., and Humbert, S. (2016) The biology of huntingtin, *Neuron*, **89**, 910-926, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>.
2. Bogomazova, A. N., Eremeev, A. V., Pozmogova, G. E., and Lagarkova, M. A. (2019) The role of mutant RNA in the pathogenesis of Huntington's disease and other polyglutamine diseases, *Mol. Biol. (Mosk)*, **53**, 954-967, <https://doi.org/10.1134/S0026893319060037>.
3. Walker, F. O. (2007) Huntington's disease, *Lancet*, **369**, 218-228, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1).
4. Saito, R., Tada, Y., Oikawa, D., Sato, Y., Seto, M., Satoh, A., Kume, K., Ueki, N., Nakashima, M., Hayashi, S., Toyoshima, Y., Tokunaga, F., Kawakami, H., and Kakita, A. (2022) Spinocerebellar ataxia type 17-digenic TBP/STUB1 disease: neuropathologic features of an autopsied patient, *Acta Neuropathol. Commun.*, **10**, 177, <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01486-6>.
5. Cortes, C. J., and La Spada, A. R. (2015) Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Mol. Cell. Neurosci.*, **66**, 53-61, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.010>.
6. Adegbiyuro, A., Sedighi, F., Pilkington, A. W., Groover, S., and Legleiter, J. (2017) Proteins containing expanded polyglutamine tracts and neurodegenerative disease, *Biochemistry*, **56**, 1199-1217, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00936>.
7. Srivastava, A. K., Takkar, A., Garg, A., and Faruq, M. (2017) Clinical behaviour of spinocerebellar ataxia type 12 and intermediate length abnormal CAG repeats in PPP2R2B, *Brain*, **140**, 27-36, <https://doi.org/10.1093/brain/aww269>.

8. Wright, G. E. B., Collins, J. A., Kay, C., McDonald, C., Dolzhenko, E., Xia, Q., Bečanović, K., Drögemöller, B. I., Semaka, A., Nguyen, C. M., Trost, B., Richards, F., Bijlsma, E. K., Squitieri, F., Ross, C. J. D., Scherer, S. W., Eberle, M. A., Yuen, R. K. C., and Hayden, M. R. (2019) Length of uninterrupted CAG, independent of polyglutamine size, results in increased somatic instability, hastening onset of huntington disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **104**, 1116-1126, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.04.007>.
9. Li, L.-B., Yu, Z., Teng, X., and Bonini, N. M. (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*, *Nature*, **453**, 1107-1111, <https://doi.org/10.1038/nature06909>.
10. Wang, L.-C., Chen, K.-Y., Pan, H., Wu, C.-C., Chen, P.-H., Liao, Y.-T., Li, C., Huang, M.-L., and Hsiao, K.-M. (2011) Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 1255-1267, <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0522-4>.
11. Hsu, R.-J., Hsiao, K.-M., Lin, M.-J., Li, C.-Y., Wang, L.-C., Chen, L.-K., and Pan, H. (2011) Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice, *PLoS One*, **6**, e16417, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016417>.
12. Barbon, A., and Barlati, S. (2011) Glutamate receptor RNA editing in health and disease, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 882-889, <https://doi.org/10.1134/S0006297911080037>.
13. Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986) Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA, *Cell*, **46**, 819-826, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90063-2).
14. Wolf, P. G., Rowe, C. A., and Hasebe, M. (2004) High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris*, *Gene*, **339**, 89-97, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.018>.
15. Solomon, O., Oren, S., Safran, M., Deshet-Unger, N., Akiva, P., Jacob-Hirsch, J., Cesarkas, K., Kabesa, R., Amariglio, N., Unger, R., Rechavi, G., and Eyal, E. (2013) Global regulation of alternative splicing by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR), *RNA*, **19**, 591-604, <https://doi.org/10.1261/rna.038042.112>.
16. Bass, B. L., and Weintraub, H. (1988) An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate, *Cell*, **55**, 1089-1098, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90253-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90253-X).
17. Thomas, J. M., and Beal, P. A. (2017) How do ADARs bind RNA? New protein-RNA structures illuminate substrate recognition by the RNA editing ADARs, *Bioessays*, **39**, 1600187, <https://doi.org/10.1002/bies.201600187>.
18. Goncharov, A. O., Shender, V. O., Kuznetsova, K. G., Kliuchnikova, A. A., and Moshkovskii, S. A. (2022) Interplay between A-to-I editing and splicing of RNA: a potential point of application for cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5240, <https://doi.org/10.3390/ijms23095240>.
19. Maurano, M., Snyder, J. M., Connelly, C., Henao-Mejia, J., Sidrauski, C., and Stetson, D. B. (2021) Protein kinase R and the integrated stress response drive immunopathology caused by mutations in the RNA deaminase ADAR1, *Immunity*, **54**, 1948-1960.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.001>.
20. Liddicoat, B. J., Piskol, R., Chalk, A. M., Ramaswami, G., Higuchi, M., Hartner, J. C., Li, J. B., Seeburg, P. H., and Walkley, C. R. (2015) RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself, *Science*, **349**, 1115-1120, <https://doi.org/10.1126/science.aac7049>.
21. Behm, M., and Öhman, M. (2016) RNA editing: a contributor to neuronal dynamics in the mammalian brain, *Trends Genet.*, **32**, 165-175, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.12.005>.
22. Vissel, B., Royle, G. A., Christie, B. R., Schiffer, H. H., Ghetti, A., Tritto, T., Perez-Otano, I., Radcliffe, R. A., Seamans, J., Sejnowski, T., Wehner, J. M., Collins, A. C., O'Gorman, S., and Heinemann, S. F. (2001) The role of RNA editing of kainate receptors in synaptic plasticity and seizures, *Neuron*, **29**, 217-227, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00192-1).
23. Egebjerg, J., and Heinemann, S. F. (1993) Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 755-759, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.755>.
24. Rice, G. I., Kasher, P. R., Forte, G. M. A., Mannion, N. M., Greenwood, S. M., Szykiewicz, M., Dickerson, J. E., Bhaskar, S. S., Zampini, M., Briggs, T. A., Jenkinson, E. M., Bacino, C. A., Battini, R., Bertini, E., Brogan, P. A., Brueton, L. A., Carpanelli, M., De Laet, C., de Lonlay, P., del Toro, M., Desguerre, I., Fazzi, E., Garcia-Cazorla, A., Heiberg, A., Kawaguchi, M., Kumar, R., Lin, J.-P. S.-M., Lourenco, C. M., Male, A. M., Marques, W., Mignot, C., Olivieri, I., Orcesi, S., Prabhakar, P., Rasmussen, M., Robinson, R. A., Rozenberg, F., Schmidt, J. L., Steindl, K., Tan, T. Y., van der Merwe, W. G., Vanderver, A., Vassallo, G., Wakeling, E. L., Wassmer, E., Whittaker, E., Livingston, J. H., Lebon, P., Suzuki, T., McLaughlin, P. J., Keegan, L. P., O'Connell, M. A., Lovell, S. C., and Crow, Y. J. (2012) Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature, *Nat. Genet.*, **44**, 1243-1248, <https://doi.org/10.1038/ng.2414>.
25. Livingston, J. H., Lin, J.-P., Dale, R. C., Gill, D., Brogan, P., Munnich, A., Kurian, M. A., Gonzalez-Martinez, V., De Goede, C. G. E. L., Falconer, A., Forte, G., Jenkinson, E. M., Kasher, P. R., Szykiewicz, M., Rice, G. I.,

- and Crow, Y. J. (2014) A type I interferon signature identifies bilateral striatal necrosis due to mutations in ADAR1, *J. Med. Genet.*, **51**, 76-82, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102038>.
26. Huntley, M. A., Lou, M., Goldstein, L. D., Lawrence, M., Dijkgraaf, G. J. P., Kaminker, J. S., and Gentleman, R. (2016) Complex regulation of ADAR-mediated RNA-editing across tissues, *BMC Genomics*, **17**, 61, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2291-9>.
 27. Tan, M. H., Li, Q., Shanmugam, R., Piskol, R., Kohler, J., Young, A. N., Liu, K. I., Zhang, R., Ramaswami, G., Ariyoshi, K., Gupte, A., Keegan, L. P., George, C. X., Ramu, A., Huang, N., Pollina, E. A., Leeman, D. S., Rustighi, A., Goh, Y. P. S., GTEX Consortium, Chawla, A., Del Sal, G., Peltz, G., Brunet, A., Conrad, D. F., Samuel, C. E., O'Connell, M. A., Walkley, C. R., Nishikura, K., and Li, J. B. (2017) Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals, *Nature*, **550**, 249-254, <https://doi.org/10.1038/nature24041>.
 28. Filippini, A., Bonini, D., Lacoux, C., Pacini, L., Zingariello, M., Sancillo, L., Bosisio, D., Salvi, V., Mingardi, J., La Via, L., Zalfa, F., Bagni, C., and Barbon, A. (2017) Absence of the Fragile X Mental Retardation Protein results in defects of RNA editing of neuronal mRNAs in mouse, *RNA Biol.*, **14**, 1580-1591, <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1338232>.
 29. Kubota-Sakashita, M., Iwamoto, K., Bundo, M., and Kato, T. (2014) A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia, *Mol. Brain*, **7**, 5, <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-5>.
 30. Srivastava, P. K., Bagnati, M., Delahaye-Duriez, A., Ko, J.-H., Rotival, M., Langley, S. R., Shkura, K., Mazzuferi, M., Danis, B., van Eyll, J., Foerch, P., Behmoaras, J., Kaminski, R. M., Petretto, E., and Johnson, M. R. (2017) Genome-wide analysis of differential RNA editing in epilepsy, *Genome Res.*, **27**, 440-450, <https://doi.org/10.1101/gr.210740.116>.
 31. Peel, A. L., Rao, R. V., Cottrell, B. A., Hayden, M. R., Ellerby, L. M., and Bredesen, D. E. (2001) Double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, binds preferentially to Huntington's disease (HD) transcripts and is activated in HD tissue, *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1531-1538, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.15.1531>.
 32. Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., and Krzyzosiak, W. J. (2007) Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets, *Mol. Cell*, **25**, 575-586, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.031>.
 33. Ota, H., Sakurai, M., Gupta, R., Valente, L., Wulff, B.-E., Ariyoshi, K., Iizasa, H., Davuluri, R. V., and Nishikura, K. (2013) ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing, *Cell*, **153**, 575-589, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.024>.
 34. Khan, N., Kolimi, N., and Rathinavelan, T. (2015) Twisting right to left: A...A mismatch in a CAG trinucleotide repeat overexpansion provokes left-handed Z-DNA conformation, *PLoS Comput. Biol.*, **11**, e1004162, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004162>.
 35. Echeverria, G. V., and Cooper, T. A. (2012) RNA-binding proteins in microsatellite expansion disorders: mediators of RNA toxicity, *Brain Res.*, **1462**, 100-111, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.030>.
 36. Donnelly, C. J., Zhang, P.-W., Pham, J. T., Haeusler, A. R., Mistry, N. A., Vidsensky, S., Daley, E. L., Poth, E. M., Hoover, B., Fines, D. M., Maragakis, N., Tienari, P. J., Petrucelli, L., Traynor, B. J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C. F., Blackshaw, S., Sattler, R., and Rothstein, J. D. (2013) RNA toxicity from the ALS/FTD C9orf72 expansion is mitigated by antisense intervention, *Neuron*, **80**, 415-428, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.015>.
 37. Mahajan, S. S., and Ziff, E. B. (2007) Novel toxicity of the unedited GluR2 AMPA receptor subunit dependent on surface trafficking and increased Ca²⁺-permeability, *Mol. Cell. Neurosci.*, **35**, 470-481, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.04.006>.
 38. Hideyama, T., Yamashita, T., Suzuki, T., Tsuji, S., Higuchi, M., Seeburg, P. H., Takahashi, R., Misawa, H., and Kwak, S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2, *J. Neurosci.*, **30**, 11917-11925, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010>.
 39. Moore, S., Alsop, E., Lorenzini, I., Starr, A., Rabichow, B. E., Mendez, E., Levy, J. L., Burciu, C., Reiman, R., Chew, J., Belzil, V. V., W Dickson, D., Robertson, J., Staats, K. A., Ichida, J. K., Petrucelli, L., Van Keuren-Jensen, K., and Sattler, R. (2019) ADAR2 mislocalization and widespread RNA editing aberrations in C9orf72-mediated ALS/FTD, *Acta Neuropathol.*, **138**, 49-65, <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01999-w>.
 40. Riedmann, E. M., Schopoff, S., Hartner, J. C., and Jantsch, M. F. (2008) Specificity of ADAR-mediated RNA editing in newly identified targets, *RNA*, **14**, 1110-1118, <https://doi.org/10.1261/rna.923308>.
 41. Herbert, A., and Rich, A. (2001) The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the *in vivo* editing of minimal substrates by ADAR1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12132-12137, <https://doi.org/10.1073/pnas.211419898>.
 42. Franklin, A., Steele, E. J., and Lindley, R. A. (2020) A proposed reverse transcription mechanism for (CAG)_n and similar expandable repeats that cause neurological and other diseases, *Heliyon*, **6**, e03258, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03258>.

43. Shuvalova, L. D., Davidenko, A. V., Ereemeev, A. V., Khomyakova, E. A., Zerkalenkova, E. A., Lebedeva, O. S., Bogomazova, A. N., Klyushnikov, S. A., Illarioshkin, S. N., and Lagarkova, M. A. (2021) Generation of induced pluripotent stem cell line RCPMi008-A derived from patient with spinocerebellar ataxia 17, *Stem Cell Res.*, **54**, 102431, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102431>.
44. Holmqvist, S., Lehtonen, Š., Chumarina, M., Puttonen, K. A., Azevedo, C., Lebedeva, O., Ruponen, M., Oksanen, M., Djelloul, M., Collin, A., Goldwurm, S., Meyer, M., Lagarkova, M., Kiselev, S., Koistinaho, J., and Roybon, L. (2016) Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients, *NPJ Parkinsons Disease*, **2**, 16009, <https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.9>.
45. Ereemeev, A. V., Volovikov, E. A., Shuvalova, L. D., Davidenko, A. V., Khomyakova, E. A., Bogomiakova, M. E., Lebedeva, O. S., Zubkova, O. A., and Lagarkova, M. A. (2019) “Necessity is the mother of invention” or inexpensive, reliable, and reproducible protocol for generating organoids, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 321-328, <https://doi.org/10.1134/S0006297919030143>.
46. Levitsky, L. I., Kliuchnikova, A. A., Kuznetsova, K. G., Karpov, D. S., Ivanov, M. V., Pyatnitskiy, M. A., Kalinina, O. V., Gorshkov, M. V., and Moshkovskii, S. A. (2019) Adenosine-to-inosine RNA editing in mouse and human brain proteomes, *Proteomics*, **19**, e1900195, <https://doi.org/10.1002/pmic.201900195>.
47. Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Goncharov, A. O., Kliuchnikova, A. A., Bubis, J. A., Lobas, A. A., Solovyeva, E. M., Pyatnitskiy, M. A., Ovchinnikov, R. K., Kukharsky, M. S., Farafonova, T. E., Novikova, S. E., Zgoda, V. G., Tarasova, I. A., Gorshkov, M. V., and Moshkovskii, S. A. (2023) Massive proteogenomic reanalysis of publicly available proteomic datasets of human tissues in search for protein recoding via adenosine-to-inosine RNA editing, *J. Proteome Res.*, **22**, 1695-1711, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00740>.
48. Nikitina, A. S., Lipatova, A. V., Goncharov, A. O., Kliuchnikova, A. A., Pyatnitskiy, M. A., Kuznetsova, K. G., Hamad, A., Vorobyev, P. O., Alekseeva, O. N., Mahmoud, M., Shakiba, Y., Anufrieva, K. S., Arapidi, G. P., Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Gorshkov, M. V., Chumakov, P. M., and Moshkovskii, S. A. (2022) Multiomic profiling identified EGF receptor signaling as a potential inhibitor of type I interferon response in models of oncolytic therapy by vesicular stomatitis virus, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5244, <https://doi.org/10.3390/ijms23095244>.
49. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
50. O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C. M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V. S., Kodali, V. K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K. M., Murphy, M. R., O’Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S. H., Rausch, D., Riddick, L. D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S. S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R. E., Vatsan, A. R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M. J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T. D., and Pruitt, K. D. (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation, *Nucleic Acids Res.*, **44**, D733-D745, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.
51. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., and Peek, A. S. (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W163-W169, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>.
52. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, **34**, i884-i890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
53. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
54. Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., and Li, H. (2021) Twelve years of SAMtools and BCFtools, *Gigascience*, **10**, giab008, <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>.
55. Picardi, E., and Pesole, G. (2013) REDIttools: high-throughput RNA editing detection made easy, *Bioinformatics*, **29**, 1813-1814, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt287>.
56. Picardi, E., D’Erchia, A. M., Lo Giudice, C., and Pesole, G. (2017) REDiportal: a comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D750-D757, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw767>.
57. Tran, S. S., Zhou, Q., and Xiao, X. (2020) Statistical inference of differential RNA-editing sites from RNA-sequencing data by hierarchical modeling, *Bioinformatics*, **36**, 2796-2804, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa066>.

58. Bahn, J. H., Lee, J.-H., Li, G., Greer, C., Peng, G., and Xiao, X. (2012) Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing, *Genome Res.*, **22**, 142-150, <https://doi.org/10.1101/gr.124107.111>.
59. Morabito, M. V., Ulbricht, R. J., O'Neil, R. T., Airey, D. C., Lu, P., Zhang, B., Wang, L., and Emeson, R. B. (2010) High-throughput multiplexed transcript analysis yields enhanced resolution of 5-hydroxytryptamine 2C receptor mRNA editing profiles, *Mol. Pharmacol.*, **77**, 895-902, <https://doi.org/10.1124/mol.109.061903>.
60. Shanmugam, R., Zhang, F., Srinivasan, H., Charles Richard, J. L., Liu, K. I., Zhang, X., Woo, C. W. A., Chua, Z. H. M., Buschdorf, J. P., Meaney, M. J., and Tan, M. H. (2018) SRSF9 selectively represses ADAR2-mediated editing of brain-specific sites in primates, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7379-7395, <https://doi.org/10.1093/nar/gky615>.
61. Mehta, S. R., Tom, C. M., Wang, Y., Bresee, C., Rushton, D., Mathkar, P. P., Tang, J., and Mattis, V. B. (2018) Human Huntington's disease iPSC-derived cortical neurons display altered transcriptomics, morphology, and maturation, *Cell Rep.*, **25**, 1081-1096.e6, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.076>.
62. Tian, B., White, R. J., Xia, T., Welle, S., Turner, D. H., Mathews, M. B., and Thornton, C. A. (2000) Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR, *RNA*, **6**, 79-87, <https://doi.org/10.1017/S1355838200991544>.
63. Mykowska, A., Sobczak, K., Wojciechowska, M., Kozlowski, P., and Krzyzosiak, W. J. (2011) CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8938-8951, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr608>.
64. Bowling, E. A., Wang, J. H., Gong, F., Wu, W., Neill, N. J., Kim, I. S., Tyagi, S., Orellana, M., Kurley, S. J., Dominguez-Vidaña, R., Chung, H.-C., Hsu, T. Y.-T., Dubrulle, J., Saltzman, A. B., Li, H., Meena, J. K., Canlas, G. M., Chamakuri, S., Singh, S., Simon, L. M., Olson, C. M., Dobrolecki, L. E., Lewis, M. T., Zhang, B., Golding, I., Rosen, J. M., Young, D. W., Malovannaya, A., Stossi, F., Miles, G., Ellis, M. J., Yu, L., Buonamici, S., Lin, C. Y., Karlin, K. L., Zhang, X. H.-F., and Westbrook, T. F. (2021) Spliceosome-targeted therapies trigger an antiviral immune response in triple-negative breast cancer, *Cell*, **184**, 384-403.e21, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.031>.
65. Germanguz, I., Shtrichman, R., Osenberg, S., Ziskind, A., Novak, A., Domev, H., Laevsky, I., Jacob-Hirsch, J., Feiler, Y., Rechavi, G., and Itskovitz-Eldor, J. (2014) ADAR1 is involved in the regulation of reprogramming human fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **23**, 443-456, <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0206>.
66. Cuddleston, W. H., Li, J., Fan, X., Kozenkov, A., Lalli, M., Khalique, S., Dracheva, S., Mukamel, E. A., and Breen, M. S. (2022) Cellular and genetic drivers of RNA editing variation in the human brain, *Nat. Commun.*, **13**, 2997, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30531-0>.
67. Sledziowska, M., Winczura, K., Jones, M., Almaghrabi, R., Mischo, H., Hebenstreit, D., Garcia, P., and Grzechnik, P. (2023) Non-coding RNAs associated with Prader-Willi syndrome regulate transcription of neurodevelopmental genes in human induced pluripotent stem cells, *Hum. Mol. Genet.*, **32**, 608-620, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac228>.
68. Zhang, L.-M., Wang, M.-H., Yang, H.-C., Tian, T., Sun, G.-F., Ji, Y.-F., Hu, W.-T., Liu, X., Wang, J.-P., and Lu, H. (2019) Dopaminergic neuron injury in Parkinson's disease is mitigated by interfering lncRNA SNHG14 expression to regulate the miR-133b/ α -synuclein pathway, *Aging (Albany NY)*, **11**, 9264-9279, <https://doi.org/10.18632/aging.102330>.
69. Ansell, B. R. E., Thomas, S. N., Bonelli, R., Munro, J. E., Freytag, S., and Bahlo, M. (2021) A survey of RNA editing at single-cell resolution links interneurons to schizophrenia and autism, *RNA*, **27**, 1482-1496, <https://doi.org/10.1261/rna.078804.121>.
70. Vitali, P., Basyuk, E., Le Meur, E., Bertrand, E., Muscatelli, F., Cavaillé, J., and Huttenhofer, A. (2005) ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs, *J. Cell Biol.*, **169**, 745-753, <https://doi.org/10.1083/jcb.200411129>.
71. Galeano, F., Leroy, A., Rossetti, C., Gromova, I., Gautier, P., Keegan, L. P., Massimi, L., Di Rocco, C., O'Connell, M. A., and Gallo, A. (2010) Human BLCAP transcript: new editing events in normal and cancerous tissues, *Int. J. Cancer*, **127**, 127-137, <https://doi.org/10.1002/ijc.25022>.
72. Puchalski, R. B., Louis, J. C., Brose, N., Traynelis, S. F., Egebjerg, J., Kukekov, V., Wenthold, R. J., Rogers, S. W., Lin, F., and Moran, T. (1994) Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors, *Neuron*, **13**, 131-147, [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90464-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90464-2).
73. Akbarian, S., Smith, M. A., and Jones, E. G. (1995) Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia, *Brain Res.*, **699**, 297-304, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00922-D](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00922-D).
74. Hideyama, T., Yamashita, T., Aizawa, H., Tsuji, S., Kakita, A., Takahashi, H., and Kwak, S. (2012) Profound down-regulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons, *Neurobiol. Dis.*, **45**, 1121-1128, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.033>.

RNA EDITING BY ADAR ADENOSINE DEAMINASES IN CELL MODELS OF CAG REPEAT EXPANSION DISEASES: A SIGNIFICANT EFFECT OF DIFFERENTIATION FROM STEM CELLS INTO BRAIN ORGANOIDS IN ABSENCE OF A SUBSTANTIAL INFLUENCE OF CAG REPEATS ON THE LEVEL OF EDITING

V. V. Kudriavskii^{1,2*}, A. O. Goncharov^{1,2}, A. V. Ereemeev², E. S. Ruchko²,
V. A. Veselovsky², K. M. Klimina², A. N. Bogomazova², M. A. Lagarkova²,
S. A. Moshkovskii^{2,3*}, and A. A. Kliuchnikova^{1,2,3}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University,
117997 Moscow, Russia; e-mail: wkudriavskii@gmail.com; moshrrffi@gmail.com

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine
of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

The expansion of CAG repeats in certain genes is a known cause of several neurodegenerative diseases, but the exact mechanism behind this is not yet fully understood. It is believed that double-stranded RNA regions formed by CAG repeats could be harmful to the cell. This study aimed to test the hypothesis that these RNA regions might potentially interfere with ADAR RNA editing enzymes, leading to reduced A→I editing of RNA and activation of the interferon response. We studied induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with Huntington's disease or ataxia type 17, as well as midbrain organoids developed from these cells. A targeted panel for next-generation sequencing was used to assess editing in specific RNA regions. The differentiation of iPSCs into brain organoids led to an increase in ADAR2 gene expression and a decrease in the expression of RNA editing inhibitor proteins. Consequently, there was an increase in the editing of specific ADAR2 substrates, allowing for the identification of differential substrates of ADAR isoforms. However, a comparison of pathology and control groups did not show differences in editing levels among iPSCs. Additionally, brain organoids with 42-46 CAG repeats did not exhibit global changes. On the other hand, brain organoids with the highest number of CAG repeats in the huntingtin gene (76) showed a significant decrease in the level of RNA editing of specific transcripts, potentially involving ADAR1. Notably, editing of the long non-coding RNA PWAR5 was nearly absent in this sample. In summary, the study found that in most cultures with repeat expansion, the hypothesized effect on RNA editing was not confirmed.

Keywords: RNA editing, Adenosine Deaminase Acting on RNA, trinucleotide repeat expansion diseases, Huntington's disease, ataxia type 17, induced pluripotent stem cells, midbrain organoids

NMDA-РЕЦЕПТОРЫ И ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ЭРИТРОЦИТАХ: НЕДОСТАЮЩЕЕ ЗВЕНО ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ

© 2024 Г.А. Алилова, Л.А. Тихонова, Е.А. Косенко*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: eakos@rambler.ru*

Поступила в редакцию 13.05.2024

После доработки 16.06.2024

Принята к публикации 23.06.2024

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) – это психоневрологический синдром, развивающийся у пациентов с тяжёлым нарушением функции печени и/или портокавальным шунтированием. Несмотря на более чем вековую историю исследования взаимосвязи между повреждением печени и развитием энцефалопатии, патогенетические механизмы гепатоэнцефалопатии до сих пор полностью не выяснены, однако общепризнано, что главным триггером неврологических осложнений при гепатоэнцефалопатии является нейротоксин – аммиак/аммоний, концентрация которого в крови при нарушении детоксикационной функции печени увеличивается до токсического уровня (гипераммониемия). Беспрепятственно проникая в клетки мозга и влияя на опосредованную NMDA-рецепторами сигнализацию, аммиак/аммоний запускает патологический каскад, приводящий к резкому торможению аэробного обмена глюкозы, окислительному стрессу, гипоперфузии мозга, повреждению нервных клеток и формированию неврологического дефицита. Гипоперфузия мозга, в свою очередь, может быть связана с нарушением кислородтранспортной функции эритроцитов, сопряжённой с нарушением метаболических/энергетических процессов, протекающих в мембранах и внутри эритроцитов и контролирующих сродство гемоглобина к кислороду, определяющее степень оксигенации крови и тканей. Недавно мы подтвердили указанную причинно-следственную взаимосвязь и выявили новое, опосредованное гиперактивацией NMDA-рецепторов аммоний-индуцированное прооксидантное действие на эритроциты, нарушающее их кислородтранспортную функцию. Для более полной оценки «эритроцитарных» факторов, нарушающих оксигенацию мозга и приводящих к энцефалопатии, в данной работе мы определили активность ферментов и концентрацию метаболитов гликолиза, шунта Рапопорта–Люберинг, а также морфологические характеристики эритроцитов крыс с острой гипераммониемией. Для выяснения роли NMDA-рецепторов в указанных процессах мы использовали неконкурентный антагонист рецепторов, МК-801. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что аммоний-индуцированные нарушения формы и функций эритроцитов и гемоглобинемия следует рассматривать как дополнительный системный «эритроцитарный» патогенетический фактор, приводящий к прогрессированию гипоперфузии мозга при гепатоэнцефалопатии, сопровождающейся гипераммониемией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипераммониемия, гепатоэнцефалопатия, NMDA-рецепторы, эритроциты, гликолиз, шунт Рапопорта–Люберинг.

DOI: 10.31857/S0320972524080071 **EDN:** KDXBWV

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) – это сложный психоневрологический синдром, возникающий

в результате острых или хронических заболеваний печени и/или портокавального шунтирования, клинические симптомы которого варьируют от минимальных расстройств сознания

Принятые сокращения: 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат; ГА – гипераммониемия; ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ГК – гексокиназа; ГЭ – гепатоэнцефалопатия; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ПК – пируваткиназа; ФФК – фосфофруктокиназа; Hb – гемоглобин; NMDA-R – NMDA-рецепторы.

* Адресат для корреспонденции.

и поведения [1] до деменции и комы, которая, как правило, приводит к смерти [2]. Несмотря на многочисленные исследования, посвящённые проблеме поражения центральной нервной системы, патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при ГЭ до сих пор полностью не выяснены.

