

Том 89, Номер 1

ISSN 0320-9725

Январь 2024



БИОХИМИЯ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 1, 2024

Природные активаторы аутофагии (обзор) <i>Ю.А. Павлова, Е.А. Гусева, О.А. Донцова, П.В. Сергеев</i>	5
Синтетические активаторы аутофагии (обзор) <i>Е.А. Гусева, Ю.А. Павлова, О.А. Донцова, П.В. Сергеев</i>	33
Влияние нуклеотидного контекста на протекание неспецифической амплификации ДНК под действием ДНК-полимеразы Bst exo- <i>Р.Р. Гарафутдинов, О.Ю. Купова, А.Р. Сахабутдинова</i>	61
Иммунология коронавируса SARS-CoV-2 (обзор) <i>А.Г. Габдулхакова, Р.Н. Мингалева, А.М. Ромозанова, А.Р. Сагъдеева, Ю.В. Филина, А.А. Ризванов, Р.Р. Мифтахова</i>	74
Геномный импринтинг и случайная моноаллельная экспрессия (обзор) <i>Я.В. Лобанова, С.В. Женило</i>	94
Экстракт листьев <i>Olea europaea</i> повышает чувствительность клеток рака желудка к химиопрепаратам за счет ингибирования процесса их эпителиально-мезенхимального перехода <i>Ч. Текин, М. Эрджелик, П. Дунаев, А. Галембикова, Г. Тезкан, С. Ак Аксой, Ф. Будақ, О. Исык, Н. Юграс, С. Бойчук, Б. Тунджа</i>	109
N-Терминальный фрагмент сердечного миозин-связывающего белка С модулирует кооперативные механизмы активации тонкой нити предсердий и желудочков <i>А.М. Кочурова, Е.А. Бельдия, В.В. Нефёдова, Н.С. Рябкова, Д.С. Ямпольская, А.М. Матюшенко, С.Ю. Бершицкий, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин</i>	131
Патогенетическая значимость длинных некодирующих РНК в развитии аневризмы торакальной и абдоминальной аорты (обзор) <i>А.Н. Кучер, Ю.А. Королёва, М.С. Назаренко</i>	147
Функции N6-метиладенозина РНК в клеточном ядре (обзор) <i>Н.А. Жигалова, К.Ю. Олейникова, А.С. Рузов, А.С. Ермаков</i>	167
Синтез и биологические свойства полифенол-содержащих катионных линейных и дендримерных пептидов <i>А.А. Шатилов, С.М. Андреев, А.В. Шатилова, Е.А. Турецкий, Р.А. Курмашева, М.О. Бабихина, Л.В. Сапрыгина, Н.Н. Шершакова, Д.К. Болякина, В.В. Смирнов, И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов</i>	182

Нарушение сборки полноценных виментиновых филаментов подавляет процесс образования и созревания фокальных контактов и приводит к изменению типа клеточных протрузий

А.О. Жолудева, Н.С. Потапов, Е.А. Козлова, М.Е. Ломакина, А.Ю. Александрова

CONTENTS

Vol. 89, Issue 1, 2024

Natural Activators of Autophagy (Review)	
<i>J. A. Pavlova, E. A. Guseva, O. A. Dontsova, and P. V. Sergiev</i>	5
Synthetic Activators of Autophagy (Review)	
<i>E. A. Guseva, J. A. Pavlova, O. A. Dontsova, and P. V. Sergiev</i>	33
The Influence of Nucleotide Context on Non-specific Amplification of DNA with Bst exo- DNA Polymerase	
<i>R. R. Garafutdinov, O. Yu. Kupova, and A. R. Sakhabutdinova</i>	61
Immunology of SARS-CoV-2 Infection (Review)	
<i>A. G. Gabdoulkhakova, R. N. Mingaleeva, A. M. Romozanova, A. R. Sagdeeva, Yu. V. Filina, A. A. Rizvanov, and R. R. Miftakhova</i>	74
Genomic Imprinting and Random Monoallelic Expression (Review)	
<i>Y. V. Lobanova and S. V. Zhenilo</i>	94
Leaf Extract from European Olive (<i>Olea europaea</i> L.) Post-Transcriptionally Suppresses the Epithelial-Mesenchymal Transition and Sensitizes Gastric Cancer Cells to Chemotherapy	
<i>C. Tekin, M. Ercelik, P. Dunaev, A. Galembikova, G. Tezcan, S. Ak Aksoy, F. Budak, O. Isik, N. Ugras, S. Boichuk, and B. Tunca</i>	109
N-Terminal Fragment of Cardiac Myosin Binding Protein C Modulates Cooperative Mechanisms of the Thin Filament Activation in the Atria and Ventricles	
<i>A. M. Kochurova, E. A. Beldiia, V. V. Nefedova, N. S. Ryabkova, D. S. Yampolskaya, A. M. Matyushenko, S. Y. Bershitsky, G. V. Kopylova, and D. V. Shchepkin</i>	131
Pathogenetic Significance of Long Non-Coding RNAs in the Development of Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms (Review)	
<i>A. N. Kucher, Iu. A. Koroleva, and M. S. Nazarenko</i>	147
The Functions of RNA N6-Methyladenosine in the Nucleus (Review)	
<i>N. A. Zhigalova, K. Yu. Oleynikova, A. S. Ruzov, and A. S. Ermakov</i>	167
Synthesis of Plyphenol-Containing Cationic Linear and Dendrimeric Peptides with Anti-Oxidant Activity	
<i>A. A. Shatilov, S. M. Andreev, A. V. Shatilova, E. A. Turetskiy, R. A. Kurmasheva, M. O. Babikhina, L. V. Saprigina, N. N. Shershakova, D. K. Bolyakina, V. V. Smirnov, I. P. Shilovsky, and M. R. Khaitov</i>	182

The Impairment of the Assembly of Vimentin Filaments Leads to Suppression
of the Formation and Maturation of Focal Contacts and an Alteration of the Type
of Cellular Protrusions

A. O. Zholudeva, N. S. Potapov, E. A. Kozlova, M. E. Lomakina, and A. Y. Alexandrova

194

ПРИРОДНЫЕ АКТИВАТОРЫ АУТОФАГИИ

Обзор

© 2024 Ю.А. Павлова^{1,2,3*#}, Е.А. Гусева^{1,2,3#}, О.А. Донцова^{1,2,3,4}, П.В. Сергиев^{1,2,3,5*}

¹ Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий,
143025 Сколково, Россия; электронная почта: petya@genebee.msu.ru; julidev@yandex.ru

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Институт функциональной геномики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.11.2023

После доработки 25.11.2023

Принята к публикации 29.11.2023

Аутофагия представляет собой процесс, в ходе которого содержимое клетки, такое как агрегированные белки, дисфункциональные органеллы и клеточные структуры, изолируется аутофагосомой и доставляется в лизосомы для деградации. Как процесс, позволяющий клетке избавляться от нефункциональных компонентов, которые, как правило, накапливаются с возрастом, аутофагия ассоциирована со многими заболеваниями человека. В связи с этим поиск активаторов аутофагии и изучение механизма их действия являются важной задачей для борьбы со многими заболеваниями, а также для продления здоровой жизни человека. Богатыми источниками активаторов аутофагии являются растения, содержащие в своем составе большое количество полифенольных соединений, которые могут быть активаторами в своем исходном виде или же могут метаболизироваться кишечной микробиотой до активных соединений. Данный обзор посвящен растительным активаторам аутофагии с акцентом на источники их получения, механизм действия и применение при тех или иных заболеваниях. Также в обзоре описаны компании, занимающиеся коммерциализацией природных активаторов аутофагии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активаторы аутофагии, митофагия, липофагия, mTOR, уrolитин А, ресвератрол, спермидин, куркумин.

DOI: 10.31857/S0320972524010018 EDN: YRUDXW

ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия – это один из фундаментальных молекулярных процессов, с помощью которого происходит удаление поврежденных или плохо работающих компонентов клетки. Известно три различных типа аутофагии: микроаутофагия, макроаутофагия и аутофагия, ассоциированная с шаперонами.

Микроаутофагия подразумевает избирательный захват лизосомой макромолекул и частей мембран с последующим перевариванием. Таким

образом, клетка может получать дополнительную энергию или материал для биосинтетической активности, что крайне необходимо, например, в условиях голодания. Однако важно отметить, что аналогичные процессы могут происходить и в нормальных условиях [1]. Хотелось бы отметить, что в данном обзоре микроаутофагия подробно рассматриваться не будет по причине того, что она представляет собой избирательный тип аутофагии. В обзоре будет сделан акцент на макроаутофагию, которая играет важную физиологическую роль в здоровье человека и дисфункция которой является причиной многих заболеваний.

При аутофагии, ассоциированной с деятельностью шаперонов, денатурировавшие белки

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

транспортируются в лизосому, где и происходит их переваривание. Для протекания этих процессов необходимы цитоплазматические шапероны семейства Hsp70–Hsp90, а также мембранные рецепторы на лизосоме, которые распознают комплексы шаперонов с белками. Такой тип аутофагии описан исключительно в клетках млекопитающих и наблюдается в условиях стресса [2].

Наиболее интересным представляется последний, избирательный, тип аутофагии – макроаутофагия. Во время этого процесса органеллы, несущие аутофагосомную метку, узнаются мембранными рецепторами (LC3/GABARAP). В качестве такой метки чаще всего служит убиквитин (Ub), но также могут использоваться сигналы на основе полисахаридов, липидов и Ub-подобных белков [3]. В результате узнавания сигнальной молекулы участок цитоплазмы отделяется от остальной цитоплазмы двумя мембранами – образуется аутофагосома. Далее, с ней сливаются лизосомы, формируя аутофаголизосому, в которой будет происходить переваривание всего содержимого, в том числе органелл [4].

Одной из отличительных особенностей макроаутофагии является быстрая и динамичная регуляция. В нормальных условиях уровень аутофагии в клетке достаточно низок, но в условиях голода или под влиянием специфических сигнальных веществ он возрастает в несколько раз. Постоянное или периодическое снижение потребления калорий без недоедания является перспективной стратегией, увеличивающей продолжительность жизни организмов [5]. Однако строгое постоянное соблюдение таких режимов питания затруднительно, что способствовало появлению миметиков ограничения калорийности (CRM). CRM – соединения, искусственно запускающие пути ограничения калорийности и способствующие аутофагии. Потенциал использования миметиков ограничения калорийности против возрастных заболеваний был описан ранее в обзоре, посвященном механизмам их действия и возможному терапевтическому использованию [6]. Некоторые из веществ, описанных в упомянутой выше статье и причисленных к числу миметиков ограничения калорийности (ресвератрол, спермидин, кверцетин, куркумин и др.), будут подробно описаны в данном обзоре с точки зрения механизма их действия.

Макроаутофагия играет важную роль в таких физиологических процессах, как адаптация к голоду, контроль качества клеточных органелл, элиминирование внутриклеточных паразитов и регуляция врожденного и приобретенного иммунитета [7].

Среди разнообразия процессов макроаутофагии стоит отдельно выделить аутофагию митохондрий (митофагию), так как в ходе этого процесса удаляются лишние и поврежденные митохондрии, которые потенциально обладают высокой цитотоксичностью [8].

Сбалансированная работа систем митофагии крайне важна, и ее нарушение приводит к развитию раковых, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний [9]. На грызунах было показано, что активация процессов митофагии и аутофагии с помощью фармакологических препаратов позволяет улучшить состояние животных с моделями инфаркта миокарда, различных типов кардиомиопатии и атеросклероза [8]. Этот факт особенно важен, так как до сих пор сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующую позицию по числу смертей не только в России, но и по всему миру [10].

На различных животных моделях было показано, что вещества, приводящие к активации митофагии, способствуют увеличению продолжительности жизни, предотвращая накопление поврежденных митохондрий. Помимо этого, употребление таких веществ также продлевает нормальную активность организма, препятствуя возрастному уменьшению силы мышц и снижению скорости ходьбы [11]. Это может быть объяснено тем, что с возрастом уровень митофагии в клетках скелетных мышц падает, что, в свою очередь, приводит к снижению энергетического снабжения мышц [12].

Другим интересным механизмом направленной аутофагии является липофагия – путь деградации липидных капель (ЛК), которые участвуют в различных биологических процессах в клетках. Чрезмерное накопление ЛК тесно связано с различными заболеваниями, включая болезни обмена веществ. Направленная деградация липидных капель является потенциальной стратегией борьбы с ожирением [13], диабетом [14], неалкогольным стеатогепатитом [15, 16] и другими заболеваниями, связанными с избыточным накоплением липидов.

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; Akt – RAC-α серин/треонин протеинкиназа; AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; BECN1 – беклин-1; EP300 – гистонацетилтрансфераза p300; FDA – управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств; HIF-1α – индуцируемый гипоксией фактор 1α; LC3 – ассоциированный с микротрубочками белок легкой цепи 3; LKB1 – киназа печени B1; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; mTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих комплекс 1; p62/SQSTM1 – секвестосома 1; p70S6K – киназа β1 рибосомального белка S6; PARL – связанный с пресенилинами ромбовидный белок; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PINK1 – PTEN-индуцируемая протеинкиназа 1; PGC-1α – пероксисомный пролифератор-активированный рецептор гамма-коактиватора 1-альфа; SIRT1 – сиртуин 1; TFE3 – транскрипционный фактор E3; TFEB – транскрипционный фактор EB; UA – уролитин A; Ub – убиквитин; ULK1 – unc-51-подобная активирующая аутофагию киназа.

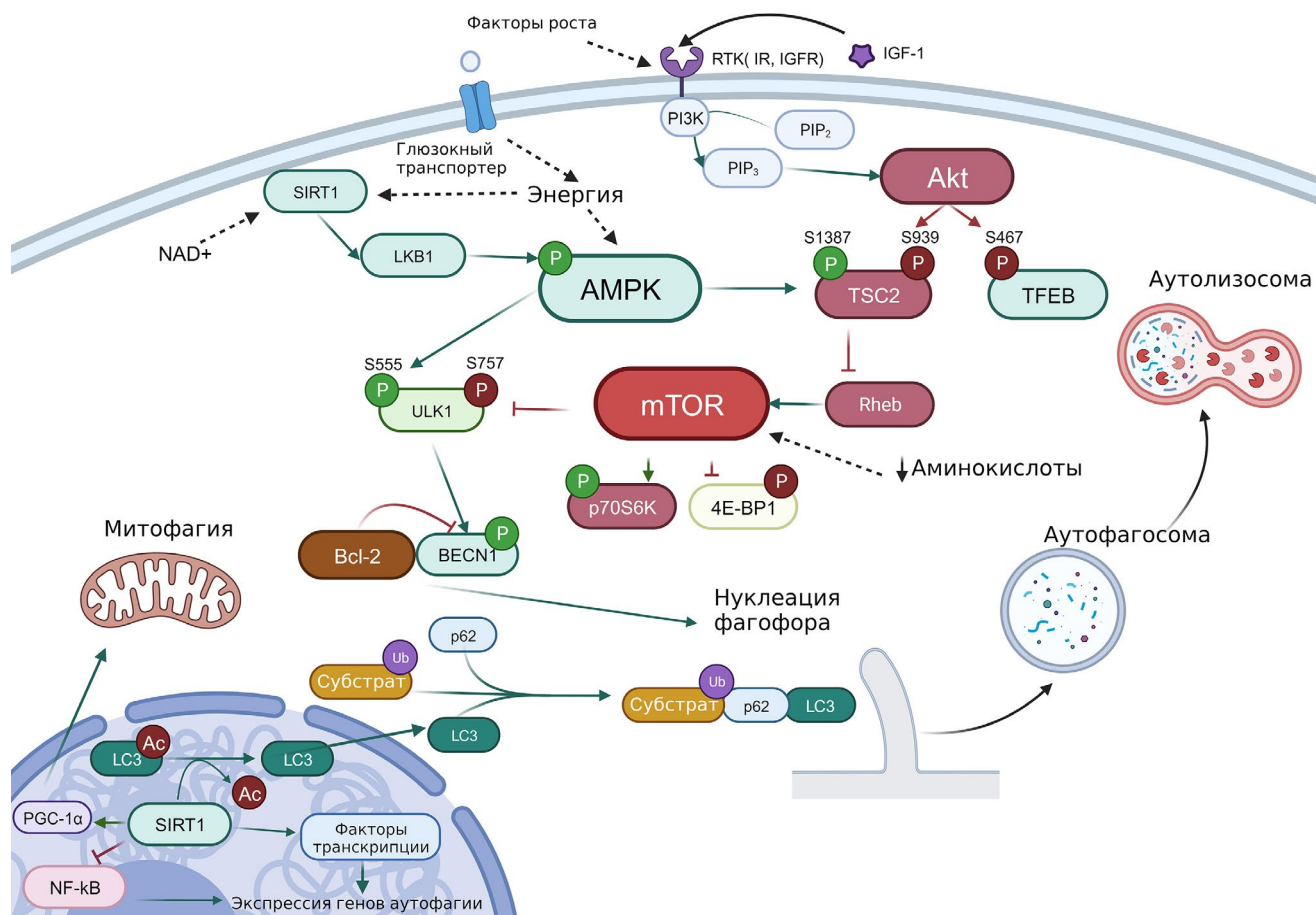


Рис. 1. Схема регуляции аутофагии. Ub – убиквитинирование, P – фосфорилирование (красным показано ингибирующее фосфорилирование, зеленым – активирующее). Зеленые стрелки показывают активирующее взаимодействие, красные – ингибирующее. Черные стрелки используются для отражения последовательности стадий в процессе аутофагии, а также для отражения мишени действия веществ. Черные пунктирные стрелки отражают влияние внутриклеточных условий/факторов на мишень

Таким образом, изучение механизма активации аутофагии является перспективным направлением исследований, нацеленных на увеличение продолжительности жизни и, что не менее важно, улучшения качества жизни пожилых людей. Более того, активаторы аутофагии все чаще рассматриваются как потенциальные средства для терапии таких заболеваний, как диабет [17], инфекционные [18], онкологические [19, 20], аутоиммунные [21], сердечно-сосудистые [22], нейродегенеративные заболевания [23] и т.д. Одобренные управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) препараты, для которых показана способность активировать аутофагию, подробно рассмотрены в обзоре, посвященном синтетическим активаторам аутофагии [24].

Данный обзор посвящен описанию природных активаторов аутофагии и митофагии с акцентом на механизм их действия, источники происхождения, а также потенциал применения при тех или иных заболеваниях.

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ АУТОФАГИИ

За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в изучении процесса аутофагии. Были обнаружены эволюционно консервативные гены, регулирующие аутофагию, что способствовало изучению ее функций, связанных с поддержанием гомеостаза и общим физиологическим состоянием. Более того, все больше данных свидетельствует о связи между нарушениями регуляции макроаутофагии и разнообразными заболеваниями. Поскольку именно макроаутофагия представляет собой избирательный тип аутофагии и играет наиболее значимую физиологическую роль в развитии различных заболеваний, мы рассмотрим механизм именно данного процесса, опустив в представленном обзоре обсуждение неизбирательной формы аутофагии, микроаутофагии.