Согласно совокупным литературным данным, этиологические факторы, вызывающие развитие ГЭ, множественны. К ним относятся бактериально-грибковые инфекции [3], системное воспаление [4], дисбаланс аминокислот и продукты их аномального метаболизма [5], некоторые медикаментозные средства [6], различные токсины [7] и многие другие [8]. Общеизвестно, однако, что главным нейротоксином, играющим центральную роль в патогенезе ГЭ, является аммиак/аммоний [9], который при сочетанном нарушении детоксикационной функции печени, вызванном повреждением гепатоцитов и/или портокавальным шунтированием, накапливается в крови (гипераммониемия, ГА) до токсического уровня и беспрепятственно проникает в мозг, где его патологическое действие, опосредованное гиперактивацией NMDA-рецепторов (NMDA-R) [10], распространяется на многие энергообразующие кислородзависимые биохимические процессы [2, 11], лежащие в основе жизнедеятельности нервных клеток и организма в целом [12]. Следует отметить, однако, что появление данных, подтверждающих наличие NMDA-R не только в мозге, но и в некоторых периферических органах, таких как печень, сердце, поджелудочная железа, а также в эритроцитах [13], давало возможность предположить, что токсические эффекты аммиака/аммония при ГЭ, усиленные гиперактивацией NMDA-R в периферических тканях, могут быть более генерализованными, чем предполагалось раньше. Недавно полученные нами данные частично подтвердили это предположение и позволили выявить дополнительный механизм причинно-следственной NMDA-R-зависимой взаимосвязи между дисфункцией печени – «гепато» и повреждением мозга – «энцефалопатией». Учитывая облигатную зависимость клеток мозга от незаменимых энергетических субстратов, глюкозы и кетоновых тел [14], образуемых исключительно в печени в процессе глюконеогенеза и кетогенеза, мы, в частности, показали, что аммоний-индуцированное и опосредованное гиперактивацией NMDA-R нарушение работы дыхательной цепи митохондрий печени крыс приводит к быстрому и резкому торможению глюконеогенеза и кетогенеза. Это, в свою очередь, вызывало значительное падение уровня обоих энергетических субстратов в печени и крови и предшествовало начальной стадии неврологических нарушений

(вялость, сонливость, нарушение координации движений, тремор и миоклонические судороги) у животных с острой ГА. Терминальным же событием, предшествующим развитию комы, являлось полное торможение глюконеогенеза и кетогенеза, приводящее к резко выраженной гипогликемии и гипокетонемии и, соответственно, к катастрофическому снижению концентраций глюкозы и кетоновых тел в мозге этих животных [15]. Помимо этого, нам удалось выявить другое, внепечёночное, аммоний-индуцированное патологическое звено, а именно нарушение равновесия про- и антиоксидантного баланса в эритроцитах, имеющее прямое отношение к нарушению их функциональных способностей. В частности, мы обнаружили, что у животных с ГА большая часть аммиака/аммония накапливается не в плазме, а в эритроцитах, что делает эти клетки, лишённые аммиак-обезвреживающих ферментов, более восприимчивыми (чем другие не-нейрональные ткани) к аммоний-индуцированному NMDA-R-опосредованному окислительному стрессу [16]. Как известно, окислительный стресс нарушает кислородтранспортную функцию эритроцитов [17, 18], сопряжённую с метаболическими/энергетическими процессами, протекающими в мембранах и внутри эритроцитов [19] и регулируемыми сродством гемоглобина (Hb) к кислороду, которое для максимально возможного связывания кислорода в лёгких должно быть высоким, но уменьшаться для беспрепятственного высвобождения кислорода из Hb и поступления в ткани [20, 21]. Следует отметить, что первые сообщения о взаимосвязи между энергетическими/метаболическими процессами в эритроцитах и способностью Hb связывать, транспортировать и доставлять кислород к тканям были опубликованы более 50 лет назад [20, 22], но эти научные открытия, как и тот факт, что для выполнения своих функций эритроциты должны быть абсолютно «здоровыми» [23], в основном игнорируются. Например, увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ, гематологический показатель, который обязательно определяют у каждого пациента вне зависимости от жалоб) обычно связывают с появлением воспалительных процессов в организме [24], тогда как уменьшение отрицательного заряда мембраны эритроцитов (что и лежит в основе увеличения СОЭ), приводящее к структуральным и биохимическим нарушениям, агрегации эритроцитов, повышению вязкости крови, «застою» в капиллярах, что нарушает микроциркуляторный кровоток и снабжение тканей кислородом [25], обычно остаётся «за скобками». А эритроциты, являющиеся одним из важных компонентов в интегрированной системе транспорта кислорода (помимо сердечно-сосудистой и дыхательной систем), из-за видимой

«простоты» организации по-прежнему рассматриваются как маленькие «мешочки», наполненные Hb, который даже в нефизиологических условиях легко связывает кислород в лёгких и так же легко отдаёт его тканям. Такая точка зрения на безграничные возможности эритроцитов подтверждается в ситуациях, когда степень гипоксемии/гипоксии выявляется по измеряемым обычно в клинических условиях показателям SaO_2 (насыщение Hb кислородом в артериальной крови) и PaO_2 (парциальное давление кислорода). Отклонение от нормы хотя бы одного показателя высокоинтегрированной системы метаболических путей в эритроцитах [26] может увеличивать сродство Hb к кислороду и нарушить его переход в ткани. Это может привести к мультиорганной гипоксии [27, 28] и стойким когнитивным нарушениям [23, 29–31] даже при нормальных значениях SaO_2 и PaO_2 [32], что не учитывается во врачебной практике.

Следовательно, мы должны признать, что в настоящее время не существует инструмента для диагностики метаболических показателей в эритроцитах, связанных с нарушением их кислородтранспортной функции и с развитием энцефалопатии, возникающей под действием аммиака/аммония, концентрация которого в крови и мозге при многих патологиях может увеличиваться в десятки раз по сравнению с нормой [33–35].

ГЭ не является исключением. Несмотря на то что аммоний-индуцированная энцефалопатия, с одной стороны, сопровождается отклонениями от нормы многих гематологических параметров [36], влияющих на доставку кислорода в ткани, с другой – мультиорганной гипоксией [37] и в том числе сниженной оксигенацией мозга [38], неминуемо приводящей к патологии мозга [39] и прогрессированию стойкой когнитивной дисфункции [30], причинно-следственная связь между нарушением энергетического обмена в эритроцитах и нарушением их функций в настоящее время не установлена.

Для выявления дополнительных изменений внутриклеточных параметров метаболического/энергетического обмена эритроцитов, необходимых для более полной оценки эффективности их кислородтранспортной функции [20] и своевременного распознавания факторов риска развития аммоний-индуцированной энцефалопатии, мы измерили активность регуляторных ферментов и концентрацию метаболитов гликолиза и шунта Рапопорта–Люберинг в эритроцитах крыс с острой ГА. Для выявления участия NMDA-R исследования проводились с использованием неконкурентного антагониста рецепторов, МК-801.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы следующие реактивы: ацетат аммония, МК-801, NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , Tris, ТЭА, АТФ, АДП, ЭГТА, ЭДТА, фосфоэнолпируват, глюкоза, пируват, убаин, сапонин, миокиназа, пируваткиназа (ПК), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФДГ), α -целлюлоза, гемикристаллинцеллюлоза тип 50 – фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Набор для определения концентрации 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) – фирмы «Roche» (Австрия). Все остальные реагенты были отечественного производства квалификации «особо чистые» и «химически чистые».

Животные. В работе использовались крысы линии Wistar (половозрелые самцы) массой 210–230 г, содержащиеся в виварии при комнатной температуре, естественном режиме освещения, свободном доступе к корму и воде. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Животным 1 группы (группа «ацетат аммония») вводился ацетат аммония в виде однократной внутрибрюшинной инъекции (в/б) в сублетальной дозе 7 ммоль/кг, декапитация производилась, как в ранее выполненных исследованиях, через 15 мин после инъекции, обычно после прохождения двух судорожных эпизодов [16]. Этот временной интервал был выбран на основе наших предыдущих результатов, показавших, что влияние острой интоксикации аммонием на энергетический обмен мозга крыс можно чётко увидеть через 15 мин после инъекции [40]. Животным 2 группы (контроль) вводился в/б 0,9%-ный (m/v) NaCl в том же объёме, что и ацетат аммония. Декапитация животных производилась через 15 мин после инъекции. Физиологический раствор был выбран в качестве контрольного на основании наших предыдущих исследований, показавших, что введение ацетата натрия, так же как и введение физиологического раствора, не оказывает влияния на измеряемые показатели. Животным 3 группы (группа «МК-801») в/б вводился МК-801 в дозе 2,0 мг/кг, необходимой для полной блокировки рецепторов, и декапитация животных проводилась через 30 мин после инъекции. Животным 4 группы («МК-801 + ацетат аммония») вначале в/б вводился МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – раствор ацетата аммония в дозе 7 ммоль/кг. Декапитацию производили через 15 мин после введения ацетата аммония.

Получение плазмы крови и очищенных эритроцитов. Для получения плазмы и суспензии очищенных эритроцитов собранная при декапитации кровь (в качестве антикоагулянта использовался 130 mM 3Na-цитрат, pH 7,4) делилась на две части. Для получения плазмы крови форменные

элементы удалялись центрифугированием первой части крови в течение 10 мин при 1000 *g* (+4 °C). Полученный супернатант немедленно использовался для измерения концентрации свободно-го Hb.

Для очищения эритроцитов от лейкоцитов и тромбоцитов вторую часть крови пропускали через колонку, заполненную α-целлюлозой и гемикристаллинцеллюлозой тип 50 в соотношении 1 : 1 и уравновешенную 0,9%-ным (w/v) NaCl [41]. Кровь элюировали (1 : 5) при комнатной температуре раствором, содержащим 10 мМ КН₂РO₄, рН 7,4, 150 мМ NaCl. Эритроциты осаждали центрифугированием при +4 °C в течение 10 мин при 1000 *g* и дважды промывали раствором, содержащим 10 мМ КН₂РO₄, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,8 мМ глюкозу, 0,5 мМ К-ЭДТА (10 мин, +4 °C, 1500 *g*, 2000 *g*), и суспендировали в этом же растворе в соотношении 1 : 5.

Получение лизатов эритроцитов для определения активности ферментов. Очищенные от тромбоцитов и лейкоцитов эритроциты (1 мл) лизировали 2 мл гипоосмотического буфера (50 мМ ТЭА, рН 7,4, 0,15 мМ К-ЭГТА, 3 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,2% сапонина. Активность ферментов определяли в течение первых двух часов после получения лизатов. Пробы во время измерения хранились при +4 °C.

Определение активности ферментов в лизатах эритроцитов. Активность Na⁺/K⁺-АТФазы (КФ 3.6.3.9), гексокиназы (ГК, КФ 2.7.1.1), фосфофруктокиназы (ФФК, КФ 2.7.1.11), ПК (КФ 2.7.1.40), ГАФДГ (КФ 1.2.1.12) и ЛДГ (КФ 1.1.1.27) определяли спектрофотометрически по скорости образования NAD⁺ или NADPH при 340 нм с помощью методов ферментативного анализа эритроцитов, разработанных международным комитетом по стандартизации в гематологии [41] и подробно описанных нами ранее [42].

Получение экстрактов эритроцитов для определения концентрации метаболитов. Очищенные эритроциты смешивали с охлажденной смесью (–20 °C) 6% HClO₄/40% C₂H₅OH в соотношении 1 : 10. Центрифугировали 5 мин при температуре +4 °C при 10 000 *g*. Осадок удаляли, рН супернатанта доводили до 5–6, используя 30%-ный (m/m) КОН и сухой КНСO₃. Осадок перхлората калия удаляли центрифугированием при тех же режимах. Прозрачный супернатант немедленно использовали для определения концентрации метаболитов.

Определение концентрации АТФ, АДФ, АМР, лактата, пирувата и 2,3-ДФГ в экстрактах эритроцитов. Концентрация адениннуклеотидов, лактата и пирувата определялась по стандартным спектрофотометрическим методам [43], подробно описанным нами ранее [42].

Энергетический заряд (ЭЗ) рассчитывали по уравнению Аткинсона [44]: $ЭЗ = (АТФ + 0,5 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМР)$.

Отношение NAD⁺/NADH рассчитывали по методу Williamson et al., 1968 [45], с учётом константы равновесия лактатдегидрогеназной реакции, равной $1,11 \times 10^4$.

Концентрация 2,3-ДФГ определялась спектрофотометрически при помощи коммерческого набора «Roche» (10 148 334 001, Германия) при сочетанном действии ферментов фосфоглицератмутаза, фосфоглицераткиназы, ГАФДГ, триозофосфатизомеразы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, согласно прилагаемой инструкции. Концентрация всех измеряемых субстратов выражалась в микро-моль/литр клеток (мкМ)

Определение концентрации Hb в крови и плазме. Осмотическая резистентность и морфологический анализ эритроцитов. Концентрацию Hb измеряли на гематологическом анализаторе DH 36 Vet («Dymind», Китай). Для исследования использовали цельную стабилизированную 3Na⁺-цитратом кровь или плазму. Степень гемолиза эритроцитов рассчитывали по формуле: % гемолиза = $[(1 - Hct) \times \text{свободный Hb (г/дл)} \times 100] / \text{общий Hb (г/дл)}$, Hct – гематокрит [46].

Морфологический анализ выполняли флуоресцентной визуализацией клеток с помощью системы CELENA® S Digital Imaging System («LogosBio», Республика Корея), объектив ×40. Нативные мазки из цельной крови готовили стандартным способом на обезжиренных предметных стёклах путём высушивания на воздухе при комнатной температуре и использовали без дополнительной фиксации и окраски.

Осмотическая резистентность эритроцитов определялась по степени лизиса эритроцитов после их инкубации в растворе NaCl различной концентрации (от 0 до 154 мМ (0,9%) NaCl). Степень лизиса эритроцитов анализировалась спектрофотометрически путём измерения оптической плотности по высвобождению Hb при 540 нм после остановки гемолиза путём добавления к пробам равного объёма NaCl в концентрации, необходимой для восстановления изотоничности. Для количественной оценки осмотической резистентности эритроцитов учитывалась концентрация NaCl, при которой наблюдался минимальный (первоначальный) и 50%-ный лизис клеток.

Статистический анализ выполняли с помощью компьютерной программы Prizm V8 («GraphPad», Сан-Диего, США). Результаты выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения переменных подтвердили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Различия между

группами анализировали с использованием *t*-теста Стьюдента, а при множественных сравнениях – метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние аммиака/аммония и МК-801 на активность регуляторных ферментов гликолиза эритроцитов крыс. В первой части исследования [16] мы показали, что содержание аммония в эритроцитах крыс контрольной группы составляло $0,300 \pm 0,038$ мМ, что входит в допустимый диапазон значений, соответствующих физиологической норме для эритроцитов этих животных [47]. Концентрация аммония после одиночной инъекции МК-801 не отличалась от контрольного значения, тогда как после введения ацетата аммония в дозе 7 ммоль/кг уровень аммония в эритроцитах животных увеличился до $3,602 \pm 0,126$ мМ ($p < 0,001$). При сочетанном введении МК-801 с ацетатом аммония концентрация аммония в эритроцитах снижалась (20%, $p < 0,05$), но оставалась достаточно высокой ($3,320 \pm 0,06$ мМ) по сравнению с контролем, что делало эритроциты, лишённые аммоний-детоксицирующих ферментов, наиболее восприимчивыми (по сравнению с другими не-нейрональными тканями)

к аммоний-индуцированному окислительному стрессу [48].

Окислительный стресс, как известно, нарушает взаимосвязь между кислородтранспортной функцией эритроцитов и их гликолитической системой [49], метаболиты и ферменты которой, как уже было сказано, контролируют сродство Нb к кислороду [20]. Поэтому для выявления дополнительных показателей, необходимых для оценки способности эритроцитов доставлять кислород тканям, мы вначале выяснили, связано ли накопление аммиака/аммония в эритроцитах, оснащённых NMDA-R, с нарушением гликолиза, главного метаболического пути, необходимого для поддержания функционального состояния и жизнеспособности эритроцитов в целом. Для этого мы измерили активность основных регуляторных ферментов гликолиза ГК, ФФК, ПК, а также ГАФДГ и ЛДГ.

Результаты определения активности ферментов гликолиза в эритроцитах крыс разных исследуемых групп суммированы на рис. 1.

Как видно из рис. 1 (а–д), введение ацетата аммония снижало активность ферментов в эритроцитах животных в разной степени. Так, активность ГК, ФФК, ПК и ГАФДГ снижалась на 38% ($p < 0,001$), 26% ($p < 0,001$), 22% ($p < 0,001$), 30% ($p < 0,001$) соответственно, тогда как значения

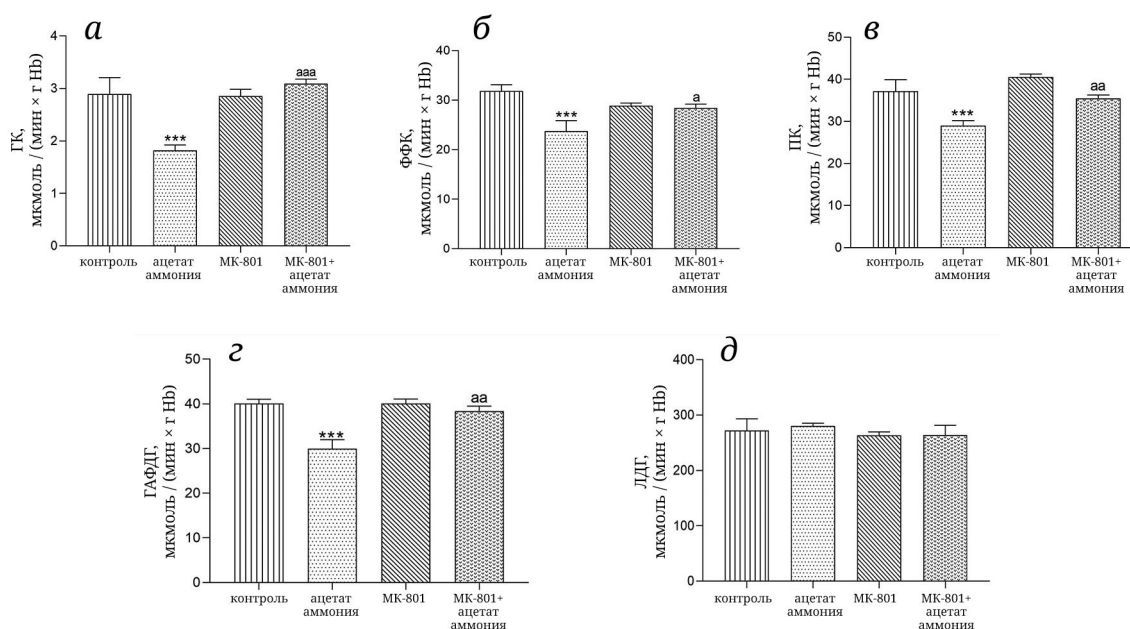


Рис. 1. Активность ГК (а), ФФК (б), ПК (в), ГАФДГ (г) и ЛДГ (д) в эритроцитах крыс исследуемых групп ($n = 10$ для каждой группы). Крысам в/б вводили ацетат аммония (7 ммоль/кг, группа «ацетат аммония»), МК-801 (2 мг/кг в/б) вводился в одиночной инъекции (группа «МК-801») и за 15 мин до инъекции ацетата аммония (группа «МК-801 + ацетат аммония»). Крысам контрольной группы («контроль») вводился физиологический раствор. Время декапитации животных и методы определения активности ферментов указаны в разделе «Материалы и методы». Активность ферментов выражена в мкмоль/(мин × г Нb). Результаты представлены в виде «среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM)». *** $p < 0,001$ по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$, aa – $p < 0,01$, aaa – $p < 0,001$ по сравнению с животными группы «ацетат аммония». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони

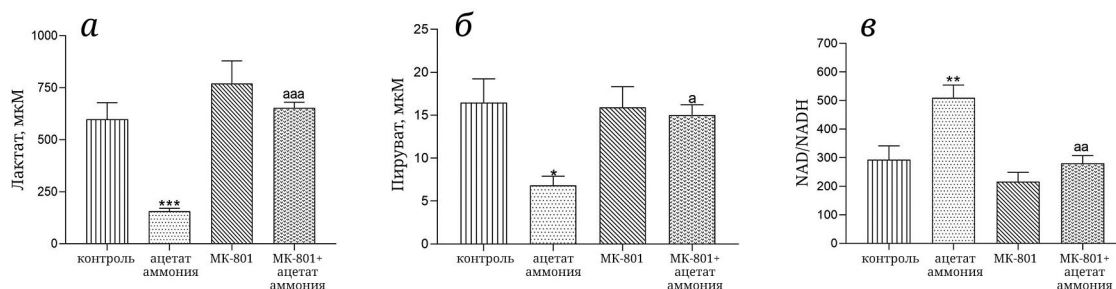


Рис. 2. Концентрация лактата (а), пирувата (б) и расчётное отношение $NAD^+/NADH$ (в) в эритроцитах животных исследуемых групп ($n = 10$ для каждой группы). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Методы определения концентрации пирувата и лактата указаны в разделе «Материалы и методы». Концентрация метаболитов выражена в мкмоль/литр клеток (мкМ). Отношение $NAD^+/NADH$ рассчитывали по методу Williamson et al. [45]: $NAD^+/NADH = [\text{пируват}]/[\text{лактат}] \times 1/k$, где k – константа равновесия лактатдегидрогеназной реакции, равная $1,11 \times 10^4$. Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ SEM». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$, aa – $p < 0,01$, aaa – $p < 0,001$ по сравнению с животными группы «ацетат аммония». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони

активности ЛДГ при аммиачной интоксикации не отличались от измеренных в эритроцитах контрольных животных (рис. 1, д). Введение МК-801 поддерживало активность всех измеряемых ферментов в пределах, характерных для контрольных значений. Совместное введение МК-801 с ацетатом аммония восстанавливало активность всех измеряемых ферментов до контрольного уровня и свидетельствовало о том, что аммоний-индуцированное торможение ферментов гликолиза опосредовано активацией NMDA-R.

Дополнительным подтверждением NMDA-R-зависимого торможения гликолитического потока являлось также восстановление до контрольных значений резко сниженной концентрации лактата и пирувата и увеличенного отношения $NAD^+/NADH$ в эритроцитах животных с ГА под воздействием МК-801, введённого совместно с ацетатом аммония (рис. 2, а–в).

Эти данные частично объясняют причины торможения гликолитического потока, связанного в основном с нарушением метаболического контроля в эритроцитах крыс с ГА, приводящим к дисбалансу отношения $NAD^+/NADH$ (рис. 2, в) из-за недостатка пирувата (рис. 2, б) и $NADH$, необходимых для регенерации NAD^+ в ЛДГ-реакции и возобновления гликолиза на стадии ГАФДГ-реакции [50].

Согласно общепринятому мнению, скорость метаболизма глюкозы в эритроцитах регулируется в основном адсорбционным механизмом [51], основанным на обратимом связывании ферментов гликолиза с трансмембранным белком полосы 3 (band 3). Суть этого механизма состоит в том, что опосредованное посттрансляционными модификациями белка полосы 3 [52] отсоединение ферментов от белка (активация ферментов) или их присоединение к белку (неактивная форма ферментов) [53] позволяет зрелым эритроцитам,

лишённым митохондрий, мгновенно адаптивно реагировать на эндогенные или появляющиеся в кровяном русле факторы и, переключая поток глюкозы от гликолиза на пентозофосфатный путь (ПФП) (и в обратном направлении), удерживать состояние своего энергетического обмена и антиоксидантной системы в пределах, необходимых для формирования многоуровневого адаптивного ответа [54]. Из этого следует, что снижение активности ферментов гликолиза в эритроцитах крыс с ГА может быть адаптивным ответом, поддерживающим внутриклеточный антиоксидантный баланс путём торможения гликолитического потока и активации ПФП [55], обеспечивающего синтез $NADPH$, необходимого для предотвращения перехода ферроформы (Fe^{2+}) Hb в ферриформу (Fe^{3+}) в присутствии активных форм кислорода, накопившихся в эритроцитах животных с ГА [56].

Однако, как показали наши недавние исследования, активность ключевого фермента ПФП, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), в эритроцитах крыс с ГА достоверно снижалась по сравнению с контролем. Совместно с резким падением отношения $NADPH/NADP^+$ и $GSH/GSSG$ это свидетельствовало о торможении ПФП, что являлось одной из причин трёхкратного накопления перекиси водорода и развития окислительного стресса в эритроцитах гипераммониемированных животных [16], что, в свою очередь, исключает возможность рассматривать снижение активности гликолитических ферментов при острой ГА (рис. 1) даже в виде краткосрочного адаптивного ответа эритроцитов.

С другой стороны, обнаруженное нами участие NMDA-R в аммоний-индуцированном торможении гликолиза даёт возможность предположить наличие взаимосвязи между Ca^{2+} -зависимым сигнальным каскадом, запускаемым гиперактивными NMDA-R и приводящим к усиленному

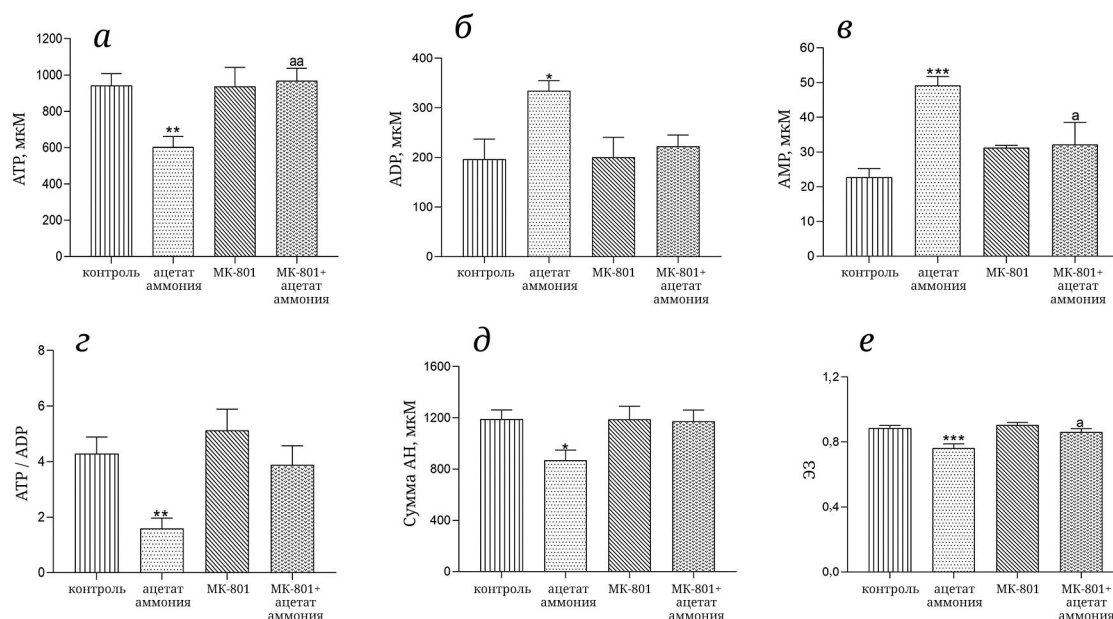


Рис. 3. Концентрация АТФ (а), АДФ (б), АМР (в), отношение АТФ/АДФ (г), их суммарное содержание, АН (д), и ЭЗ (е) в эритроцитах крыс исследуемых групп ($n = 10$ для каждой группы). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Методы определения концентрации АТФ, АДФ, АМР указаны в разделе «Материалы и методы». Концентрация метаболитов выражена в мкмоль/литр клеток (мкМ). Энергетический заряд рассчитывали по уравнению Аткинсона [44]: $ЭЗ = (АТФ + 0,5 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМР)$. Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ SEM». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$, аа – $p < 0,01$ по сравнению с животными группы «ацетат аммония». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони

образованию $NO^{\bullet}$ в эритроцитах [13], и $NO^{\bullet}$ -опосредованной посттрансляционной модификацией белка полосы 3 [52], регулирующей скорость метаболизма глюкозы [54]. Исходя из этого, можно предположить, что одна из причин торможения регуляторных ферментов гликолиза в эритроцитах животных с ГА в условиях окислительного стресса может быть связана с $NO^{\bullet}$ -зависимым ингибированием фосфотирозинкиназы, что параллельно с нитрозилированием по остаткам тирозина белка полосы 3 приводит к необратимому торможению гликолиза [57]. Не исключено также, что $NO^{\bullet}$ и его производные могут оказывать прямое ингибирующее действие на ферменты гликолиза в эритроцитах [58]. Хотя, если учесть множественные причины, приводящие к торможению гликолитического пути, включая ингибирование ферментов продуктами реакций [59] и посттрансляционными модификациями [60], влияние рН, наличие дезокси-Нб, конкурирующего с ферментами гликолиза за места связывания с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 [54], состояние глюкозного транспортера [61], наличие в крови гормонов [62] и многие другие факторы, становится очевидным, что для выявления механизмов, ответственных за торможение утилизации глюкозы в эритроцитах в условиях окислительного стресса, обнаруженного нами у животных с ГА, необходимы специальные, более

углублённые исследования (и, конечно, проведённые с учётом обнаруженного участия NMDA-R в аммоний-индуцированном торможении гликолитического потока).

Влияние аммиака/аммония и МК-801 на содержание адениннуклеотидов в эритроцитах крыс. Отличительной особенностью анаэробного гликолиза в эритроцитах является то, что это основной путь производства АТФ, который используется клетками для поддержания ряда жизненно важных функций. Поэтому при обнаруженном торможении гликолиза в эритроцитах крыс с ГА (рис. 1, 2) снижение концентрации АТФ и общего пула адениннуклеотидов было ожидаемым. На рис. 3 (а–д) представлены результаты определения концентрации АТФ, АДФ, АМР, их суммарное содержание (АН), а также отношение АТФ/АДФ и расчётное значение энергетического заряда (ЭЗ), характеризующего энергетический статус клеток.