Макроаутофагия. В аутофагии участвует множество белков, необходимых для слияния аутофагосом и лизосом, закисления лизосом и лизосомного переваривания, а также для передачи

регуляторных сигналов, которые связывают состояние окружающей среды и систему аутофагии. Общая схема регуляции аутофагии приведена на рис. 1.

Основными сигналами для запуска аутофагии являются голодание клетки по энергии и аминокислотам, а также гипоксия и окислительный стресс. Основным сенсором голодания клеток по энергии служит AMP-активируемая протеинкиназа (AMPK). Активность этого фермента также регулируется сиртуином 1 (SIRT1), NAD⁺-зависимой деацетилазой и ADP-рибозилтрансферазой. Сигналом активации для SIRT1 служит накопление NAD⁺ в клетке, что, в свою очередь, свидетельствует об истощении источников энергии и снижении потенциала на мембране митохондрий. В активированном состоянии SIRT1 проявляет деацетилазную активность, что, в свою очередь, приводит к активации киназы печени B1 (LKB1) и AMPK, а также к деацетилированию LC3 (ассоциированный с микротрубочками белок легкой цепи 3), ведущему к его перемещению из ядра в цитоплазму. SIRT1 также может контролировать аутофагию через транскрипционные факторы FOXO1 и NF-κB (ядерный фактор каппа-Би). Кроме того, поддерживая деацетилированное состояние пероксисомного пролифератор-активированного рецептора гамма-коактиватора 1-альфа (PGC-1α), SIRT1 участвует в регуляции функции митохондрий и окислительного стресса [25].

Основными сенсорами сигналов выживания и роста для клеток служат PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа) и Akt (RAC-α серин/треонин протеинкиназа). При активации данного сигнального пути происходит подавление аутофагии за счет ингибирования белка туберозного склероза 2 (TSC2), который перестает выключать регулятор RheB за счет гидролиза GTP. Помимо этого, Akt также фосфорилирует TFEB – основной транскрипционный фактор, регулирующий биогенез митохондрий. В фосфорилированном состоянии TFEB транслоцируется из ядра в цитоплазму, что приводит к снижению уровня аутофагии в клетках [26].

Центральным регулятором, который вовлечен в подавляющее большинство путей, связанных и с биогенезом, и с аутофагией компонентов клетки, является серин/треонин протеинкиназа mTOR (мишень рапамицина млекопитающих). mTOR регулирует клеточный рост и выживание за счет восприятия межклеточных сигналов и информации о метаболизме, в частности, о доступности аминокислот. Также активность mTOR регулируется по AMPK- и Akt-зависимым путям.

В клетках mTOR входит в состав двух киназных комплексов (mTORC1 и mTORC2), различающихся по функциям. Роль mTORC2 заключается в регуляции сигнальных путей факторов роста за

счет фосфорилирования киназ Akt и SGK, которые влияют на клеточное выживание и подавляют апоптоз [27]. В то же время mTORC1 в активном состоянии ингибирует аутофагию с помощью подавления активности Unc-51-подобной киназы 1 (ULK1) и запускает биосинтез белков за счет фосфорилирования основных регуляторов трансляции мРНК, таких как белки группы 4E-BP, ингибирующие фактор инициации синтеза белка eIF4E [27]. Для активации mTORC1 должен быть транслоцирован на поверхность лизосомы, где он может быть активирован аминокислотами [7]. При ингибировании mTOR голоданием или индукторами аутофагии ULK1 автофосфорилируется и претерпевает конформационные изменения, тем самым запуская сборку платформы для дальнейшего процесса образования аутофагосомы [28]. Основным эффектором этой платформы является белок беклин-1 (BECN1), который в составе различных комплексов будет активировать сборку аутофагофора – двумембранной везикулы, содержащей удаляемые органеллы и участок цитоплазмы.

Процесс сборки аутофагофора включает два основных этапа: зарождение (нуклеация) и удлинение (элонгация) изолирующей мембраны. На стадии зарождения фагофорной мембраны требуется комплекс с фосфатидилинозитол-3-киназой III класса (PI3K), который включает в себя BECN1. Регуляция активности этого комплекса происходит через BECN1 с помощью комплекса ULK, а также Bcl-2, антиапоптотического белка, который ингибирует аутофагию путем связывания BECN1 при избытке питательных веществ в клетке. Для индукции аутофагии необходима диссоциация BECN1 и Bcl-2 [7].

Комплекс PI3K также запускает сборку платформы, необходимой для привлечения, модификации и закоривания LC3 в мембране фагофора. Изначально LC3 присутствует в клетке в виде предшественника – proLC3. На первом этапе модификаций от него отщепляется небольшой фрагмент с C-конца. В результате этой реакции появляется растворимая форма LC3 – LC3-I [29]. У LC3-I C-концевой глицин экспонирован на поверхности. На следующем этапе Atg7 (E1) и Atg3 (E2) проводят реакцию, подобную убиквитинированию [29]. В результате образуется связь между экспонированным C-концевым глицином и фосфатидилэтаноламином и образуется изоформа белка, связанная с мембраной, – LC3-II. При этом LC3-II связывается как с внешней, так и с внутренней мембранами аутофагосомы.

В клетке существуют специальные адаптерные системы, которые соединяют LC3 с мишенями аутофагии. Наиболее изученным из них является p62, также известный как SQSTM1/sequestosome 1 (секвестосома 1). p62 является селективным рецептором аутофагии. В структуру данного белка входят

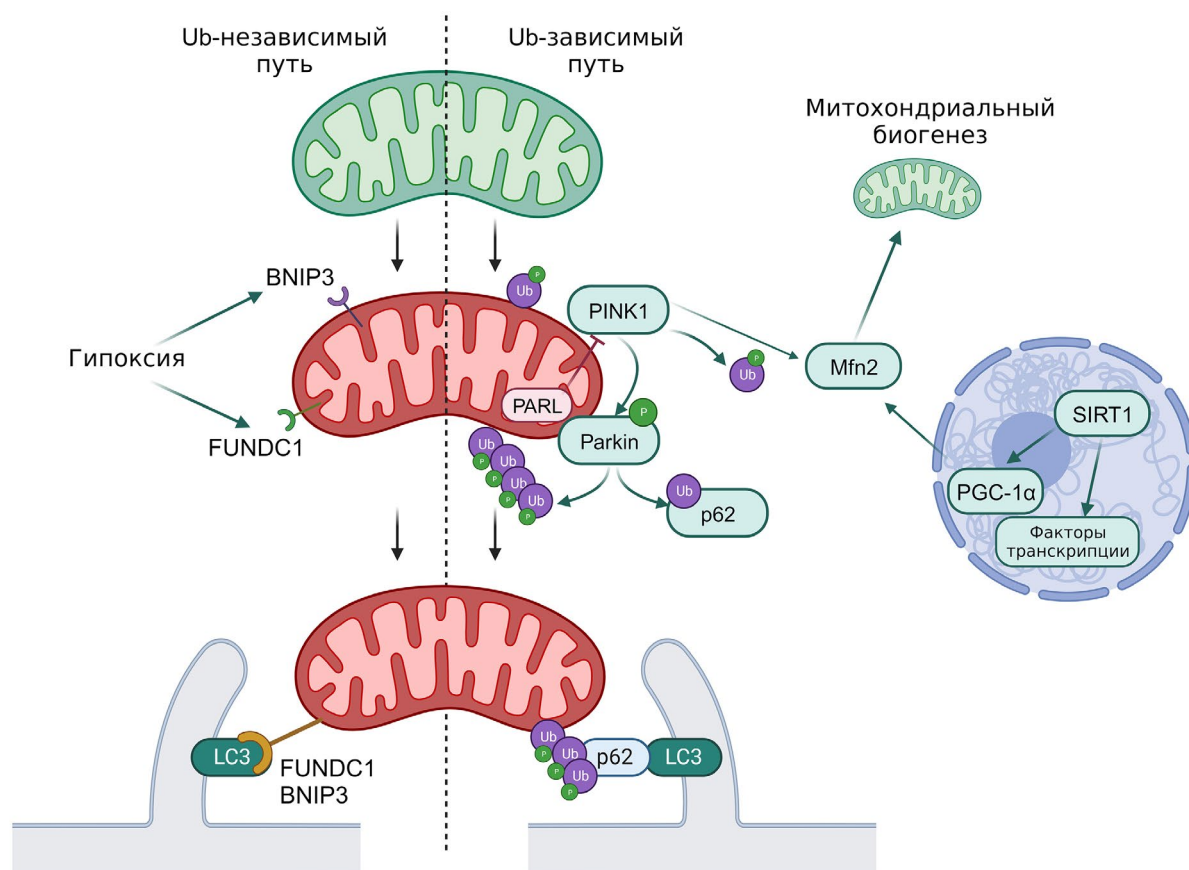


Рис. 2. Общая схема митоза. Зеленым изображены нормальные митохондрии, красным – митохондрии с нарушениями в работе. Ub – убикуитинирование, P – активирующее фосфорилирование. Зеленые стрелки показывают активирующее мишень взаимодействие. Красная стрелка показывает ингибирующее мишень взаимодействие. Черные стрелки используются для отражения последовательности стадий в процессе митоза

5 доменов: N-концевые домены Phox и Bem1p (PB1), домен цинкового пальца ZZ-типа, участок PEST (содержащий предполагаемые сайты фосфорилирования) и C-концевой домен, связывающий полиубиквитин (UBA). N-Концевой домен PB1 используется для полимеризации p62 и связывания с другими белками, содержащими домены PB1 [30]. Предполагается, что p62 способствует связыванию полиубиквитинированных белковых агрегатов с LC3, что приводит к их включению в аутофагосому и деградации. Таким образом, клетка разрушает неправильно свернутые белки и p62 вместе с ними [30].

Митоза. Митоза представляет собой селективную форму макроаутофагии, которая необходима для устранения поврежденных или избыточных митохондрий и, следовательно, является одним из важнейших процессов, поддерживающих клеточный гомеостаз. Нарушение митоза может привести к развитию ряда заболеваний, включая рак, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, а также заболевания печени [8, 31–35].

Механизмы митоза можно классифицировать на Ub-зависимые и Ub-независимые пути.

Ub-Зависимый путь митоза основан на убикуитинировании поверхностных белков митохондрий для распознавания поврежденных органелл. Наиболее изученным путем активации митоза является система PINK1/Parkin, схема которого приведена на рис. 2.

PINK1 – это PTEN-индуцируемая Ser/Thr киназа 1, которая накапливается на внешней мембране митохондрий в ответ на нарушение мембранного потенциала. PINK1 фосфорилирует убикуитинлигазу Parkin и ее субстрат, убикуитин, в результате чего на поврежденные митохондрии навешиваются убикуитиновые метки. В этом процессе также принимают участие убикуитинлигазы SMURF1 и Grp78. Убикуитиновую метку на митохондриях узнают рецепторы аутофагии OPTN и NDP52, которые инициируют образование аутофагосом вблизи митохондрий, а также выступают в качестве адаптеров при связывании митохондрий и LC3-II [9]. Также было обнаружено, что p62 участвует в митоза по PINK1/Parkin-зависимому пути. Фосфорилированный Parkin убикуитинирует p62 и способствует его связыванию с LC3-II, что, в свою очередь, способствует транспорту митохондрий в аутофагосому [36].

SIRT1, регулируя деацетилирование транскрипционных факторов, может приводить к активации митофагии через путь SIRT1/PGC1 α /Mfn2/Parkin [37]. Система PINK1/Parkin катализирует фосфоубиквитинирование Mfn2, запуская p97-зависимую разборку комплексов Mfn2 от внешней митохондриальной мембраны. Это приводит к отделению митохондрий от эндоплазматического ретикулума и их фрагментации, что способствует митофагии [38].

В дополнение к описанной сигнальной системе на внешней мембране митохондрий локализованы рецепторы митофагии BNIP3, NIX/BNIP3L10 и FUNDC1, которые напрямую взаимодействуют с LC3 через типичные или атипичные мотивы LIR (участки взаимодействия с LC3) независимо от убиквитинирования. Первоначально NIX был идентифицирован как ключевой медиатор дегенерации митохондрий при созревании эритроцитов, но недавно было показано, что он также активируется в ответ на нарушение мембранного потенциала митохондрий. Также показано, что экспрессия NIX и BNIP3 частично находится под контролем HIF-1 (индуцируемый гипоксией фактор 1) и их активация во время гипоксии способствует удалению поврежденных митохондрий. Таким образом, BNIP3, наряду с FUNDC1, считается одним из основных медиаторов митофагии, индуцированной гипоксией. В отличие от NIX и BNIP3, экспрессия FUNDC1 существенно не зависит от гипоксии или мембранного потенциала митохондрий, и его активность контролируется посттрансляционными модификациями. В нормальных условиях взаимодействие между FUNDC1 и LC3 подавляется фосфорилированием домена LIR. Однако при гипоксии или нарушении потенциала Ser/Thr фосфа-

таза PGAM5 дефосфорилирует FUNDC1, что усиливает его сродство к LC3 и облегчает прикрепление митохондрий к мембране формирующейся аутофагосомы [9].

ПРИРОДНЫЕ АКТИВАТОРЫ АУТОФАГИИ И МИТОФАГИИ

Сложная схема регуляции аутофагии в целом и митофагии в частности способствует тому, что достаточно разнородный набор природных и синтетических соединений влияет на этот процесс. Поскольку активация или ингибирование аутофагии важны для поддержания баланса мономерных блоков, таких как аминокислоты, с одной стороны, макромолекул и органелл – с другой стороны, поиск и исследование веществ, регулирующих аутофагию, – важная задача фундаментальной и прикладной науки.

Источники природных активаторов аутофагии и митофагии. Вторичные метаболиты растений. Растения содержат большое количество полифенольных соединений, основные структурные фрагменты которых приведены на рис. 3. Данные соединения влияют на здоровье человека, оказывая антиоксидантное, противовоспалительное, противоопухолевое, антиадипогенное и нейропротекторное действие [39–42]. Роль полифенольных соединений в процессах аутофагии и апоптоза, а также их возможное применение в химиотерапии онкологических заболеваний подробно обсуждаются в обзорах [43–50].

Среди фитосоединений, обладающих антиканцерогенным действием и влиянием на процессы апоптоза и аутофагии, отмечены представители

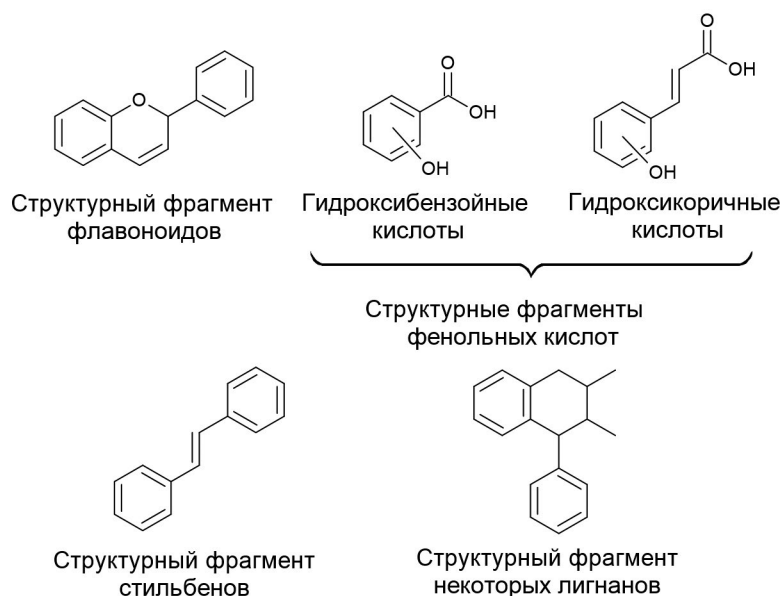


Рис. 3. Основные структурные фрагменты, входящие в состав полифенольных соединений

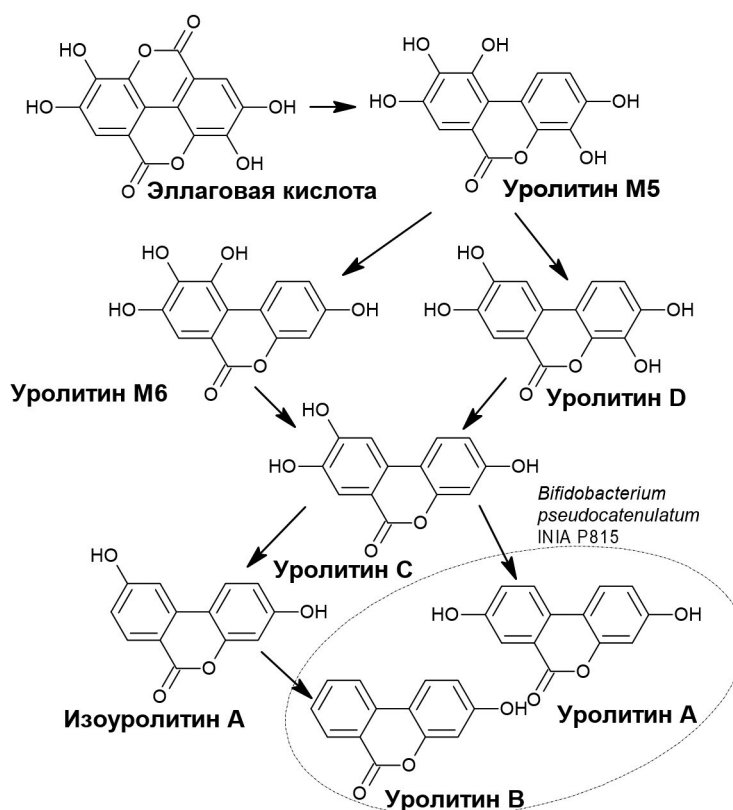


Рис. 4. Упрощенная схема образования уролитинов из эллаговой кислоты бактерией *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815

всех классов полифенольных соединений, таких как флавоноиды (флавонолы, флавоны, флаваноны, изофлавоны, флаван-3-олы, антоцианины) и нефлавоноиды (кумарины, куркуминоиды, феноловые кислоты, лигнаны, стильбены, ксантоны) [43, 48]. Большинство флавоноидов встречается в растениях в связанной с сахарами форме, как О- или С-гликозиды, что затрудняет их адсорбцию в тонком кишечнике. Реакции гидролиза сахаров и образование таким образом агликонов флавоноидов повышает их биодоступность для организма.

Ниже приведены примеры некоторых полифенольных фитосоединений, метаболизм которых микроорганизмами приводит к образованию продуктов, активирующих аутофагию. К таким соединениям относятся эллаготанины, встречающиеся во многих видах растений. Эти соединения вследствие своего молекулярного веса характеризуются очень низкой биодоступностью и не поглощаются в кишечном тракте до тех пор, пока они не гидролизуются кишечной микрофлорой до уролитинов [51, 52]. Бактериальная трансформация эллаготанинов включает восстановление одной из двух лактонных групп, затем декарбоксилирование и последовательное восстановление до тетрагидрокси (уролитин D), тригидрокси (уролитин C), дигидрокси (уролитин А и изоуролитин А) и моногидрокси (уролитин В) дибензопиранонов.