Как видно из рис. 3, в эритроцитах крыс с ГА в соответствии со снижением активности гликолитического потока наблюдалось достоверное снижение внутриклеточной концентрации АТФ (40%, $p < 0,01$). Усиленный гидролиз АТФ приводил к увеличению концентрации АДФ и АМР на 69% ($p < 0,05$) и 113% ($p < 0,001$) соответственно (рис. 3, а–в) и к трёхкратному уменьшению отношения АТФ/АДФ (рис. 3, г, $p < 0,01$). Сумма АН (рис. 3, д) и ЭЗ (рис. 3, ж) при сравнении с контролем

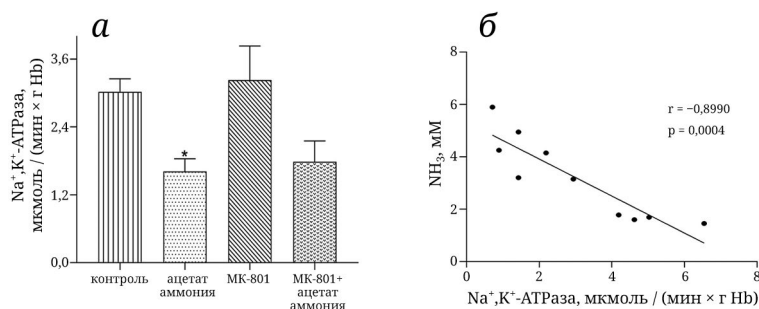


Рис. 4. Активность Na⁺,K⁺-АТФазы в эритроцитах крыс исследуемых групп ($n = 10$ для каждой группы) (а). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Метод определения активности Na⁺,K⁺-АТФазы указан в разделе «Материалы и методы». Активность фермента выражена в мкмоль/мин × г Hb. Данные выражены в виде «среднее значение ± SEM». * $p < 0,05$ по сравнению с животными контрольной группы. Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони. Для выявления взаимосвязи между концентрацией аммония в эритроцитах и активностью Na⁺,K⁺-АТФазы использовался коэффициент корреляции Пирсона (б). Анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V8. Достоверная отрицательная корреляция между концентрацией аммония и активностью Na⁺, K⁺-АТФазы в эритроцитах крыс с ГА ($r = -0,899$, $p = 0,0004$)

снижались на 27% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,001$) соответственно. Введение МК-801 в виде однократной инъекции не изменяло (по отношению к контролю) эти показатели, а при сочетанном действии МК-801 с ацетатом аммония наблюдалось полное восстановление до контрольных значений всех измеренных показателей адениновых нуклеотидов (рис. 3, а–е). Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышенная утилизация АТР, некомпенсированная заторможенным гликолизом и приводящая к нарушению энергетического обмена в эритроцитах животных с ГА, опосредована гиперактивацией NMDA-R.

Влияние аммиака/аммония и МК-801 на активность Na⁺,K⁺-АТФазы в эритроцитах крыс. Большая часть энергии АТР, образуемой в эритроцитах в процессе гликолиза, используется для активации Na⁺,K⁺-АТФазы [63], основная роль которой заключается в поддержании градиента концентраций Na⁺ и K⁺, необходимого для регуляции водного гомеостаза, объёма, формы клеток, играющих важную роль в сохранении функциональных свойств эритроцитов [64]. Для выявления взаимосвязи между NMDA-R-зависимым аммоний-индуцированным гидролизом АТР и функциональной способностью Na⁺,K⁺-АТФазы мы измерили активность этого фермента в эритроцитах крыс всех исследуемых групп. Данные представлены на рис. 4.

Как видно (рис. 4, а), в эритроцитах животных, получивших сублетальную дозу ацетата аммония, активность Na⁺,K⁺-АТФазы почти в 2 раза ниже ($p < 0,05$), чем у животных контрольной группы. МК-801 ни в одиночной инъекции, ни при сочетанном введении с ацетатом аммония не влиял на активность фермента. Это указывало на то, что аммоний-индуцированное торможение Na⁺,K⁺-АТФазы в эритроцитах не зависит от NMDA-R, а связано исключительно с действием

аммония, что подтверждалось наличием достоверной отрицательной корреляции между концентрацией аммония, накопившегося в эритроцитах животных с ГА, и активностью Na⁺,K⁺-АТФазы ($r = -0,899$, $p = 0,0004$, рис. 4, б).

В биологических жидкостях аммиак существует в двух формах: в виде NH₃, незаряженной липофильной формы, что обеспечивает его быструю проницаемость через мембрану эритроцитов [65], и в протонированной форме, NH₄⁺ (ион аммония), транспорт которого в клетки более медленный (по сравнению с газообразным NH₃) [66] и осуществляется при помощи специфических транспортёров, локализованных на мембране эритроцитов [67]. Если учесть, что транспорт NH₄⁺ в эритроциты животных может приводить к снижению внутриклеточной концентрации K⁺ и увеличению концентрации Na⁺ и Cl⁻ [68], то можно предположить, что одной из причин аммоний-индуцированного снижения активности Na⁺,K⁺-АТФазы является резкое снижение концентрации АТР, которое не удовлетворяет повышенную потребность в энергии, необходимой для функциональной активности фермента, направленной на поддержание ионного градиента, значительно нарушенного усиленным транспортом обеих форм аммиака в эритроциты животных с ГА. По-видимому, NH₄⁺-зависимое закисление внутриклеточной среды эритроцитов (торможение гликолиза), сменяющее защелачивание, вызванное первоочередным транспортом NH₃ в клетки [67], играет важную роль в торможении гликолиза, снижении уровня АТР и торможении Na⁺,K⁺-АТФазы в эритроцитах животных с ГА [69]. Также хорошо известно, что активность фермента в значительной степени ингибируется в условиях окислительного стресса [70], что частично объясняется многочисленными свободнорадикальными

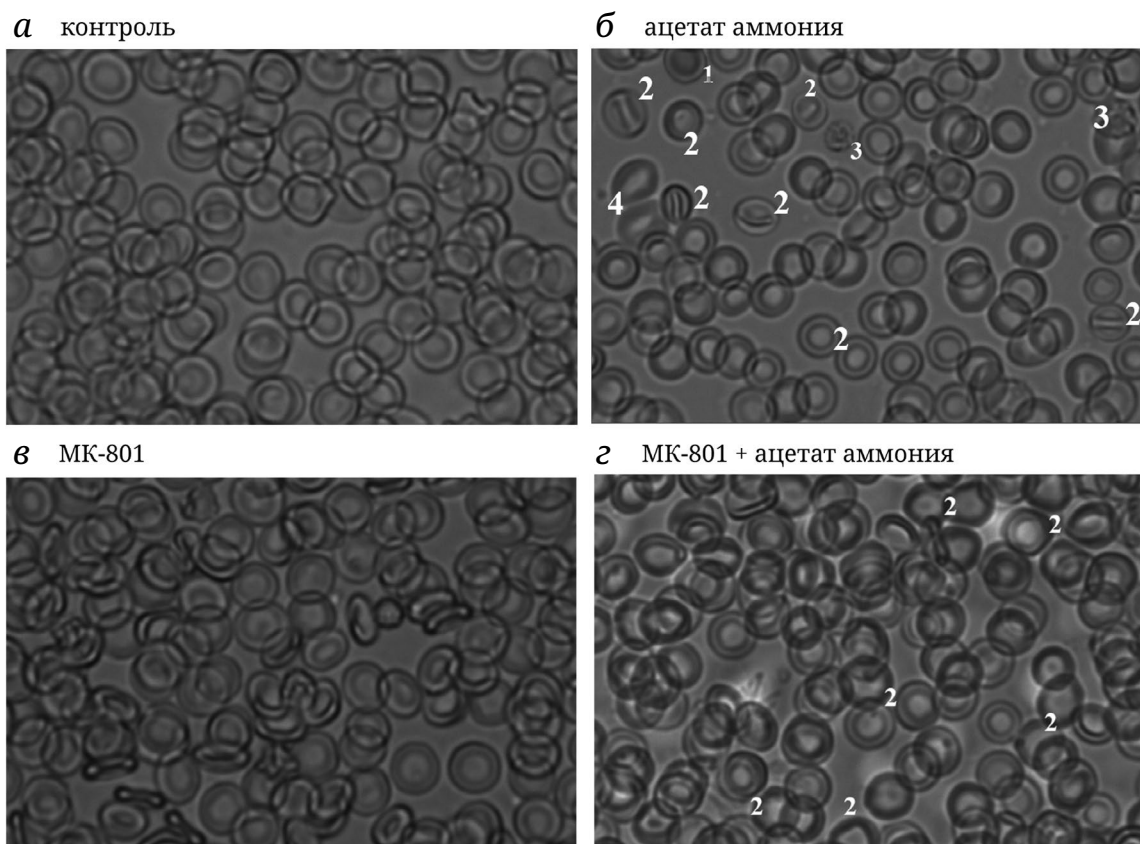


Рис. 5. Изменение морфологии эритроцитов у крыс с ГА. Влияние МК-801. Условия введения препаратов, доза, время декапитации животных ($n = 6$ для каждой группы) указаны в подписи к рис. 1. Морфологический анализ выполняли флуоресцентной визуализацией клеток с помощью системы CELENA® S Digital Imaging System («LogosBio»), объектив $\times 40$. Способ подготовки клеток для микроскопии указан в разделе «Материалы и методы». 1 – Дискоциты-нормоциты, 2 – стоматоциты (наличие поперечной щели или белого пятна в центре), 3 – эхиноциты, 4 – овалоциты

модификациями, приводящими к конформационным изменениям и нарушению функции Na^+, K^+ -АТФазы [71]. Это хорошо согласуется с данными, показывающими, что неспецифическое ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы в условиях окислительного стресса характерно не только для эритроцитов пациентов с заболеваниями печени [72], но и для пациентов со многими другими патологиями [73].

Интересно, что несмотря на то что механизмы торможения Na^+, K^+ -АТФазы являются множественными и могут различаться в зависимости от конкретных условий [64], блокада Na^+/K^+ -помпы в эритроцитах, наблюдаемая при многих патологиях, обычно приводит к изменению формы, ухудшению способности к деформации и усиленному лизису эритроцитов в кровяном русле [74].

В связи с этим следует отметить: хотя и общепризнано, что основной причиной ГЭ является ГА, и более века известно, что соли аммония увеличивают объем эритроцитов и вызывают их лизис [75], наличие внутрисосудистого гемолиза у пациентов с ГЭ в основном объясняется повышенным давлением в воротной вене (портальная гипертензия), кровотечением из варикозно-рас-

ширенных вен желудочно-кишечного тракта [76], травмированием вены при взятии крови на анализ [77] и многими другими причинами [78], тогда как роль аммиака/аммония в лизисе эритроцитов *in vivo* практически не рассматривается в повседневной клинической практике. Для выявления недостающего звена следующий этап наших исследований был связан с изучением влияния ГА на морфологию циркулирующих эритроцитов, на их осмотическую резистентность, степень лизиса и связанную с ней концентрацию свободного Hb в плазме крови животных.

Влияние ГА и МК-801 на морфологию, концентрацию Hb и степень лизиса эритроцитов крыс. Микроскопическое исследование мазков крови показало, что для популяции эритроцитов животных с ГА характерна некоторая неоднородность, возникающая из-за трансформации дискоцитов-нормоцитов (рис. 5, а) в стоматоциты (рис. 5, б (2)) – клетки, практически не способные не только поддерживать прочность мембран, но и деформироваться в кровотоке [79]. МК-801 в одиночной инъекции заметно не изменял морфологию нормальных клеток (рис. 5, в), а при со-

четанном действии с ацетатом аммония только частично способствовал восстановлению стоматоцитов до дисковидной формы, в результате чего, как можно видеть, большая часть клеток в кровотоке животных с ГА в присутствии МК-801 оставалась в виде набухших стоматоцитов (рис. 5, з (2)).

Это свидетельствовало о том, что аммоний-индуцированные морфологические изменения и переход нормальных эритроцитов в стоматоциты в кровяном русле животных с ГА не зависят от NMDA-R, а связаны в основном с действием аммиака/аммония, накопившегося в эритроцитах животных. Согласно литературным данным, причины появления стоматоцитов в кровяном русле животных и человека множественны [80]. В основном считается, что трансформация нормальных дискоцитов в стоматоциты связана со сниженным транспортом K^+ в эритроциты [81] и усиленным входом Na^+ , приводящим к аномально высокому содержанию воды в клетках и их лизису в кровотоке [82]. Учитывая, что концентрация аммония у животных с ГА увеличивалась более чем в 10 раз по сравнению с контролем [16] и что его транспорт в эритроциты, как было сказано выше, сопряжен со снижением внутриклеточной концентрации K^+ и увеличением концентрации Na^+ [68], можно предположить, что одна из причин образования стоматоцитов, набухших прелизисных клеток, в кровотоке животных с ГА связана с аммоний-индуцированным нарушением градиента концентраций Na^+ и K^+ , способствующим усиленному входу воды, что, как было обнаружено, не зависит от активации NMDA-R. Аммоний-индуцированные нарушения, такие как

совместный с NH_4^+ избыточный котранспорт Cl^- , снижение pH [83], конформационные изменения интегральных мембранных белков [84], ингибирование активности Na^+, K^+ -АТФазы [64], снижение концентрации АТФ [85], окислительный стресс [16, 86], прямо или косвенно вызывающие усиленный вход воды в эритроциты, также могут быть связаны с образованием стоматоцитов в кровяном русле животных с ГА.

Полученные результаты находятся в соответствии с многочисленными литературными данными, показавшими, что появление атипичной формы эритроцитов, в частности, стоматоцитов, наблюдается в общей популяции эритроцитов пациентов с различными заболеваниями печени [78, 87]. Однако в связи с этим необходимо отметить: несмотря на то что стоматоциты являются клетками, легко лизирующими в кровяном русле [88], вопрос о роли накопившегося в эритроцитах аммония в лизисе клеток *in vivo* при патологиях, сопровождающихся ГА, как было отмечено выше, в настоящее время всё ещё остаётся открытым. Поскольку концентрация свободного Hb в плазме крови является одним из главных показателей внутрисосудистого гемолиза [89], мы измерили концентрацию этого показателя и с учётом других гематологических параметров рассчитали степень лизиса эритроцитов (% гемолиза) [90], а затем по степени устойчивости к сниженной концентрации NaCl определили осмотическую резистентность эритроцитов животных всех исследуемых групп. Данные представлены в табл. 1.

Как видно из приведённых данных, величина Hct, концентрация общего и свободного Hb,

Таблица 1. Влияние ацетата аммония и МК-801 на величину гематокрита, концентрацию общего и свободного Hb, осмотическую резистентность и степень лизиса эритроцитов (% гемолиза)

	Контроль	Ацетат аммония	МК-801	МК-801 + ацетат аммония
Концентрация Hb в крови, г/100 мл	13,35 ± 0,1753	11,49 ± 0,1339***	12,81 ± 0,1833	12,43 ± 0,2930 ^{a,*}
Гематокрит, %	52,24 ± 1,391	43,30 ± 2,253***	52,00 ± 0,8876	46,03 ± 0,8048*
Концентрация свободного Hb в плазме, г/100 мл	0,096 ± 0,008	0,55 ± 0,11***	0,084 ± 0,009	0,12 ± 0,013***
% гемолиза	0,32 ± 0,02	2,2 ± 0,12***	0,30 ± 0,02	0,64 ± 0,04 ^{aaa,**}
Осмотическая резистентность				
Концентрация NaCl (%), вызывающая 50%-ный лизис	0,41 ± 0,007	0,49 ± 0,011**	0,42 ± 0,02	0,44 ± 0,016

Примечание. Введение препаратов, доза, время декапитации животных ($n = 10$ для каждой группы) указаны в подписи к рис. 1. Концентрацию Hb, осмотическую резистентность и процент гемолиза определяли, как указано в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее ± SEM». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с животными контрольной группы; ^a – $p < 0,05$, ^{aaa} – $p < 0,001$ по сравнению с животными группы «ацетат аммония».

осмотическая устойчивость эритроцитов крыс контрольной группы входят в допустимый диапазон значений, соответствующих физиологической норме для этих животных [91].

У животных с ГА наблюдалось достоверное и почти равнозначное уменьшение содержания общего Hb и Hct на 14% (** $p < 0,001$) и 17% (* $p < 0,05$) соответственно, что в совокупности с окрашенной в красный цвет плазмой свидетельствовало о происходящем внутрисосудистом лизисе эритроцитов и выходе Hb в плазму. Действительно, прямые измерения показали, что содержание свободного Hb в плазме и степень лизиса эритроцитов животных с ГА увеличивались тоже почти в одинаковой степени (в 6–7 раз, *** $p < 0,001$) при сравнении с контролем (табл. 1). Большая осмотическая хрупкость эритроцитов животных с ГА под воздействием накопившегося в них аммиака/аммония подтверждалась данными, показавшими, что первоначальный (6%) лизис клеток был зарегистрирован в растворе с достаточно высокой концентрацией NaCl, равной 0,7%, тогда как минимальный лизис эритроцитов контрольных животных (1,6%) наблюдался в присутствии 0,58%-ного раствора NaCl (не показано). 50%-ный лизис эритроцитов животных с ГА также происходил при более высокой концентрации NaCl ($0,49 \pm 0,011\%$, * $p < 0,05$) при сравнении с контролем ($0,41 \pm 0,0073\%$) (табл. 1).

При одиночной инъекции МК-801 не влиял на измеряемые показатели, и они соответствовали контрольным значениям (табл. 1). Введённый совместно с ацетатом аммония МК-801 частично восстанавливал аммоний-индуцированное нарушение гематологических параметров, но их значения оставались достоверно завышенными по сравнению с контролем. Можно видеть, что при сниженном по отношению к контролю содержании общего Hb, Hct на 7% (* $p < 0,05$) и 12% (* $p < 0,05$) соответственно и повышенной концентрации свободного Hb (25%, *** $p < 0,001$) степень (%) внутрисосудистого гемолиза эритроцитов животных с ГА в присутствии МК-801 оставалась двукратно завышенной ($0,64 \pm 0,04$, ** $p < 0,01$) по сравнению с контролем ($0,32 \pm 0,02$, *** $p < 0,001$). Полученные данные указывают на то, что морфологические изменения, а также нарушение регуляции объёма клеток, осмотической резистентности и усиленный вход воды [92], способствующий внутрисосудистому гемолизу эритроцитов и накоплению свободного Hb в плазме крови животных с ГА, являются результатом токсического действия аммиака/аммония (частично сопряжённого с гиперактивными NMDA-R), который усиленно транспортируется *in vivo* в эритроциты крыс с ГА. Не исключено, что в дестабилизирующем действии мембран и последующем лизисе эритро-

цитов могут участвовать и окисленные формы Hb, образуемые в условиях окислительного стресса [93] в эритроцитах животных с ГА [16]. В совокупности, согласно литературным данным, обнаруженные нарушения могут приводить к увеличению вязкости крови, ухудшению кровотока в микроциркуляторном русле [94], нарушению связывания и освобождения кислорода Hb и, следовательно, к гипоперфузии [95], которая лежит в основе мультиорганных повреждений [89] и в том числе неврологических расстройств и когнитивных нарушений [96, 97], которые к тому же могут прогрессировать под действием токсических эффектов внеклеточного Hb [98].

В целом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что морфофункциональные нарушения эритроцитов и гемоглобинемию, вызванные аммоний-индуцированным нарушением высокоинтегрированной системы метаболических путей, следует рассматривать как дополнительный системный «эритроцитарный» патогенетический фактор, приводящий к прогрессированию мультиорганной гипоксии [99] при ГА.

Изменение концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах гипераммониемированных крыс. Влияние МК-801. Другим эритроцитарным маркером нарушенной оксигенации тканей является 2,3-ДФГ, который образуется в шунте Рапопорта–Люберинг, обходной стадии гликолиза. Снижая сродство Hb к кислороду [100], 2,3-ДФГ обеспечивает облегчённое высвобождение кислорода из комплекса с Hb и его переход в ткани. Для дополнительной оценки кислородтранспортной функции эритроцитов далее мы выяснили, как изменяется концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах животных с ГА, для которых характерна сниженная скорость гликолитического потока (рис. 1, 2), и какова роль МК-801 в поддержании нормальной внутриклеточной концентрации этого метаболита.

Полученные данные суммированы на рис. 6. Как можно видеть, концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ГА уменьшалась достоверно (20%, *** $p < 0,001$) при сравнении с контролем. Одиночная инъекция МК-801 не влияла на стационарную концентрацию этого метаболита, а совместное введение МК-801 с ацетатом аммония не восстанавливало концентрацию 2,3-ДФГ до контрольного значения, и она оставалась такой же сниженной, как и в эритроцитах животных с ГА (рис. 6).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что снижение концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ГА происходит независимо от сигнального каскада, запускаемого гиперактивными NMDA-R, и связано исключительно с действием накопившегося в клетках аммиака/аммония, что дополнительно подтверждалось достоверной от-

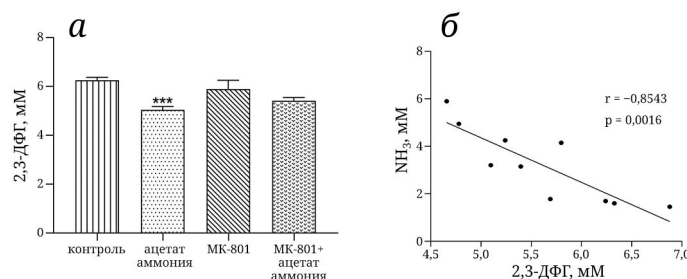


Рис. 6. Концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс исследуемых групп ($n = 10$ для каждой группы) (а). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Методы определения концентрации 2,3-ДФГ указаны в разделе «Материалы и методы». Концентрация метаболита выражена в ммоль/литр клеток (мм). Данные выражены в виде «среднее значение $\pm$ SEM». *** $p < 0,001$ по сравнению с животными контрольной группы. Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони. Для выявления взаимосвязи между концентрацией аммония в эритроцитах и концентрацией 2,3-ДФГ использовался коэффициент корреляции Пирсона (б). Анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V8. Достоверная отрицательная корреляция между концентрацией аммония и активностью 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ГА, $r = -0,854$, $p = 0,0016$

рицательной корреляционной связью ($r = -0,854$, $p = 0,0016$) между этими показателями (рис. 6, б). Если учесть, что активность фермента дифосфоглицератмутаза (ДФГМ), катализирующей образование 2,3-ДФГ из 1,3-дифосфоглицерата (1,3-ДФГ), резко тормозится при уменьшении внутриклеточного pH [101], то можно предположить, что роль аммиака/аммония в ингибировании ДФГМ, как и других ферментов гликолиза (рис. 1), не прямая, а связана, как уже было сказано выше, с закислением внутриклеточной среды эритроцитов, вызванным транспортом NH_4^+ в клетки [67]. Повышенная концентрация ADP, обнаруженная в эритроцитах крыс с ГА (рис. 3, б) и перенаправляющая 1,3-ДФГ в реакцию, катализируемую фосфоглицераткиназой, по-видимому, также может быть косвенным скоростью-лимитирующим фактором при синтезе 2,3-ДФГ [102]. NO-Радикал ($\text{NO}^\bullet$), образуемый в избытке при окислительном стрессе [103] в результате каталитического действия эндотелиальной [104] и эритроцитарной NO-синтазы [105], тоже может подавлять синтез 2,3-ДФГ, поскольку ингибирует ГАФДГ, катализирующую реакцию образования 1,3-ДФГ [106].

Следует также отметить, что сходство между обнаруженными нами характеристиками эритроцитов животных с ГА с характеристиками эритроцитов пациентов с энзимопатиями [107], диабетической нейропатией [108], эндотоксиновым шоком [109], синдромом Дауна [110], спорадической формой болезни Альцгеймера [31, 42], а также у пожилых людей [111], связанными [112] или не связанными с ГА [113], позволяет сделать вывод о наличии дополнительных и неизвестных в настоящее время регуляторов синтеза 2,3-ДФГ.

Конечно, помимо 2,3-ДФГ на сродство Hb к кислороду могут влиять и другие факторы, такие как pH, pCO_2 , pO_2 , Cl^- , АТР, Mg^{2+} , Pi [114], конформация и структура Hb, температура [115]. Однако

общепризнано, что 2,3-ДФГ является первоочередным биологическим индикатором тканевой гипоксии [116], сопрягающим метаболизм эритроцитов с системным кислородзависимым метаболическим гомеостазом, лежащим в основе жизнедеятельности всех тканей и органов организма.

Выявленная нами высокая восприимчивость эритроцитов крыс к повреждающему действию аммиака/аммония указывает на то, что нарушение морфологических характеристик, показателей энергетического обмена и антиоксидантного статуса [16] эритроцитов является важнейшим недостающим сигнальным звеном, предупреждающим о нарушении оксигенации тканей, которая может привести к возникновению неврологических расстройств при ГЭ [117], сопровождающейся ГА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов мы сделали следующий вывод: при рассмотрении жизнедеятельности клеток центральной нервной системы в изоляции от интегрированной системы транспорта кислорода упускается из виду, что мозг имеет самый высокий уровень окислительного метаболизма [118] и при ограниченных запасах кислорода [39] требует постоянного снабжения насыщенной кислородом кровью [119, 120].

Эритроциты являются единственными клетками в интегрированной системе транспорта кислорода (помимо сердечно-сосудистой и дыхательной систем), способными переносить кислород и поддерживать необходимый уровень окислительного метаболизма в тканях. В настоящем исследовании нам удалось выявить последовательность событий, показывающих, как аммиак-индуцированные нарушения энергетических/метаболических процессов, контролирующих мор-

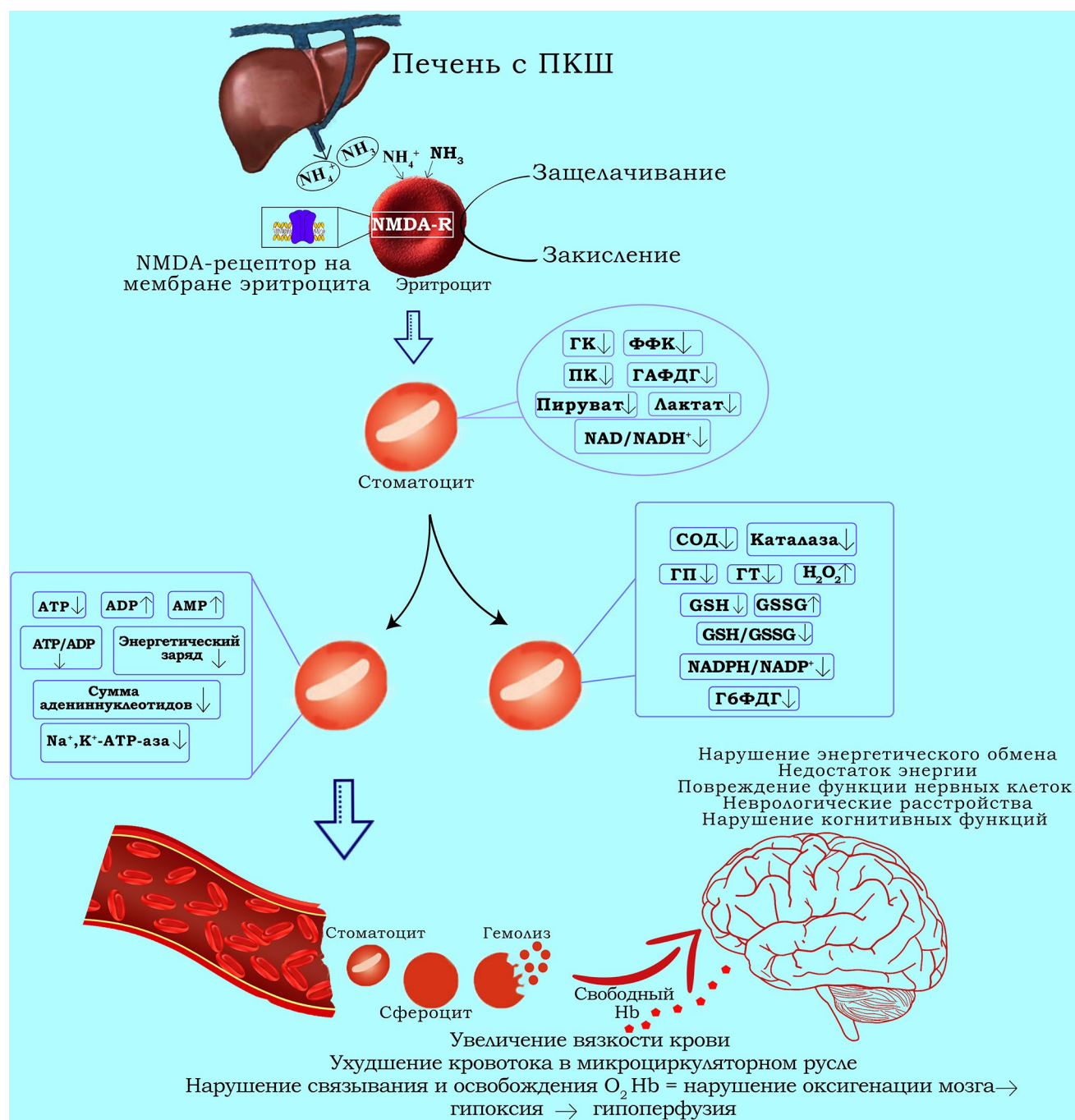


Рис. 7. Предполагаемая последовательность нарушений на метаболическом уровне, приводящая к взаимозависимой дисфункции эритроцитов и клеток мозга при ГЭ, индуцированной гипераммониемией. ПКШ – портокавальный шунт, ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ПК – пируваткиназа, ГАФДГ – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, ГТ – глутатионтрансфераза, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

фологические и реологические характеристики эритроцитов [20, 22], могут быть связаны с нарушением их кислородтранспортной функции и энцефалопатией (рис. 7).

Согласно полученным данным, самые первые этапы повреждающего «токсического» действия аммиака/аммония на эритроциты сопряжены с его внутриклеточным транспортом (обеих форм),

приводящим к нарушению ионного гомеостаза (Na^+ и K^+), торможению гликолиза, снижению концентрации АТФ, что не удовлетворяет повышенной потребности в энергии, необходимой для активности Na^+, K^+ -АТФазы, направленной на восстановление ионного градиента, значительно нарушенного усиленным транспортом аммиака/аммония в эритроциты животных с ГА.