Способность к трансформации эллаготанинов до уролитинов обнаружена у *Gordonibacter urolithinifaciens* и *Gordonibacter pamelaee* (семейство Coriobacteriaceae), а также у *Ellagibacter isourolithinifaciens* (семейство Eggerthellaceae) и у штамма *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815 (рис. 4) [53, 54].

Установлены 3 группы людей с разными метаболитами (А, В и 0) в зависимости от образуемых ими уролитинов [55]. В группе А (25–80%) образуется только уролитин А; в группе В (10–50%) – изоуролитин А и/или В и уролитин А. В группе 0 (5–25%) уролитины не образуются.

Дайдзеин является также примером фитосоединения, трансформация которого кишечной микробиотой приводит к образованию более активных и биодоступных метаболитов, чем нативный изофлавоноид. Трансформация микробиотой дайдеина может идти с образованием (S)-эквола (изофлавандиолювый эстроген) или через О-десметиланголенсина (О-DMA) в зависимости от состава микробиоты (рис. 5).

У большинства происходит образование О-десметиланголенсина с участием видов *Clostridium*. У 30% исследуемых дайдеин превращается в S-эквол, обладающий более активным эстрогенным действием, антиоксидантной активностью и биодоступностью, чем дайдеин.

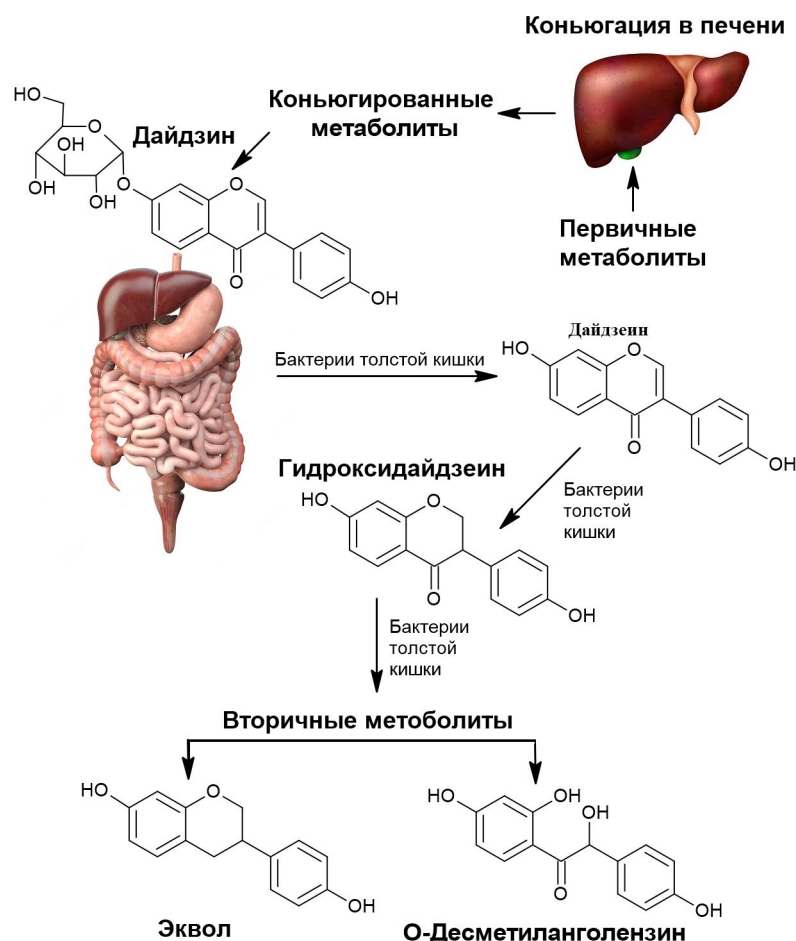


Рис. 5. Преобразование дайдзеина микробиотой человека в биодоступные производные

S-эквол образуется широким спектром бактерий: *Streptococcus intermedius*, *Bacteroides ovatus*, *Blautia producta*, *Eggerthella* sp. Julong 732, *Adlercreutzia equolifaciens*, *Slakia isoflavoniconvertens*, *Slakia equolifaciens*, *Asaccharobacter celatus*, *Enterorhabdus mucosicola* (Actinobacteria) и *Lactococcus garvieae* (Firmicutes) [56, 57].

Вторичные метаболиты бактерий. Микробиом и продукты его метаболизма могут потенциально влиять на активность аутофагии, как это показано для образования уролитиннов. Можно представить, что микробиом, формирующийся в условиях голодания, должен, из общих соображений, активировать аутофагию. Исходя из предположения выгоды процесса активации аутофагии в условиях голодания как для хозяина организма, так и для населяющей его микробиоты, в данном обзоре в основном рассматриваются метаболиты, образуемые комменсальными бактериями кишечника. Исследования показывают, что гнотобионты («чистые», без микробиоты) мышей, крыс, птиц имеют более высокую смертность в условиях недостатка пищи, чем нормальные животные, несмотря на одинаковые скорости потери массы. Это объясняется обеспечением кишечной

микробиотой использования альтернативных источников энергии (жирных кислот, кетонных тел, хозяйских белков), стимулирования иммунитета и многих других защитных процессов в клетках [58]. В условиях спячки и голодания одним из главных источников энергии и углерода для микробиоты становятся высокомолекулярные гликопротеины слизистой кишечника, атрофированные эпителиальные клетки организма и мертвые клетки бактерий. Это приводит к изменению состава кишечной микробиоты, в которой увеличивается доля бактерий *Bacteroidetes* и *Akkermansia*, использующих эндогенные гликозилированные белки, и уменьшается доля бактерий из филума *Firmicutes*, использующих растительные полисахариды для роста [58]. В условиях полного голодания бактерии, способные к деградации хозяйских белков, получают конкурентное преимущество [59, 60]. Метагеномные исследования содержимого слепого отдела кишечника живых организмов, находящихся в условиях гибернации (спячки) или в условиях голодания, показали преобладание *Bacteroides* (*B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*), некоторых *Firmicutes* (*Ruminococcus gnavus*) и *Verrucomicrobiales* (*Akkermansia muciniphila*).

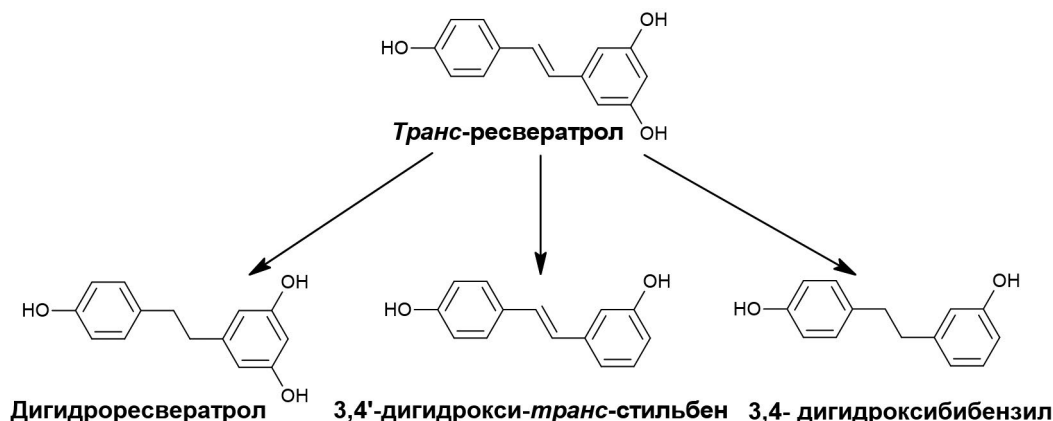


Рис. 6. Дегидрирование *транс*-ресвератрола с образованием дигидроресвератрола, 3,4'-дигидрокси-*транс*-стильбена и 3,4'-дигидроксибибензила (лунуларина) кишечной микробиотой

Бактерия *A. muciniphila* специализируется исключительно на использовании муцинов, в отличие от универсалов *Bacteroides*, способных потреблять муцины и широкий спектр растительных полисахаридов. Основные метаболиты кишечной микрофлоры животных – это короткоцепочечные (летучие) жирные кислоты, образуемые в результате брожения неперевариваемых ферментными системами животного растительных полисахаридов, а именно: целлюлозы, гемицеллюлозы, резистентного крахмала, пектинов, декстранов и олигосахаридов. Главные продукты брожения – ацетат, пропионат и бутират, образуемые соответственно в соотношении примерно от 75/15/10 до 40/40/20 (в среднем – 60/20/18) [61].

В работе Iannucci et al. [62] показано, что пропионат и бутират индуцировали UCP2/AMPK-зависимую аутофагию в клетках печени мыши через активацию PPAR γ (гамма-рецептор, активирующий пролифератор пероксисомы). Применение антибиотиков существенно снижало уровни базальной аутофагии в клетках печени мыши.

Таким образом, в условиях голодания у животных и у человека в микробиоте кишечника преобладали бактерии, способные использовать в качестве субстратов муцины и другие эндогенные субстраты хозяина. Голодание является, по-видимому, фактором отбора видов бактерий, способных перенести длительное отсутствие нутриентов в результате переключения метаболизма на использование доступных эндогенных муцинов и/или рециклизации мертвых бактериальных и эпителиальных клеток.

Природные соединения, вызывающие аутофагию. Среди активаторов аутофагии есть немало природных веществ, которые зачастую могут действовать сразу на несколько мишеней, что затрудняет понимание точного механизма действия; отчасти поэтому данные по таким соединениям сводятся к экспериментам на клеточных линиях [63].

Начнем рассмотрение природных активаторов аутофагии с веществ, механизм действия которых связан с mTOR-зависимым сигнальным путем, ингибирование которого положительно регулирует аутофагию. Примеров веществ с таким механизмом действия достаточно много.

Природный полифенол ресвератрол, производное *транс*-стильбена, обладает широким спектром действия, включая антипролиферативную активность за счет стимулирования как BECN1-независимой аутофагии, так и апоптоза раковых клеток [64]. Также было показано, что ресвератрол ингибирует путь PI3K/Akt/mTOR и активирует AMPK, что является определяющими событиями в подавлении роста аденомы в мышинной модели колоректального рака [65]. Однако, согласно другому исследованию, ресвератрол индуцирует аутофагию в клетках рака яичников иным механизмом – путем разрушения комплекса BECN1–Bcl-2 [66]. Также было замечено, что индуцируемый ресвератролом апоптоз приводит к ингибированию аутофагии в клетках рака эндометрия [67] и эзофагеальной плоскоклеточной карциномы [68]. Помимо описанного выше, он также усиливает экспрессию SIRT1, что может приводить к усилению аутофагии [69]. Стоит отметить, что действие ресвератрола многогранно, оно сильно зависит от клеточной линии и используемых концентраций.

Ресвератрол в кишечнике быстро поглощается путем пассивной диффузии и затем метаболизируется посредством глюкуронидирования и сульфатирования в энтероцитах и в печени или восстанавливается до дигидроресвератрола кишечными бактериями *Sl. equolifaciens* и *Adl. equolifaciens* [70, 71]. Кроме дигидроресвератрола (рис. 6), в результате метаболизма кишечной микробиотой образуются 3,4'-дигидрокси-*транс*-стильбен и 3,4'-дигидроксибибензил (лунуларин) [70].

Исследований о противоопухолевом действии и влиянии на процесс аутофагии микробных

метаболизм ресвератрола нет, несмотря на большое количество таких исследований в отношении самого ресвератрола и его метаболитов, образующихся в печени и энтероцитах [72].

Аналогичный механизм действия имеет куркумин, наиболее изученное биологически активное вещество, извлекаемое из растений рода *Curcuma*, которое из доклинических и клинических исследований более известно как средство, сенситизирующее раковые клетки к химио- и радиотерапии [73]. В клеточных линиях рака желудка SGC-7901 и BGC-823 он вызывает подавление PI3K/Akt/mTOR-пути, вследствие чего повышает экспрессию BECN1, Atg3, Atg5, p53 и p21, увеличивает соотношение LC3-II/LC3-I и потенцирует аутофагию [74]. В клетках кастрационно-резистентного рака простаты куркумин индуцирует протективную форму аутофагии [75]. Также установлено ингибирующее действие куркумина на процессы транскрипции рибосомных генов и активацию аутофагии в клетках мышинных эмбриональных фибробластов (MEFs) [76], в клетках глиомы [77] и аденокарциномы легких [78]. Многие клинические исследования указывают на очень низкую биодоступность куркумина вследствие низкой растворимости и быстрого метаболизма [79]. Предполагается, что одним из возможных механизмов положительного эффекта куркумина при его низкой биодоступности является воздействие на микробиоту кишечника [80–83]. В результате трансформации куркумина кишечной микробиотой образуются соединения с высокой биологической активностью и лучшей биодоступностью. Один из главных метаболитов куркумина, тетрагидрокуркумин, индуцировал аутофагию в человеческих клетках лейкемии HL-60 и раковых клетках легкого A549 NSCLC [84, 85].

Аналогичным механизмом действия обладает кверцетин [86, 87], природный флавоноид, содержащийся во многих травах, который был объектом доклинических исследований, посвященных изучению его антипролиферативного действия. Кверцетин так же, как и куркумин, подавляет пролиферацию клеток рака желудка [87], глиомы [78] и рака легких [88]. В клетках рака желудка кверцетин индуцирует защитную аутофагию путем воздействия на путь Akt/mTOR и передачу сигналов, опосредованную HIF-1 α [87]. В исследовании на клетках рака легкого человека A549 и H1299 кверцетин дозозависимо повышал уровни белка SIRT1 и накопление фосфорилированной формы AMPK [89].

Среди флавоноидов есть и другие активаторы аутофагии, механизм которых связан с ингибированием mTOR. В частности, изобакалалкон, содержащийся в дуднике кейском и псоралее лежачей, ингибирует активность Akt и mTORC1,

активирует проаутофагические факторы транскрипции TFEB и TFE3 *in vitro*, а также *in vivo* в мышинной модели фибросаркомы [90]. Важно уточнить, что, помимо активации аутофагии, изобакалалкон также вызывает стресс эндоплазматического ретикулума, проявлением которого является зависимое от PKR-подобной киназы эндоплазматического ретикулума (PERK) фосфорилирование eIF2 α .

Представители группы пренилированных флавонов, такие как морузин и малберрин, могут замедлять старение в моделях почкующихся дрожжей, червей и клеток человека, воздействуя на систему mTOR-Sch9/p70S6K и вызывая аутофагию. В исследовании на клетках HeLa человека морузин и малберрин ингибировали фосфорилирование киназы β 1 рибосомального белка S6 (p70S6K), стимулировали аутофагию и замедляли старение клеток [91]. Кроме того, у червей, обработанных морузином и малберрином, наблюдались дополнительные преимущества, в том числе увеличение воспроизводства без влияния на здоровье.

Сразу три вещества – эриокаликсин В (EriB), дитерпеноид из прутьевика, α -гедерин, тритерпеновый сапонин, и омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты – обладают схожим механизмом индукции аутофагии, ингибируя сигнальный Akt/mTOR/p70S6K и, одновременно с этим, запуская генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках рака молочной железы [92], колоректального рака [93] и рака простаты [94].

К числу ингибиторов Akt/mTOR можно отнести еще и одобренное FDA природное соединение гваязулен (1,4-диметил-7-изопропилазулен) [95], которое раньше использовалось в офтальмологических препаратах, а затем стало популярным ингредиентом для косметических продуктов, зубных паст и фармацевтических препаратов. Данное соединение обладает противораковыми свойствами, а также может использоваться для лечения болей при воспалении в синергии с диклофенаком [96]. Гваязулен подавляет немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), запуская апоптоз, индуцированный АФК. При этом была показана индукция аутофагии в клетках НМРЛ посредством ингибирования сигнального пути Akt/mTOR [97].

Еще одним интересным примером ингибитора сигнального пути mTOR является кофеин, вызывающий аутофагию *in vitro* и *in vivo* [98–100]. Кофеин уменьшает печеночный гепатоз у мышей с неалкогольной жировой болезнью печени [101] и защищает от проявлений нейротоксичности, вызванной прионами [102]. Стоит также сказать, что проводились исследования, в которых было показано, что кофейные зерна, содержащие, помимо кофеина, большое количество полифенолов, вызывают усиление аутофагии, ингибирование mTORC1, снижение уровня фосфорилирования

p70S6K и перемещение LC3B в аутофагосомы [103]. Можно предположить, что кофеин-индуцированная аутофагия является причиной того, что потребление кофе снижает смертность среди людей среднего возраста [104].

Индукция аутофагии через ингибирование сигнального пути PI3K/Akt/mTOR может использоваться в качестве подхода к борьбе с ожирением. Подтверждением тому является исследование, в котором показано, что флавоноиды *Pueraria montana* благодаря этому механизму действия улучшают состояние при неалкогольной жировой болезни печени у мышей с ожирением [105]. Также показано, что пуэарин, один из изофлавонов *P. montana*, может значительно увеличивать продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* за счет регуляции протеасомной субъединицы бета 5 (prosbeta5) и SIRT1 [106].

Еще одним механизмом активации аутофагии является ингибирование рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1), регулятора пути PI3K/AKT/mTOR. Таким механизмом действия обладает пикроподофиллин (PPP), циклолигнанный алкалоид, полученный из растения майская яблоня. PPP был описан в качестве мощного индуктора аутофагии, который действует посредством ингибирования рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R). При введении мышам с опухолями PPP повышал эффективность иммуногенной химиотерапии в сочетании с иммунотерапией, и эти эффекты основывались на индукции аутофагии в злокачественных клетках [107].

Несмотря на то что mTOR играет важную роль в метаболизме клетки, участвуя в путях восприятия питательных веществ, существует большое разнообразие mTOR-независимых путей, которые являются мишенями других активаторов аутофагии. Натуральный дисахарид трегалоза стимулирует аутофагию и снижает агрегацию белков путем ингибирования глюкозных транспортеров [108, 109]. Было показано, что она повышает конверсию LC3-I в LC3-II mTOR-независимым путем, как и сахароза [110]. Трегалоза, таким образом, может быть использована для индукции аутофагии при болезнях Паркинсона [111] и Альцгеймера [112], а также прионных заболеваниях [113]. Несмотря на это, трегалоза не применима в клинической практике, так как она имеет низкую биодоступность из-за быстрого метаболизма в организме, поэтому были синтезированы более стабильные аналоги трегалозы – лентрегалоза А, В и С, которые были определены как эффективные активаторы аутофагии [114].

Гормонально активная форма витамина D (кальцитриол) за счет индукции аутофагии через PI3K, ATG5 и BECN1 ингибирует репликацию ВИЧ-1 [115] и микобактерий туберкулеза в человеческих

макрофагах [18] и убивает клетки рака молочной железы [116]. Это объясняет то, что дефицит витамина D может лежать в основе повышенной восприимчивости к различным видам рака и инфекционным заболеваниям [117].

Среди природных активаторов аутофагии можно выделить активаторы киназы AMPK, положительно регулирующей аутофагию путем фосфорилирования киназы ULK1 по Ser-317, Ser-555 и Ser-777. Примером такого вещества является казинол С, полученный из растения *Broussonetia kazinoki*, которое через активацию AMPK в высоких концентрациях вызывает апоптоз, а в низких – аутофагию [118]. Таким образом, благодаря своей способности казинол С может быть эффективным терапевтическим средством как при раке, так и при метаболических заболеваниях.

Регулирование активности AMPK может происходить вышестоящими путями, например, через путь SIRT1/LKB1 [119]. Активация SIRT1 приводит к деацетилированию и повышению киназной активности белка LKB1, который может активировать AMPK путем фосфорилирования. Примерами двойных активаторов SIRT1 и AMPK являются комбинация феруловой кислоты и берберина, которые вызывают аутофагию, митофагию, митохондриальный биогенез, репарацию ДНК, при этом способствуя выживанию клеток за счет подавления апоптоза, старения и воспаления, вызванного NF-κB [120].

Дигидрофлавоноидное соединение нарингин, широко распространенное в цитрусовых и используемое в китайской фитотерапии, замедляет старение на модели *Caenorhabditis elegans*, уменьшает накопление жира и способствует аутофагии. Анализ транскриптома показал изменение уровня транскрипции генов, связанных с регуляцией биосинтеза и метаболизма липидов и аутофагией (например, гены *skn-1*, *hlh-30*, *lgg-1*, *unc-51* и *pha-4*) [121]. Согласно исследованию, нарингин существенно активирует SIRT1 и AMPK и стимулирует путь митохондриального биогенеза посредством регуляции сигналов LKB1/AMPK/PGC-1α [122].

Регуляция аутофагии на уровне транскрипции является еще одним возможным механизмом действия некоторых активаторов. В частности, 3,4-диметоксихалкон (3,4-DC), который был описан как миметик ограничения калорийности, запускает аутофагию в клетках путем активации транскрипционных факторов TFEB и TFE3 [123]. Полисахарид сладкого чая (*Rubus suavissimus* S. Lee) STP-60a в исследовании на *C. elegans* увеличивает продолжительность жизни через инсулинозависимые и митохондриальные пути, зависящие от аутофагии. Он активирует три фактора транскрипции (FoxO/DAF-16, Nrf-2/SKN-1 и HSF-1), действующие ниже сигнального пути инсулина [124].

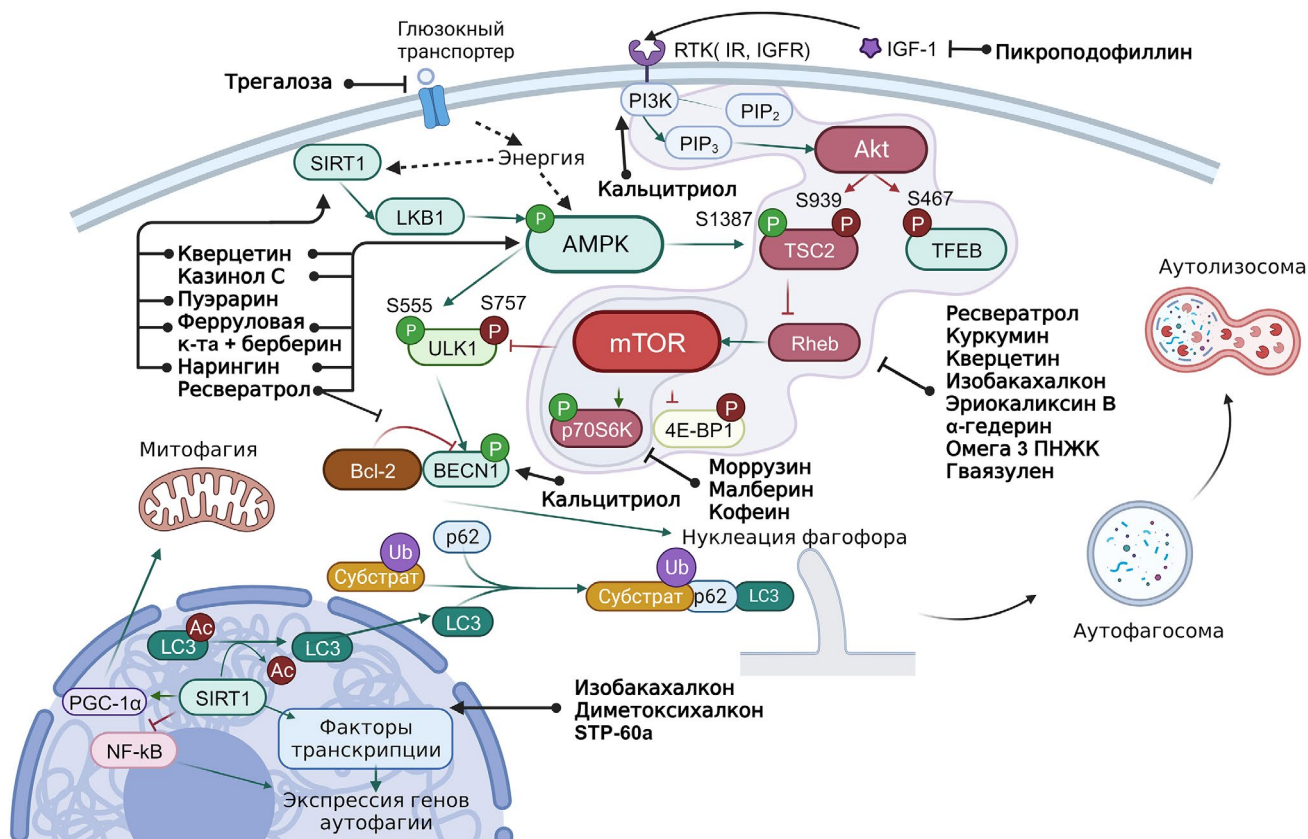


Рис. 7. Механизм действия природных активаторов аутофагии. Ub – убиквитинирование, P – фосфорилирование (красным показано ингибирующее фосфорилирование, зеленым – активирующее). Зеленые стрелки показывают активирующее взаимодействие, красные – ингибирующее. Черные стрелки используются для отражения последовательности стадий в процессе аутофагии, а также для отражения мишени действия веществ. Черные пунктирные стрелки отражают влияние внутриклеточных условий/факторов на мишень

Таким образом, природные активаторы аутофагии достаточно разнообразны по механизмам своего действия, которое в большинстве случаев сводится к влиянию сразу на несколько мишеней. Резюмирующая схема, отражающая мишени воздействия природных активаторов аутофагии, приведена на рис. 7.

Стоит отметить, что на резюмирующей схеме отражены лишь основные мишени, на которые оказывают влияние рассматриваемые соединения, однако для многих соединений в литературе описаны и альтернативные механизмы действия, которые упоминались в данном обзоре. Многие молекулы действуют на процесс аутофагии, влияя на белки (AMPK, ULK1, SIRT1 и др.), положительно регулирующие данный процесс. Однако немалое количество молекул активирует аутофагию путем подавления пути АКТ/мTOR, который оказывает ингибирующее действие на аутофагию. Безусловно, есть вещества, влияющие на оба упомянутых выше пути, к примеру, ресвератрол и кверцетин. Однако необходимо понимать, что действие многих из приведенных молекул в зависимости от типа клеток и концентрации зачастую включает в себя влияние и на другие мишени, которые были упо-

мянуты выше. Таким образом, общая черта большинства природных активаторов аутофагии – отсутствие уникальных механизмов действия и, как следствие, наличие большого количества побочных эффектов, ограничивающих их применение.

Природные активаторы митохондриальной аутофагии. Митохондриальную аутофагию также вызывают многие природные вещества, которые обсуждались в предыдущем разделе, такие как спермидин и ресвератрол. Подробнее хотелось бы остановиться на наиболее известном природном активаторе митохондриальной аутофагии – урוליитине А (UA). Это бензокумарин, который образуется в результате метаболизма эллаговой кислоты и эллаготанинов кишечной микрофлорой [125]. Он не содержится ни в каких источниках пищи, а его биодоступность зависит от индивидуального состава микробиоты. Механизм индукции митохондриальной аутофагии с помощью UA пока что не до конца известен, однако уже сейчас понятно, что он поддерживает функции митохондрий с помощью нескольких белков-регуляторов митохондриальной аутофагии, например, AMPK, BECN1, PINK1, p62/SQSTM1 и т.д. UA может активировать SKN1 (гомолог NRF2 у нематоды *C. elegans*), что увеличивает продолжительность жизни и улучшает митохондриальный биогенез, сохраняющий

популяцию и активность митохондрий. На нематодах было показано, что при длительном приеме UA активируется биогенез митохондрий, что, в свою очередь, приводит к улучшению подвижности, активности глоточных мышц и процессов дыхания, причем эти эффекты независимы от диеты и возраста [11]. На мышинных моделях были получены данные, что при длительном пероральном приеме уролитина А у молодых мышей повышается физическая выносливость, а у старых мышей увеличивается как сила, так и выносливость мышц. Эти результаты подчеркивают терапевтический потенциал уролитина А в улучшении функции мышечной системы и двигательной активности [126]. Исследования *in vivo* не выявили каких-либо токсических или специфических побочных эффектов [127], кроме того, UA хорошо переносится пожилыми людьми [128]. В 2018 г. FDA включило уролитин А в список безопасных пищевых добавок.

Другим природным активатором аутофагии, используемым в настоящее время в пищевых добавках для поддержания функции митохондрий, является спермидин, представляющий собой природный эндогенный полиамин, синтезируемый из диамина путресцина. Природными источниками спермидина являются злаковые, бобовые, соя, фундук, фисташки, а также некоторые фрукты и ягоды [129]. Молоко, яйца, а также мясо содержат спермидин в своем составе. Спермидину приписывают такие свойства, как замедление старения, кардиозащитное действие [130], улучшение когнитивных функций [131], защита от нейродегенеративных расстройств [132], при этом описанных механизмов его возможного влияния на аутофагию достаточно много. В одном исследовании говорится, что спермидин, аналогично куркумину и кверцетину, проявляет свойства эпигенетического регулятора и индуцирует аутофагию *in vitro* путем ингибирования гистонацетилтрансферазы p300 (EP300), которая подавляет функции нескольких белков аутофагии [133]. В стволовых клетках женской зародышевой линии (FGSC) спермидин вызывает аутофагию через ингибирование пути PI3K/Akt [134]. Спермидин приводил к усилению BECN1-зависимой аутофагии в фибробластах при индуцированном блеомицином идиопатическом легочном фиброзе у мышей [135].

Также показано, что добавки спермидина оказывают влияние на количество и морфологию митохондрий в сердце старых мышей путем стимулирования митофагии и митохондриального биогенеза [136]. На мышах было показано, что спермидин преодолевает гематоэнцефалический барьер и усиливает гипузинацию эукариотического фактора инициации трансляции 5A (eIF5A) в гиппокампе, улучшая функцию митохондрий. В этом же исследовании на модели старения дро-

зофилы спермидин повышает дыхательную способность митохондрий посредством регулятора аутофагии Atg7 и пути PINK1/Parkin [131].

Из-за большого числа эффектов спермидина на клеточный метаболизм способы действия данного вещества различаются в зависимости от типа клеток, органа или наличия какого-либо заболевания. Это, с одной стороны, может быть выгодным подходом при борьбе со старением, которое является сложным по своему механизму процессом. Однако отсутствие уникального механизма действия может представлять серьезные проблемы для применения данного соединения. Несмотря на то что безопасность применения спермидина для мышей и пожилых людей была показана с использованием растительного экстракта, богатого спермидином [132], другое исследование, где крысам давали добавки чистого спермидина, выявило несколько побочных эффектов данного вещества [137].

Учитывая перспективность спермидина при многих заболеваниях, подходом к преодолению ограничений применения спермидина является дизайн и синтез новых производных. Уже получены структурно родственные аналоги спермидина, которые в экспериментах на *C. elegans* способствуют увеличению продолжительности жизни и защите клеток от окислительного повреждения путем активации митофагии. В частности, соединение VL-004 (1,8-диаминооктан) обладает лучшей способностью вызывать митофагию, чем спермидин [138]. Неожиданным результатом исследования механизма действия VL-004 является открытие того, что функция данного соединения зависит от PINK1, но не зависит от PDR-1, ортолога Parkin у *C. elegans*. Авторы исследования предполагают, что вместо Parkin другая убиквитинлигаза E3 может действовать вместе с PINK1, вызывая митофагию.

Митохондриальная дисфункция характерна для многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, а митофагия, опосредованная путем PRKN1/Parkin может служить терапевтическим вариантом лечения таких состояний. Было показано, что, помимо индивидуальных молекул, митофагию могут активировать пробиотики, облегчая симптомы нейродегенеративных заболеваний. В результате скрининга 49 пробиотических штаммов были обнаружены два пробиотика, *Saccharomyces boulardii* и *Lactococcus lactis*, которые повышали рекрутирование Parkin в митохондрии, накопление фосфоубиквитина и деградацию митофузинов [139].

В качестве агентов для активации митофагии с целью борьбы с болезнью Паркинсона также были описаны лактат и пируват, способные к кратковременному закислению цитозоля [140]. Инкубация клеток SH-SY5Y или первичных нейронов

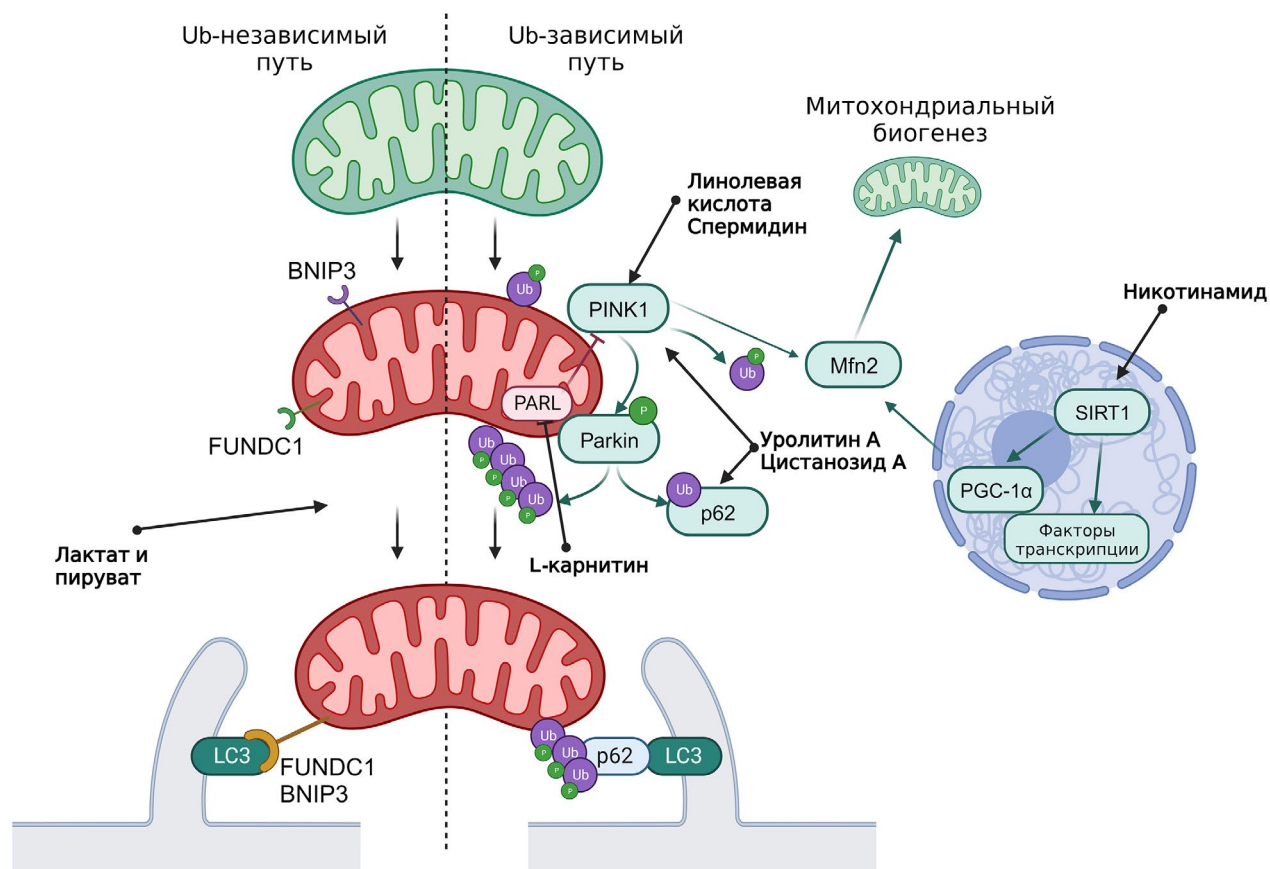


Рис. 8. Механизм действия природных активаторов митофагии. Зеленым изображены нормальные митохондрии, красным – митохондрии с нарушениями в работе. Ub – убиквитинирование, P – активирующее фосфорилирование. Зеленые стрелки показывают активирующее взаимодействие. Красная линия показывает ингибирующее взаимодействие. Черные стрелки используются для отражения последовательности стадий в процессе митофагии, а также для отражения мишени действия веществ

и астроцитов с данными веществами приводила к активации митофагии после обработки MPP⁺ (1-метил-4-фенилпиридиний), способствующей восстановлению функции митохондрий и защите этих клеток от апоптотической и некротической гибели. В исследовании не установлен точный механизм активации митофагии, однако высказано предположение, что это может происходить не только PINK1/Parkin-зависимым путем, но и через убиквитин-независимые пути, например, в результате окислительного стресса при болезни Паркинсона.

Другим активным соединением, оказывающим защитный нейропротекторный эффект при болезни Паркинсона путем индукции митофагии, является цистанозид А (CA), фенолэтанол, выделенный из Цистанхе пустынное (*Cistanche deserticola*). Точный механизм действия не установлен, однако предположительным вариантом является активация пути PINK1/Parkin/p62, ведущего к деградации поврежденных митохондрий и уменьшению окислительного стресса [141].

Потенциалом к улучшению качества митохондрий путем активации митофагии обладает никотинамид (NAM), одобренная FDA добавка к пище.

NAM вызывает снижение митохондриального дыхания и продукции АФК в первичных фибробlastах человека и продлевает срок их репликативной жизни. NAM в клетках превращается в NAD⁺ (никотинамидадениндинуклеотид) при участии никотинамидфосфорибозилтрансферазы (Nampt). Возможный механизм связан либо с увеличением активности GAPDH, что, в свою очередь, стимулирует активацию ATG12, либо с активацией SIRT1 [142].

Восстановление функции митохондрий путем активации митофагии также является подходом к лечению саркопении, синдрома возрастной потери мышечной массы и силы. В качестве вещества, обладающего таким потенциалом, описана линолевая кислота, которая значительно уменьшала саркопению у *C. elegans*, восстанавливая функцию митохондрий, стимулируя митофагию и борясь с окислительным стрессом. Механизм действия связан с увеличением экспрессии гена *pink1* [143].