Блокада Na^+/K^+ -помпы в эритроцитах животных с ГА, как показали наши исследования, не зависит от функциональной активности NMDA-R, тогда как морфологические изменения, переход нормальных эритроцитов в стоматоциты, нарушение регуляции объёма клеток, осмотической резистентности, усиленный лизис эритроцитов, накопление свободного Hb в плазме крови являются результатом токсического действия аммиака/аммония, частично сопряжённого с гиперактивными NMDA-R. Напротив, аммиак-индуцированное уменьшение активности гликолитических ферментов, внутриклеточной концентрации АТР, энергетического заряда и других показателей АН (кроме 2,3-ДФГ), по-видимому, полностью взаимосвязаны с Ca^{2+} - NO^+ -зависимым сигнальным каскадом, запускаемым гиперактивными NMDA-R. Блокада Na^+/K^+ -помпы, вызванная недостатком АТР, лежит в основе изменения формы эритроцитов (образование стоматоцитов), ухудшения способности к деформации и увеличения вязкости крови, ухудшения кровотока в микроциркуляторном русле [74]. Уменьшение концентрации АТР и 2,3-ДФГ приводит к нарушению связывания и освобождения кислорода Hb и, следовательно, к гипоперфузии [95], которая лежит в основе мультиорганных повреждений [89], в том числе неврологических расстройств и когнитивных нарушений [23, 96, 97], которые к тому же могут прогрессировать под действием окислительного стресса [16] и токсических эффектов внеклеточного Hb, накопление которого приводит к развитию несовместимых с жизнью осложнений [89, 121].

Учитывая важность причинно-следственной взаимосвязи «ГЭ – ГА – повреждение эритроцитов – дисфункция мозга», мы считаем, что данные о биохимических отклонениях эритроцитов должны быть использованы в качестве дополнительных инструментов для выявления факторов риска развития гипоксии и сопряжённых с ней неврологических расстройств и когнитивных нарушений. Эти дополнительные сведения особенно важны при лечении пациентов, у которых показатели внутриклеточных процессов эритроцитов значительно отклонены от нормы, как, например, у пожилых людей [31], у которых подобные неврологические расстройства могут возникать даже при нормальных значениях SaO_2 и PaO_2 [32].

А разработка новых научно обоснованных медицинских технологий восстановления внутриклеточного метаболизма в эритроцитах [122] и снижения концентрации аммиака/аммония в системной циркуляции [123–125] позволит создать инновационные лекарственные препараты индивидуального назначения, имеющие важное значение для использования новых терапевтических стратегий, направленных на улучшение транспорта кислорода в клетки и, следовательно, на снижение органной недостаточности и неврологических расстройств у пациентов с заболеваниями, сопровождающимися ГА.

На основании полученных результатов мы приводим схему последовательности событий, показывающую, как первоначальный каскад аммиак-индуцированных нарушений энергетических/метаболических процессов, контролирующих морфологические и реологические характеристики эритроцитов [20, 22], может приводить к нарушению их кислородтранспортной функции, гипоперфузии, энергетическому кризису мозга и энцефалопатии (рис. 7).

Вклад авторов. Е.А. Косенко – концепция и руководство работой, написание текста статьи; Л.А. Тихонова, Г.А. Алилова – проведение экспериментов; Е.А. Косенко, Л.А. Тихонова, Г.А. Алилова – обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00133); <https://rscf.ru/project/23-25-00133/>.

Благодарности. В работе использовали оборудование (спектрофлуориметр Cary Eclipse («Varian», Австралия)) центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с животными в соответствии с Европейскими правилами по использованию лабораторных животных 1986 г. (пересмотренными в Директиве 2010/63/EU Совета Европы). Все протоколы были одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (протокол № 31/2023 от 15.02.2023; № 10/2024 от 18.03.2024).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Решетняк В. И. (2005) Печёночно-клеточная недостаточность, *Общая реаниматология*, **1**, 68-79, <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2005-3-68-79>.
2. Häussinger, D., Dhiman, R. K., Felipo, V., Görg, B., Jalan, R., Kircheis, G., Merli, M., Montagnese, S., et al. (2022) Hepatic encephalopathy, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **8**, 43, <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00366-6>.

3. Merli, M., Lucidi, C., Pentassuglio, I., Giannelli, V., Giusto, M., Di Gregorio, V., Pasquale, C., Nardelli, S., Lattanzi, B., Venditti, M., and Riggio, O. (2013) Increased risk of cognitive impairment in cirrhotic patients with bacterial infections, *J. Hepatol.*, **59**, 243-250, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.012>.
4. Seyan, A. S., Hughes, R. D., and Shawcross, D. L. (2010) Changing face of hepatic encephalopathy: role of inflammation and oxidative stress, *World J. Gastroenterol.*, **16**, 3347-3357, <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i27.3347>.
5. Walker, C. O., and Schenker, S. (1970) Pathogenesis of hepatic encephalopathy with special reference to the role of ammonia, *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 619-632, <https://doi.org/10.1093/ajcn/23.5.619>.
6. Walker, V. (2012) Severe hyperammonaemia in adults not explained by liver disease, *Ann. Clin. Biochem.*, **49**, 214-228, <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011206>.
7. Lockwood, A. H. (1987) Hepatic encephalopathy: experimental approaches to human metabolic encephalopathy, *Crit. Rev. Neurobiol.*, **3**, 105-133.
8. Häussinger, D., and Schliess, F. (2008) Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy, *Gut*, **57**, 1156-1165, <https://doi.org/10.1136/gut.2007.122176>.
9. Butterworth, R. F., Giguère, J. F., Michaud, J., Lavoie, J., and Layrargues, G. P. (1987) Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, *Neurochem. Pathol.*, **6**, 1-12, <https://doi.org/10.1007/BF02833598>.
10. Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., and Felipo, V. (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1369-1374, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00339-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00339-6).
11. Kosenko, E., Felipo, V., Montoliu, C., Grisolia, S., and Kaminsky, Y. (1997) Effects of acute hyperammonemia *in vivo* on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria, *Metab. Brain Dis.*, **12**, 69-82, <https://doi.org/10.1007/BF02676355>.
12. Monfort, P., Kosenko, E., Erceg, S., Canales, J.-J., and Felipo, V. (2002) Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors, *Neurochem. Int.*, **41**, 95-102, [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00029-3](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00029-3).
13. Makhro, A., Wang, J., Vogel, J., Boldyrev, A. A., Gassmann, M., Kaestner, L., and Bogdanova, A. (2010) Functional NMDA receptors in rat erythrocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, 1315-1325, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00407.2009>.
14. Sherwin, R. S. (1980) Role of the liver in glucose homeostasis, *Diabetes Care*, **3**, 261-265, <https://doi.org/10.2337/diacare.3.2.261>.
15. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., and Montoliu, C. (2020) A look into liver mitochondrial dysfunction as a hallmark in progression of brain energy crisis and development of neurologic symptoms in hepatic encephalopathy, *J. Clin. Med.*, **9**, 2259, <https://doi.org/10.3390/jcm9072259>.
16. Kosenko, E. A., Alilova, G. A., and Tikhonova, L. A. (2023) Impaired enzymatic antioxidant defense in erythrocytes of rats with ammonia-induced encephalopathy: role of NMDA receptors, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1404-1415, <https://doi.org/10.1134/S0006297923090195>.
17. Sivilotti, M. L. A. (2004) Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte, *Toxicol. Rev.*, **23**, 169-188, <https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00004>.
18. Gyawali, P., Richards, R. S., Bwititi, P. T., and Nwose, E. U. (2015) Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome, *Blood Cells Mol. Dis.*, **54**, 360-363, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.005>.
19. Brewer, G. J., Oelshlegel, F. J., Moore, L. G., and Noble, N. A. (1974) *In vivo* red cell glycolytic control and DPG-ATP levels, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **241**, 513-523, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb21907.x>.
20. Brewer, G. J., and Eaton, J. W. (1971) Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport, *Science*, **171**, 1205-1211, <https://doi.org/10.1126/science.171.3977.1205>.
21. Mairbäurl, H., Oelz, O., and Bärtsch, P. (1993) Interactions between Hb, Mg, DPG, ATP, and Cl determine the change in Hb-O₂ affinity at high altitude, *J. Appl. Physiol.* (1985), **74**, 40-48, <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.1.40>.
22. Walder, J. A., Chatterjee, R., Steck, T. L., Low, P. S., Musso, G. F., Kaiser, E. T., Rogers, P. H., and Arnone, A. (2015) The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10238-10246.
23. Bosman, G. J. C. G. M. (2018) Disturbed red blood cell structure and function: an exploration of the role of red blood cells in neurodegeneration, *Front. Med. (Lausanne)*, **5**, 198, <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00198>.
24. Bray, C., Bell, L. N., Liang, H., Haykal, R., Kaiksow, F., Mazza, J. J., and Yale, S. H. (2016) Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements and their relevance in clinical medicine, *WMJ*, **115**, 317-321.
25. Podzolkov, V., Koroleva, T., Bragina, A., Kudryavtseva, M., Druzhinina, N., and Pisarev, M. (2018) Change in the functional state of erythrocytes as a component of microcirculatory disorders in metabolic syndrome, *Rational Pharmacother. Cardiol.*, **14**, 184-189, <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2018-14-2-184-189>.
26. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., and Safo, M. K. (2020) Hemoglobin: structure, function and allostery, *Subcell. Biochem.*, **94**, 345-382, https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14.

27. Orvain, C., Joly, P., Pissard, S., Badiou, S., Badens, C., Bonello-Palot, N., Couque, N., Gulbis, B., and Aguilar-Martinez, P. (2017) Diagnostic approach to hemoglobins with high oxygen affinity: experience from France and Belgium and review of the literature, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **75**, 39-51, <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1204>.
28. Юсипович А. И., Браже Н. А., Лунева О. Г., Паршина Е. Ю., Чуринов А. А., Родненков О. В., Максимов Г. В. (2013) Изменения состояния гемоглобина у больных ишемической болезнью сердца и больных с недостаточностью кровообращения, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **155**, 201-203.
29. Blass, J. P., and Gibson, G. E. (1999) Cerebrometabolic aspects of delirium in relationship to dementia, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **10**, 335-338, <https://doi.org/10.1159/000017165>.
30. De la Torre, J. C. (2000) Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's pathogenesis, *Neurobiol. Aging*, **21**, 331-342, [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00111-1](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00111-1).
31. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., Urios, A., and Montoliu, C. (2020) The erythrocytic hypothesis of brain energy crisis in sporadic Alzheimer disease: possible consequences and supporting evidence, *J. Clin. Med.*, **9**, 206, <https://doi.org/10.3390/jcm9010206>.
32. Zur, B., Bagci, S., Ludwig, M., and Stoffel-Wagner, B. (2012) Oxygen saturation in pulse oximetry in hemoglobin anomalies, *Klin. Padiatr.*, **224**, 259-265, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1312612>.
33. Snyder, M. J., Bradford, W. D., Kishnani, P. S., and Hale, L. P. (2003) Idiopathic hyperammonemia following an unrelated cord blood transplant for mucopolysaccharidosis I, *Pediatr. Dev. Pathol.*, **6**, 78-83, <https://doi.org/10.1007/s10024-001-0271-3>.
34. Lichtenstein, G. R., Yang, Y. X., Nunes, F. A., Lewis, J. D., Tuchman, M., Tino, G., Kaiser, L. R., Palevsky, H. I., Kotloff, R. M., Furth, E. E., Bavaria, J. E., Stecker, M. M., Kaplan, P., and Berry, G. T. (2000) Fatal hyperammonemia after orthotopic lung transplantation, *Ann. Intern. Med.*, **132**, 283-287, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-4-200002150-00006>.
35. Hoyer, S., Nitsch, R., and Oesterreich, K. (1990) Ammonia is endogenously generated in the brain in the presence of presumed and verified dementia of Alzheimer type, *Neurosci. Lett.*, **117**, 358-362, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90691-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90691-2).
36. Gupte, P., and Nagral, A. (2009) Hematological problems and liver disease, *Trop. Gastroenterol.*, **30**, 65-70.
37. Fuhrmann, V., Kneidinger, N., Herkner, H., Heinz, G., Nikfardjam, M., Bojic, A., Schellongowski, P., Angermayr, B., Kitzberger, R., Warszawska, J., Holzinger, U., Schenk, P., and Madl, C. (2009) Hypoxic hepatitis: underlying conditions and risk factors for mortality in critically ill patients, *Intensive Care Med.*, **35**, 1397-1405, <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1508-2>.
38. Nakata, H., Miyamoto, T., Ogoh, S., Kakigi, R., and Shibasaki, M. (2017) Effects of acute hypoxia on human cognitive processing: a study using ERPs and SEPs, *J. Appl. Physiol.*, **123**, 1246-1255, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00348.2017>.
39. Bailey, D. M., Willie, C. K., Hoiland, R. L., Bain, A. R., MacLeod, D. B., Santoro, M. A., DeMasi, D. K., Andrijanic, A., Mijacika, T., Barak, O. F., Dujic, Z., and Ainslie, P. N. (2017) Surviving without oxygen: how low can the human brain go? *High Alt. Med. Biol.*, **18**, 73-79, <https://doi.org/10.1089/ham.2016.0081>.
40. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Grisolia, S., and Felipe, V. (1995) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism, *Neurochem. Res.*, **20**, 451-456, <https://doi.org/10.1007/BF00973101>.
41. Beutler, E., Blume, K. G., Kaplan, J. C., Löhr, G. W., Ramot, B., and Valentine, W. N. (1977) International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis, *Br. J. Haematol.*, **35**, 331-340, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1977.tb00589.x>.
42. Kosenko, E. A., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2016) Relationship between chronic disturbance of 2,3-diphosphoglycerate metabolism in erythrocytes and Alzheimer disease, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **15**, 113-123, <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821103444>.
43. Beutler, E. (1971) *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, Grune & Stratton, ISBN 978-0-8089-0687-2.
44. Atkinson, D. E. (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers, *Biochemistry*, **7**, 4030-4034, <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>.
45. Williamson, D. H., Lund, P., and Krebs, H. A. (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver, *Biochem. J.*, **103**, 514-527, <https://doi.org/10.1042/bj1030514>.
46. Borsakova, D. V., Koleva, L. D., Protasov, E. S., Ataulakhanov, F. I., and Sinauridze, E. I. (2022) Ammonium removal by erythrocyte-bioreactors based on glutamate dehydrogenase from *Proteus* Sp. jointly with Porcine heart alanine aminotransferase, *Sci. Rep.*, **12**, 5437, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09435-y>.
47. Huizenga, J. R., Tangerman, A., and Gips, C. H. (1994) Determination of ammonia in biological fluids, *Ann. Clin. Biochem.*, **31** (Pt 6), 529-543, <https://doi.org/10.1177/000456329403100602>.

48. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., and Montoliu, C. (2022) Is NMDA-receptor-mediated oxidative stress in mitochondria of peripheral tissues the essential factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy? *J. Clin. Med.*, **11**, 827, <https://doi.org/10.3390/jcm11030827>.
49. Edwards, C. J., and Fuller, J. (1996) Oxidative stress in erythrocytes, *Comp. Haematol. Int.*, **6**, 24-31, <https://doi.org/10.1007/BF00368098>.
50. Tilton, W. M., Seaman, C., Carriero, D., and Piomelli, S. (1991) Regulation of glycolysis in the erythrocyte: role of the lactate/pyruvate and NAD/NADH ratios, *J. Lab. Clin. Med.*, **118**, 146-152.
51. Kurganov, B. I., Sugrobova, N. P., and Mil'man, L. S. (1985) Supramolecular organization of glycolytic enzymes, *J. Theor. Biol.*, **116**, 509-526, [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(85\)80086-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(85)80086-2).
52. Minetti, M., Mallozzi, C., and Di Stasi, A. M. M. (2002) Peroxynitrite activates kinases of the Src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 744-754, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00891-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00891-2).
53. Chu, H., Breite, A., Ciralo, P., Franco, R. S., and Low, P. S. (2008) Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties, *Blood*, **111**, 932-938, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100180>.
54. Chu, H., McKenna, M. M., Krump, N. A., Zheng, S., Mendelsohn, L., Thein, S. L., Garrett, L. J., Bodine, D. M., and Low, P. S. (2016) Reversible binding of hemoglobin to band 3 constitutes the molecular switch that mediates O₂ regulation of erythrocyte properties, *Blood*, **128**, 2708-2716, <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-692079>.
55. Nemkov, T., Reisz, J. A., Xia, Y., Zimring, J. C., and D'Alessandro, A. (2018) Red blood cells as an organ? How deep omics characterization of the most abundant cell in the human body highlights other systemic metabolic functions beyond oxygen transport, *Expert Rev. Proteomics*, **15**, 855-864, <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1531710>.
56. Mohorovic, L., Lavezzi, A., Jonjic, N., Stifter, S., Perry, G., Malatestinic, D., Micovic, V., Materljan, E., Haller, H., and Petrovic, O. (2017) Methemoglobinemia as biomarker and precursor of brain capillary oxidative damage link to ferric iron accumulation and originator of neurodegenerative diseases, *J. Syst. Integr. Neurosci.*, **3**, 1-5, <https://doi.org/10.15761/JSIN.1000180>.
57. Harrison, M. L., Rathinavelu, P., Arese, P., Geahlen, R. L., and Low, P. S. (1991) Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis, *J. Biol. Chem.*, **266**, 4106-4111.
58. Ansari, F. A., Ali, S. N., and Mahmood, R. (2015) Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes, *Toxicol. In Vitro*, **29**, 1878-1886, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.022>.
59. Chandel, N. S. (2021) Glycolysis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **13**, a040535, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>.
60. Schmalhausen, E. V., Medvedeva, M. V., Serebryakova, M. V., Chagovets, V. V., and Muronetz, V. I. (2022) Products of S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: relation between s-nitrosylation and oxidation, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1866**, 130032, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130032>.
61. Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., and Yan, N. (2014) Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1, *Nature*, **510**, 121-125, <https://doi.org/10.1038/nature13306>.
62. Zancan, P., and Sola-Penna, M. (2005) Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function, *Mol. Genet. Metab.*, **86**, 401-411, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.06.011>.
63. Clausen, T., Van Hardeveld, C., and Everts, M. E. (1991) Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis, *Physiol. Rev.*, **71**, 733-774, <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.3.733>.
64. Radosinska, J., and Vrbjar, N. (2016) The role of red blood cell deformability and Na⁺,K⁺-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia, *Physiol. Res.*, **65**, 43-54, <https://doi.org/10.33549/physiolres.933402>.
65. Cooper, A. J., and Plum, F. (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia, *Physiol. Rev.*, **67**, 440-519, <https://doi.org/10.1152/physrev.1987.67.2.440>.
66. Labotka, R. J., Lundberg, P., and Kuchel, P. W. (1995) Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by 14N and 15N saturation transfer NMR spectroscopy, *Am. J. Physiol.*, **268**, 686-699, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.3.C686>.
67. Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D.-O.D., and Foskett, J. K. (2002) Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter, *J. Biol. Chem.*, **277**, 12499-12502, <https://doi.org/10.1074/jbc.C200060200>.
68. Martinelle, K., and Häggström, L. (1993) Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes, *J. Biotechnol.*, **30**, 339-350, [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90148-g](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90148-g).

69. Whittam, R., and Ager, M. E. (1965) The connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes, *Biochem. J.*, **97**, 214-227, <https://doi.org/10.1042/bj0970214>.
70. Tozzi-Ciancarelli, M. G., Di Giulio, A., Troiani-Sevi, E., D'Alfonso, A., Amicosante, G., and Oratore, A. (1989) Human erythrocyte damage at the initial stages of oxidative stress, *Cell Biophys.*, **15**, 225-234, <https://doi.org/10.1007/BF02989685>.
71. Liu, J., Nie, Y., Chaudhry, M., Bai, F., Chuang, J., Sodhi, K., and Shapiro, J. I. (2020) The redox-sensitive Na⁺/K⁺-ATPase signaling in uremic cardiomyopathy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1256, <https://doi.org/10.3390/ijms21041256>.
72. Owen, J. S., and McIntyre, N. (1978) Erythrocyte lipid composition and sodium transport in human liver disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 168-176, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90138-4).
73. Korff, J. M., Siebens, A. W., and Gill, J. R. (1984) Correction of hypokalemia corrects the abnormalities in erythrocyte sodium transport in Bartter's syndrome, *J. Clin. Invest.*, **74**, 1724-1729, <https://doi.org/10.1172/JCI111590>.
74. Maturu, P., Vaddi, D. R., Pannuru, P., and Nallanchakravarthula, V. (2010) Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na⁺/K⁺-ATPase activity in chronic alcoholics, *Mol. Cell Biochem.*, **339**, 35-42, <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0367-z>.
75. Hedin, S. G. (1897) Ueber die Permeabilität der Blutkörperchen [in German], *Pflüger. Arch.*, **68**, 229-338, <https://doi.org/10.1007/BF01661862>.
76. Gonzalez, R., Zamora, J., Gomez-Camarero, J., Molinero, L.-M., Bañares, R., and Albillos, A. (2008) Meta-analysis: combination endoscopic and drug therapy to prevent variceal rebleeding in cirrhosis, *Ann. Intern. Med.*, **149**, 109-122, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-2-200807150-00007>.
77. Лазебник Л. Б., Голованова Е. В., Алексеенко С. А., Буеверов А. О., Плотникова Е. Ю., Долгушина А. И., Ильченко Л. Ю., Ермолова Т. В., Тарасова Л. В., Ли Е. Д., Цыганова Ю. В., Ахмедов В. А., Агеева Е. А., Лосев В. М., Куприянова И. Н., Серикова С. Н., Корочанская Н. В., Вологжанина Л. Г., Циммерман Я. С., Сас Е. И., Журавель С. В., Оковитый С. В., Осипенко М. Ф., Радченко В. Г., Солдатова Г. С., Ситкин С. И., Селиверстов П. В., Шавкута Г. В., Бутова Е. Н., Кожевникова С. А. (2021) Российский консенсус «Гипераммониемии у взрослых» (Версия 2021), *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 97-118, <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-187-3-97-118>.
78. Morse, E. E. (1990) Mechanisms of hemolysis in liver disease, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **20**, 169-174.
79. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T., and Suresh, S. (2010) Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease, *MRS Bull.*, **35**, 382-388, <https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>.
80. Lim, H. W. G., Wortis, M., and Mukhopadhyay, R. (2002) Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16766-16769, <https://doi.org/10.1073/pnas.202617299>.
81. Oski, F. A., Naiman, J. L., Blum, S. F., Zarkowsky, H. S., Whaun, J., Shohet, S. B., Green, A., and Nathan, D. G. (1969) Congenital hemolytic anemia with high-sodium, low-potassium red cells. Studies of three generations of a family with a new variant, *N. Engl. J. Med.*, **280**, 909-916, <https://doi.org/10.1056/NEJM196904242801701>.
82. Parker, J. C., and Welt, L. G. (1972) Pathological alterations of cation movements in red blood cells, *Arch. Intern. Med.*, **129**, 320-332.
83. Gedde, M. M., Davis, D. K., and Huestis, W. H. (1997) Cytoplasmic PH and human erythrocyte shape, *Biophys. J.*, **72**, 1234-1246, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78770-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78770-8).
84. Wong, P. (1999) A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte, *J. Theor. Biol.*, **196**, 343-361, <https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0845>.
85. Wolf, P. L., and Koett, J. (1980) Hemolytic anemia in hepatic disease with decreased erythrocyte adenosine triphosphate, *Am. J. Clin. Pathol.*, **73**, 785-788, <https://doi.org/10.1093/ajcp/73.6.785>.
86. Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Velentzas, A. D., Kokkalis, A. C., Georgakopoulou, S.-C., and Papassideri, I. S. (2011) Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis, *J. Proteomics*, **74**, 2441-2452, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.009>.
87. Wislöff, F., and Boman, D. (1979) Acquired stomatocytosis in alcoholic liver disease, *Scand. J. Haematol.*, **23**, 43-50, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1979.tb02852.x>.
88. Wiley, J. S. (1976) Hereditary stomatocytosis: a disease of cell water regulation, in *Membranes and Disease* (Bolis, L., Hoffman, J. F., and Leaf, A., eds), Raven Press, N.Y., pp. 89-94.
89. Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., and Gladwin, M. T. (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease, *JAMA*, **293**, 1653-1662, <https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653>.
90. Кумукова И. Б., Трахтман П. Е., Старостин Н. Н., Борсакова Д. В., Игнатова А. А., Федотов А. Ю., Плахотник М. Е., Атауллаханов Ф. И. (2018) Сравнение лабораторных показателей патогенредуцированных и рент-

- геноблученных эритроцитных взвесей, *Вопр. Гематол. Онкол. Иммунопатол. Педиатр.*, **17**, 64-74, <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2018-17-1-64-74>.
91. He, Q., Su, G., Liu, K., Zhang, F., Jiang, Y., Gao, J., Liu, L., Jiang, Z., Jin, M., and Xie, H. (2017) Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method, *PLoS One*, **12**, e0189837, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189837>.
92. Bruce, L. J. (2009) Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells – recent developments, *Blood Cells Mol. Dis.*, **42**, 216-222, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.01.014>.
93. Kosmachevskaya, O. V., and Topunov, A. F. (2018) Alternate and additional functions of erythrocyte hemoglobin, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1575-1593, <https://doi.org/10.1134/S0006297918120155>.
94. Helms, C. C., Gladwin, M. T., and Kim-Shapiro, D. B. (2018) Erythrocytes and vascular function: oxygen and nitric oxide, *Front. Physiol.*, **9**, 125, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00125>.
95. Berisavac, I. I., Jovanović, D. R., Padjen, V. V., Ercegovac, M. D., Stanarčević, P. D. J., Budimkić-Stefanović, M. S., Radović, M. M., and Beslač-Bumbaširević, L. G. (2017) How to recognize and treat metabolic encephalopathy in neurology intensive care unit, *Neurol. India*, **65**, 123-128, <https://doi.org/10.4103/0028-3886.198192>.
96. Stevenson, A., Lopez, D., Khoo, P., Kalara, R. N., and Mukaetova-Ladinska, E. B. (2017) Exploring erythrocytes as blood biomarkers for Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **60**, 845-857, <https://doi.org/10.3233/JAD-170363>.
97. Kosenko, E. A., Tikhonova, L. A., Montoliu, C., Barreto, G. E., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2017) Metabolic abnormalities of erythrocytes as a risk factor for Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **11**, 728, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00728>.
98. Oh, D. J., Kim, J. S., Lee, S., Yang, H. W., Bae, J. B., Han, J. W., and Kim, K. W. (2022) Association between serum free hemoglobin level and cerebral white matter hyperintensity volume in older adults, *Sci. Rep.*, **12**, 3296, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07325-x>.
99. Moreau, R., Lee, S. S., Soupison, T., Roche-Sicot, J., and Sicot, C. (1988) Abnormal tissue oxygenation in patients with cirrhosis and liver failure, *J. Hepatol.*, **7**, 98-105, [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(88\)80512-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(88)80512-9).
100. Benesch, R., and Benesch, R. E. (1967) The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 162-167, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90228-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90228-8).
101. Rapoport, I., Berger, H., Elsner, R., and Rapoport, S. (1977) pH-dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states *in vitro*, *Eur. J. Biochem.*, **73**, 421-427, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11333.x>.
102. Duhm, J., Deuticke, B., and Gerlach, E. (1968) Metabolism of 2,3-diphosphoglycerate and glycolysis in human red blood cells under the influence of dipyrindamole and inorganic sulfur compounds, *Biochim. Biophys. Acta*, **170**, 452-454, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(68\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(68)90033-0).
103. Hsu, L. L., Champion, H. C., Campbell-Lee, S. A., Bivalacqua, T. J., Mancini, E. A., Diwan, B. A., Schimel, D. M., Cochard, A. E., Wang, X., Schechter, A. N., Noguchi, C. T., and Gladwin, M. T. (2007) Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability, *Blood*, **109**, 3088-3098, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-039438>.
104. Tejero, J., Shiva, S., and Gladwin, M. T. (2019) Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation, *Physiol. Rev.*, **99**, 311-379, <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>.
105. Cortese-Krott, M. M., and Kelm, M. (2014) Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.*, **2**, 251-258, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.027>.
106. Bertrand, R. (2012) Nitric oxide-mediated suppression of 2,3-bisphosphoglycerate synthesis: therapeutic relevance for environmental hypoxia and sickle cell disease, *Med. Hypotheses*, **79**, 315-318, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.05.020>.
107. Valentine, W. N., Tanaka, K. R., and Paglia, D. E. (1985) Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies, *Ann. Intern. Med.*, **103**, 245-257, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-2-245>.
108. Nakamura, J., Koh, N., Sakakibara, F., Hamada, Y., Wakao, T., Hara, T., Mori, K., Nakashima, E., Naruse, K., and Hotta, N. (1995) Polyol pathway, 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes and diabetic neuropathy in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **294**, 207-214, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00531-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00531-5).
109. Matsumoto, Y. (1995) The function of red blood cells during experimental hemorrhagic and endotoxic shock, *Masui*, **44**, 342-348.
110. Kedziora, J., Hübner, H., Kański, M., Jeske, J., and Leyko, W. (1972) Efficiency of the glycolytic pathway in erythrocytes of children with Down's syndrome, *Pediatr. Res.*, **6**, 10-17, <https://doi.org/10.1203/00006450-197201000-00002>.
111. Kaminsky, Y. G., Reddy, V. P., Ashraf, G. M., Ahmad, A., Benberin, V. V., Kosenko, E. A., and Aliev, G. (2013) Age-related defects in erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate metabolism in dementia, *Aging Dis.*, **4**, 244-255, <https://doi.org/10.14336/AD.2013.0400244>.