Другим активатором PINK1/Parkin-зависимой митофагии является L-карнитин, поддерживающий митохондриальную функцию и нормальное состояние микрососудов сердца. Описанным механизмом действия L-карнитина является снижение

Таблица. Природные активаторы ауто- и митохондриальной аутофагии

Название	Структура	Механизм	Источник	Ссылки на исследования
Активаторы аутофагии				
Ресвератрол		разрушение комплекса BECN1-Vps34; подавление пути PI3K/Akt/mTOR и активация AMPK	красный виноград, черника, голубика, клюква, брусника, красная смородина, корни черной шелковицы, рейнгурия сахалинская и др.	[64–72]
Куркумин		подавление пути PI3K/Akt/mTOR	растения рода <i>Curcuma</i>	[73–85]
Кверцетин		ингибирование пути Akt/mTOR и воздействие на передачу сигналов, опосредованную HIF-1α; активация SIRT1 и AMPK	многие растения, фрукты, овощи и ягоды преимущественно красного цвета (красный лук, виноград, яблоки, томаты, любисток, каперсы, перец, вишня, черника и многое др.)	[86–89]
Изобакахаалкон		ингибирование Akt и mTORC1; активация проаутофагических факторов транскрипции TFEB и TFEB3	дудник кейский и псоралея лецинолистная	[90]
Моррузин		воздействие на сеть mTOR-Sch9/p70S6K путем ингибирования фосфорилирования p70S6K	шелковица и другие растения семейства тутовых	[91]
Малберин				[91]

Таблица (продолжение)

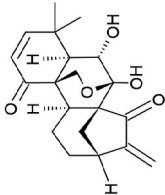
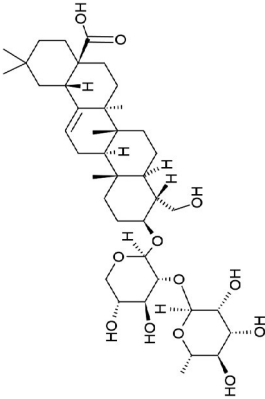
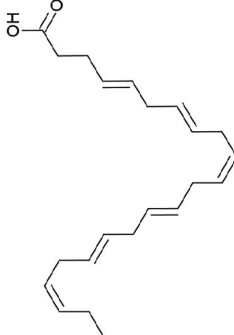
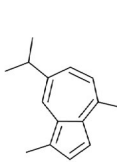
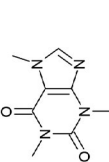
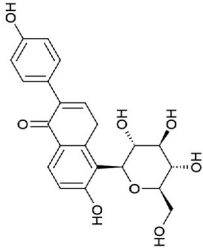
Название	Структура	Механизм	Источник	Ссылки на исследования
Эриокаликсин В (EriB)		ингибирование Akt/mTOR/p70S6K	пругьевик	[92]
α-гедерин			семена черного тмина и листья плюща обыкновенного	[93]
Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (в частности, докозагексаеновая кислота)			рыба, семена чиа, льна, морские водоросли и микроводоросли	[94]
Гваязулен		ингибирование Akt/mTOR	некоторые эфирные масла, в основном масла гваякового дерева и ромашки, различные мягкие кораллы	[95–97]
Кофеин		ингибитор mTOR сигнального пути	листья чая, семена кофе, семена какао, орехи кола	[98–104]
Пуэарин		регулирование протеасомной субъединицы бета 5 (prosbeta5) и сиртуина-1 (SIRT1)	пуэария долговая	[105–106]

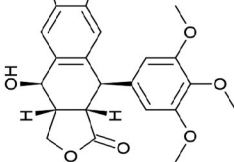
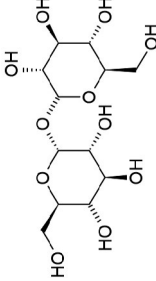
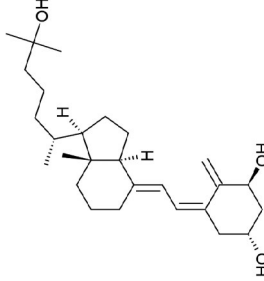
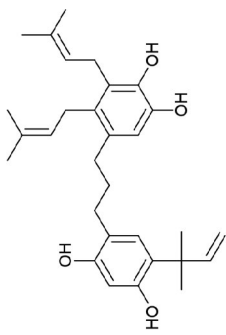
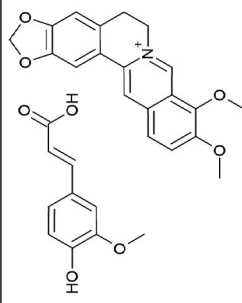
Таблица (продолжение)					
Название	Структура	Механизм	Источник	Ссылки на исследования	
Пикропоподофиллин (PPP)		ингибирование рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1)	многолетнее травянистое растение семейства Berberidaceae, <i>Podophyllum peltatum</i>	[107]	
Трегалоза		ингибирование глюкозных транспортеров	спорынья, водоросли, дрожжи, высшие грибы, лишайники, некоторые высшие растения, гемолимфа ряда червей и насекомых	[108-113]	
Кальцитриол		индукция аутофагии через PI3K, ATG5 и BECN1	вырабатывается в почках из холестерина	[18, 115-117]	
Казинол С		активация AMPK	бруссонетия казиноки (<i>Broussonetia kazinoki</i>)	[118]	
Комбинация феруловой кислоты и берберина		активация SIRT1 и AMPK	феруловая кислота содержится повсеместно в высших растениях: берберин – в барбарисе (<i>Berberis vulgaris</i>), корнях коломба (<i>Radix colombo</i>), коптисе китайском (<i>Coptis chinensis</i>)	[120]	

Таблица (продолжение)

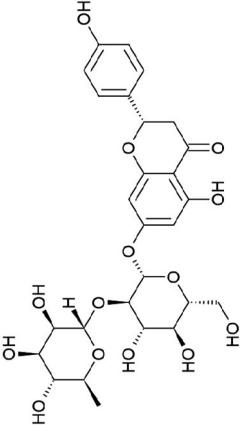
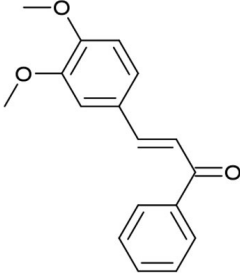
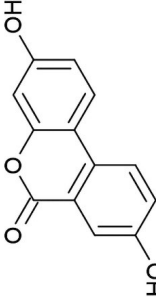
Название	Структура	Механизм	Источник	Ссылки на исследования
Нарингин		активация SIRT1 и AMPK и стимулирование митохондриального биогенеза посредством регуляции сигналов LKB1/AMPK/PGC-1α	цитрусовые, особенно грейпфруты	[121, 122]
Диметоксихалкон (3,4-DC)		активация транскрипционных факторов TFEB и TFEB3	дудник кейский	[123]
Полисахарид сладкого чая STR-60a	томогенный гетерополисахарид, состоящий из рамнозы, арабинозы, глюкозы, галактозы и глюкуроновой кислоты	активация факторов транскрипции FoxO/DAG-16, Nrf-2/SKN-1 и HSF-1	<i>Rubus Suavis</i> S. Lee	[124]
Активаторы митохондрий				
Уролитин А (UA)		влияние на множество белков-регуляторов аутофагии (AMPK, BECN1, PINK1, p62/SQSTM1, SKN1)	образуется в кишечнике в результате метаболизма эллаговой кислоты и эллаготанинов кишечной микрофлорой	[11, 51–55, 125–128]
Спермидин		ингибирование пути PI3K/Akt/mTOR; ингибирование ER300; активация пути PINK1/Parkin	злаковые, бобовые, соя, фундук, фисташки, а также некоторые фрукты и ягоды, молоко, яйца, а также мясо содержат спермидин в своем составе	[129–137]

Таблица (окончание)				
Название	Структура	Механизм	Источник	Ссылки на исследования
Лактат		точный механизм не установлен; предположительно, активация аутофагии через убиквитин-независимые пути	лактат – продукт анаэробного метаболизма глюкозы (гликолиза), в ходе которого он образуется из пирувата под действием лактатдегидрогеназы	[140]
Пируват				[140]
Цистанозид А (СА)		предположительно, активация пути PINK1/Parkin/p62	цистанхе пустынное	[141]
Никотинамид (NAM)		активация ATG12 либо активация SIRT1	содержится в таких продуктах питания, как печень, почки, мясо индейки, рыба (тунец, лосось), дрожжи, ржаной хлеб, гречка, фасоль и т.д.	[142]
Линолевая кислота		увеличение экспрессии гена <i>pink-1</i>	растительные масла, такие как соевое, кукурузное, рапсовое	[143]
L-карнитин		снижение активности PARG, посредством которой расщепляется PINK1	мясо, рыба, птица, молоко, сыр, творог	[144]

протеазной активности митохондриальной внутримембранной расщепляющей протеазы PARL (связанный с пресенилинами ромбовидный белок), посредством которой расщепляется PINK1, путем усиления взаимодействия между PINK2 (Прогриббин-2) и PARL [144].

Таким образом, среди природных соединений идентифицировано большое количество активаторов аутофагии и митофагии, которые обладают широким спектром механизмов действия, которые в большинстве случаев не ограничиваются влиянием на одну мишень (рис. 8), а распространяются на многие белки-регуляторы аутофагии. Помимо того, что большинство из описанных природных молекул-активаторов митофагии влияют на путь PINK/Parkin, они также усиливают аутофагию посредством активации AMPK и SIRT1 или же путем ингибирования mTOR.

Резюмирующие данные по активаторам аутофагии и митофагии с описанием структуры, краткого механизма и источников приведены в таблице.

КОММЕРЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ ПРИРОДНЫХ АКТИВАТОРОВ АУТОФАГИИ

Исследования в области аутофагии становятся все более и более популярным подходом к поиску веществ, способных замедлить старение, улучшить состояние здоровья в пожилом возрасте и отсрочить наступление различных возрастных патологий. Компании Amazentis, Longevity labs, Mimio Health, Nestlé Health Science выпускают биологически активные добавки, призванные активировать аутофагию в клетках, замедлить процесс старения и улучшить состояние организма.

Некоторые компании не акцентируют внимание покупателей на том, что их продукт способен модулировать аутофагию, однако используют ингредиенты, описанные в литературе как активаторы аутофагии. К примеру, можно отметить компанию Nara Hills, которая производит напитки с ресвератролом и другими антиоксидантами, которые помогают уменьшить воспаление, способствуют улучшению сердечно-сосудистой системы и предотвращению старения. Ресвератрол также входит в состав пищевых добавок, производимых компаниями Vinomis и Life Extension. Компания Taiyo является производителем изокверцитрина, предшественника кверцетина, который предоставляет антиоксидантную защиту клеток от окислительного стресса, а также может вызывать аутофагию. Jarrow Formulas использует кверцетин и другие ингредиенты в продуктах для поддержания функции митохондрий, а Zeus Nugia – биодоступную форму куркумина для восстановления работы мышц и суставов. Список компаний, использующих природ-

ные активаторы аутофагии в составе своей продукции, безусловно, не заканчивается на описанном выше, поскольку природные молекулы имеют широкий спектр действия и потенциал их применения не ограничен нацеливанием на аутофагию.

Начнем более подробное рассмотрение компаний с тех, кто использует природные активаторы аутофагии в своей продукции. Компания Amazentis, основанная в 2007 г. в Лозанне, Швейцария, использует ведущие современные исследования и клиническую науку для открытия и разработки добавок для увеличения продолжительности здоровой жизни. Компания нацелена на борьбу с дисфункциями митохондрий, которые происходят с возрастом. Началась история компании с ингредиента Mitopure™ (запатентованный высокочистый уrolитин А). Несмотря на то что уrolитин А может вырабатываться в организме человека под воздействием микрофлоры кишечника, микрофлора разных людей различается и выработка уrolитина А может происходить с разной эффективностью. Поэтому команда Amazentis создала Mitopure, защищенный патентами (EP-3393467-B1, US-9994542-B2, US-10906883-B2 и др.), эффективность которого подтверждается несколькими клиническими исследованиями [145, 146]. Компания запатентовала способ синтеза уrolитина А, а также использование композиций, содержащих данный ингредиент в пищевых добавках, продуктах питания и напитках. Mitopure вызывает митофагию и поддерживает улучшение функции митохондрий и мышечную силу. Используя свой ингредиент Mitopure, компания Timeline (дочерняя компания Amazentis) выпускает пищевые добавки, а также косметику против старения для лица.

Коммерциализацией уrolитина А заинтересовалась компания Nestlé Health Science, которая приобрела долю в Amazentis и получила глобальные права на использование запатентованного ингредиента Mitopure. Поэтому уrolитин А в виде ингредиента Mitopure также входит в состав линейки добавок Celltrient Cellular Nutrition, выпускаемой компанией Nestlé Health Science.

Среди компаний, выпускающих биологически активные добавки для модулирования аутофагии, также стоит выделить австрийскую компанию Longevity Labs+, которая была основана в 2016 г., хотя ее история начинается шестью годами ранее, в 2010 г. Считающийся «первооткрывателем» спермидина, профессор доктор Франк Мадео в то время руководил исследовательской деятельностью в области полиамина спермидина в университете Граца. Об этом исследовании в 2016 г. узнали и заинтересовались доктор Джеральд Ситте и дипломированный инженер Герберт Пок, ставшие основателями компании. Они сразу же начали работать вместе с исследователями из Университета Граца

над разработкой специального процесса экстракции, что привело к созданию дочерней компании Longevity Labs+. Компания выпускает добавки Spermidine LIFE, которые содержат 100%-ный натуральный и клинически протестированный спермидин из зародышей пшеницы. Компания запатентовала использование спермидина в пищевых и фармацевтических композициях для лечения заболеваний или нарушений, связанных с митохондриальной дисфункцией.

Несмотря то что Longevity Labs+ первой выпустила на рынок добавки со спермидином в 2019 г., в настоящий момент она не является единственной, использующей данное активное вещество. Американская компания Mimio Health также использует спермидин, как один из ингредиентов, который входит в состав запатентованной формулы, имитирующей голодание и предназначенной для активации естественной способности клеток к самоочищению, восстановлению и защите. Проведенное компанией клиническое исследование показало, что периодическое длительное голодание активирует действие нескольких биологически активных метаболитов (спермидин, 1-метилникотинамид, пальмитоилэтаноламид и олеоилэтаноламид), для которых была показана способность увеличивать среднюю продолжительность жизни *C. elegans* на целых 96% [5]. Указанные выше соединения вошли в состав выпускаемых компанией пищевых добавок. Говоря о механизме действия, данная смесь помогает активировать аутофагию посредством регуляции mTOR, Akt и переноса ацетила гистонов, а также стимулирования AMPK и SIRT1.

Несмотря на то что спермидин признан перспективным активатором аутофагии, его механизм действия может различаться в зависимости от типа клеток и типа заболевания. Сложный, до конца невыясненный механизм действия в совокупности с высокой активностью по отношению к активации аутофагии привели к идее получения более селективных аналогов спермидина. В настоящее время израильский стартап Vitalunga ведет активные исследования по получению и изучению его производных для получения клинических препаратов, усиливающих митофагию и аутофагию. Исследователи-основатели стартапа уже протестировали семейство структурно родственных соединений спермидина и показали, что молекула 1,8-диаминооктан (VL-004) превосходит спермидин по своей способности вызывать митофагию и защищать от окислительного стресса, способствуя увеличению продолжительности жизни *C. elegans* [138].

Исследования стартапа Vitalunga преследуют целью разработку препаратов для профилактики множественных заболеваний, связанных со старением, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, сердечная недостаточность, саркопения и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аутофагия играет важную роль среди клеточных процессов, а ее дисфункция связана со многими заболеваниями человека. Нарушение процесса аутофагии может привести к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, нейродегенеративных заболеваний, а также диабета, рака и других нарушений. Однако роль природных соединений для предотвращения данных заболеваний достаточно сложна ввиду плейотропного механизма их действия. Более того, в зависимости от концентрации, типа клеток или типа заболевания природные соединения могут оказывать не только активирующее действие на аутофагию, но и ингибирующее. Например, описанное в данном обзоре широко известное природное соединение ресвератрол активирует аутофагию по нескольким механизмам, а также вызывает апоптоз раковых клеток. Другим наглядным примером является соединение казинол С, для которого в низких концентрациях показана способность вызывать аутофагию, а в высоких – апоптоз. Использование многих природных соединений в пищевых добавках или фармацевтических препаратах ограничено из-за того, что механизм их действия не до конца понятен, а также из-за наличия побочных эффектов.

Несмотря на большое количество работ, посвященных природным активаторам аутофагии, актуальной задачей для будущих исследований остается установление точных мишеней, на которые воздействуют растительные активаторы аутофагии, а также поиск новых соединений, обладающих более направленным действием. Перспективным подходом к открытию новых природных активаторов аутофагии может стать более глубокое изучение новых растительных источников на предмет установления точных формул молекул, входящих в их состав и отвечающих за активацию аутофагии, а также изучение метаболитов, вырабатываемых микробиотой животных, устойчивых к длительному голоданию, поскольку голодание – одно из хорошо известных условий, способствующих активации аутофагии в организме.

Хочется отметить, что аутофагия интересна не только в контексте медицины, но и в качестве процесса, влияя на который можно достичь долголетия и отсрочить возрастные заболевания человека. Особенно в этом ключе интересны вещества, активирующие митофагию. Примечательно, что несколько компаний уже выпускают биологически активные добавки на основе природных веществ-активаторов митофагии уролитина А (Amazentis, Nestlé Health Science) и спермидина (Longevity labs, Mimio Health), призванных улучшить состояние клеток и замедлить старение. Необходимо подчеркнуть, что в настоящий момент компаний, занимающихся выпуском пищевых

добавок на основе активаторов аутофагии, в России нет. Учитывая тот факт, что исследования активаторов аутофагии набирают все большую популярность в мире, число пищевых добавок или клинических препаратов на их основе будет только расти. Ввиду вышесказанного развитие данного направления в России имеет важное значение для создания нашей собственной индустрии функциональных пищевых добавок, направленных на увеличение продолжительности здоровой жизни и, как следствие, качества жизни людей.

Вклад авторов. Ю.А. Павлова, Е.А. Гусева – написание текста, О.А. Донцова – обсуждение

материала, редактирование текста, П.В. Сергиев – концепция и руководство работой, обсуждение материала, редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке компании ЭФКО.

Благодарности. Авторы благодарны коллективу лаборатории, а также академикам А.Г. Габинову и А.А. Макарову за обсуждение и дискуссии.

Конфликт интересов. Работа выполнена при финансовой поддержке компании ЭФКО.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shintani, T., and Klionsky, D. J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science*, **306**, 990-995, doi: 10.1126/science.1099993.
- Yang, Q., Wang, R., and Zhu, L. (2019) Chaperone-mediated autophagy, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1206**, 435-452, doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_20.
- Khaminets, A., Behl, C., and Dikic, I. (2016) Ubiquitin-dependent and independent signals in selective autophagy, *Trends Cell Biol.*, **26**, 6-16, doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.010.
- Kaizuka, T., Morishita, H., Hama, Y., Tsukamoto, S., Matsui, T., et al. (2016) An autophagic flux probe that releases an internal control, *Mol. Cell*, **64**, 835-849, doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.037.
- Rhodes, C. H., Zhu, C., Agus, J., Tang, X., Li, Q., et al. (2023) Human fasting modulates macrophage function and upregulates multiple bioactive metabolites that extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*: a pilot clinical study, *Am. J. Clin. Nutr.*, **117**, 286-297, doi: 10.1016/j.ajcnut.2022.10.015.
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S. J., and Kroemer, G. (2019) Caloric restriction mimetics against age-associated disease: targets, mechanisms, and therapeutic potential, *Cell Metab.*, **29**, 592-610, doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.018.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010) Methods in mammalian autophagy research, *Cell*, **140**, 313-326, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028.
- Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017) Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease, *Circ. Res.*, **120**, 1812-1824, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311082.
- Georgakopoulos, N. D., Wells, G., and Campanella, M. (2017) The pharmacological regulation of cellular mitophagy, *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 136-146, doi: 10.1038/nchembio.2287.
- Vaduganathan, M., Mensah, G. A., Turco, J. V., Fuster, V., and Roth, G. A. (2022) The global burden of cardiovascular diseases and risk, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **80**, 2361-2371, doi: 10.1016/j.jacc.2022.11.005.
- Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., Moullan, N., et al. (2016) Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents, *Nat. Med.*, **22**, 879-888, doi: 10.1038/nm.4132.
- Andreux, P. A., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Burdet, F., Ibberson, M., et al. (2019) The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans, *Nat. Metab.*, **1**, 595-603, doi: 10.1038/s42255-019-0073-4.
- Yang, S., Liu, T., Hu, C., Li, W., Meng, Y., et al. (2022) Ginsenoside compound K protects against obesity through pharmacological targeting of glucocorticoid receptor to activate lipophagy and lipid metabolism, *Pharmaceutics*, **14**, 1192, doi: 10.3390/pharmaceutics14061192.
- Lim, H., and Lee, M.-S. (2018) Amelioration of obesity-induced diabetes by a novel autophagy enhancer, *CST*, **2**, 181-183, doi: 10.15698/cst2018.07.146.
- Minami, Y., Hoshino, A., Higuchi, Y., Hamaguchi, M., Kaneko, Y., et al. (2023) Liver lipophagy ameliorates non-alcoholic steatohepatitis through extracellular lipid secretion, *Nat. Commun.*, **14**, 4084, doi: 10.1038/s41467-023-39404-6.
- Jung, J., Park, J., Kim, M., Ha, J., Cho, H., et al. (2023) SB2301-mediated perturbation of membrane composition in lipid droplets induces lipophagy and lipid droplets ubiquitination, *Commun. Biol.*, **6**, 300, doi: 10.1038/s42003-023-04682-9.

17. Yerra, V. G., Kalvala, A. K., and Kumar, A. (2017) Isoliquiritigenin reduces oxidative damage and alleviates mitochondrial impairment by SIRT1 activation in experimental diabetic neuropathy, *J. Nutr. Biochem.*, **47**, 41-52, doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.05.001.
18. Campbell, G. R., and Spector, S. A. (2012) Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy, *PLoS Pathog.*, **8**, e1002689, doi: 10.1371/journal.ppat.1002689.
19. Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature*, **402**, 672-676, doi: 10.1038/45257.
20. Marinković, M., Šprung, M., Buljubašić, M., and Novak, I. (2018) Autophagy modulation in cancer: current knowledge on action and therapy, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 8023821, doi: 10.1155/2018/8023821.
21. Xie, Z., Lau, K., Eby, B., Lozano, P., He, C., et al. (2011) Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice, *Diabetes*, **60**, 1770-1778, doi: 10.2337/db10-0351.
22. Wang, B., Yang, Q., Sun, Y., Xing, Y., Wang, Y., et al. (2014) Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice, *J. Cell. Mol. Med.*, **18**, 1599-1611, doi: 10.1111/jcmm.12312.
23. Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., Puchalski, M., Rintz, E., et al. (2018) Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases, *Metab. Brain. Dis.*, **33**, 989-1008, doi: 10.1007/s11011-018-0214-6.
24. Гусева, Е. А., Павлова, Ю. А., Донцова, О. А. и Сергиев, П. В. (2024) Синтетические активаторы аутофагии, *Биохимия*, **89**, 33-60, doi: 10.31857/S0320972524010027.
25. Li, X., Feng, Y., Wang, X.-X., Truong, D., and Wu, Y.-C. (2020) The critical role of SIRT1 in Parkinson's disease: mechanism and therapeutic considerations, *Aging Dis.*, **11**, 1608-1622, doi: 10.14336/AD.2020.0216.
26. Palmieri, M., Pal, R., Nelvagal, H. R., Lotfi, P., Stinnett, G. R., et al. (2017) mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases, *Nat. Commun.*, **8**, 14338, doi: 10.1038/ncomms14338.
27. Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., et al. (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2, *PLoS Biol.*, **7**, e38, doi: 10.1371/journal.pbio.1000038.
28. He, C., and Klionsky, D. J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy, *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 67-93, doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
29. Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3, *Autophagy*, **3**, 452-460, doi: 10.4161/auto.4451.
30. Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., et al. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death, *J. Cell. Biol.*, **171**, 603-614, doi: 10.1083/jcb.200507002.
31. Guan, Y., Wang, Y., Li, B., Shen, K., Li, Q., et al. (2021) Mitophagy in carcinogenesis, drug resistance and anticancer therapeutics, *Cancer Cell Int.*, **21**, 350, doi: 10.1186/s12935-021-02065-w.
32. Yang, Y., Li, T., Li, Z., Liu, N., Yan, Y., et al. (2020) Role of mitophagy in cardiovascular disease, *Aging dis.*, **11**, 419, doi: 10.14336/AD.2019.0518.
33. Jetto, C. T., Nambiar, A., and Manjithaya, R. (2022) Mitophagy and neurodegeneration: between the knowns and the unknowns, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 837337, doi: 10.3389/fcell.2022.837337.
34. Ma, X., McKeen, T., Zhang, J., and Ding, W.-X. (2020) Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases, *Cells*, **9**, 837, doi: 10.3390/cells9040837.
35. Ke, P.-Y. (2020) Mitophagy in the pathogenesis of liver diseases, *Cells*, **9**, 831, doi: 10.3390/cells9040831.
36. Liu, H., Dai, C., Fan, Y., Guo, B., Ren, K., Tangna Sun, T., and Wang W. (2017) From autophagy to mitophagy: the roles of P62 in neurodegenerative diseases, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **49**, 413-422, doi: 10.1007/s10863-017-9727-7.
37. Zheng, M., Bai, Y., Sun, X., Fu, R., Liu, L., et al. (2022) Resveratrol reestablishes mitochondrial quality control in myocardial ischemia/reperfusion injury through Sirt1/Sirt3-Mfn2-Parkin-PGC-1 α pathway, *Molecules*, **27**, 5545, doi: 10.3390/molecules27175545.
38. McLelland, G.-L., Goiran, T., Yi, W., Dorval, G., Chen, C. X., et al. (2018) Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy, *eLife*, **7**, e32866, doi: 10.7554/eLife.32866.
39. Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., and Bernatoniene, J. (2020) Flavonoids as anticancer agents, *Nutrients*, **12**, E457, doi: 10.3390/nu12020457.
40. Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., and Gaforio, J. J. (2019) Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies, *Antioxidants (Basel)*, **8**, E137, doi: 10.3390/antiox8050137.
41. Serra, D., Almeida, L. M., and Dinis, T. C. P. (2020) Polyphenols in the management of brain disorders: Modulation of the microbiota-gut-brain axis, *Adv. Food. Nutr. Res.*, **91**, 1-27, doi: 10.1016/bs.afnr.2019.08.001.
42. Shabbir, U., Rubab, M., Daliri, E. B.-M., Chelliah, R., Javed, A., et al. (2021) Curcumin, quercetin, catechins and metabolic diseases: the role of gut microbiota, *Nutrients*, **13**, 206, doi: 10.3390/nu13010206.

43. Benvenuto, M., Albonici, L., Focaccetti, C., Ciuffa, S., Fazi, S., et al. (2020) Polyphenol-mediated autophagy in cancer: evidence of *in vitro* and *in vivo* studies, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, E6635, doi: 10.3390/ijms21186635.
44. Deng, S., Shanmugam, M. K., Kumar, A. P., Yap, C. T., Sethi, G., et al. (2019) Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy, *Cancer*, **125**, 1228-1246, doi: 10.1002/cncr.31978.
45. García-Aguilar, A., Palomino, O., Benito, M., and Guillén, C. (2021) Dietary polyphenols in metabolic and neurodegenerative diseases: molecular targets in autophagy and biological effects, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 142, doi: 10.3390/antiox10020142.
46. Lewandowska, H., Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stepkowski, T. M., and Brzóska, K. (2016) The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development, *J. Nutr. Biochem.*, **32**, 1-19, doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.006.
47. Moosavi, M. A., Haghi, A., Rahmati, M., Taniguchi, H., Mocan, A., et al. (2018) Phytochemicals as potent modulators of autophagy for cancer therapy, *Cancer Lett.*, **424**, 46-69, doi: 10.1016/j.canlet.2018.02.030.
48. Pang, X., Zhang, X., Jiang, Y., Su, Q., Li, Q., et al. (2021) Autophagy: mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer, *Biomolecules*, **11**, 135, doi: 10.3390/biom11020135.
49. Patra, S., Pradhan, B., Nayak, R., Behera, C., Panda, K. C., et al. (2021) Apoptosis and autophagy modulating dietary phytochemicals in cancer therapeutics: Current evidences and future perspectives, *Phytother. Res.*, **35**, 4194-4214, doi: 10.1002/ptr.7082.
50. Zhao, Y., Hu, X., Zuo, X., and Wang, M. (2018) Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review, *Food Funct.*, **9**, 4548-4568, doi: 10.1039/C8FO00850G.
51. Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., and Tomás-Barberán, F. (2013) Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far, *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, **2013**, 270418, doi: 10.1155/2013/270418.
52. Sallam, I. E., Abdelwareth, A., Attia, H., Aziz, R. K., Homsy, M. N., von Bergen, M., and Farag, M. A. (2021) Effect of gut microbiota biotransformation on dietary tannins and human health implications, *Microorganisms*, **9**, 965, doi: 10.3390/microorganisms9050965.
53. Beltrán, D., Romo-Vaquero, M., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., and Selma, M. V. (2018) *Ellagibacter isourolithinifaciens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Eggerthellaceae, isolated from human gut, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **68**, 1707-1712, doi: 10.1099/ijsem.0.002735.
54. Selma, M. V., Beltrán, D., García-Villalba, R., Espín, J. C., and Tomás-Barberán, F. A. (2014) Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species, *Food Funct.*, **5**, 1779-1784, doi: 10.1039/C4FO00092G.
55. Tomás-Barberán, F. A., García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Selma, M. V., and Espín, J. C. (2014) Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status, *J. Agric. Food. Chem.*, **62**, 6535-6538, doi: 10.1021/jf5024615.
56. Ráfii, F. (2015) The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol, *Metabolites*, **5**, 56-73, doi: 10.3390/metabo5010056.
57. Stevens, J. F., and Maier, C. S. (2016) The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols, *Phytochem. Rev.*, **15**, 425-444, doi: 10.1007/s11101-016-9459-z.
58. Kurtz, C. C., Otis, J. P., Regan, M. D., and Carey, H. V. (2021) How the gut and liver hibernate, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **253**, 110875, doi: 10.1016/j.cbpa.2020.110875.
59. Martens, E. C., Chiang, H. C., and Gordon, J. I. (2008) Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont, *Cell Host Microbe*, **4**, 447-457, doi: 10.1016/j.chom.2008.09.007.
60. Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C.-H., Westover, B. P., et al. (2005) Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont, *Science*, **307**, 1955-1959, doi: 10.1126/science.1109051.
61. Bergman, E. N. (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species, *Physiol. Rev.*, **70**, 567-590, doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.567.
62. Iannucci, L. F., Sun, J., Singh, B. K., Zhou, J., Kaddai, V. A., Lanni, A., Yen, P. M., and Sinha, R. A. (2016) Short chain fatty acids induce UCP2-mediated autophagy in hepatic cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **480**, 461-467, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.072.
63. Russo, M., and Russo, G. L. (2018) Autophagy inducers in cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **153**, 51-61, doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.007.
64. Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., and Ghidoni, R. (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells, *Cell Death Differ.*, **15**, 1318-1329, doi: 10.1038/cdd.2008.51.
65. Cai, H., Scott, E., Kholghi, A., Andreadi, C., Rufini, A., et al. (2015) Cancer chemoprevention: evidence of a non-linear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice, *Sci. Transl. Med.*, **7**, 298ra117, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7619.

66. Ferraresi, A., Titone, R., Follo, C., Castiglioni, A., Chiorino, G., et al. (2017) The protein restriction mimetic Resveratrol is an autophagy inducer stronger than amino acid starvation in ovarian cancer cells, *Mol. Carcinog.*, **56**, 2681-2691, doi: 10.1002/mc.22711.
67. Tang, Q., Li, G., Wei, X., Zhang, J., Chiu, J.-F., et al. (2013) Resveratrol-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer. Lett.*, **336**, 325-337, doi: 10.1016/j.canlet.2013.03.023.
68. Fukuda, T., Oda, K., Wada-Hiraike, O., Sone, K., Inaba, K., et al. (2016) Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells, *Oncol. Lett.*, **12**, 2560-2566, doi: 10.3892/ol.2016.4978.
69. Wang, J., Li, J., Cao, N., Li, Z., Han, J., et al. (2018) Resveratrol, an activator of SIRT1, induces protective autophagy in non-small-cell lung cancer via inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK, *Onco Targets Ther.*, **11**, 7777-7786, doi: 10.2147/OTT.S159095.
70. Bode, L. M., Bunzel, D., Huch, M., Cho, G.-S., Ruhland, D., et al. (2013) *In vivo* and *in vitro* metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota, *Am. J. Clin. Nutr.*, **97**, 295-309, doi: 10.3945/ajcn.112.049379.
71. Jarosova, V., Vesely, O., Marsik, P., Jaimes, J. D., Smejkal, K., et al. (2019) Metabolism of stilbenoids by human faecal microbiota, *Molecules*, **24**, E1155, doi: 10.3390/molecules24061155.
72. Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., et al. (2020) Bioactivity of dietary polyphenols: the role of metabolites, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **60**, 626-659, doi: 10.1080/10408398.2018.1546669.
73. Kasi, P. D., Tamilselvam, R., Skalicka-Woźniak, K., Nabavi, S. F., Daglia, M., et al. (2016) Molecular targets of curcumin for cancer therapy: an updated review, *Tumour Biol.*, **37**, 13017-13028, doi: 10.1007/s13277-016-5183-y.
74. Fu, H., Wang, C., Yang, D., Wei, Z., Xu, J., et al. (2018) Curcumin regulates proliferation, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cells by affecting PI3K and P53 signaling, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 4634-4642, doi: 10.1002/jcp.26190.
75. Yang, C., Ma, X., Wang, Z., Zeng, X., Hu, Z., et al. (2017) Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation, *Drug Des. Devel. Ther.*, **11**, 431-439, doi: 10.2147/DDDT.S126964.
76. Xu, Y., Wu, Y., Wang, L., Qian, C., Wang, Q., et al. (2020) Identification of curcumin as a novel natural inhibitor of rDNA transcription, *Cell Cycle*, **19**, 3362-3374, doi: 10.1080/15384101.2020.1843817.
77. Xiao, K., Jiang, J., Guan, C., Dong, C., Wang, G., et al. (2013) Curcumin induces autophagy via activating the AMPK signaling pathway in lung adenocarcinoma cells, *J. Pharmacol. Sci.*, **123**, 102-109, doi: 10.1254/jphs.13085FP.
78. Bi, Y., Shen, C., Li, C., Liu, Y., Gao, D., et al. (2016) Inhibition of autophagy induced by quercetin at a late stage enhances cytotoxic effects on glioma cells, *Tumour Biol.*, **37**, 3549-3560, doi: 10.1007/s13277-015-4125-4.
79. Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., and Michel, M. C. (2014) The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer, *Pharmacol. Rev.*, **66**, 222-307, doi: 10.1124/pr.110.004044.
80. Jabczyk, M., Nowak, J., Hudzik, B., and Zubelewicz-Szkodzińska, B. (2021) Curcumin and its potential impact on microbiota, *Nutrients*, **13**, 2004, doi: 10.3390/nu13062004.
81. Scazzocchio, B., Minghetti, L., and D'Archivio, M. (2020) Interaction between gut microbiota and curcumin: a new key of understanding for the health effects of curcumin, *Nutrients*, **12**, 2499, doi: 10.3390/nu12092499.
82. Shen, L., and Ji, H.-F. (2019) Bidirectional interactions between dietary curcumin and gut microbiota, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **59**, 2896-2902, doi: 10.1080/10408398.2018.1478388.
83. Zam, W. (2018) Gut microbiota as a prospective therapeutic target for curcumin: a review of mutual influence, *J. Nutr. Metab.*, **2018**, 1367984, doi: 10.1155/2018/1367984.
84. Song, G., Lu, H., Chen, F., Wang, Y., Fan, W., et al. (2018) Tetrahydrocurcumin-induced autophagy via suppression of PI3K/Akt/mTOR in nonsmall cell lung carcinoma cells, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 5964-5969, doi: 10.3892/mmr.2018.8600.
85. Wu, J.-C., Lai, C.-S., Badmaev, V., Nagabhushanam, K., Ho, C.-T., et al. (2011) Tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin, induced autophagic cell death through coordinative modulation of PI3K/Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in human leukemia HL-60 cells, *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 1646-1654, doi: 10.1002/mnfr.201100454.
86. Russo, M., Milito, A., Spagnuolo, C., Carbone, V., Rosén, A., et al. (2017) CK2 and PI3K are direct molecular targets of quercetin in chronic lymphocytic leukaemia, *Oncotarget*, **8**, 42571-42587, doi: 10.18632/oncotarget.17246.
87. Wang, K., Liu, R., Li, J., Mao, J., Lei, Y., et al. (2011) Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 α -mediated signaling, *Autophagy*, **7**, 966-978, doi: 10.4161/auto.7.9.15863.
88. Moon, J.-H., Eo, S. K., Lee, J. H., and Park, S.-Y. (2015) Quercetin-induced autophagy flux enhances TRAIL-mediated tumor cell death, *Oncol. Rep.*, **34**, 375-381, doi: 10.3892/or.2015.3991.
89. Guo, H., Ding, H., Tang, X., Liang, M., Li, S., et al. (2021) Quercetin induces pro-apoptotic autophagy via SIRT1/AMPK signaling pathway in human lung cancer cell lines A549 and H1299 *in vitro*, *Thoracic. Cancer*, **12**, 1415-1422, doi: 10.1111/1759-7714.13925.
90. Wu, Q., Tian, A.-L., Durand, S., Aprahamian, F., Nirmalathasan, N., et al. (2020) Isobacacalcone induces autophagy and improves the outcome of immunogenic chemotherapy, *Cell Death Dis.*, **11**, 1015, doi: 10.1038/s41419-020-03226-x.