112. Kosenko, E. A., Solomadin, I. N., Tikhonova, L. A., Reddy, V. P., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2014) Pathogenesis of Alzheimer disease: role of oxidative stress, amyloid- β peptides, systemic ammonia and erythrocyte energy metabolism, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **13**, 112-119, <https://doi.org/10.2174/18715273113126660130>.
113. MacDonald, R. (1977) Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity, *Anaesthesia*, **32**, 544-553, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.1977.tb10002.x>.
114. Larsen, V. H., Waldau, T., Gravesen, H., and Siggaard-Andersen, O. (1996) Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate depletion associated with hypophosphatemia detected by routine arterial blood gas analysis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **224**, 83-87, <https://doi.org/10.3109/00365519609088626>.
115. Lichtman, M. A., Miller, D. R., Cohen, J., and Waterhouse, C. (1971) Reduced red cell glycolysis, 2, 3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate concentration, and increased hemoglobin-oxygen affinity caused by hypophosphatemia, *Ann. Intern. Med.*, **74**, 562-568, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-74-4-562>.
116. Juel, R. (1979) 2,3-diphosphoglycerate: its role in health and disease, *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **10**, 113-146, <https://doi.org/10.3109/10408367909147131>.
117. Cordoba, J., Ventura-Cots, M., Simón-Talero, M., Amorós, À., Pavesi, M., Vilstrup, H., Angeli, P., Domenicali, M., Ginés, P., Bernardi, M., Arroyo, V., and CANONIC Study Investigators of EASL-CLIF Consortium (2014) Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF), *J. Hepatol.*, **60**, 275-281, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.10.004>.
118. Hall, C. N., Klein-Flügge, M. C., Howarth, C., and Attwell, D. (2012) Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing, *J. Neurosci.*, **32**, 8940-8951, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0026-12.2012>.
119. Leithner, C., and Royle, G. (2014) The oxygen paradox of neurovascular coupling, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 19-29, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.181>.
120. Peers, C., Dallas, M. L., Boycott, H. E., Scragg, J. L., Pearson, H. A., and Boyle, J. P. (2009) Hypoxia and neurodegeneration, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1177**, 169-177, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05026.x>.
121. Meegan, J. E., Bastarache, J. A., and Ware, L. B. (2021) Toxic effects of cell-free hemoglobin on the microvascular endothelium: implications for pulmonary and nonpulmonary organ dysfunction, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **321**, 429-439, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00018.2021>.
122. Papassotiriou, I., Kister, J., Griffon, N., Abraham, D. J., Kanavakis, E., Traeger-Synodinos, J., Stamoulakatou, A., Marden, M. C., and Poyart, C. (1998) Synthesized allosteric effectors of the hemoglobin molecule: a possible mechanism for improved erythrocyte oxygen release capability in hemoglobinopathy H disease, *Exp. Hematol.*, **26**, 922-926.
123. Kosenko, E. A., Venediktova, N. I., Kudryavtsev, A. A., Ataulakhanov, F. I., Kaminsky, Y. G., Felipo, V., and Montoliu, C. (2008) Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification, *Biochem. Cell Biol.*, **86**, 469-476, <https://doi.org/10.1139/O08-134>.
124. Godfrin, Y., Horand, F., Franco, R., Dufour, E., Kosenko, E., Bax, B. E., Banz, A., Skorokhod, O. A., Lanao, J. M., Vitvitsky, V., Sinauridze, E., Bourdeaux, V., and Gunter, K. C. (2012) International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **12**, 127-133, <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.631909>.
125. Protasov, E. S., Borsakova, D. V., Alexandrovich, Y. G., Korotkov, A. V., Kosenko, E. A., Butylin, A. A., Ataulakhanov, F. I., and Sinauridze, E. I. (2019) Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood, *Sci. Rep.*, **9**, 1455, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37828-5>.

**NMDA RECEPTORS AND INDICES
OF ENERGY EXCHANGE IN ERYTHROCYTES:
THE MISSING LINK TO THE ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY
OF OXYGEN TRANSPORT IN HEPATIC ENCEPHALOPATHY**

G. A. Alilova, L. A. Tikhonova, and E. A. Kosenko*

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

Hepatic encephalopathy (HE) is a prevalent neuropsychiatric syndrome occurring in patients with severe liver dysfunction and/or portocaval shunt. Despite more than a one hundred year history of study on interrelationships between liver failure and brain pathology, pathogenetic mechanisms leading

to development of encephalopathy in liver diseases have not been fully elucidated yet however, it is generally accepted that the main trigger of neurological complications of HE is a neurotoxin – ammonia, the concentration of which in the blood increases to toxic levels (hyperammonemia, HA) when the detoxification function of the liver is impaired. Seamlessly penetrating into brain cells and affecting NMDA receptor-mediated (NMDA-R) signaling, ammonia triggers a pathological cascade leading to dramatic inhibition of aerobic glucose metabolism, oxidative stress, cerebral hypoperfusion, nerve cell damage, and the formation of neurological deficits. Brain hypoperfusion, in turn, may be associated with impaired oxygen transport function of erythrocytes, associated with impaired metabolic/energetic processes occurring in the membranes and inside erythrocytes and controlling the affinity of hemoglobin to oxygen, which determines the degree of oxygenation of blood and tissues. We recently confirmed the above causal relationship and identified a novel NMDA-R hyperactivation-mediated ammonium-induced prooxidant effect on erythrocytes that impairs their oxygen transport function. For a more complete assessment of “erythrocytic” factors that impair brain oxygenation and lead to encephalopathy, in this study we determined enzyme activity and concentration of metabolites of glycolysis, Rapoport-Luebering shunt, and morphological characteristics of erythrocytes from rats with acute HA. To assess the role of NMDA-R in the said processes, the study was conducted using MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist. The results obtained allow us to conclude that morphofunctional disorders of erythrocytes and hemoglobinemia resulting from ammonium-induced disruption of a highly integrated system of metabolic pathways should be considered as an additional systemic “erythrocytic” pathogenetic factor leading to the progression of cerebral hypoperfusion in HE accompanied by HA.

Keywords: hyperammonemia, hepatic encephalopathy, NMDA receptors, erythrocytes, glycolysis, Rapoport-Luebering shunt

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА (BDNF) ВО ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ УСИЛИВАЕТ СОЦИАЛЬНЫЙ ИНТЕРЕС У МЫШЕЙ ЛИНИИ BTBR – МОДЕЛИ АУТИЗМА

© 2024 Я.П. Каминская, Т.В. Ильчибаева, А.И. Щербакова, Э.Р. Аллаярова, Н.К. Попова, В.С. Науменко, А.С. Цыбко*

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024

После доработки 02.07.2024

Принята к публикации 05.07.2024

Большое количество данных указывают на участие нейротрофического фактора мозга (BDNF) в патогенезе расстройств аутистического спектра (РАС). В ряде работ отмечался дефицит BDNF в гиппокампе и фронтальной коре мышей линии BTBR, являющихся моделью аутизма. Ранее нами было показано, что индукция сверхэкспрессии BDNF в гиппокампе мышей BTBR снижает тревожность и выраженность стереотипного поведения, но не влияет на социальный интерес. В данном исследовании с помощью аденоассоциированного вирусного вектора мы индуцировали сверхэкспрессию BDNF в нейронах фронтальной коры мышей BTBR. Нами обнаружено значительное усиление социального интереса в трёхкамерном социальном тесте у животных со сверхэкспрессией BDNF. Вместе с тем не выявлено каких-либо изменений в стереотипии, исследовательском и тревожном поведении, а также распознавании нового объекта. Таким образом, нами впервые показано, что именно BDNF во фронтальной коре критически важен для выраженности социального интереса у мышей BTBR, так как компенсация его дефицита в указанной структуре устраняет аутистически-подобное нарушение социального поведения, характерное для данных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейротрофический фактор мозга BDNF, аутизм, расстройства аутистического спектра, мыши BTBR.

DOI: 10.31857/S0320972524080087 EDN: KDSGKX

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) – группа патологических состояний, сопровождающихся нарушением социальной коммуникации и стереотипным поведением. Возникновение РАС связывают в первую очередь с нарушением развития нервной системы. Было показано, что страдающие РАС дети имеют целый ряд нейроанатомических отличий [1]. Атипичная траектория развития мозга отражается также на микроструктурной организации – нарушается формирование кортикальных колонок и формирование функциональных связей, то есть коннективность в целом [2].

Патофизиология аутизма сложна и не обуславливается одной аномалией развития или одним молекулярным каскадом. На данный момент известны сотни генов, ассоциированных с РАС [3], однако среди них можно выделить определённые функциональные группы: гены и сигнальные пути, связанные с синаптогенезом, миграцией нейронов и аксональным наведением, а также с ремоделированием хроматина [4]. Нарушение работы этих генов связано с дефектами формирования, развития и функционирования нейрональных сетей.

Нейротрофические факторы играют одну из центральных ролей в процессах нейропластичности и неизбежно участвуют в регуляции как нор-

Принятые сокращения: РАС – расстройства аутистического спектра; AAV – аденоассоциированный вирусный вектор; BDNF – нейротрофический фактор мозга; BTBR – линия мышей BTBR T+ Itpr3tf/J, представляющая собой модель идиопатического РАС; EGFP – зелёный флуоресцентный белок; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

* Адресат для корреспонденции.

мального, так и патологического поведения [5]. Особого внимания в контексте РАС заслуживает нейротрофический фактор мозга (BDNF). Во-первых, BDNF играет ключевую роль в росте аксонов и дендритов [6]. Во-вторых, BDNF участвует не только в контроле выживания и дифференцировки различных популяций нейронов развивающегося мозга, но также и в формировании и пластичности синаптических связей [6].

На связь BDNF и аутизма указывают многочисленные исследования уровня BDNF в сыворотке пациентов с РАС, в ходе которых было показано его повышение по сравнению с нейротипичными пациентами. Эти исследования были обобщены в систематических обзорах и мета-анализах [7, 8]. Однако известно, что на уровень BDNF в сыворотке может влиять множество факторов, таких как: физические нагрузки [9], состояние микробиоты [10], гормональный статус и циркадные ритмы [11], поэтому такие данные требуют тщательного анализа. Поскольку количество работ, оценивающих уровень BDNF непосредственно в ЦНС, остаётся весьма ограниченным, на первый план выходят исследования на животных моделях РАС. На данный момент наиболее распространены: модель синдрома ломкой X-хромосомы – нокаут *Fmr1*, модель синдрома Ретта – нокаут *Mecp2*, вальпроатная модель РАС, а также линия мышей BTBR T+ Itpr3tf/J (BTBR) – представляющая собой модель идиопатического РАС [12, 13]. Для всех вышеперечисленных моделей характерны изменения BDNF-сигналинга [14]. Прямое или опосредованное увеличение BDNF способствовало нормализации поведенческого фенотипа у животных с нокаутом *Fmr1* [15]. Животные с нокаутом *Mecp2* характеризуются прогрессивным снижением уровня BDNF, а также нарушением секреции и транспорта BDNF. Мыши линии BTBR демонстрируют более комплексное нарушение поведения, и у них также установлен сниженный уровень белка BDNF и его рецепторов [16–18].

Ранее на мышах BTBR нами были проведены эксперименты с внутрижелудочковым введением рекомбинантного BDNF и сверхэкспрессией BDNF в гиппокампе, вызванной при помощи аденоассоциированного вирусного вектора [19]. Введение рекомбинантного белка BDNF не смогло повлиять на аутистическое поведение, в то время как сверхэкспрессия BDNF в гиппокампе значительно уменьшала стереотипное поведение и тревожность. Вероятно, функциональные эффекты BDNF в разных структурах мозга не однородны, о чём, например, свидетельствует разнонаправленное изменение уровня экспрессии BDNF в миндалине, гиппокампе и префронтальной коре в ответ на формирование памяти о страхе [20]. Таким образом, данное исследование является логическим

продолжением предшествующих работ, и его задачей является оценить влияние сверхэкспрессии BDNF во фронтальной коре на поведение мышей линии BTBR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. С помощью праймеров (табл. 1), содержащих сайты распознавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и AgeI мы синтезировали ген *Bdnf* мыши, используя мышиную кДНК в качестве матрицы. Полученную последовательность обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и AgeI («New England Biolabs», США) и лигировали в вектор pAAV-Syn-EGFP для экспрессии под контролем синапсного промотора. Ген *Bdnf* содержал стоп-кодон для получения функциональной формы BDNF без зелёного флуоресцентного белка (EGFP) на С-конце. Данный стоп-кодон тем не менее позволяет экспрессироваться EGFP в достаточном для контроля эффективности экспрессии плазмиды в нейронах млекопитающих количестве. В качестве контроля использовали плазмиду, несущую только ген, кодирующий EGFP. Все этапы клонирования проверены секвенированием по Сэнгеру, которое было проведено на базе ЦКП «Геномика» СО РАН.

Клеточная культура и трансфекция. Клетки НЕК 293FT # PTA-5077 («ATCC», США) использовали для получения векторов рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Линию клеток поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS («Sigma-Aldrich», США) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина («Sigma-Aldrich»), при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Клетки пассировали при конfluентности не менее 70%, и культуральную среду обновляли каждые 2–3 дня.

Создание аденоассоциированных вирусных векторов (AAV). Упаковку pAAV-Syn-BDNF-EGFP и pAAV-Syn-EGFP в капсиды проводили путём котрансфекции с плазмидами AAV-DJ и pHelper («Cell Biolabs Inc.», США) в НЕК-клетки. Вирусные частицы собирали через 48 ч, согласно протоколу, описанному Grimm et al. [21]. Количество полученных вирусных частиц определяли методом количественной ПЦР (кПЦР), как было описано ранее [22].

Экспериментальные животные. Исследования проводились на самцах мышей инбредной линии BTBR T+ Itpr3tf/J (BTBR) (источник: Jackson Laboratory, 2015). Животных (вес – 26 ± 1 г) содержали в стандартных условиях SPF-вивария ИЦиГ СО РАН при искусственном 14-часовом освещении и свободном доступе к сбалансированному корму и воде. Мышей содержали группами по 4–5 особей в клетках системы OptiMICE («Animal Care

Таблица 1. Характеристика праймеров, используемых в работе

Ген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Температура отжига, °C	Длина ПЦР продукта, п.н.
<i>Bdnf</i> (плазмида)	F: tagctGGATCCcaccatgttccaccagggtgagaagag R: tagctACCGGTctatcttccccctttaatggctcagtg	62	774
<i>Bdnf</i>	F: tacctggatgccgcaaacat R: tgcttcagttggcctttgga	60	191
<i>Ngfr</i>	F: acaacacccagcaccagga R: cacaaccacagcagccaaga	62	145
<i>Ntrk2</i>	F: cattcactgtgagaggcaacc R: atcagggtgtagtctccgttatt	60	175
<i>rPol2</i>	F: tgtgacaactccatacaatgc R: ctctcttagtgaatttcgtact	60	194

Systems», США), за 2 дня до тестирования поведения животных рассаживали в отдельные клетки того же размера для снятия группового эффекта.

В 2-месячном возрасте животным осуществляли инъекцию AAV, кодирующего BDNF (AAV-BDNF, $n = 12$) или зелёный флуоресцентный белок (EGFP) (AAV-EGFP, $n = 15$). Спустя 4 недели с момента укола были проведены поведенческие тесты (рис 1, а). На момент начала тестирования в группе AAV-BDNF $n = 10$. Мыши были выведены из эксперимента через 24 ч после окончания поведенческих тестов. Животных умерщвляли углекислым газом. Мозг был извлечён на лёд, образцы фронтальной коры были выделены в соответствии с онлайн-атласом мышиного мозга (https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA_v3), заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80°C до процедур выделения РНК или белка.

Стереотаксическое введение во фронтальную кору. Перед проведением процедуры животных наркотизировали смесью 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бутанола. С помощью стереотаксической установки («TSE Systems», Германия) вирусные частицы (0,5 мкл), разведённые в $1 \times \text{PBS}$ до концентрации 10^9 вирусных частиц в мкл, вводили билатерально в область лобной коры, согласно координатам онлайн-атласа: AP: +1,5 мм, ML: $\pm 0,5$ мм, DV: 2,0 мм (<https://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=0.5&ap=%2B1.5&dv=2>).

Поведенческие тесты. За исключением трёхкамерного социального теста, в котором использовалось по 8 животных, размер выборки в остальных тестах составлял 12 и 10 животных для групп AAV-EGFP и AAV-BDNF соответственно.

Тест «открытое поле». Двигательная активность оценивалась в тесте «открытое поле». Тестирование проводилось по стандартному протоколу, описанному ранее [19]. Для покадрового

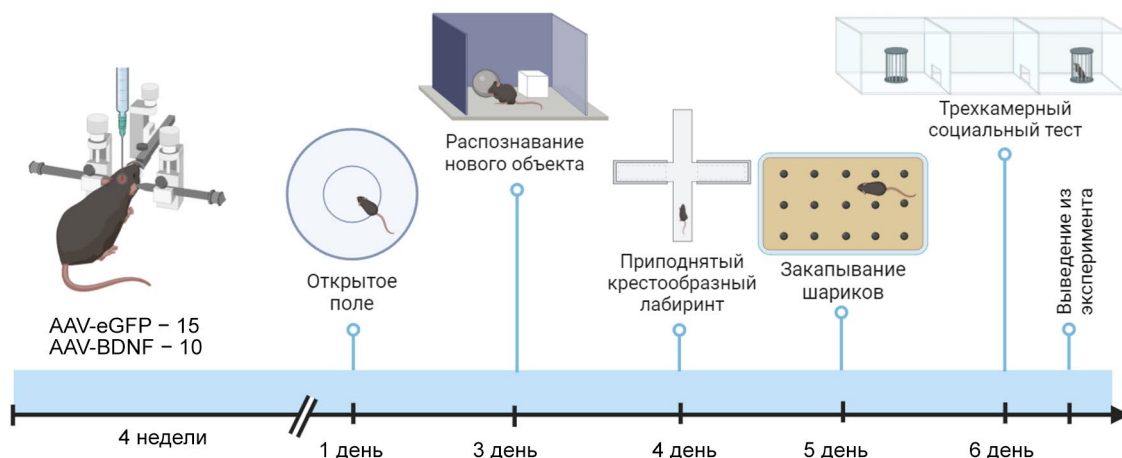
анализа видеопотока использовалось оригинальное программное обеспечение EthoStudio [23]. Общий пройденный путь, исследованная площадь арены и время в центре измерялись автоматически. Количество вертикальных стоек как мера исследовательского поведения оценивалось вручную.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Для оценки тревожности и двигательной активности мышей применялся тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Устройство установки и протокол тестирования повторяли те, что использовались в предыдущей работе [19]. С помощью оригинального программного обеспечения «EthoStudio» фиксировались следующие показатели: время пребывания в открытых и закрытых рукавах, а также время пребывания в центре лабиринта, исследованная площадь рукавов. Число выглядываний из закрытого рукава и свешивания с края арены подсчитывали вручную.

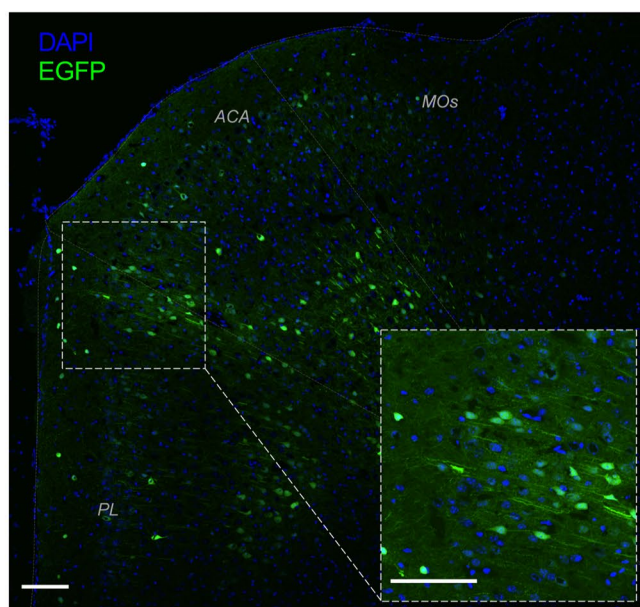
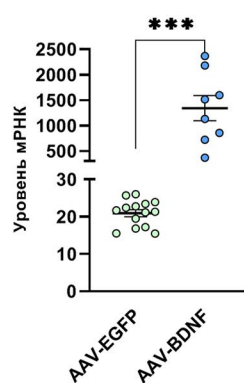
Тест «закапывание шариков». Для оценки стереотипного поведения применялся тест «закапывание шариков» по следующему протоколу: в клетку на подстил толщиной 4 см раскладывали 18 шариков из стекла ($d = 1,0$ см), после чего в клетку с шариками помещали мышь на 30 мин. По окончании теста мышь возвращали в домашнюю клетку и подсчитывали, какое количество шариков и в какой степени (менее $\frac{1}{2}$; или более $\frac{1}{2}$) были закопаны [24].

Для трёхкамерного социального теста животное помещали в прямоугольную непрозрачную клетку ($60 \times 40 \times 40$ см) с тремя сообщающимися отсеками (OpenScience, Россия). На первом (ознакомительном) этапе мышь сажали в центральный отсек и в течение 10 мин животное могло свободно исследовать все отсеки. На втором этапе мышь располагалась в центральном отсеке, а в боковые камеры помещали новый объект

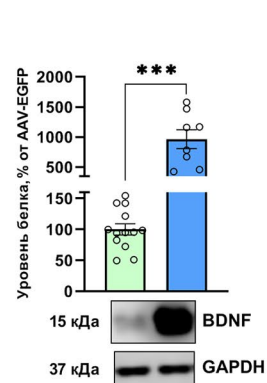
а



б

в *Bdnf*

г BDNF



д proBDNF

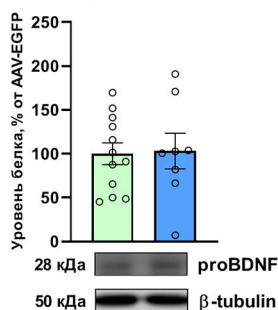
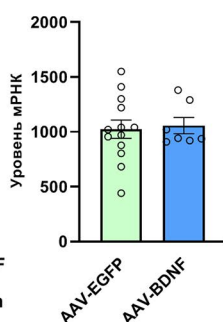
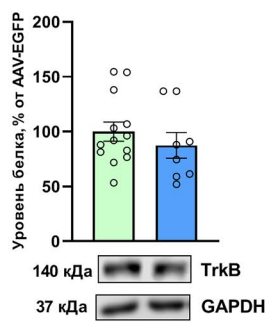
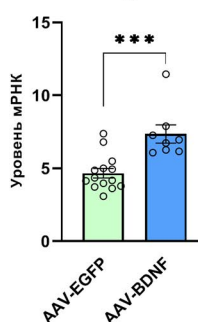
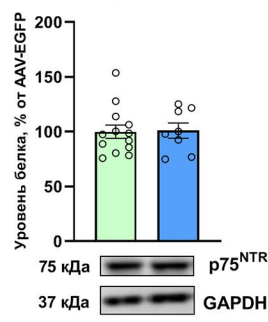
е *Ntrk2*ж *TrkB*з *Ngfr*и *p75^{NTR}*

Рис. 1. Индукция сверхэкспрессии BDNF в гиппокампе мышей ВТВР. *а* – Дизайн эксперимента. *б* – Репрезентативная микрофотография среза мозга мышей линии ВТВР после инъекции AAV-EGFP. Видны области фронтальной коры и отдельные нейроны, экспрессирующие зелёный флуоресцентный белок. Размерная шкала – 50 мкм. ACA – область опоясывающей коры; PL – прелимбическая область; MOs – вторичная моторная область. *в* – Уровень экспрессии гена *Bdnf*; *г* – уровень белка зрелой формы BDNF; *д* – уровень белка проформы BDNF во фронтальной коре мышей ВТВР, получивших инъекцию AAV-EGFP и AAV-BDNF. Уровень экспрессии рецепторов к BDNF: *Ntrk2* (*е*) и *Ngfr* (*з*), и уровни соответствующих белков *TrkB* (*ж*) и *p75^{NTR}* (*и*) во фронтальной коре мышей линии ВТВР после инъекции AAV-EGFP и AAV-BDNF. Уровни мРНК (*б*, *д* и *ж*) представлены как число копий кДНК целевого гена, отнесённое на 100 копиям кДНК *rPol2*. На графиках (*в*, *г*, *е* и *з*) приведены количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на уровень соответствующего GAPDH и представлены как процент от контроля. Данные представлены как $m \pm SEM$. *** $p < 0,001$ – для группы AAV-BDNF относительно группы AAV-EGFP

и другую мышь. Каждому тестируемому животному давали возможность исследовать все 3 камеры в течение 10 мин. Время пребывания в каждой камере и время обнюхивания (носом к клетке на расстоянии менее 2 см) регистрировали с помощью программного обеспечения «EthoStudio». Индекс социального предпочтения рассчитывали как разницу во времени взаимодействия с новой мышью и новым объектом, делённую на общее время, проведённое в двух боковых камерах или обнюхивая цели.

Тест «распознавание нового объекта» проводили в классической арене, где на равном от стенок расстоянии помещали объекты [25]. В первый (тренировочный) день тестируемым животным предъявлялись 2 одинаковых объекта. Для устранения предпочтения животными тех или иных характеристик объектов половине мышей каждой группы предъявлялся объект X, а другой половине – объект Y. Животных помещали по одному на арену, где они могли свободно взаимодействовать с объектами в течение 5 мин. В день тестирования на арену помещали один из старых предметов вместе с новым, незнакомым животному, после чего также предоставляли 5 мин на исследование объектов. Время взаимодействия с новыми и старыми объектами записывали вручную в «EthoStudio». Регистрировали следующие взаимодействия с предметом: обнюхивание (расстояние от носа менее 1 см) и стойки с опорой на предмет. Индекс дискриминации рассчитывался как $d = d_1/e_1$, где d_1 – время, потраченное на изучение нового объекта, минус время, потраченное на изучение знакомого объекта, а e_1 – общее время исследования во время изучения двух идентичных объектов.

Количественная ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли с помощью ExtractRNA («Евроген», Россия), обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase, 1000 о.е./мл; «Promega», США) в соответствии с протоколами производителей. РНК разводили водой до концентрации 0,125 мкг/мкл. На основе полученной общей РНК синтезировали кДНК. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 System («Roche», Швейцария). кДНК (1 мкл) смешивали с 19 мкл смеси Master mix («Синтол», Россия), приготовленной согласно инструкции производителя. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов, представлены в табл. 1. Серия разведений геномной ДНК (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл) была амплифицирована одновременно и была использована как внешний стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 («Roche Applied Science»). Экспрессию генов пред-

ставляли как отношение количества копий кДНК анализируемого гена к 100 копиям гена *rPol2*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [26, 27].

Вестерн-блот-анализ. Для определения уровня общего белка образцы ткани гомогенизировали в 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 8,4), 300 мМ NaCl, 4 мМ EDTA, 0,2% (w/v) Triton X-100; 1мМ NaVO₄, 2 мМ PMSF, 1 мМ смеси ингибиторов протеаз («Sigma-Aldrich»). Гомогенат инкубировали на льду 60 мин и центрифугировали (12 000 g, 15 мин) с последующим отбором супернатанта. Количество общего белка было измерено по методу BCA с использованием коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Пробы разводили до концентрации 1500 мкг/мл с помощью 2-кратного буфера Лэммли и хранили при температуре –20 °С. Проводили термическую обработку проб для денатурации белка (5 мин, 95 °С). Экстракты белка (15 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-ного разделяющего SDS-PAGE. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad Laboratories Inc.», США) с помощью системы для полусухого электроблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad Laboratories Inc.»).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком, разведённом в буфере TBS-T (Tris Bufferd Saline, «Bio-Rad Laboratories Inc.») с добавлением 0,05% (v/v) Tween 20, в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при 4 °С в течение ночи (табл. 2).

После первичных антител мембрану отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T и инкубировали со вторичными поликлональными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение часа. Затем мембрану снова отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T.

Связанные антитела визуализировали с помощью Clarity Western ECL («Bio-Rad Laboratories Inc.»), в соответствии с инструкцией производителя, и сканера C-Digit Blot Scanner («Li-Cor», США). Для каждой мембраны проводилось измерение конститутивного белка GAPDH в качестве внутреннего стандарта для дальнейшей нормировки. Экспрессия белка выражалась в относительных единицах. Плотность бендов определялась с помощью денситометрии для количественной оценки содержания белка при помощи программы Image Studio Lite 5.2.

Микроскопия срезов мозга. Два животных из группы AAV-BDNF и одно животное из группы AAV-EGFP транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным рас-

Таблица 2. Характеристика антител, используемых в работе

Белок	Первичные антитела		Вторичные антитела: разведение, шифр производителя
	разведение	шифр производителя	
BDNF	1 : 1000	Ab108319 («Abcam», Великобритания)	против кролика; разведение 1 : 10 000; G-21234 («Invitrogen», США)
proBdnf	1 : 200	Sc-65514 («Santa Cruz», США)	
TrkB	1 : 500	Ab 18987 («Abcam»)	
p75 ^{NTR}	1 : 500	Ab38335 («Abcam»)	
GAPDH	1 : 5000	HC301-01 («TransGen Biotech», КНР)	против мыши; разведение 1 : 30 000; ab6728 («Abcam»)

твором параформальдегида. Мозг извлекали и постфиксировали 4%-ным параформальдегидом на 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 10 мкм делали в криостате («Thermo Scientific», США). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензида (краситель Hoechst 33258 (5 мкг/мл в PBS); «Sigma-Aldrich»). Срезы помещали в монтирующую среду с DAPI (ab104139, «Abcam») для последующего микроскопического анализа с использованием конфокального микроскопа Olympus IX83P2ZF («Olympus Corp.», Япония).

Статистическая обработка результатов. Перед началом эксперимента мы осуществили предопределение размера выборки. Основываясь на предыдущих исследованиях (в особенности социального поведения в «трёхкамерном социальном тесте»), нами была выбрана сила эффекта, равная 1,4. При $\alpha = 0,05$ и минимально приемлемой мощности, равной 80%, оптимальный размер выборки был равен 8 животным. Соответствие выборки нормальному распределению проверяли с помощью тестов Д'Агостини–Пирсона и Колмогорова–Смирнова. Для выявления и исключения выбросов из выборки использовался Q-критерий Диксона. После проверки на соответствие нормальному распределению данные обрабатывались с помощью *t*-критерия Стьюдента или U-критерия Манна–Уитни. Статистический анализ данных проводился с помощью программы GraphPad prism 9.1.0, анализ мощности выборки выполнили с помощью программы G*Power. Все значения представлены как $m \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инъекция AAV-BDNF вызвала повышение уровня мРНК *Bdnf* более чем в 60 раз ($t = 7,17$; $df = 20$; $p < 0,0001$; рис. 1, в). Вестерн-блот-анализ также показал, что уровень белка BDNF во фронтальной коре экспериментальных животных

значительно повысился ($t = 7,10$; $df = 19$; $p < 0,0001$; рис. 1, г). Однако уровень проформы (proBDNF) не изменился (рис. 1, д).

Индукция сверхэкспрессии BDNF во фронтальной коре мышей BTBR привела к значимому повышению уровня мРНК *Ngfr* ($t = 4,22$; $df = 20$; $p = 0,0004$; рис. 1, з), но не отразилась на уровне кодируемого им белка p75^{NTR} (рис. 1, з). В то же время не было обнаружено эффекта на экспрессию *Ntrk2* и уровень белка TrkB (рис. 1, е и ж). Интересно, что в нашей предыдущей работе [19], при индукции сверхэкспрессии BDNF в гиппокампе мышей BTBR было обнаружено увеличение уровня белка proBDNF. Однако если уровень зрелой формы вырос 10-кратно, уровень proBDNF вырос не более чем на 50%. Таким образом, не столь удивительно, что во фронтальной коре мы не наблюдали никакой разницы в уровне proBDNF после индукции сверхэкспрессии BDNF. Такому очевидному разобщению между уровнем проформы и зрелым белком BDNF, вероятно, имеется объяснение. Одним из важнейших ферментов, осуществляющих расщепление proBDNF, является матриксная металлопротеиназа 9 (MMP-9), при этом BDNF сам стимулирует транскрипцию данного белка [28]. Можно предположить, что в условиях сверхэкспрессии BDNF через MMP-9 может многократно повысить эффективность расщепления proBDNF по механизму положительной обратной связи, практически не оставляя проформы в свободном виде. Однако данное предположение требует дополнительных исследований.

Сверхэкспрессия BDNF не повлияла на двигательную активность, исследовательское и тревожное поведение в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Индекс дискриминации и общее время исследования объектов в тесте «распознавание нового объекта» не отличались у животных групп AAV-EGFP и AAV-BDNF, это свидетельствует о том, что сверхэкспрес-

Таблица 3. Результаты поведенческих тестов

Характеристика	AAV-EGFP	AAV-BDNF
Тест «открытое поле»		
Время в центре арены, %	17,63 ± 2,43	16,89 ± 2,43
Исследованная площадь арены, %	97,37 ± 0,48	95,81 ± 1,44
Путь, м	34,02 ± 2,55	32,89 ± 2,78
Вертикальные стойки, число	11,00 ± 1,14	8,5 ± 1,3
Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»		
Время в открытых рукавах, %	47,12 ± 4,58	56,67 ± 2,76
Исследованная площадь открытых рукавов, %	78,79 ± 6,02	90,95 ± 1,58
Время в закрытых рукавах, %	35,45 ± 3,48	30,78 ± 2,39
Исследованная область закрытых рукавов, %	82,47 ± 0,91	85,52 ± 1,26
Путь, м	9,22 ± 0,60	10,20 ± 0,52
Свешивания с края платформы, число	55,80 ± 6,87	40,70 ± 2,64
Тест «закапывание шариков»		
Закопанные шарики более ½	6,87 ± 0,96	8,5 ± 1,28
Закопанные шарики менее ½	11,13 ± 0,96	9,5 ± 1,28
Тест «распознавание нового объекта»		
Общее время исследования, с	17,48 ± 3,16	17,80 ± 4,29
Индекс дискриминации	0,14 ± 0,60	0,25 ± 0,16

сия BDNF не повлияла на распознавание объектов и неофобию (табл. 3). Также не было выявлено эффекта сверхэкспрессии BDNF в коре на стереотипию. Ранее нами было показано, что сверхэкспрессия BDNF в гиппокампе мышей BTBR оказывала анксиолитический эффект, а также уменьшала стереотипное поведение [19], аналогичные данные были получены и на крысиной модели РАС [29].

Сверхэкспрессия BDNF в коре привела к увеличению индекса социального предпочтения ($t = 3,72$; $df = 13$; $p = 0,0026$; рис. 2) в «трёхкамерном социальном тесте». Кроме того, животные из группы AAV-BDNF достоверно больше времени тратили на исследование социального объекта ($t = 5,77$; $df = 13$; $p < 0,0001$; рис. 2). Примечательно, что при центральном введении BDNF и интрагиппокампальной инъекции AAV-BDNF такого эффекта в аналогичном тесте не наблюдалось [19]. Таким образом, можно заключить, что BDNF во фронтальной коре мышей BTBR специфически регулирует распознавание и/или предпочтение социального объекта.

Патогенез расстройств аутистического спектра до сих пор является горячей темой для дискуссий, однако некоторые факты неизменно указывают на значительный вклад BDNF в ключевые процессы, затронутые при РАС. Данные, свидетельствующие о повышенном уровне BDNF у пациентов с РАС непосредственно в ЦНС ограничены лишь несколькими публикациями [30, 31]. Кроме того, недостаточная специфичность метода ИФА, применяемого при оценке уровня BDNF post-mortem, может показать ложно-повышенный уровень нейротрофина за счёт proBDNF. Так, в исследовании post-mortem уровня BDNF в веретенообразной извилине пациентов с РАС методом ИФА было показано увеличение BDNF, однако последующий вестерн-блот-анализ выявил, что оно было связано с proBDNF [32]. Таким образом, несмотря на показанное ранее увеличение содержания BDNF в сыворотке и некоторых данных post-mortem о повышенном уровне BDNF в базальных отделах переднего мозга [30, 31], соотнести их друг с другом достаточно сложно.

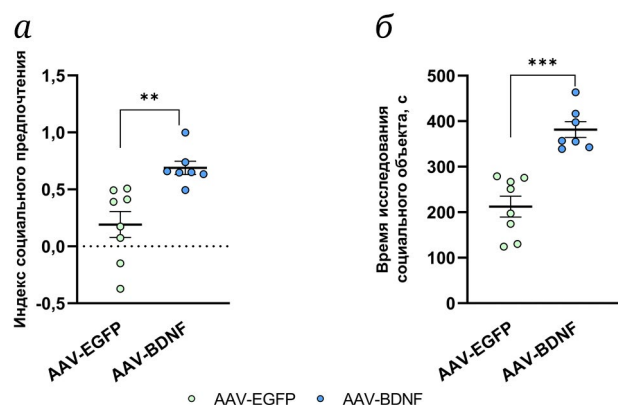


Рис. 2. Эффект сверхэкспрессии BDNF во фронтальной коре мышей BTBR на поведение в «трёхкамерном социальном тесте»: *а* – индекс социального предпочтения; *б* – время исследования социального объекта. Данные представлены как $m \pm \text{SEM}$. ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ – для животных группы AAV-BDNF по сравнению с AAV-EGFP

Вместе с тем данные, полученные на животных, в большей степени свидетельствуют о вкладе транскрипционной дисрегуляции, недостаточной биодоступности BDNF и нарушении его сигналинга в развитие социальных дефицитов. Таковые наблюдаются у мышей, экспрессирующих сплайсированную форму кальций-зависимого активатора секреции (CADPS2), которая вызывает снижение высвобождения BDNF [33]. Сплайсированная форма CADPS2 также встречается у пациентов с РАС [34]. Распространённый однонуклеотидный полиморфизм (SNP) Val66Met в гене BDNF человека снижает BDNF-сигналинг, зависящий от активности, не изменяя базальный уровень BDNF. Мыши-носители Met-аллеля демонстрируют снижение индекса социального предпочтения [35].

В исследовании Li et al. [36] было показано, что проекционный путь орбито-фронтальная кора–базолатеральная миндалина модулирует социальное поведение как у людей-обладателей SNP Val66Met в гене BDNF, так и у мышей с аналогичным аллелем. Авторами была выдвинута гипотеза о том, что существует временное окно, благодаря которому дефицит BDNF может иметь решающее значение в формировании нарушений социального поведения. Более того, с помощью сверхэкспрессии BDNF в медиальной орбито-фронтальной коре молодых мышей удалось восстановить длительность социальных контактов мышей BDNF^{Met/Met} до уровня мышей дикого типа (BDNF^{Val/Val}). Однако в данной работе сверхэкспрессия осуществлялась во всех типах клеток за счёт CMV-промотора.

Для мышей BTBR неоднократно сообщалось о снижении экспрессии BDNF в гиппокампе и коре головного мозга [16–18]. При этом в работе Jasien et al. [16] показано снижение в коре уровня

именно зрелой формы BDNF, но в недавнем исследовании Bove et al. [37] подобного снижения продемонстрировано не было. Стоит, однако, отметить, что в работе Bove et al. [37] не приведены данные о транскрипции гена *Bdnf* и уровне proBDNF. Примечательно, что в исследовании Scattoni et al. [38] обработка BDNF срезов гиппокампа мышей BTBR не могла индуцировать фасилитацию, что авторы связали со сниженной экспрессией рецептора TrkB. Также было показано, что экспрессия TrkB снижена и во фронтальной коре [16]. Именно нарушением сигналинга можно было бы объяснить обнаруженное нами ранее отсутствие эффекта от центральной инъекции рекомбинантного белка BDNF [19]. Таким образом, социальный дефицит у мышей BTBR можно связать, хотя бы отчасти, с недостаточным процессингом и сигналингом BDNF во фронтальной коре. Вероятно, индукция сверхэкспрессии именно нейронального BDNF позволила нам компенсировать не только дефицит зрелой формы нейротрофина, но и преодолеть также ограничения, наложенные недостатком рецепторов TrkB.

Настоящее исследование, показывающее улучшение социального поведения на мышах линии BTBR в ответ на индукцию сверхэкспрессии BDNF в нейронах фронтальной коры, согласуется с вышеупомянутыми данными о роли BDNF в регуляции социального поведения. В контексте предшествующих работ с введением AAV-BDNF в гиппокамп и введении рекомбинантного BDNF [19] можно также сказать, что дефицит BDNF именно во фронтальной коре и лимбической системе вносит вклад в патогенез РАС. Также данная работа подчёркивает важность разработки терапевтических стратегий при РАС, направленных на BDNF-систему.

Вклад авторов. Я.П. Каминская – проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста; Т.В. Ильчибаева – создание вирусных конструкторов, микроскопия; А.И. Щербакова – проведение экспериментов; Э.Р. Аллаярова – проведение экспериментов; Н.К. Попова – финансирование работы; В.С. Науменко – редактирование текста статьи, общее руководство проектом; А.С. Цыбко – концепция, проведение экспериментов, редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00028). Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

Благодарности. Исследование было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской

академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта: RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все экспериментальные процедуры были проведены в соот-

ветствии с международными правилами обращения с животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the Eighth Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2020 National Academy of Sciences (USA)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (заключение № 116 от 27 января 2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donovan, A. P. A., and Basson, M. A. (2017) The neuroanatomy of autism – a developmental perspective, *J. Anatomy*, **230**, 4-15, <https://doi.org/10.1111/joa.12542>.
2. Kana, R. K., Libero, L. E., and Moore, M. S. (2011) Disrupted cortical connectivity theory as an explanatory model for autism spectrum disorders, *Phys. Life Rev.*, **8**, 410-437, <https://doi.org/10.1016/j.pprev.2011.10.001>.
3. Vorstman, J. A. S. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. I., and Hallmayer, J. F. (2017) Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 362-376, <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.4>.
4. Kisaretova, P., Tsybko, A., Bondar, N., and Reshetnikov, V. (2023) Molecular abnormalities in BTBR mice and their relevance to schizophrenia and autism spectrum disorders: an overview of transcriptomic and proteomic studies, *Biomedicines*, **11**, 289, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020289>.
5. Popova, N. K., Ilchibaeva, T. V., and Naumenko, V. S. (2017) Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 308-317, <https://doi.org/10.1134/S0006297917030099>.
6. Leal, G., Comprido, D., and Duarte, C. B. (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity, *Neuropharmacology*, **76**, 639-656, <https://doi.org/10.1016/j.NEUROPHARM.2013.04.005>.
7. Liu, S. H., Shi, X. J., Fan, F. C., and Cheng, Y. (2021) Peripheral blood neurotrophic factor levels in children with autism spectrum disorder: a meta-analysis, *Sci. Rep.*, **11**, 15, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79080-w>.
8. Saghazadeh, A., and Rezaei, N. (2017) Brain-derived neurotrophic factor levels in autism: a systematic review and meta-analysis, *J. Autism Dev. Disord.*, **47**, 1018-1029, <https://doi.org/10.1007/s10803-016-3024-x>.
9. Szuhany, K. L., Bugatti, M., and Otto, M. W. (2015) A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor, *J. Psychiatric Res.*, **60**, 56-64, <https://doi.org/10.1016/j.JPSYCHIRES.2014.10.003>.
10. Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K. D., Verdu, E. F., and Collins, S. M. (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice, *Gastroenterology*, **141**, 599-609, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>.
11. Begliuomini, S., Lenzi, E., Ninni, F., Casarosa, E., Merlini, S., Pluchino, N., Valentino, V., Luisi, S., Luisi, M., Genazzaniet, A. R. (2008) Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm, *J. Endocrinology*, **197**, 429-435, <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0376>.
12. Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., and Ornoy, A. (2016) Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD), *Reproduct. Toxicol.*, **64**, 116-140, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.024>.
13. Meyza, K. Z., and Blanchard, D. C. (2017) The BTBR mouse model of idiopathic autism – current view on mechanisms, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **76**, 99-110, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>.
14. Reim, D., and Schmeisser, M. J. (2017) Neurotrophic factors in mouse models of autism spectrum disorder: focus on BDNF and IGF-1, *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **224**, 121-134, https://doi.org/10.1007/978-3-319-52498-6_7.
15. Sun, M.-K., Hongpaisan, J., and Alkon, D. L. (2016) Rescue of synaptic phenotypes and spatial memory in young fragile X mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **357**, 300-310, <https://doi.org/10.1124/jpet.115.231100>.
16. Jasien, J. M., Daimon, C. M., Wang, R., Shapiro, B. K., Martin, B., and Maudsley, S. (2014) The effects of aging on the BTBR mouse model of autism spectrum disorder, *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 225, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00225>.
17. Daimon, C. M., Jasien, J. M., Wood, W. H., Zhang, Y., Becker, K. G., Silverman, J. L., Crawley, J. N., Martin, B., and Maudsley, S. (2015) Hippocampal transcriptomic and proteomic alterations in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder, *Front. Physiol.*, **6**, 324, <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00324>.
18. Stephenson, D. T., O'Neill, S. M., Narayan, S., Tiwari, A., Arnold, E., Samaroo, H. D., Du, F., Ring, R. H., Campbell, B., Pletcher, M., Vaidya, V. A., and Mortonet, D. (2011) Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis, *Mol. Autism*, **2**, 7, <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-7>.

19. Ilchibaeva, T., Tsybko, A., Lipnitskaya, M., Eremin, D., Milutinovich, K., Naumenko, V., Popova, N. K. (2023) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mechanisms of autistic-like behavior in BTBR mice: crosstalk with the dopaminergic brain system, *Biomedicines*, **11**, 1482, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051482>.
20. Kataoka, T., Fuchikami, M., Nojima, S., Nagashima, N., Araki, M., Omura, J., Miyagi, T., Okamoto, Y., and Morinobu, S. (2019) Combined brain-derived neurotrophic factor with extinction training alleviate impaired fear extinction in an animal model of post-traumatic stress disorder, *Genes Brain Behav.*, **18**, e12520, <https://doi.org/10.1111/gbb.12520>.
21. Grimm, D., Kay, M. A., and Kleinschmidt, J. A. (2003) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6, *Mol. Ther.*, **7**, 839-850, [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00095-9).
22. Rodnyy, A. Y., Kondaurova, E. M., Bazovkina, D. V., Kulikova, E. A., Ilchibaeva, T. V., Kovetskaya, A. I., Baraboshkina, I. A., Bazhenova, E. Yu., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2022) Serotonin 5-HT₇ receptor overexpression in the raphe nuclei area produces antidepressive effect and affects brain serotonin system in male mice, *J. Neurosci. Res.*, **100**, 1506-1523, <https://doi.org/10.1002/jnr.25055>.
23. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., and Kulikov, V. A. (2008) Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 345-351, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.024>.
24. Deacon, R. M. J. (2006) Digging and marble burying in mice: simple methods for *in vivo* identification of biological impacts, *Nat. Protocols*, **1**, 122-124, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.20>.
25. Lueptow, L. M. (2017) Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice, *J. Visual. Exp.*, 55718, <https://doi.org/10.3791/55718>.
26. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and Popova, N. K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 97-101, <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2004.06.005>.
27. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>.
28. Kuzniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L., and Kalita, K. (2013) Brain-derived neurotrophic factor induces matrix metalloproteinase 9 expression in neurons via the serum response factor/c-Fos pathway, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2149-2162, <https://doi.org/10.1128/MCB.00008-13>.
29. Bahi, A. (2017) Hippocampal BDNF overexpression or microR124a silencing reduces anxiety- and autism-like behaviors in rats, *Behav. Brain Res.*, **326**, 281-290, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.010>.
30. Perry, E. K., Lee, M. L. W., Martin-Ruiz, C. M., Court, J. A., Volsen, S. G., Merrett, J. E., Folly, E., Iversen, P. E., Bauman, M. L., Perry, R. H., and Wenket, G. L. (2001) Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain, *Am. J. Psychiatry*, **158**, 1058-1066, <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.7.1058>.
31. Maussion, G., Moalic, J. M., Simonneau, M., Gorwood, P., and Ramoz, N. (2019) Increased expression of BDNF mRNA in the frontal cortex of autistic patients, *Behav. Brain Res.*, **359**, 903-909, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.023>.
32. Garcia, K. L. P., Yu, G., Nicolini, C., Michalski, B., Garzon, D. J., Chiu, V. S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., and Fahnstocket, M. (2012) Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **71**, 289-297, <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31824b27e4>.
33. Sadakata, T., Shinoda, Y., Oka, M., Sekine, Y., Sato, Y., Saruta, C., Miwa, H., Tanaka, M., Itohara, S., and Furuichiet, T. (2012) Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 21104-21109, <https://doi.org/10.1073/pnas.1210055109>.
34. Sadakata, T., Yoshikawa, T., Furuichi, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., Katoh-Semba, R., Nakajima, M., Sekine, Y., Tanaka, M., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K. J., Mori, N., Detera-Wadleigh, S. D., Ichikawa, H., Itohara, S., Yoshikawa, T., and Furuichiet, T. (2007) Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients, *J. Clin. Invest.*, **117**, 931-943, <https://doi.org/10.1172/JCI29031>.
35. Ma, K., Taylor, C., Williamson, M., Newton, S. S., and Qin, L. (2023) Diminished activity-dependent BDNF signaling differentially causes autism-like behavioral deficits in male and female mice, *Front. Psychiatry*, **14**, 1182472, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1182472>.
36. Li, A., Jing, D., Dellarco, D. V., Hall, B. S., Yang, R., Heilberg, R. T., Huang, C., Liston, C., Casey, B. J., and Leeet, F. S. (2021) Role of BDNF in the development of an OFC-amygdala circuit regulating sociability in mouse and human, *Mol. Psychiatry*, **26**, 955-973, <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0422-4>.

37. Bove, M., Palmieri, M. A., Santoro, M., Agosti, L. P., Gaetani, S., Romano, A., Dimonte, S., Costantino, G., Sikora, V., Tucci, P., Schiavone, S., Morgese, M. G., and Trabace, L. (2024) Amygdalar neurotransmission alterations in the BTBR mice model of idiopathic autism. *Translat. Psychiatry*, **14**, 193, <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02905-z>.
38. Scattoni, M. L., Martire, A., Cartocci, G., Ferrante, A., and Ricceri, L. (2013) Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T+ tf/J strain, a mouse model of autism, *Behav. Brain Res.*, **251**, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.028>.

OVEREXPRESSION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) IN THE FRONTAL CORTEX ENHANCES SOCIAL INTEREST IN BTBR MICE, A MODEL OF AUTISM

**Y. P. Kaminskaya, T. V. Ilchibaeva, A. I. Shcherbakova, E. R. Allayarova,
N. K. Popova, V. S. Naumenko, and A. S. Tsybko***

*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: antoncybko@mail.ru*

A large body of evidence implicates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the pathogenesis of autism spectrum disorders (ASD). A number of studies have noted BDNF deficiency in the hippocampus and frontal cortex of BTBR mice, which are a model of autism. We have previously shown that induction of BDNF overexpression in the hippocampus of BTBR mice reduces anxiety and the severity of stereotypic behavior, but does not affect social interest. In the present study, we induced BDNF overexpression in frontal cortical neurons of BTBR mice using an adeno-associated viral vector. We found a significant increase in social interest in the three-chamber social test in animals from the experimental group. At the same time, no changes were revealed in stereotypy, exploratory and anxiety-like behavior, as well as novel object recognition. Thus, we have shown for the first time that the BDNF in the frontal cortex is critically important for the expression of social interest in BTBR mice, since compensation for its deficiency in this structure eliminates the autism-like disorder of social behavior characteristic for these animals.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), autism, autism spectrum disorders, BTBR mice

ФЕРМЕНТ CYP74B34 МОРКОВИ (*Daucus carota*) С ДВОЙНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗЫ И ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ: ВЫЯВЛЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2024 Я.Ю. Топоркова*, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Н.В. Ланцова, А.Н. Гречкин

ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казанский институт биохимии и биофизики,
420111 Казань, Россия; электронная почта: kibmail@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 17.06.2024

После доработки 08.07.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Липоксигеназный каскад растений является источником окисленных производных жирных кислот – оксипинов, которые играют важную роль в регуляторных процессах, а также при формировании ответных реакций на воздействие стрессовых факторов. Одними из самых распространенных ферментов липоксигеназного каскада являются 13-специфичные гидропероксидлиазы (ГПЛ, синоним «гемиацетальсинтазы») подсемейства CYP74B. В настоящей работе описано обнаружение и клонирование гена CYP74B34 моркови (*Daucus carota* L.), а также описание биохимических свойств соответствующего рекомбинантного фермента. Фермент CYP74B34 проявляет активность в отношении 9- и 13-гидроперекисей линолевой (9-ГПОД и 13-ГПОД соответственно) и α -линоленовой (9-ГПОТ и 13-ГПОТ соответственно) кислот. CYP74B34 специфически превращает 9-ГПОТ и 13-ГПОТ в альдокислоты (продукты ГПЛ). Превращение 13-ГПОД приводит к образованию альдокислот (в качестве основных продуктов) и эпокиспиртов (в качестве минорных продуктов). Эпокиспирты являются продуктами активности эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). В то же время в случае превращения 9-ГПОД основными продуктами являются эпокиспирты, а минорными – альдокислоты. Таким образом, фермент CYP74B34 является первым описанным у моркови ферментом с двойной активностью ГПЛ и ЭАС. Присутствие соответствующих каталитических активностей подтверждено результатами анализа профилей оксипинов корней молодых проростков и зрелых растений. Кроме того, в работе описаны результаты замены аминокислотного остатка в одном из каталитически важных сайтов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липоксигеназный каскад, цитохромы P450, семейство CYP74, гидропероксидлиаза, эпоксиалкогольсинтаза, *Daucus carota*.

DOI: 10.31857/S0320972524080092 EDN: KDMQSB

ВВЕДЕНИЕ

Оксипины – биоактивные метаболиты, образующиеся при окислении полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), широко распространены во всех организмах: животных, растениях, бактериях, грибах и водорослях [1–6]. Это семейство структурно разнообразных соединений может образовываться в результате как неферментативных, так и ферментативных реакций [7–10]. Биосинтез большинства растительных оксипинов начинается с липоксигеназ (ЛОГ), превращающих линолевую и α -линоленовую кислоты в соответствующие 9- или 13-гидроперекиси, которые являются субстратами для нескольких типов ферментов,

включая алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС), эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС), пероксигеназы, редуктазы, а также для вторичных превращений, катализируемых ЛОГ [10, 11]. Из этих ферментов четыре (АОС, ГПЛ, ДЭС и ЭАС) образуют отдельное семейство CYP74 цитохромов P450, основанное на сходстве белковых последовательностей и биохимических свойств [2, 12, 13]. Семейство CYP74 растений входит в состав клана CYP74, наряду с CYP74-подобными ферментами протеобактерий [2], бурых водорослей [14], а также некоторых животных [2, 15–18], которые по требованиям номенклатуры (более 40% идентичности аминокислотных последовательностей) нельзя отнести к семейству CYP74. Поэтому было введено понятие клана CYP74 [19], объединяющего ферменты

* Адресат для корреспонденции.

семейства CYP74, а также представителей других семейств, проявляющих сходство с этими ферментами по структуре, механизмам каталитического действия и результатам филогенетических исследований. Интересно, что в последние годы среди членов клана CYP74 мы обнаружили ферменты, проявляющие несколько активностей, такие как LuDES/HPL с дополнительной эпоксиалкогольсинтазной активностью [20].

Одними из ферментов, обнаруженных у всех изученных к настоящему времени наземных растений, являются гидропероксидлиазы, которые относятся к подсемействам CYP74B [21–31], CYP74C [23, 32–37], CYP74L [38, 39], CYP74E [40], CYP74F [41] и CYP74G [42]. При этом было показано, что 13-специфичные ГПЛ подсемейства CYP74B обладают дополнительной активностью ЭАС [31], а 13-специфичная ГПЛ CYP74L1 плаунка *Selaginella moellendorffii* обладает дополнительными активностями ЭАС и АОС [39]. Более того, ферменты подсемейства CYP74C обладают двойной активностью ГПЛ и ЭАС в зависимости от используемого субстрата [37].

В данной работе мы сообщаем о выявлении и клонировании гена CYP74B34 моркови и биохимической характеристике соответствующего рекомбинантного фермента. До настоящей работы был известен единственный фермент CYP74 моркови – CYP74B33, который был определен как 9-специфичная алленоксидсинтаза с дополнительными активностями ГПЛ и ЭАС [43]. Последовательности CYP74B33 и CYP74B34 являются сходными по каталитически важным доменам; и в работе описано влияние единственного каталитически важного сайта, по которому различаются последовательности этих двух ферментов. Кроме того, в работе описываются профили оксипинов корней молодых и зрелых растений моркови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Линолевая и α -линоленовая кислоты, соевая липоксигеназа V типа, а также метанол для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были получены от фирмы «Sigma-Aldrich» (США); боргидрид натрия, силилирующие реагенты, N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид (диазальд) и изопропанол – от фирмы «Fluka» (Швейцария). (9S,10E,12Z)-9-Гидро-

перокси-10,12-октадекадиеновую (9-ГПОД) и (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидроперокси-10,12,15-октадекатриеновую (9-ГПОТ) кислоты получали в результате инкубации соответствующих кислот с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 (GeneBank: AAG61118.1) кукурузы (*Zea mays*) [44] в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0) при 0 °C при постоянном кислородном барботаже. (9Z,11E,13S)-13-Гидроперокси-9,11-октадекадиеновую (13-ГПОД) и (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновую (13-ГПОТ) кислоты получали в результате инкубации соответствующих кислот с соевой липоксигеназой V типа в 50 мМ буфере Tris-HCl (pH 9,0) при 23 °C при постоянном кислородном барботаже. Экстрагированные гидроперекиси (в виде свободных карбоксильных кислот) дважды очищали методом ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм; 4,0 × 250 мм; «Elsico», Россия) в изократическом режиме (скорость потока – 0,4 мл/мин), используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98,1/1,8/0,1 (v/v)). Гидроперекиси были хроматографически чистыми и как минимум на 98% оптически чистыми, как было определено с помощью хирально-фазовой ВЭЖХ.

Методы биоинформатики. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей семейства CYP74 проводили в базах данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), а их сравнение проводили с помощью программы BLAST. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 («Invitrogen», США). Для построения филогенетического дерева аминокислотные последовательности выравнивали с использованием программы ClustalW, интегрированной в пакет программ MEGA10 [45]. Молекулярно-филогенетический анализ проведен методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) с применением модели коррекции Пуассона [46]. Устойчивость полученного филогенетического дерева оценивали методом бутстрепа, используя 1000 бутстреп-реплик [47].

Клонирование гена CYP74B34. Корни (100 мг) молодых проростков моркови собирали, замораживали и гомогенизировали, растирая в жидком азоте. Тотальную РНК из корней выделяли

Принятые сокращения: АОС – алленоксидсинтаза; ГПЛ – гидропероксидлиаза; 9-Г(П)ОД – (9S,10E,12Z)-9-гидро(перо)кси-10,12-октадекадиеновая кислота; 13-Г(П)ОД – (9Z,11E,13S)-13-гидро(перо)кси-9,11-октадекадиеновая кислота; 9-Г(П)ОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидро(перо)кси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-Г(П)ОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидро(перо)кси-9,11,15-октадекатриеновая кислота; ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия; ДЭС – дивинилэфирсинтаза; ЭАС – эпоксиалкогольсинтаза; Me/TMC – триметилсилилированное производное метилового эфира.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для клонирования гена, кодирующего фермент CYP74B34, и сайт-направленного мутагенеза

Название праймера	Последовательность 5'→3'
CYP74B34EkF	gACgACgACA Ag ATGTCAGCTAGCGATAAAACACC
CYP74B34EkR	gAggAgAAgCCCggTGCATGCTTAGCCTTTTCGAG
CYP74B34_P355Af	CTCAACCCGCCCGTT GCT CTCCAGTTCG
CYP74B34_P355Ar	CGAACTGGAG AGCA ACGGGCGGGTTGAG
CYP74B33_A367Pf	GGCTCAACCCGCCCGT GC ATTACAATATGCGAG
CYP74B33_A367Pr	CTCGCATATTGTAAT TGG CACGGGCGGGTTGAGCC

Примечание. Серым цветом выделены последовательности, необходимые для безлигазного клонирования в векторе рЕТ-32 Ek/LIC. Полу жирным шрифтом выделены кодоны, измененные сайт-направленным мутагенезом.