91. Xu, P., Chen, Q., Chen, X., Qi, H., Yang, Y., et al. (2023) Morusin and mulberrin extend the lifespans of yeast and *C. elegans* via suppressing nutrient-sensing pathways, *GeroScience*, **45**, 949-964, doi: 10.1007/s11357-022-00693-2.
92. Zhou, X., Yue, G. G.-L., Chan, A. M.-L., Tsui, S. K.-W., Fung, K.-P., et al. (2017) Eriocalyxin B, a novel autophagy inducer, exerts anti-tumor activity through the suppression of Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in breast cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **142**, 58-70, doi: 10.1016/j.bcp.2017.06.133.
93. Sun, J., Feng, Y., Wang, Y., Ji, Q., Cai, G., et al. (2019) α -Hederin induces autophagic cell death in colorectal cancer cells through reactive oxygen species dependent AMPK/mTOR signaling pathway activation, *Int. J. Oncol.*, **54**, 1601-1612, doi: 10.3892/ijo.2019.4757.
94. Shin, S., Jing, K., Jeong, S., Kim, N., Song, K.-S., et al. (2013) The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 568671, doi: 10.1155/2013/568671.
95. Prajapat, S. K., Subramani, C., Sharma, P., Vrati, S., and Kalia, M. (2022) Avobenzone, Guaiiazulene and Tioxolone identified as potent autophagy inducers in a high-throughput image based screen for autophagy flux, *Autophagy Rep.*, **1**, 523-536, doi: 10.1080/27694127.2022.2132075.
96. Ortiz, M. I., Fernández-Martínez, E., Soria-Jasso, L. E., Lucas-Gómez, I., Villagómez-Ibarra, R., et al. (2016) Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats, *Biomed. Pharmacother.*, **78**, 248-256, doi: 10.1016/j.biopha.2016.01.029.
97. Ye, Q., Zhou, L., Jin, P., Li, L., Zheng, S., et al. (2021) Guaiiazulene triggers ROS-induced apoptosis and protective autophagy in non-small cell lung cancer, *Front. Pharmacol.*, **12**, 621181, doi: 10.3389/fphar.2021.621181.
98. Reinke, A., Chen, J. C.-Y., Aronova, S., and Powers, T. (2006) Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p, *J. Biol. Chem.*, **281**, 31616-31626, doi: 10.1074/jbc.M603107200.
99. Saiki, S., Sasazawa, Y., Imamichi, Y., Kawajiri, S., Fujimaki, T., et al. (2011) Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition, *Autophagy*, **7**, 176-187, doi: 10.4161/auto.7.2.14074.
100. Wanke, V., Camerini, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., et al. (2008) Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1, *Mol. Microbiol.*, **69**, 277-285, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06292.x.
101. Sinha, R. A., Farah, B. L., Singh, B. K., Siddique, M. M., Li, Y., et al. (2014) Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice, *Hepatology*, **59**, 1366-1380, doi: 10.1002/hep.26667.
102. Moon, J.-H., Lee, J.-H., Park, J.-Y., Kim, S.-W., Lee, Y.-J., et al. (2014) Caffeine prevents human prion protein-mediated neurotoxicity through the induction of autophagy, *Int. J. Mol. Med.*, **34**, 553-558, doi: 10.3892/ijmm.2014.1814.
103. Pietrocola, F., Malik, S. A., Mariño, G., Vacchelli, E., Senovilla, L., et al. (2014) Coffee induces autophagy *in vivo*, *Cell Cycle*, **13**, 1987-1994, doi: 10.4161/cc.28929.
104. Freedman, N. D., Park, Y., Abnet, C. C., Hollenbeck, A. R., and Sinha, R. (2012) Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality, *N. Engl. J. Med.*, **366**, 1891-1904, doi: 10.1056/NEJMoa1112010.
105. Sun, C., Zhang, J., Hou, J., Hui, M., Qi, H., et al. (2023) Induction of autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by Pueraria flavonoids improves non-alcoholic fatty liver disease in obese mice, *Biomed. Pharmacother.*, **157**, 114005, doi: 10.1016/j.biopha.2022.114005.
106. Kang, A.-W., Sun, C., Li, H.-T., Zhong, K., Zeng, X.-H., et al. (2023) Puerarin extends the lifespan of *Drosophila melanogaster* by activating autophagy, *Food Funct.*, **14**, 2149-2161, doi: 10.1039/D2FO02800J.
107. Wu, Q., Tian, A.-L., Li, B., Leduc, M., Forveille, S., et al. (2021) IGF1 receptor inhibition amplifies the effects of cancer drugs by autophagy and immune-dependent mechanisms, *J. Immunother. Cancer*, **9**, e002722, doi: 10.1136/jitc-2021-002722.
108. Honma, Y., Sato-Morita, M., Katsuki, Y., Mihara, H., Baba, R., et al. (2018) Trehalose activates autophagy and decreases proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress-mediated cytotoxicity in hepatocytes, *Hepatol. Res.*, **48**, 94-105, doi: 10.1111/hepr.12892.
109. Meier, J. L., and Grose, C. (2017) Variable effects of autophagy induction by trehalose on herpesviruses depending on conditions of infection, *Yale J. Biol. Med.*, **90**, 25-33.
110. Chen, X., Li, M., Li, L., Xu, S., Huang, D., et al. (2016) Trehalose, sucrose and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway, *Sci. Rep.*, **6**, 28423, doi: 10.1038/srep28423.
111. He, Q., Koprach, J. B., Wang, Y., Yu, W., Xiao, B., et al. (2016) Treatment with trehalose prevents behavioral and neurochemical deficits produced in an AAV α -synuclein rat model of Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 2258-2268, doi: 10.1007/s12035-015-9173-7.
112. Krüger, U., Wang, Y., Kumar, S., and Mandelkow, E.-M. (2012) Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose, *Neurobiol. Aging*, **33**, 2291-2305, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.009.
113. Aguib, Y., Heiseke, A., Gilch, S., Riemer, C., Baier, M., et al. (2009) Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection, *Autophagy*, **5**, 361-369, doi: 10.4161/auto.5.3.7662.

114. Wada, S., Kubota, Y., Sawa, R., Umekita, M., Hatano, M., et al. (2015) Novel autophagy inducers lentztrehaloses A, B and C, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **68**, 521-529, doi: 10.1038/ja.2015.23.
115. Campbell, G. R., and Spector, S. A. (2011) Hormonally active vitamin D3 (1 α ,25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection, *J. Biol. Chem.*, **286**, 18890-18902, doi: 10.1074/jbc.M110.206110.
116. Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, I. S., Elling, F., and Jäättelä, M. (2005) Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin-1 mediated autophagic cell death, *Cell Death Differ.*, **12**, 1297-1309, doi: 10.1038/sj.cdd.4401651.
117. Høyer-Hansen, M., Nordbrandt, S. P. S., and Jäättelä, M. (2010) Autophagy as a basis for the health-promoting effects of vitamin D, *Trends Mol. Med.*, **16**, 295-302, doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.005.
118. Lee, Y., Kwon, J., Jeong, J. H., Ryu, J.-H., and Kim, K. I. (2022) Kazinol C from *Broussonetia kazinoki* stimulates autophagy via endoplasmic reticulum stress-mediated signaling, *Anim. Cells Syst.*, **26**, 28-36, doi: 10.1080/19768354.2021.2023628.
119. Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008) SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1, *J. Biol. Chem.*, **283**, 27628-27635, doi: 10.1074/jbc.M805711200.
120. DiNicolantonio, J. J., McCarty, M. F., Assanga, S. I., Lujan, L. L., and O'Keefe, J. H. (2022) Ferulic acid and berberine, via Sirt1 and AMPK, may act as cell cleansing promoters of healthy longevity, *Open Heart*, **9**, e001801, doi: 10.1136/openhrt-2021-001801.
121. Guo, P., Wang, P., Liu, L., Wang, P., Lin, G., et al. (2023) Naringin alleviates glucose-induced aging by reducing fat accumulation and promoting autophagy in *Caenorhabditis elegans*, *Nutrients*, **15**, 907, doi: 10.3390/nu15040907.
122. Salama, A. A. A., Yassen, N. N., and Mansour, H. M. (2023) Naringin protects mice from D-galactose-induced lung aging and mitochondrial dysfunction: implication of SIRT1 pathways, *Life Sci.*, **324**, 121471, doi: 10.1016/j.lfs.2023.121471.
123. Kepp, O., Chen, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., and Kroemer, G. (2020) A discovery platform for the identification of caloric restriction mimetics with broad health-improving effects, *Autophagy*, **16**, 188-189, doi: 10.1080/15548627.2019.1688984.
124. Liu, M., Li, N., Lu, X., Shan, S., Gao, X., et al. (2022) Sweet tea (*Rubus Suavissimus* S. Lee) polysaccharides promote the longevity of *Caenorhabditis elegans* through autophagy-dependent insulin and mitochondrial pathways, *Int. J. Biol. Macromol.*, **207**, 883-892, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.138.
125. Espín, J. C., González-Sarriás, A., and Tomás-Barberán, F. A. (2017) The gut microbiota: a key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols, *Biochem. Pharmacol.*, **139**, 82-93, doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.033.
126. Palikaras, K., Daskalaki, I., Markaki, M., and Tavernarakis, N. (2017) Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover, *Pharmacol. Ther.*, **178**, 157-174, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.04.005.
127. Heilman, J., Andreux, P., Tran, N., Rinsch, C., and Blanco-Bose, W. (2017) Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid, *Food Chem. Toxicol.*, **108**, 289-297, doi: 10.1016/j.fct.2017.07.050.
128. Singh, A., Andreux, P., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Aebischer, P., et al. (2017) Orally administered urolithin a is safe and modulates muscle and mitochondrial biomarkers in elderly, *Innov. Aging*, **1**, 1223-1224, doi: 10.1093/geronl/igx004.4446.
129. Muñoz-Esparza, N. C., Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Toro-Funes, N., Veciana-Nogués, M. T., et al. (2019) Polyamines in food, *Front. Nutr.*, **6**, 108, doi: 10.3389/fnut.2019.00108.
130. Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., et al. (2016) Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine, *Nat. Med.*, **22**, 1428-1438, doi: 10.1038/nm.4222.
131. Schroeder, S., Hofer, S. J., Zimmermann, A., Pechlaner, R., Dammbrueck, C., et al. (2021) Dietary spermidine improves cognitive function, *Cell Rep.*, **35**, 108985, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108985.
132. Schwarz, C., Stekovic, S., Wirth, M., Benson, G., Royer, P., et al. (2018) Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline, *Aging*, **10**, 19-33, doi: 10.18632/aging.101354.
133. Pietrocola, F., Lachkar, S., Enot, D. P., Niso-Santano, M., Bravo-San Pedro, J. M., et al. (2015) Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300, *Cell Death Differ.*, **22**, 509-516, doi: 10.1038/cdd.2014.215.
134. Yuan, X., Tian, G. G., Pei, X., Hu, X., and Wu, J. (2021) Spermidine induces cytoprotective autophagy of female germline stem cells in vitro and ameliorates aging caused by oxidative stress through upregulated sequestosome-1/p62 expression, *Cell Biosci.*, **11**, 107, doi: 10.1186/s13578-021-00614-4.
135. Baek, A. R., Hong, J., Song, K. S., Jang, A. S., Kim, D. J., et al. (2020) Spermidine attenuates bleomycin-induced lung fibrosis by inducing autophagy and inhibiting endoplasmic reticulum stress (ERS)-induced cell death in mice, *Exp. Mol. Med.*, **52**, 2034-2045, doi: 10.1038/s12276-020-00545-z.
136. Messerer, J., Wrede, C., Schipke, J., Brandenberger, C., Abdellatif, M., et al. (2023) Spermidine supplementation influences mitochondrial number and morphology in the heart of aged mice, *J. Anat.*, **242**, 91-101, doi: 10.1111/joa.13618.

137. Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K., and Willems, M. I. (1997) Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats, *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 337-348, doi: 10.1016/S0278-6915(97)00121-X.
138. Srivastava, V., Zelmanovich, V., Shukla, V., Abergel, R., Cohen, I., et al. (2023) Distinct designer diamines promote mitophagy, and thereby enhance healthspan in *C. elegans* and protect human cells against oxidative damage, *Autophagy*, **19**, 474-504, doi: 10.1080/15548627.2022.2078069.
139. Hawrysh, P. J., Gao, J., Tan, S., Oh, A., Nodwell, J., et al. (2023) PRKN/parkin-mediated mitophagy is induced by the probiotics *Saccharomyces boulardii* and *Lactococcus lactis*, *Autophagy*, **19**, 2094-2110, doi: 10.1080/15548627.2023.2172873.
140. Fedotova, E. I., Dolgacheva, L. P., Abramov, A. Y., and Berezhnov, A. V. (2022) Lactate and pyruvate activate autophagy and mitophagy that protect cells in toxic model of Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 177-190, doi: 10.1007/s12035-021-02583-8.
141. Xu, C., Wu, Y., Tang, L., Liang, Y., and Zhao, Y. (2023) Protective effect of cistanoside A on dopaminergic neurons in Parkinson's disease via mitophagy, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **70**, 268-280, doi: 10.1002/bab.2350.
142. Kang, H. T., and Hwang, E. S. (2009) Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells, *Aging Cell*, **8**, 426-438, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00487.x.
143. Zhang, L., Zhang, X., Zhang, T., Guo, Y., Pei, W., et al. (2023) Linolenic acid ameliorates sarcopenia in *C. elegans* by promoting mitophagy and fighting oxidative stress, *Food Funct.*, **14**, 1498-1509, doi: 10.1039/D2FO02974J.
144. Li, S., Liu, M., Chen, J., Chen, Y., Yin, M., et al. (2023) L-carnitine alleviates cardiac microvascular dysfunction in diabetic cardiomyopathy by enhancing PINK1-Parkin -dependent mitophagy through the CPT1a-PHB2-PARL pathways, *Acta Physiol.*, **238**, e13975, doi: 10.1111/apha.13975.
145. D'Amico, D., Olmer, M., Fouassier, A. M., Valdés, P., Andreux, P. A., et al. (2022) Urolithin A improves mitochondrial health, reduces cartilage degeneration, and alleviates pain in osteoarthritis, *Aging Cell*, **21**, e13662, doi: 10.1111/ace1.13662.
146. Singh, A., D'Amico, D., Andreux, P. A., Dunngalvin, G., Kern, T., et al. (2022) Direct supplementation with Urolithin A overcomes limitations of dietary exposure and gut microbiome variability in healthy adults to achieve consistent levels across the population, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **76**, 297-308, doi: 10.1038/s41430-021-00950-1.

NATURAL ACTIVATORS OF AUTOPHAGY

Review

J. A. Pavlova^{1,2,3}, E. A. Guseva^{1,2,3#}, O. A. Dontsova^{1,2,3,4}, and P. V. Sergiev^{1,2,3,5*}**

¹ Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology,
143025 Skolkovo, Russia; e-mail: petya@genebee.msu.ru; julidev@yandex.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia

³ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁵ Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Autophagy is the process by which cell contents, such as aggregated proteins, dysfunctional organelles, and cell structures, are sequestered by the autophagosome and delivered to lysosomes for degradation. As a process that allows the cell to get rid of non-functional components that tend to accumulate with age, autophagy has been associated with many human diseases. In this regard, the search for autophagy activators and the study of their mechanism of action is an important task for the treatment of many diseases, as well as for increasing healthy life expectancy. Plants are rich sources of autophagy activators, containing a large amount of polyphenolic compounds in their composition, which can be activators in their original form, or can be metabolized by the intestinal microbiota to active compounds. This review is devoted to plant-based autophagy activators with an emphasis on the sources of their production, mechanism of action, and application in various diseases. The review also describes companies commercializing natural autophagy activators.

Keywords: autophagy activators, mitophagy, lipophagy, mTOR, urolithin A, resveratrol, spermidine, curcumin

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АКТИВАТОРЫ АУТОФАГИИ

Обзор

© 2024 Е.А. Гусева^{1,2,3**}, Ю.А. Павлова^{1,2,3#}, О.А. Донцова^{1,2,3,4}, П.В. Сергиев^{1,2,3,5*}

¹ Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий,
143025 Сколково, Россия; электронная почта: petya@genebee.msu.ru; eguseva98@mail.ru

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Институт функциональной геномики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.10.2023

После доработки 24.11.2023

Принята к публикации 26.11.2023

Аутофагия является центральным процессом для деградации внутриклеточных компонентов, работающих с нарушениями. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, крайне сложны для изучения, так как в них задействовано большое число участников. Основная задача аутофагии – это перераспределение клеточных ресурсов в ответ на изменение окружающей среды, например голодание. Исследования последних лет показывают, что регуляция аутофагии может стать ключом к достижению здорового долголетия, а также позволит создать терапевтические средства для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Паркинсона и Альцгеймера. В связи с этим разработка активаторов аутофагии с детально описанным механизмом действия является важнейшим направлением для исследований. Ряд коммерческих компаний на данный момент находится на разных этапах разработки таких молекул, а некоторые уже используют активаторы аутофагии на практике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активаторы аутофагии, митофагия, mTOR, торин 1, FCCP.

DOI: 10.31857/S0320972524010027 **EDN:** YRTMUL

ВВЕДЕНИЕ

Разработка активаторов аутофагии является перспективным направлением для исследований, так как такие соединения могут найти свое применение в лечении нейродегенеративных заболеваний [1], рака [2, 3], инфекций [4], аутоиммунных заболеваний [5], сердечно-сосудистых заболеваний [6] и т.д. Одним из подвидов аутофагии является митофагия, сбалансированная работа которой крайне важна. Ее нарушение приводит к развитию раковых, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний [7]. На грызунах было показано, что активация процессов митофагии и аутофагии

с помощью фармакологических препаратов позволяет улучшить состояние животных с моделями инфаркта миокарда, различных типов кардиомиопатий и атеросклероза [8]. Этот факт особенно важен, так как до сих пор сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующую позицию по числу смертей не только в России, но и по всему миру [9].

В обзоре, посвященном растительным активаторам аутофагии [10], описаны основные механизмы активации аутофагии, природные источники растительных активаторов аутофагии, а также механизм их действия. Данный обзор будет посвящен синтетическим активаторам аутофагии, многие из которых рассматриваются как перспективные агенты для лечения различных заболеваний.

Стоит отметить, что многие известные в клинической практике лекарства или природные

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

соединения, являющиеся активаторами аутофагии, обладают низкой специфичностью и высокой плеiotропностью действия (т.е. действуют на разнообразные системы организма), что при определенных режимах дозирования может обуславливать развитие побочных эффектов, не связанных с аутофагией [11], и осложнять идентификацию механизма действия этих веществ на молекулярном уровне [12]. Поэтому, помимо перепрофилирования уже известных препаратов, огромное внимание уделяется направленной разработке новых высокоселективных активаторов аутофагии с благоприятным соотношением пользы к потенциальному риску, а также решению проблем, связанных с транслированием данных, полученных в результате доклинических испытаний этих препаратов, на клинические исследования и определением клинических конечных точек, специфических для аутофагии [13, 14].