с помощью коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США), после чего препарат подвергали обработке ДНКазой («Qiagen»). Определение концентрации РНК проводили с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen») и коммерческого набора Quant-iT TM RNA HS Assay Kit («Invitrogen»). Для постановки реакции обратной транскрипции и получения двуцепочечной кДНК использовали коммерческий набор MINT («Евроген», Россия). Полученную двуцепочечную кДНК использовали для амплификации открытой рамки считывания гена CYP74B34 моркови с помощью Q5®High-Fidelity 2X Master Mix («NEB», США) и праймеров, перечисленных в табл. 1. Полученную последовательность длиной 1437 п.н., кодирующую белок длиной 479 аминокислотных остатков, клонировали в векторе рЕТ-32 EK/LIC («Novagen», США) методом безлигазного клонирования.

Сайт-направленный мутагенез генов CYP74B33 и CYP74B34. Модификацию первичной структуры рекомбинантных белков проводили, используя метод сайт-направленного мутагенеза, разработанный для генов, клонированных на плазмидных векторах [48, 49]. Для синтеза мутантных плазмид проводили ПЦР с использованием Q5®High-Fidelity 2X Master Mix («NEB») и праймеров, перечисленных в табл. 1. Анализ результатов сайт-направленного мутагенеза проводили с помощью генетического анализатора Нанофор 5 («Синтол», Россия).

Получение рекомбинантных ферментов дикого типа и мутантных форм. Для наработки рекомбинантного фермента CYP74B34 использовали вектор рЕТ-32 EK/LIC системы рЕТ («Novagen»), реципиентом которого служили клетки штамма *Escherichia coli* Rosetta-gami(DE3) pLysS B («Novagen»). Клетки бактериального продуцента засеивали в 2 мл среды LB/M9 (1/1 (v/v)), содержащей 500 мг/литр ампициллина,

12,5 мг/литр тетрациклина, 35 мг/литр канамицина и 35 мг/литр хлорамфеникола. Культуру клеток выращивали в шейкере-инкубаторе в течение 14 ч при 37 °С, после чего суспендировали в 1 литре свежей среды LB/M9 с теми же антибиотиками. Культуру клеток продуцента выращивали при интенсивной аэрации (250 об./мин) и умеренной температуре (32 °С) до поглощения при 600 нм, равного 0,6–0,8. Клеточную суспензию быстро охлаждали до 20 °С на ледяной бане, немедленно добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 0,1 мМ и предшественник гема – δ-аминолевулиновую кислоту – из расчета 50 мг/литр. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 14 ч при умеренной аэрации (180 об./мин) и пониженной температуре (20 °С), после чего клетки собирали центрифугированием (7500 g, 5 мин, 4 °С).

Клеточные лизаты получали путем механического разрушения с помощью системы French Press Cell Disrupter («Thermo Scientific», США). Очистку рекомбинантного белка проводили металлоаффинной хроматографией на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP («Bio-Rad», США). Целевой белок элюировали Na-фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим 30 мМ гистидина. Нарботку белка, а также степень очистки оценивали по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза в системе PowerPac Universal MiniProtean («Bio-Rad»). Гели окрашивали Coomassie R250. Концентрацию фермента измеряли по содержанию гема [50].

Кинетические исследования. Ферментативную активность очищенного рекомбинантного фермента CYP74B34 дикого типа определяли по снижению поглощения при 234 нм. Измерения проводили с использованием спектрофотометра РВ 2201 В («Солар», Беларусь). Концентрация суб-

страта составляла от 5 до 150 мкмоль. Анализ проводили при 25 °C в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,0). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Коэффициент молярной экстинкции для 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот при 234 нм составляет 25 000 М⁻¹·см⁻¹. Кинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 11 («Systat Software Inc.», США). Для каждого варианта было поставлено пять независимых экспериментов; для расчетов использовали усредненные значения.

Условия проведения и анализ продуктов реакций, катализируемых рекомбинантным ферментом CYP74B34 дикого типа и мутантных форм ферментов CYP74B33 и CYP74B34. Рекомбинантные ферменты (10 мкг) инкубировали с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ в течение 15 мин при 4 °C в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,0), после чего pH смеси снижали до 6,0 и продукты экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1/1 (v/v)), метилировали диазо-метаном и силилировали смесью пиридин/гексаметилдисилазан/триметилхлорсилана (1/1/1 (v/v)) в течение 30 мин при 23 °C. Затем силилирующие реагенты удаляли в вакууме. Сухой остаток растворяли в 100 мкл гексана и подвергали анализу методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) в виде триметилсилилированных

производных метилового эфира (Me/TMC) с помощью масс-спектрометра QP2020A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A («Shimadzu», Япония). В некоторых случаях продукты восстанавливали NaBH₄, после чего метилировали и триметилсилилировали. Кроме того, в отдельных случаях перед метилированием и триметилсилилированием продукты восстановления NaBH₄ гидрировали над PtO₂. Продукты (с/без восстановления NaBH₄) анализировали в виде метиловых эфиров (Me) либо Me/TMC методом ГХ-МС, как описано ранее [34].

Профилирование оксипиринов молодых и старых корней растений моркови. Молодые и старые корни растений моркови (по 3 г) растирали в жидком азоте, после чего добавляли ледяную смесь гексана и этилацетата (1/1 (v/v)). Полученные гомогенаты центрифугировали (8000 g, 20 мин, 4 °C), супернатанты отбирали, растворитель упаривали в вакууме. Полученные экстракты растворяли в смеси хлороформ/изопропанол (2/1 (v/v)) и пропускали через картриджи Supelclean LC-NH₂ (3 мл; «Supelco», США). Свободные карбоновые кислоты элюировали смесью этилацетата и уксусной кислоты (98/2 (v/v)). Восстановление, метилирование и триметилсилилирование продуктов проводили, как описано выше. Продукты (Me/TMC без или после восстановления NaBH₄) анализировали методом ГХ-МС, как описано выше.

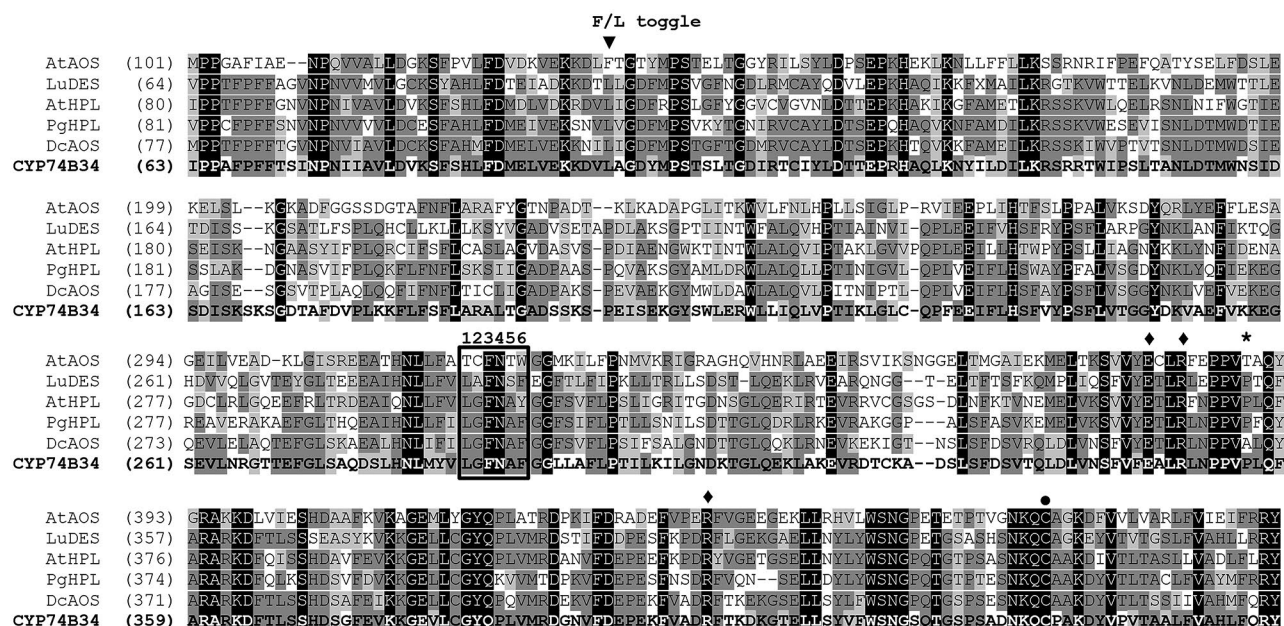


Рис. 1. Множественное выравнивание частичных аминокислотных последовательностей фермента CYP74B34 и описанных ранее представителей CYP74: At – *Arabidopsis thaliana*, AtAOS, NP_199079.1, AtHPL Q9ZSY9.1; Lu – *Linum usitatissimum*, LuDES, ADP03054.2; Pg – *Psidium guajava*, PgHPL, AAK15070.1; Dc – *Daucus carota*, DcAOS WOH02659.1. Стрелкой указан сайт «F/L toggle»; участок перегиба I-спирали обведен рамкой и пронумерован. ERR-триада и цистеин в гем-связывающем домене указаны ♦ и • соответственно. Сайт внутри PPV-мотива, в котором были произведены замены в последовательностях ферментов CYP74B33 (DcAOS) и CYP74B34, обозначен звездочкой

в кварцевую колонку MDN-5S (5% фенил, 95% метилполисилоксана) длиной 30 м, диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм («Supelco», США) при программировании температуры от 120 °С до 240 °С по 10 °С/мин, подавая в систему в качестве газа-носителя гелий с линейной скоростью 30 см/с. Полное сканирование или мониторинг селективных ионов проводили, используя электронную ионизацию (70 эВ) [34].

Биоинформатический и филогенетический анализ последовательности СУР74В34. Первич-

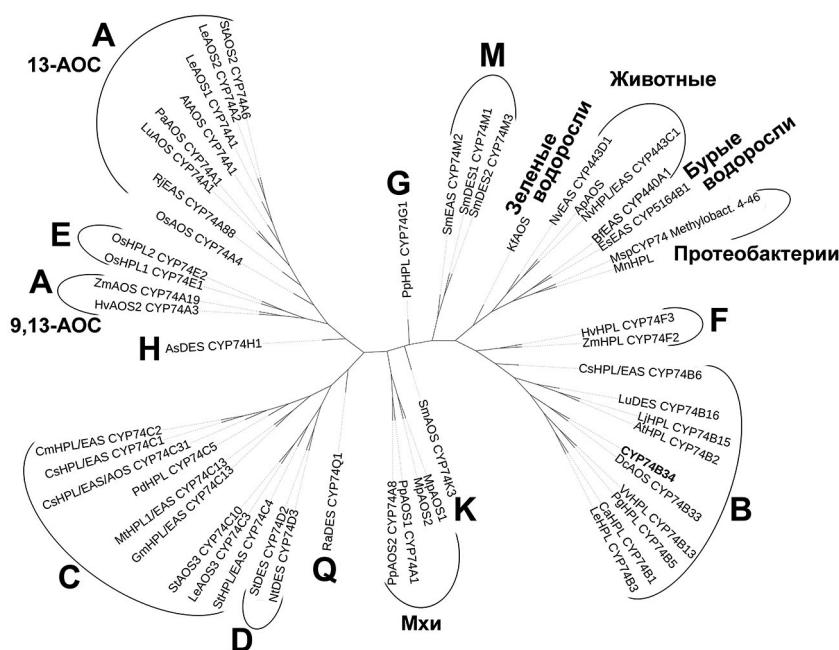


Рис. 2. Неукорененное филогенетическое древо клана CYP74. Подсемейства обведены и обозначены А, В, С и т.д. Представители семейства CYP74 растений: As – *Allium sativum*; AsDES – CYP74H1, GI: 83414021; At – *Arabidopsis thaliana*; AtAOS – CYP74A1, GI: 15239032; AtHPL – CYP74B2, GI: 3822403; Ca – *Capsicum annuum*; CaHPL – CYP74B1, GI: 1272340; Cm – *Cucumis melo*; CmHPL/EAS – CYP74C2, GI: 14134199; Csa – *Cucumis sativus*; CsaHPL/EAS – CYP74C1_CS, GI: 101211324; CsaHPL/EAS/AOS – CYP74C31, GI: 101211574; CsaHPL – CYP74B6, GI: 101223126; DcAOS – *Daucus carota*; CYP74B33 – GI: 108219710; Hv – *Hordeum vulgare*; HvAOS2 – CYP74A3, SI: AJ251304.1; HvHPL – CYP74F3, CAC82980.1; Gm – *Glycine max*; GmHPL/EAS – CYP74C13_GM, XP_028186824.1; Kf – *Klebsormidium flaccidum* (green alga); KfAOS – SI: LC032459.1; Le – *Solanum lycopersicum*; LeAOS1 – CYP74A1, GI: 7581989; LeAOS2 – CYP74A2, GI: 7677376; LeAOS3 – CYP74C3, GI: 25991603; LeHPL – CYP74B3, GI: 7677378; Lj – *Lotus japonicus*; LjHPL – CYP74B15, SI: AB600748.1; Lu – *Linum usitatissimum*; LuAOS – CYP74A1, GI: 1352186; LuDES – CYP74B16, GI: 379048766; Mp – *Marschandia polymorpha*; MpAOS1 – SI: LC032457.1, MpAOS2 – SI: LC032458.1; MthHPL/EAS – CYP74C13_MT, GI: 33504430; Nt – *Nicotiana tabacum*; NtDES – CYP74D3, GI: 107799697; Os – *Oryza sativa*; OsaOS – CYP74A4, GI: 115455571; OsHPL1 – CYP74E2, GI: 115445057; OsHPL2 – CYP74E1, GI: 125538638; Pa – *Parthenium argentatum*; PaAOS – CYP74A1, GI: 218511958; Pd – *Prunus dulcis*; PdHPL – CYP74C5, GI: 33300600; Pg – *Psidium guajava*; PgHPL – CYP74B5, GI: 13183137; Pp – *Physcomitrella patens*; PpAOS1 – CYP74A1, GI: 22217985; PpAOS2 – CYP74A8, GI: 168014176; PpHPL – CYP74G1, GI: 76057841; Ra – *Ranunculus acris*; RaDES – CYP74Q1, GI: 768564485; Rj – *Ranunculus japonicus*; RjEAS – CYP74A88, SI: MK061531; Sm – *Selaginella moellendorffii*; SmDES1 – CYP74M1, GI: 9660714; SmEAS – CYP74M2, GI: 9637471; SmDES2 – CYP74M3, GI: 9654395; SmAOS – CYP74K3, SI: EFJ20163.1; St – *Solanum tuberosum*; StAOS2 – CYP74A6, GI: 86769479; StAOS3 – CYP74C10, GI: 56605358; StHPL/EAS – CYP74C4, GI: 102588560; StDES – CYP74D2, GI: 12667099; Vv – *Vitis vinifera*; VvHPL – CYP74B13, FJ861082; Zm – *Zea mays*; ZmAOS – CYP74A19, GI: 223947589; ZmHPL – CYP74F2, GI: 162462890. Представители других семейств клана CYP74: Es – *Ectocarpus siliculosus* (brown alga); EsEAS – CYP5164B1, GI: 1109557544; Mn – *Methylobacterium nodulans* (proteobacteria); MnHPL – SI: WP_015932840.1; Msp – *Methylobacterium* sp. 4-46; MspCYP74 – SI: WP_012335549.1. Ap – *Acropora palmata* (Metazoa); ApAOS – GI: 187948710; Bf – *Branchiostoma floridae* (Metazoa); BfEAS – CYP440A1, GI: 189312561; Nv – *Nematostella vectensis* (Metazoa); NvEAS – CYP443D1, GI: 5516222; NvHPL/EAS – CYP443C1

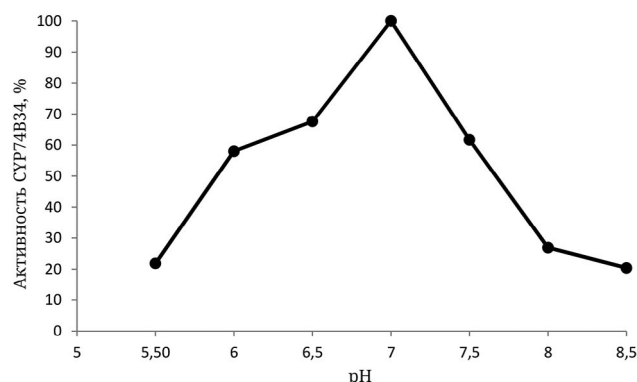


Рис. 3. Зависимость уровня каталитической активности фермента CYP74B34 от значения pH реакционной смеси

ная структура фермента CYP74B34 имеет консервативные мотивы, общие для цитохромов P450 в целом (мотивы ETLR и P(E/D)RF, которые образуют так называемую ERR-триаду, участвующую в стабилизации структуры белка [51]) и ферментов CYP74 в частности, такие как участок перегиба I-спирали, соответствующий кислород-связывающему домену монооксигеназ P450, и сайт «F/L toggle» вблизи N-конца (рис. 1). Участок перегиба I-спирали фермента CYP74B34 имеет последовательность LGFNAF, характерную для 13-специфичных ГПЛ подсемейства CYP74B. В сайте «F/L toggle» фермента CYP74B34 находится остаток лейцина, как у всех описанных ранее гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз. У алленоксидсинтаз и эпоксиалкогольсинтаз в данном сайте, как правило, находится остаток фенилаланина. Единственным исключением, известным на данный момент, является алленоксидсинтаза DcAOS (CYP74B33) моркови, у которой в сайте «F/L toggle» находится остаток лейцина. Тем не менее DcAOS входит в состав подсемейства CYP74B. Таким образом, структура каталитически важных доменов указывает на принадлежность фермента CYP74B34 к подсемейству CYP74B. Филогенетический анализ также это подтверждает (рис. 2).

Наибольшим сходством последовательность CYP74B34 обладает с ферментом DcAOS (CYP74B33).

Основные каталитически важные домены у этих двух ферментов имеют идентичные последовательности. И основным отличием в каталитически важных доменах является сайт Pro355 у фермента CYP74B34 (Ala367 – у фермента CYP74B33; рис. 1), расположенный внутри PPV-мотива, который находится в составе ERR-триады.

Получение рекомбинантного фермента CYP74B34 дикого типа и мутантных форм ферментов CYP74B33 и CYP74B34. Ген CYP74B34 локализован в 4-й хромосоме в локусе LOC108217632 (34,138,074; 34,140,278). Ген CYP74B34 (Gene ID: 108217632) состоит из двух экзонов и одного интрона и имеет длину 2205 п.н. Для получения рекомбинантного белка CYP74B34 ORF соответствующего гена (1437 п.н.) клонировали в экспрессирующем векторе pET-32 Ek/LIC методом безлигазного клонирования. Для клонирования использовали полную последовательность, поскольку целевой ген не содержит последовательности, транспортирующей в хлоропласты. Целевой белок получали в клетках *E. coli* Rosetta-gami(DE3) pLysS B; очистку проводили металлоаффинной хроматографией (рис. П1 в Приложении). Очищенный фермент использовали для определения каталитических свойств. Полные нуклеотидная и аминокислотная последовательности представлены на рис. П2 в Приложении. Сайт-направленный мутагенез генов CYP74B33 и CYP74B34 проводили с помощью ПЦР с использованием праймеров, перечисленных в табл. 1. Получение и очистку мутантных форм CYP74B33_A367P и CYP74B34_P355A проводили по тем же методикам, что и фермента CYP74B34 дикого типа.

Определение кинетических параметров реакций, катализируемых рекомбинантным ферментом CYP74B34. Для характеристики каталитических свойств рекомбинантного фермента CYP74B34 использовали 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ в качестве субстратов. Оптимальным pH для каталитической активности рекомбинантного фермента CYP74B34 является 7,0 (рис. 3). Поэтому для определения каталитических свойств этого фермента использовали Na-фосфатный буфер (100 мМ; pH 7,0). Фермент CYP74B34

Таблица 2. Кинетические параметры реакций, катализируемых ферментом CYP74B34

Субстрат	k_{cat} (с ⁻¹)	K_M (мкМ)	k_{cat}/K_M (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	Субстратная специфичность, % 9(S)-ГПОТ
9-ГПОТ	283 ± 17	42 ± 3,3	6,9	100
9-ГПОД	225 ± 15,6	58 ± 7,3	3,8	55
13-ГПОТ	125 ± 4,5	67 ± 9,1	1,8	26
13-ГПОД	88 ± 6,3	72 ± 5,1	1,2	17

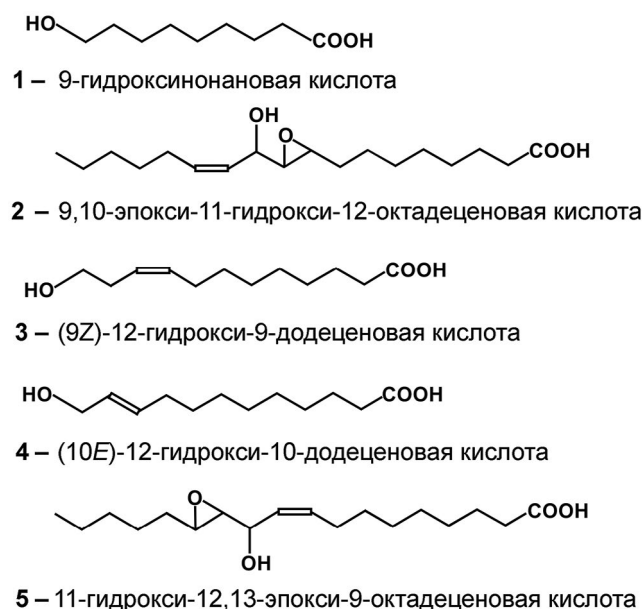


Рис. 4. Структурные формулы продуктов каталитического действия фермента CYP74B34 моркови дикого типа

проявляет слабую активность в отношении 13-гидроперекисей линолевой и α -линоленовой кислот, однако эффективно утилизирует 9-гидроперекиси. Сродство и каталитическая активность рекомбинантного фермента CYP74B34 к (9S)-ГПОТ были значительно выше, чем к другим субстратам, о чем свидетельствуют значения K_M и k_{cat} (табл. 2). Наименее предпочтительным субстратом для фермента CYP74B34 является 13-ГПОД.

Выявление продуктов каталитического действия рекомбинантного фермента CYP74B34. Для определения продуктов реакций гидроперекиси (100 мкг) инкубировали в течение 15 мин при 25 °C в 10 мл Na-фосфатного буфера (100 мМ; pH 7,0) в присутствии фермента CYP74B34. Продукты инкубаций в виде Me/TMC после восстановления с помощью NaBH₄ подвергали анализу методом ГХ-МС. Структурные формулы продуктов реакций представлены на рис. 4.

Предпочтительными субстратами фермента CYP74B34 были (9S)-ГПОТ и (9S)-ГПОД. Результаты анализа ГХ-МС восстановленных NaBH₄ продуктов (Me/TMC) инкубации фермента с 9-ГПОТ представлены на рис. 5, а. Был обнаружен единственный относительно летучий продукт **1** (рис. 5, а). Электронный масс-спектр продукта **1** (Me/TMC) содержал следующие фрагменты: [M–Me]⁺ при m/z 245 (9%); [M–MeO]⁺ при m/z 229 (2%); [245–MeOH]⁺ при m/z 213 (37%), m/z 138 (4%), m/z 107 (7%); [CH₂=O⁺–SiMe₃]⁺ при m/z 103 (16%), m/z 89 (19%), m/z 75 (30%); [SiMe₃]⁺ при m/z 73 (100%), m/z 69 (37%). Параметры фрагментации полностью соответствовали спектру 9-гидроксинonanовой кислоты

(Me/TMC) [52]. Кроме того, когда продукты (Me/TMC) инкубации фермента CYP74B34 с 9-ГПОТ анализировали методом ГХ-МС без предварительного восстановления NaBH₄, был обнаружен продукт, масс-спектр электронного удара которого (Me) содержал [M⁺–H] при m/z 185 (5%); [M–CO]⁺ при m/z 158 (1,5%); [M–OMe]⁺ при m/z 155 (2%); [M–C8/C9]⁺ при m/z 143 (22%), m/z 87 (66%), а также ион перегруппировки Маклафферти метилового эфира при m/z 74 (100%). Спектр соответствовал таковому 9-оксонonanовой кислоты (Me) [52]. Таким образом, данные ГХ-МС подтверждают структуру 9-оксонonanовой кислоты для продукта ферментативного превращения 9-ГПОТ.

После инкубации CYP74B34 с 9-ГПОД соединение **1** образовывалось лишь в следовом количестве, о чем свидетельствуют данные ГХ-МС-анализа продуктов. Основными продуктами превращения 9-ГПОД были значительно более полярные продукты, из которых основным был пик **2** и два минорных пика, элюируемых непосредственно после пика **2** (рис. 5, б). Масс-спектр электронного удара продукта **2** (Me/TMC) содержал M⁺ при m/z 398 (1%); [M–Me]⁺ при m/z 383 (2%); [M–C1/C8]⁺ при m/z 241 (4%); [M–C1/C9]⁺ при m/z 212 (7%); [M–C1/C10]⁺ при m/z 199 (85%) и [SiMe₃]⁺ при m/z 73 (100%). Интенсивный пик при m/z 199 в спектре свидетельствовал о присутствии оксиранилкарбинольной группы, включая оксиран при C9/C10 и смежную с ним окси-ТМС группу (C11) [14]. Каталитическое гидрирование соединения **2** над PtO₂ с последующими метилированием и триметилсилилированием приводили к образованию продукта, масс-спектр которого содержал следующие основные фрагменты: [M–Me]⁺ при m/z 385 (3%); [M–MeO]⁺ при m/z 369 (1%); [M–Me–MeOH]⁺ при m/z 353 (1%); [M–н-гептил]⁺ при m/z 301 (12%); [M–C11/C18 + TMC–Me]⁺ при m/z 257 (18%); [M–C1/C9–H]⁺ при m/z 215 (22%); [M–C1/C10]⁺ при m/z 201 (61%); [SiMe₃]⁺ при m/z 73 (100%) и соответствовал таковому 9,10-эпокси-11-гидроксиоктадекановой кислоты (Me/TMC) [14]. Таким образом, данные масс-спектрометрии подтвердили, что соединение **2** является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислотой. Минорные пики, элюируемые непосредственно после пика **2** (рис. 5, б), имели идентичные масс-спектры, таким образом, являясь стереоизомерами соединения **2**, предположительно, различающимися стереоконфигурацией при C11 или C12.

Каталитическая активность фермента CYP74B34 по отношению к 13-гидроперекисям линолевой и α -линоленовой кислот была значительно ниже, о чем свидетельствуют данные кинетических параметров (табл. 2). Большие пики 13-ГОД и 13-ГОТ на хроматограммах (рис. 5, в и г) восстановленных NaBH₄ продуктов (Me/TMC) свидетельствуют

о значительных остатках гидроперекисей после инкубации с ферментом.

Анализ продуктов инкубации фермента СУР74В34 с 13-ГПОТ методом ГХ-МС выявил два основных относительно летучих продукта **3** и **4** (Me/TMC производные NaBH_4 -восстановленных продуктов; рис. 5, в). Масс-спектр продукта **3** содержал следующие характерные фрагменты: M^+ при m/z 300 (0,04%); $[\text{M}-\text{Me}]^+$ при m/z 285 (1%); $[285-\text{MeOH}]^+$ при m/z 253 (5%); $[\text{M}-\text{TMC}-\text{OH}]^+$ при m/z 210 (3%); $[210-\text{MeOH}]^+$ при m/z 178 (12%), m/z 159 (10%), m/z 123 (12%); $[\text{CH}_2=\text{O}^+-\text{SiMe}_3]$ при m/z 103 (100%) и $[\text{SiMe}_3]^+$ при m/z 73 (93%). Спектр соответствовал таковому (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовой кислоты (Me/TMC), которая образуется в результате восстановления с помощью NaBH_4 альдокислоты (9Z)-12-оксо-9-додеценовой кислоты, продукта реакции 13-ГПЛ [52]. Каталитическое гидрирование продукта **3** с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию соединения, идентифицированного по его масс-фрагментации: M^+ при m/z 302 (0,3%); $[\text{M}-\text{Me}]^+$ при m/z 287 (43%); $[285-\text{MeOH}]^+$ при m/z 255 (100%), m/z 159 (9%), m/z 107 (28%), m/z 89 (30%); $[\text{Me}_2\text{Si}^+-\text{OH}]$ при m/z 75 (88%) и $[\text{SiMe}_3]^+$ при m/z 73 (84%), как 12-гидроксидодекановая кислота (Me/TMC) [52].

Масс-спектр продукта **4** (элюируемого непосредственно после пика **3**) содержал $[\text{M}]^+$ при m/z 300 (0,5%); $[\text{M}-\text{Me}]^+$ при m/z 285 (0,7%); $[285-\text{MeOH}]^+$ при m/z 253 (4%); $[\text{M}-\text{TMC}-\text{OH}-\text{MeOH}]^+$ при m/z 178 (0,6%), m/z 159 (5%), m/z 143 (2%), m/z 129 (19%); $[\text{Me}_2\text{Si}^+-\text{OH}]$ при m/z 75 (17%) и $[\text{SiMe}_3]^+$ при m/z 73 (86%). Спектр соответствовал таковому (10E)-12-гидрокси-10-додеценовой кислоты (Me/TMC), образующейся в результате восстановления с помощью NaBH_4 травматина, (10E)-12-оксо-10-додеценовой кислоты – продукта спонтанной аллильной изомеризации альдокислоты (9Z)-12-оксо-9-додеценовой кислоты. Таким образом, соединение **4** также является продуктом 13-ГПЛ. Каталитическое гидрирование продукта **4** с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию 12-гидроксидодекановой кислоты (Me/TMC), описанной выше.

В результате ГХ-МС-анализа продуктов (Me/TMC-производных, восстановленных с помощью NaBH_4 продуктов) инкубации фермента СУР74В34 с 13-ГПОД выявили те же основные продукты **3** и **4** (рис. 5, г). Дополнительным продуктом этой реакции являлись соединения **5** и несколько минорных пиков, элюируемых непосредственно после соединения **5**. Масс-спектр продукта **5** содержал M^+ при m/z 398 (0,1%); $[\text{M}-\text{Me}]^+$ при m/z 383 (0,7%); $[\text{M}-\text{n-пентил}]^+$ при m/z 327 (2%); $[\text{M}-\text{Me}(\text{CH}_2)_4\text{CHO}]^+$ при m/z 298 (3%); $[\text{M}-\text{C}_{12}/\text{C}_{18}]^+$ при m/z 285 (69%), m/z 129 (40%) и $[\text{SiMe}_3]^+$ при m/z 73 (100%). Спектр

соответствовал таковому 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Me/TMC) [14]. Гидрирование соединения **5** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию соединения, идентифицированного как 11-гидрокси-12,13-эпоксидодекановая кислота (Me/TMC) по следующему масс-спектру: $[\text{M}-\text{Me}]^+$ при m/z 385 (7%); $[385-\text{MeOH}]^+$ при m/z 353 (2%); $[\text{M}-\text{Me}(\text{CH}_2)_4\text{CHO} + \text{H}]^+$ при m/z 301 (7%); $[\text{M}-\text{C}_{12}/\text{C}_{18}]^+$ при m/z 287 (42%), m/z 271 (13%); $[\text{M}-(\text{CH}_2)_9\text{COOMe}]^+$ при m/z 215 (7%), m/z 129 (20%), m/z 95 (26%), m/z 81 (35%), m/z 75 (50%); $[\text{Me}_2\text{Si}^+-\text{OH}]$ при m/z 75 (53%) и $[\text{SiMe}_3]^+$ при m/z 73 (100%). Таким образом, полученные данные подтвердили структуру соединения **5** как 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Me/TMC) [14]. Минорные пики, элюируемые непосредственно после пика **5** (рис. 5, г), имели идентичные масс-спектры, таким образом, являясь стереоизомерами соединения **5**, по-видимому, различающимися стереоконфигурацией при C11 или C12.

Выявление продуктов каталитического действия мутантных форм ферментов СУР74В33 и СУР74В34. Для выявления изменений в катализе мутантных форм СУР74В33_А367Р и СУР74В34_Р355А по сравнению с соответствующими ферментами дикого типа проводили инкубации с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Анализ хроматограмм продуктов инкубации показал, что замена А367Р, внесенная в последовательность фермента СУР74В33, являющегося 9-специфичной АОС, привела к практически полной потере способности катализировать превращения субстратов (рис. ПЗ в Приложении). Эта мутантная форма полностью потеряла способность превращать предпочтительные субстраты – 9-ГПОД и 9-ГПОТ. Слабая активность наблюдалась в отношении 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Единственными обнаруженными продуктами, присутствующими в минорном количестве при инкубации с 13-гидроперекисями, были соединения **3** и **4** – (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовая и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовая кислоты соответственно (рис. ПЗ в Приложении). Присутствие данных продуктов свидетельствует о сохранении у мутантной формы СУР74В33_А367Р небольшой 13-ГПЛ активности при полной потере активностей АОС и ЭАС.

Замена Р355А в ферменте СУР74В34 также повлияла на катализ. Мутантная форма СУР74В34_Р355А сохранила способность катализировать превращение 9-гидроперекисей жирных кислот (рис. 6), тогда как способность утилизировать 13-гидроперекиси, по сравнению с дикой формой, была утрачена полностью. Единственным минорным продуктом превращения 13-ГПОД при участии этой мутантной формы был эпокиспирт –

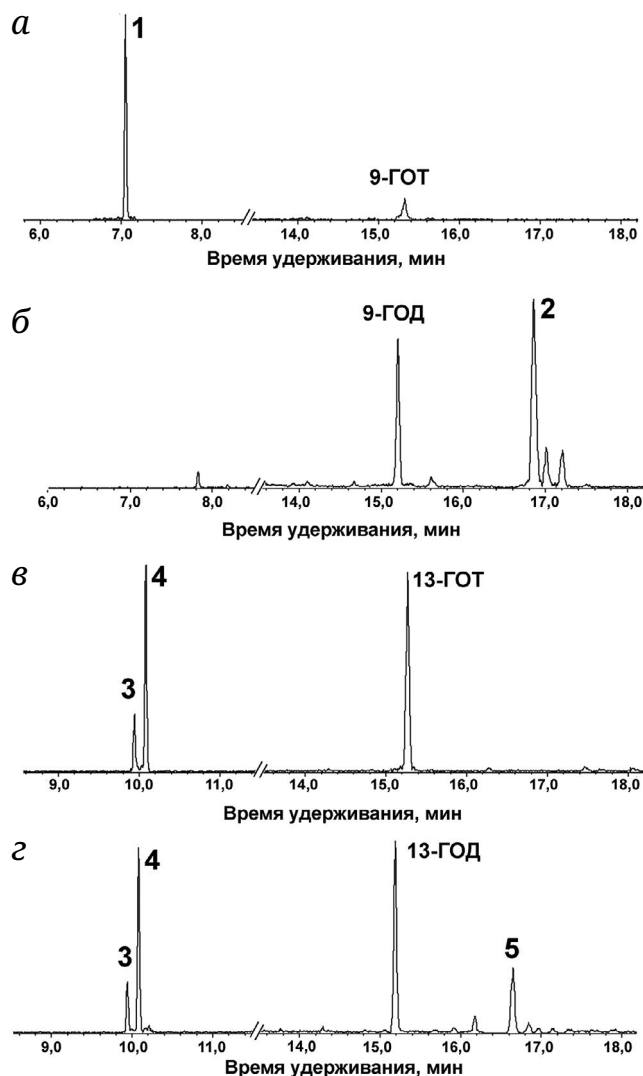


Рис. 5. Хроматограммы полного ионного тока продуктов (Me/TMS после восстановления с помощью NaBH_4) превращения 9-ГПОТ (а), 9-ГПОД (б), 13-ГПОД (в) и 13-ГПОТ (г) при участии рекомбинантного фермента CYP74B34 дикого типа. 9-ГОД – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-ГОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидрокси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-ГОД – (9Z,11E,13S)-13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая кислота; 13-ГОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидрокси-9,11,15-октадекатриеновая кислота

9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценивая кислота. В то же время мутантная форма CYP74B34_P355A катализировала превращение 9-ГПОД с образованием соединения **1** – 9-гидроксинонановой кислоты (9-ГПЛ-продукт) в качестве основного продукта. Минорным продуктом в той же реакции было соединение **2** – эпокиспирт 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценивая кислота (Me/TMS). Единственным продуктом превращения 9-ГПОТ при участии этой мутантной формы, так же как при участии фермента дикого типа, была 9-гидроксинонановая кислота.

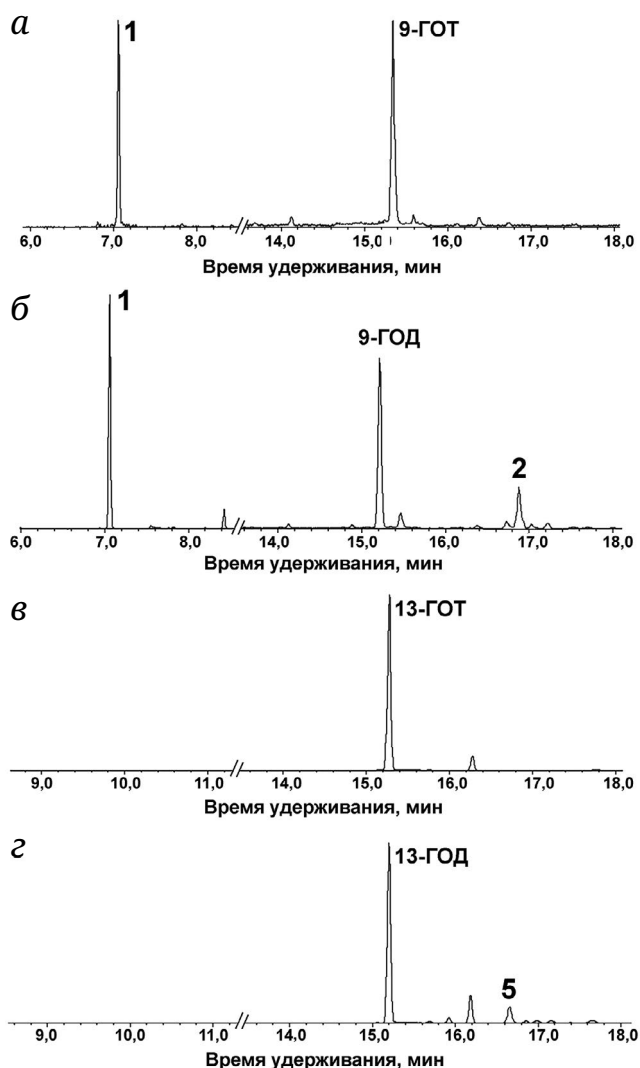


Рис. 6. Хроматограммы полного ионного тока продуктов (Me/TMS после восстановления с помощью NaBH_4) превращения 9-ГПОД (а), 9-ГПОТ (б), 13-ГПОД (в) и 13-ГПОТ (г) при участии мутантной формы CYP74B34_P355A. 9-ГОД – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-ГОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидрокси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-ГОД – (9Z,11E,13S)-13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая кислота; 13-ГОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидрокси-9,11,15-октадекатриеновая кислота

Профилирование оксипинов корней молодых и старых растений моркови. Поскольку 9-липоксигеназный каскад характерен, как правило, для подземных органов, для проверки присутствия продуктов каталитического действия фермента CYP74B34 выбрали корни растений моркови – молодых и старых. Предпочтительными субстратами фермента CYP74B34 являются 9-гидроперекиси линолевой и α -линоленовой кислот, поэтому активность этого фермента в растении оценивали после инкубации гомогенатов корней с линолевой и α -линоленовой кислотами.

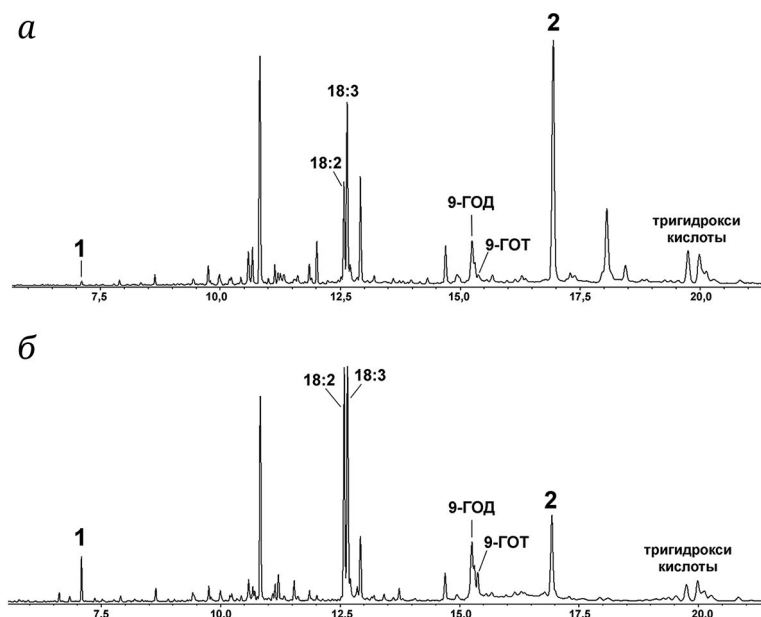


Рис. 7. Хроматограммы полного ионного тока продуктов (Me/TMS после восстановления с помощью NaBH_4) инкубации гомогенатов молодых (а) и старых (б) корней растений моркови с линолевой и α -линоленовой кислотами. 1 – 9-гидроксинанановая кислота; 2 – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная кислота; 9-ГОД – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-ГОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидрокси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 18:2 – линолевая кислота; 18:3 – α -линоленовая кислота

Результаты согласуются с данными, полученными для рекомбинантного фермента СYP74B34. В обоих случаях на хроматограммах выявили как 9-гидроксинанановую кислоту (соединение 1, продукт превращения 9-ГПОТ при участии фермента СYP74B34), так и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценную кислоту (соединение 2, основной продукт превращения 9-ГПОД при участии фермента СYP74B34) (рис. 7). При этом в старых корнях наблюдается снижение количества 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислоты и увеличение количества 9-гидроксинанановой кислоты по сравнению с молодыми корнями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В геноме моркови выявлено два гена, кодирующие ферменты СYP74 – GI: 108219710 и Gene ID: 1082176320. Первый фермент – DcAOS (СYP74B33) – был описан ранее как первая 9-специфичная АОС с дополнительными активностями ГПЛ и ЭАС, принадлежащая к подсемейству СYP74В [43]. До настоящей работы считалось, что подсемейство СYP74В включает в основном 13-специфичные гидропероксидлиазы с двумя исключениями: DcAOS и фермент LuDES/HPL льна-долгунца с двойной активностью ДЭС и ГПЛ с дополнительной активностью ЭАС [20]. Выявленный в настоящей работе фермент стал третьим исключением подсемейства СYP74В. Предпочти-

тельными субстратами для этого фермента, так же как для DcAOS, являются не 13-, а 9-гидроперекиси линолевой и α -линоленовой кислоты, то есть фермент СYP74B34 является не 13-, а 9-специфичным. Более того, в зависимости от используемой 9-гидроперекиси – 9-ГПОТ или 9-ГПОД – фермент СYP74B34 проявляет активность либо ГПЛ, либо ЭАС соответственно. В случае превращения неpreferred субстратов – 13-ГПОД и 13-ГПОТ – фермент также проявляет активности ГПЛ и ЭАС. Таким образом, ферменту присвоено тривиальное название DcHPL/EAS (ГПЛ *Daucus carota*), тогда как гену – *DcHPL/EAS*.

Присутствие каталитической активности DcHPL/EAS в растениях моркови доказано в результате экспериментов по инкубации гомогенатов корней растений моркови с линолевой и α -линоленовой кислотами. В профилях оксипинов обнаружены 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная (эпоксиспирт, продукт превращения 9-ГПОД при участии DcHPL/EAS) и 9-гидроксинанановая (альдокислота, продукт превращения 9-ГПОТ при участии DcHPL/EAS) кислоты. При этом в старых корнях, по сравнению с молодыми, наблюдается уменьшение содержания 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислоты (эпоксиспирт, продукт ЭАС) и увеличение содержания 9-оксонановой кислоты (альдокислоты, продукта ГПЛ). Поскольку эпоксиспирт и альдокислота являются продуктами превращения 9-ГПОД и 9-ГПОТ соответственно, очевидно, что изменение соотноше-

ния конечных продуктов связано с изменением соотношения 9-ГПОД и 9-ГПОТ, что, по-видимому, связано с изменением содержания определенных липаз или липоксигеназ, ответственных за биосинтез этих гидроперекисей.

Ранее было описано присутствие дополнительной активности ЭАС у 13-специфичных ГПЛ подсемейства CYP74B [31], однако ферменты с двойной активностью ГПЛ и ЭАС были описаны до сих пор только в подсемействе CYP74C [37]. До настоящей работы в подсемействе CYP74B был описан только один фермент с двойной активностью – LuDES/HPL [20].

Результаты биоинформатических исследований свидетельствуют, что, несмотря на разную каталитическую активность, наибольшим сходством DcHPL/EAS (CYP74B34) обладает с DcAOS (CYP74B33). Основные каталитически важные домены у этих двух ферментов являются практически идентичными, и основным отличием является сайт Ala367 у фермента DcAOS и Pro355 – у фермента DcHPL/EAS, отмеченный на рис. 1. В структуре белка, как правило, остаток пролина нарушает α -спираль, поворачивая следующую за остатком пролина часть спирали на 90 градусов. По-видимому, вследствие этого замена остатка аланина на остаток пролина привела к практически полной потере каталитической активности у DcAOS. При этом обратная замена в последовательности DcHPL/EAS привела к обратному эффекту. Мутантная форма DcHPL/EAS P355A является более специфичной 9-ГПЛ, чем фермент дикого типа. Мутантная форма, в отличие от фермента дикого типа, не проявляет активности в отношении 13-гидроперекисей. Более того, мутантная форма превращает 9-ГПОД в основном в альдокислоту (продукт ГПЛ),

тогда как в случае фермента дикого типа основным продуктом превращения 9-ГПОД являются эпокиспирты.

Активности ГПЛ и ЭАС приводят к образованию разных продуктов, участвующих в защите растений – продуцируются заживляющие соединения, сигнализирующие об опасности и непосредственно защитные – антимикробные и фунгицидные. При этом наличие двух активностей у одного фермента (как правило, ГПЛ и ЭАС) позволяет растению применять одновременно более широкий спектр соединений, участвующих в защите от изменений окружающей среды.

Вклад авторов. Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин – концепция и руководство работой; С.С. Горина, Т.М. Ильина, Н.В. Ланцова – проведение экспериментов; С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин – обсуждение результатов исследования; Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин – написание текста.

Финансирование. Эксперименты по получению рекомбинантного фермента CYP74B34 дикого типа и мутантных форм ферментов CYP74B33 и CYP74B34 и изучению их каталитических свойств проводили при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00350). Эксперименты по изучению профилей оксипинов растений моркови проводили при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «КазНЦ 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. Grechkin, A. N. (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway, *Prog. Lipid Res.*, **37**, 317-352, [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00014-9).
2. Lee, D.-S., Nioche, P., Hamberg, M., and Raman, C. S. (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes, *Nature*, **455**, 363-368, <https://doi.org/10.1038/nature07307>.
3. Brodhun, F., and Feussner, I. (2011) Oxylipins in fungi, *FEBS J.*, **278**, 1047-1063, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08027.x>.
4. Barbosa, M., Valentão, P., and Andrade, P. B. (2016) Biologically active oxylipins from enzymatic and nonenzymatic routes in macroalgae, *Mar. Drugs*, **14**, 23, <https://doi.org/10.3390/md14010023>.
5. Jiang, Z.-D., and Gerwick, W. H. (1997) Novel oxylipins from the temperate red alga *Polyneura latissima*: evidence for an arachidonate 9(S)-lipoxygenase, *Lipids*, **32**, 231-235, <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0029-9>.
6. Calder, P. C. (2020) Eicosanoids, *Essays Biochem.*, **64**, 423-441, <https://doi.org/10.1042/EBC20190083>.
7. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, USA, <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
8. Göbel, C., and Feussner, I. (2009) Methods for the analysis of oxylipins in plants, *Phytochemistry*, **70**, 1485-1503, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.040>.
9. Kuhn, H., Banthiya, S., and Van Leyen, K. (2015) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 308-330, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.10.002>.

10. Toporkova, Y. Y., Smirnova, E. O., and Gorina, S. S. (2024) Epoxyalcohol synthase branch of lipoxygenase cascade, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **46**, 821-841, <https://doi.org/10.3390/cimb46010053>.
11. Feussner, I., and Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 275-297, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>.
12. Nelson, D. R., Goldstone, J. V., and Stegeman, J. J. (2013) The cytochrome P450 genes locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **368**, 20120474, <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0474>.
13. Savchenko, T. V., Zastrijnaja, O. M., and Klimov, V. V. (2014) Oxylipins and plant abiotic stress resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 362-375, <https://doi.org/10.1134/S0006297914040051>.
14. Toporkova, Y. Y., Fatykhova, V. S., Gogolev, Y. V., Khairutdinov, B. I., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2017) Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1419-1428, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.007>.
15. Toporkova, Y. Y., Gorina, S. S., Mukhitova, F. K., Hamberg, M., Ilyina, T. M., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2017) Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**(10 Pt A), 1099-1109, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.015>.
16. Горина С. С., Топоркова Я. Ю., Мухтарова Л. Ш., Гречкин А. Н. (2019) Цитохром CYP443C1 (клан CYP74) актинии *Nematostella vectensis* – первый фермент Metazoa, проявляющий двойную активность гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы, *Доклады Академии наук*, **486**, 384-388, <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863384-388>.
17. Toporkova, Y. Y., Smirnova, E. O., Lantsova, N. V., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2021) Detection of the first epoxyalcohol synthase/allene oxide synthase (CYP74 clan) in the lancelet (*Branchiostoma belcheri*, Chordata), *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4737, <https://doi.org/10.3390/ijms22094737>.
18. Smirnova, E. O., Lantsova, N. V., Hamberg, M., Toporkova, Y. Y., and Grechkin, A. N. (2024) The versatile CYP74 clan enzyme CYP440A19 from the European lancelet *Branchiostoma lanceolatum* biosynthesizes novel macrolactone, epoxydiene, and related oxylipins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1869**, 159507, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2024.159507>.
19. Hansen, C. C., Nelson, D. R., Moller, B. L., Werck-Reichhart, D. (2021) Plant cytochrome P450 plasticity and evolution, *Mol. Plant.*, **14**, 1244-1265, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.06.028>.
20. Toporkova, Y. Y., Smirnova, E. O., Iljina, T. M., Mukhtarova, L. S., Gorina, S. S., and Grechkin, A. N. (2020) The CYP74B and CYP74D divinyl ether synthases possess a side hydroperoxide lyase and epoxyalcohol synthase activities that are enhanced by the site-directed mutagenesis, *Phytochemistry*, **179**, 112512, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112512>.
21. Ono, E., Handa, T., Koeduka, T., Toyonaga, H., Tawfik, M. M., Shiraishi, A., Murata, J., and Matsui, K. (2016) CYP74B24 is the 13-hydroperoxide lyase involved in biosynthesis of green leaf volatiles in tea (*Camellia sinensis*), *Plant Physiol. Biochem.*, **98**, 112-118, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.016>.
22. Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., and Kajiwar, T. (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B), *FEBS Lett.*, **394**, 21-24, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00924-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00924-6).
23. Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S.H., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwar, T., and Feussner, I. (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber, *FEBS Lett.*, **481**, 183-188, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01997-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01997-9).
24. Matsui, K., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., and Kajiwar, T. (1999) Molecular cloning and expression of *Ara-bidopsis* fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Cell Physiol.*, **40**, 477-481, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029567>.
25. Matsui, K., Miyahara, C., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., and Kajiwar, T. (2000) Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1189-1196, <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1189>.
26. Kandzia, R., Stumpe, M., Berndt, E., Szalata, M., Matsui, K., and Feussner, I. (2003) On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Plant Physiol.*, **160**, 803-809, <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01026>.
27. Noordermeer, M. A., van Dijken, A. J., Smeekens, S. C., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2000) Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2473-2482, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01283.x>.
28. Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L., and DeRocher, A. E. (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Physiol.*, **123**, 711-724, <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.711>.

29. Tijet, N., Waspi, U., Gaskin, D. J., Hunziker, P., Muller, B. L., Vulfson, E. N., Slusarenko, A., Brash, A. R., and Whitehead, I. M. (2000) Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*), *Lipids*, **35**, 709-720, <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0577-z>.
30. Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance, *Chembiochem*, **2**, 494-504, [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010803\)2:7/8<494::AID-CBIC494>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<494::AID-CBIC494>3.0.CO;2-1).
31. Toporkova, Y. Y., Askarova, E. K., Gorina, S. S., Ogorodnikova, A. V., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2020) Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1865**, 158743, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158743>.
32. Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L., and Brash, A. R. (2001) Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **386**, 281-289, <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2218>.
33. Mita, G., Quarta, A., Fasano, P., De Paolis, A., Di Sansebastiano, G. P., Perrotta, C., Iannacone, R., Belfield, E., Hughes, R., Tsesmetzis, N., Casey, R., and Santino, A. (2005) Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies, *J. Exp. Bot.*, **56**, 2321-2333, <https://doi.org/10.1093/jxb/eri225>.
34. Grechkin, A. N., Brühlmann, F., Mukhtarova, L. S., Gogolev, Y. V., and Hamberg, M. (2006) Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the hemolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1419-1428, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.09.002>.
35. Hughes, R. K., Belfield, E. J., Muthusamay, M., Khan, A., Rowe, A., Harding, S. E., Fairhurst, S. A., Bornemann, S., Ashton, R., Thorneley, R. N. F., and Casey, R. (2006) Characterization of *Medicago truncatula* (barrel medic) hydroperoxide lyase (CYP74C3), a water-soluble detergent-free cytochrome P450 monomer whose biological activity is defined by monomer-micelle association, *Biochem. J.*, **395**, 641-652, <https://doi.org/10.1042/BJ20051667>.
36. Wan, X.-H., Chen, S.-X., Wang, C.-Y., Zhang, R.-R., Cheng, S.-Q., Meng, H.-W., and Shen, X.-Q. (2013) Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 22082-22101, <https://doi.org/10.3390/ijms141122082>.
37. Toporkova, Y. Y., Gorina, S. S., Bessolitsyna, E. K., Smirnova, E. O., Fatykhova, V. S., Brühlmann, F., Ilyina, T. M., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2018) Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 369-378, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.01.002>.
38. Tanaka, M., Koeduka, T., and Matsui, K. (2021) Green leaf volatile-burst in *Selaginella moellendorffii*, *Front Plant Sci.*, **12**, 731694, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.731694>.
39. Toporkova, Y. Y., Askarova, E. K., Gorina, S. S., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2022) Oxylin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Identification of allene oxide synthase (CYP74L2) and hydroperoxide lyase (CYP74L1), *Phytochemistry*, **195**, 113051, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113051>.
40. Kuroda, H., Oshima, T., Kaneda, H., and Takashio, M. (2005) Identification and functional analyses of two cDNAs that encode fatty acid 9-/13-hydroperoxide lyase (CYP74C) in rice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1545-1554, <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1545>.
41. Li, Y., and Wei, K. (2020) Comparative functional genomics analysis of cytochrome P450 gene superfamily in wheat and maize, *BMC Plant Biol.*, **20**, 93, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2288-7>.
42. Stumpe, M., Bode, J., Göbel, C., Wichard, T., Schaaf, A., Frank, W., Frank, M., Reski, R., Pohnert, G., and Feussner, I. (2006) Biosynthesis of C9-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 301-312, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.03.008>.
43. Gorina, S. S., Mukhitova, F. K., Ilyina, T. M., Toporkova, Y. Y., and Grechkin, A. N. (2019) Detection of unprecedented allene oxide synthase member of CYP74B subfamily: CYP74B33 of carrot (*Daucus carota*), *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1580-1590, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.07.004>.
44. Wilson, R. A., Gardner, H. W., and Keller, N. P. (2001) Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 980-987, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.8.980>.
45. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
46. Zuckerkandl, E., and Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins (Bryson, V., and Vogel, H. J., eds) *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York, pp. 97-166, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6>.
47. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**, 783-791, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.

48. Zoller, M. J., and Smith, M. (1982) Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6487-6500, <https://doi.org/10.1093/nar/10.20.6487>.
49. Toporkova, Y. Y., Gogolev, Y. V., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2008) Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis, *FEBS Lett.*, **582**, 3423-3428, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.005>.
50. Schenkman, J. B., and Jansson, I. (2006) Spectral analyses of cytochromes P450, *Cytochrome P450 protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 11-18, <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:11>.
51. Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story, *Genome Biol.*, **1**, REVIEWS3003, <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>.
52. Mukhtarova, L. S., Mukhitova, F. K., Gogolev, Y. V., and Grechkin, A. N. (2011) Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations, *Phytochemistry*, **72**, 356-364, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.013>.

THE CYP74B34 ENZYME OF CARROT (*Daucus carota*) WITH DOUBLE HYDROPEROXYDE LYASE/EPOXYALCOHOL SYNTHASE ACTIVITY: IDENTIFICATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES

Y. Y. Toporkova*, S. S. Gorina, T. M. Iljina, N. V. Lantsova, and A. N. Grechkin

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences",
420111 Kazan, Russia; email: kibmail@kibb.knc.ru*

The lipoxygenase cascade of plants is a source of oxidized fatty acid derivatives, oxylipins, which play an important role in regulatory processes, as well as in the formation of responses to stress factors. One of the most common enzymes of the lipoxygenase cascade are 13-specific hydroperoxide lyases (HPL, synonym "hemiacetal synthase") of the CYP74B subfamily. This work described the discovery and cloning of the *CYP74B34* gene of the carrot (*Daucus carota*), as well as a description of the biochemical properties of the corresponding recombinant enzyme. The CYP74B34 enzyme was active towards 9- and 13- hydroperoxides of linoleic (9-HPOD and 13-HPOD, respectively) and α -linolenic acids (9-HPOT and 13-HPOT, respectively). CYP74B34 specifically converted 9-HPOT and 13-HPOT into aldoacids (HPL products). The transformation of 13-HPOD led to the formation of aldoacids (as main products) and epoxyalcohols (as minor products). Epoxyalcohols are products of the epoxyalcohol synthase (EAS) activity. At the same time, 9-HPOD conversion resulted in the formation of the epoxyalcohols as main products and aldoacid as the minor one. Thus, the CYP74B34 enzyme is the first enzyme with double HPL/EAS activity described in carrot. The presence of corresponding catalytic activities was confirmed by the results of analyses of oxylipin profiles of roots of young seedlings and mature plants. In addition, the work describes the results of substitution of amino acid residues in one of the catalytically essential sites.

Keywords: lipoxygenase cascade, cytochromes P450, CYP74 family, hydroperoxide lyase, epoxyalcohol synthase, *Daucus carota*

Готовятся к публикации следующие специальные выпуски:

Том 89, выпуск 10, 2024

Метаболизм аминокислот в норме и при патологии

Приглашённые редакторы: В.И. Буник, В.С. Покровский

Том 89, выпуск 11, 2024

Молекулярные механизмы расстройств, связанных с употреблением
психоактивных веществ

Приглашённые редакторы: Н.В. Гуляева, Д.И. Перегуд