Более того, в данном обзоре приведена информация об одобренных управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) синтетических соединениях-активаторах аутофагии и митофагии, которые в настоящее время уже нашли применение при различных показаниях для здоровья. Также в обзоре кратко резюмирована актуальная на сегодняшний день информация о биотехнологических компаниях, занимающихся продвижением исследований в области аутофагии с целью увеличения продолжительности здоровой жизни человека или борьбы с различными заболеваниями, такими как нейродегенерация, рак и др.

ОДОБРЕННЫЕ К ПРИМЕНЕНИЮ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ ПРЕПАРАТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АУТОФАГИЮ

На данный момент нет препаратов, которые были бы разработаны и одобрены FDA в первую очередь как индукторы аутофагии и митофагии. Однако при скрининге библиотек химических веществ нередко удается обнаружить препараты, первоначально одобренные FDA для терапии, например рака, диабета или нейродегенеративных заболеваний, которые проявляют свойства активаторов аутофагии. Такой подход к поиску новых

активаторов аутофагии в ряде случаев позволил обнаружить новые механизмы активации аутофагии. Помимо этого, к плюсам таких скринингов можно отнести то, что для этих молекул, как правило, уже проведены все необходимые доклинические и клинические испытания, что существенно сокращает время до расширения показаний к их применению в качестве активаторов аутофагии.

Препараты-активаторы аутофагии. mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) является ключевым регулятором аутофагии в клетке, и, в целом, все пути активации данного процесса можно разделить на mTOR-зависимые и mTOR-независимые. Начнем рассмотрение группы препаратов, одобренных для лечения человека и вызывающих аутофагию, с соединений, механизм действия которых зависит от mTOR.

В качестве первой мишени для активаторов аутофагии из этой группы рассмотрим AMP-активируемую протеинкиназу (AMPK), которая участвует в регуляции активности mTOR. Примером соединения, активирующего AMPK, может служить известный препарат метформин (рис. 1). Данное соединение является побочным продуктом при синтезе N,N-диметилгуанидина [15] и было одобрено FDA в 1998 г. для терапии сахарного диабета 2-го типа. Хотя конкретный механизм активации аутофагии посредством метформина пока не до конца выяснен, считается, что он активирует AMPK; в свою очередь, это переключает клетку из анаболического состояния в катаболическое и запускает аутофагию через mTOR-, ULK1- и p53-зависимые сигнальные пути [16–18]. Исследования показывают, что метформин активирует аутофагию в опухолевых клетках рака эндометрия и меланомы [19, 20] и предотвращает развитие кардиомиопатии в мышцах линии OVE26 с трансген-индуцированным диабетом [5].

Большое количество активаторов аутофагии было обнаружено в ходе скринингов различных библиотек веществ, одобренных FDA к использованию на людях. Как правило, основной целью таких проектов является выявление противоопухолевой активности, однако при более детальном изучении механизма в некоторых случаях удается выявить вещества, активирующие зависимый от аутофагии апоптоз. Так, например, для известного лекарства рибавирин, который был ранее

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; 3-MA – 3-метиладенин; Akt – RAC-α серин/треонин протеинкиназа; AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; BECN1 – беклин-1; FCCP – карбонилцианид р-(трифторметокси) фенилгидразона; FDA – управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств; LC3 – ассоциированный с микротрубочками белок легкой цепи 3; MPTP – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; mTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих комплекс 1; p62/SQSTM1 – секвестосома 1; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PIK3C3 – каталитическая субъединица фосфатидилинозитол-3-киназы 3 типа; PINK1 – PTEN-индуцируемая протеинкиназа 1; PPAR – рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом; SIRT1 – сиртуин 1; TFEB – транскрипционный фактор EB; ULK1 – unc-51-подобная активирующая аутофагию киназа.

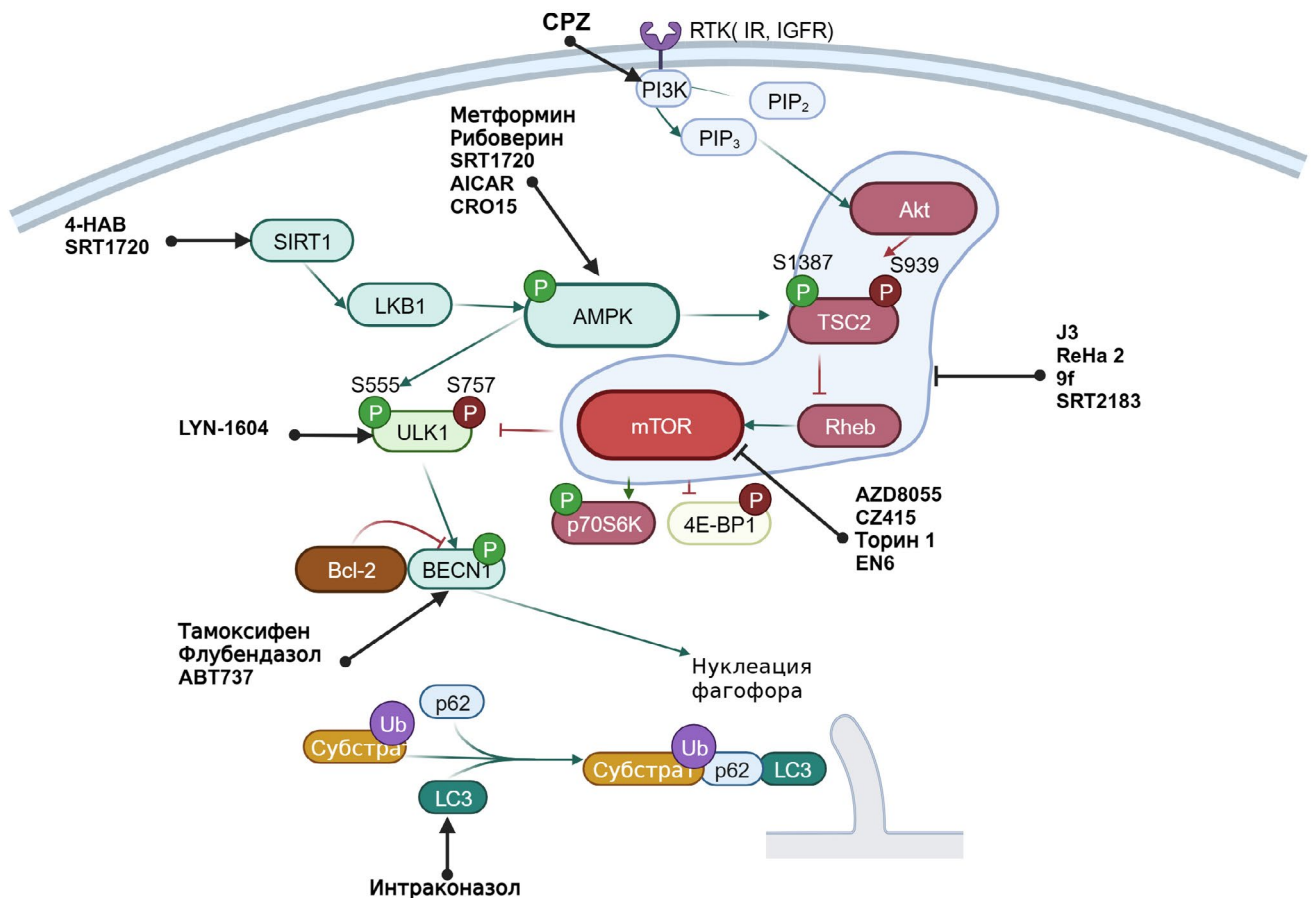


Рис. 1. Механизм действия синтетических веществ, активирующих аутофагию по mTOR-зависимому и mTOR-независимому путям. Ub – убиквитинирование, P – фосфорилирование (красным показано ингибирующее фосфорилирование, зеленым – активирующее), черные стрелки указывают на мишени действия активаторов аутофагии; в каскаде активации аутофагии зелеными стрелками показано активирующее действие белков, красными – подавляющее

зарегистрирован в качестве препарата широкого спектра против ДНК- и РНК-вирусов, недавно была показана противоопухолевая активность. При более детальном изучении механизма его действия удалось показать, что обработка рибавирином приводит к активации AMPK и ингибированию mTOR. Более того, известно, что рибавирин активирует AMPK за счет снижения уровней аденозинтрифосфата (АТФ) и лизосомального комплекса v-АТРаза–Regulator–AXIN. Интересно, что обработка рибавирином также приводит к увеличению продолжительности жизни и замедлению ухудшения здоровья с возрастом у *Caenorhabditis elegans*. Таким образом, рибавирин рассматривается как потенциальное средство против старения [21].

Аналогично противоопухолевая активность была обнаружена у препарата хлорпромазин (CPZ). Данное вещество является производным фенотиазина и было одобрено FDA для лечения шизофрении и других психических расстройств. CPZ индуцировал апоптоз у клеток рака ротовой полости, а также активировал аутофагию по пути

PI3K/Akt/mTOR/p70S6K (киназа $\beta 1$ рибосомального белка S6) и повышал экспрессию связанных с аутофагией генов. При совместной инкубации клеток с CPZ и ингибитором фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), 3-метиладенина (3-MA), аутофагия не наблюдалась, что позволяет считать, что именно этот клеточный процесс способствовал CPZ-индуцированному апоптозу [22].

Селинексор – препарат, одобренный FDA в качестве селективного ингибитора протоонкогена XPO1. Для данного соединения описаны свойства ингибирования пролиферации клеток, запуска аутофагии и активации апоптоза за счет снижения потенциала на мембране митохондрий. Показано, что селинексор способствует накоплению p53 в ядре и активирует путь p53/mTOR для регуляции апоптоза, ассоциированного с аутофагией [23].

Однако активация процессов аутофагии характерна не только для препаратов, для которых была выявлена противоопухолевая активность. При скрининге веществ, способных снижать цитотоксичность макрофагов при микобактериальной инфекции, был отобран антидепрессант амоксапин.

Постинфекционное лечение амоксапином приводило к ингибированию mTOR, что способствовало индукции аутофагии. При ингибировании аутофагии с помощью 3-МА действие амоксапина на микобактерии в клетках-хозяевах существенно снижалось. Показано, что амоксапин также проявляет активность против *Mycobacterium tuberculosis* на мышцах [24].

Также интересный механизм активации mTOR-зависимой аутофагии описан для флубендазола, одобренного FDA антигельминтного препарата. Это соединение вызывает деполимеризацию динамических микротрубочек, что приводит к ингибированию mTOR и его диссоциации с поверхности лизосом. В результате этого транскрипционный фактор EB (TFEB) транслируется в ядро, где он повышает экспрессию генов, ассоциированных с аутофагией, что, в свою очередь, приводит к активации аутофагии [25]. Помимо этого, флубендазол активирует JNK1, что приводит к фосфорилированию Bcl-2, вызывая высвобождение беклина-1 (BECN1) из комплексов Bcl-2–BECN1, и также способствует активации аутофагии [26].

Помимо веществ, запускающих аутофагию по mTOR-зависимому пути, известны также низкомолекулярные вещества, способствующие индукции аутофагии на уровне регуляции транскрипции. Например, считается, что тамоксифен увеличивает уровень аутофагии за счет увеличения экспрессии BECN1, что было показано на клеточной линии MCF7. Однако на линии клеток U87MG изменений в экспрессии BECN1 не обнаружено. Таким образом, действие тамоксифена отличается в зависимости от типа клеток. Согласно другим данным, его действие обусловлено блокировкой биосинтеза холестерина [27]. Предполагается, что активация аутофагии под действием тамоксифена может лежать в основе резистентности рака к этому препарату [28].

С помощью увеличения экспрессии генов *LC3* (кодирует ассоциированный с микротрубочками белок легкой цепи 3) и *p62* активацию аутофагии вызывает итраконазол. Данное соединение используется в качестве противогрибкового препарата, однако также вызывает аутофагическую гибель клеток при раке молочной железы. При исследовании влияния итраконазола на клетки рака толстой кишки удалось показать, что механизм индукции апоптоза итраконазолом может быть связан с аутофагией [29].

Следующая большая группа активаторов аутофагии – это вещества, действующие на ионные каналы: блокаторы кальциевых каналов (верапамил, пимозид, амиодарон и т.д.); противоэпилептические препараты (карбамазепин, вальпроевая кислота, соли лития); активаторы имидазолиновых рецепторов (клонидин и рилменидин) и т.д.

Более подробно с ними можно ознакомиться в обзоре Pierzypowska et al. [1]; мы же сосредоточимся на некоторых примерах.

Блокаторы кальциевых каналов быстро снижают внутриклеточную концентрацию кальция, таким образом, происходит инактивация кальпаинов, что приводит к формированию аутофагосом. Верапамил, синтетическое антиангинальное и антиаритмическое средство, восстанавливает аутофагический поток и подавляет образование белковых агрегатов/телец включения в клетках гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro* и *in vivo* [30]. Он также вызывает улучшение моторных функций в мышечной модели болезни Хантингтона [31], хотя при этом не показал значительного эффекта у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом [32].

Вальпроевая кислота, впервые синтезированная в 1882 г., применяется в клинической практике как противоэпилептическое средство. По одним данным, она, как и литий, на молекулярном уровне ингибирует активность мио-инозитол-1-фосфат синтазы (один из ключевых ферментов, вовлеченных в метаболизм инозитола), таким образом, вызывая снижение концентрации инозитола и внутриклеточного кальция, и, как следствие, активацию аутофагии [33]. Другие авторы утверждают, что вальпроевая кислота не оказывает эффекта на этот фермент, а действует иным образом – через образование активных форм кислорода (АФК) и активацию ERK1/2-сигнального пути, что и приводит к аутофагии в клетках глиомы [34]. Кроме этого, были исследования, подтверждающие, что вальпроат ингибирует деацетилазу гистонов (HDAC) и подавляет Akt/mTOR-путь в клетках рака простаты [35]. Однако было показано, что вальпроевая кислота, литий и карбамазепин могут приводить также к ингибированию киназы гликогенсинтазы 3β (GSK-3β), что вызывает подавление аутофагии. GSK-3β является положительным регулятором аутофагии, так как он ингибирует mTOR [36]. Поэтому при использовании этих соединений для активации аутофагии необходимо сочетать их, например, с ингибиторами mTOR. Стоит отметить, что противоэпилептические препараты имеют массу побочных эффектов со стороны ЦНС, пищеварительной системы, гемостаза, и их необходимо использовать только по назначению врача и с большой осторожностью.

Клонидин (клофелин), помимо связывания с центральными имидазолиновыми рецепторами, приводящими к значительному снижению системного артериального давления, также активирует калиевые каналы и снижает концентрацию кальция внутри клеток [37]. Было показано, что клонидин и его аналог, рилменидин, эффективны в животной модели лобно-височной деменции [38].

Также для некоторых препаратов были описаны свойства активаторов аутофагии, однако детали механизма остаются неизвестными. Таким примером может служить миконазол (производное имидазола), известный противогрибковый препарат, одобренный FDA в 1974 г. для лечения вагинального кандидоза. Сейчас это вещество рассматривается как потенциальное противоопухолевое средство: в ряде экспериментов оно ингибировало рост клеток глиобластомы за счет аутофагии, которая обусловлена стрессом эндоплазматического ретикулума, вызванным продукцией АФК [39].

Помимо этого, некоторые препараты, используемые в косметических средствах, таких как шампуни и солнцезащитные крема, проявляют свойства активаторов аутофагии, однако механизм их действия остается неизвестным. Так, недавно для соединений авобензол и тиоксолол было показано, что они вызывают аутофагию по mTOR-независимому пути [40]. Авобензон (бутилметоксибензоилметан) – синтетическое соединение-поглотитель ультрафиолета, широко используемый в солнцезащитных кремах. Исследования показали, что авобензон может эффективно проникать в роговой слой кожи и жизнеспособный эпидермис. Также было показано, что он ингибирует пролиферацию трофобластов человека, усиливает активность RAC-α серин/треонин протеинкиназы (Akt) и ERK1/2 и вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны [41]. Тиоксолол (6-гидрокси-2Н-1,3-бензоксатиол-2-он) используется в косметических продуктах, таких как шампуни для волос, очищающие средства для кожи и средства для лечения акне. Он обладает противогрибковым, антибактериальным, противовоспалительным и противоопухолевым действием и, как было показано, является ингибитором карбоангидразы II человека [40].

Последнее соединение, которое стоит отметить в этом разделе, – это макролид такролимус, который используется в качестве мягкого иммуносупрессора [42]. Было продемонстрировано на клеточных культурах и мышинных моделях, что данный препарат существенно снижает количество прионного белка в аномальной форме. При этом установлено, что данный эффект достигается за счет активации молекул, ассоциированных с аутофагией [43]. Таким образом, такролимус рассматривается в качестве потенциального препарата для лечения прионной инфекции. Однако также было продемонстрировано, что такролимус ингибирует TFEВ-зависимую митофагию в β-клетках поджелудочной железы, что, в свою очередь, приводит к их дисфункции [44].

Препараты-активаторы митофагии. Отдельно рассмотрим одобренные FDA препараты, кото-

рые также демонстрируют свойства активаторов митофагии.

Многие соединения, активирующие митофагию, действуют на участников PINK/Parkin-пути передачи сигнала (рис. 2). Например, по такому механизму действует препарат репаглинид, который был одобрен FDA в качестве инсулинотропного противодиабетического препарата. Помимо этого, его также рассматривали в качестве потенциального терапевтического средства для лечения болезней Паркинсона и Хантингтона. Данное соединение также проявляет свойства активатора митофагии, и, хотя точный механизм неизвестен, было показано, что репаглинид повышает экспрессию маркера митофагии PINK1 (PTEN-индуцируемая протеинкиназа 1) и BECN1 [45].

Другой распространенный путь активации ауто- и митофагии – SIRT1-зависимый сигналинг. Примером соединения, воздействующего на этот путь, может служить противоопухолевое средство олапариб (AZD2281), который является ингибитором PARP-1, что и приводит к активации сиртуин-зависимого пути активации аутофагии. Было показано, что олапариб индуцирует митофагию в клетках рака молочной железы, а также существенно сокращает количество митохондрий в клетках с нарушениями митофагии [7].

Встречаются также препараты, которые активируют сразу несколько различных подтипов аутофагии, например, милтефозин способен активировать липофагию, митофагию и аутофагию. Этот препарат был одобрен FDA для лечения кожного и висцерального лейшманиоза. Показано, что инкубация с милтефозином оказывает множественное влияние на липидный гомеостаз в макрофагах, включающее повышение уровня высвобождения холестерина, ускорение разрушения липидных рафтов и перераспределение PIP2 из плазматической мембраны в регионы клетки, богатые актином. Также обработанные милтефозином клетки демонстрировали увеличение активирующего фосфорилирования AMPK и ULK1 (unc-51-подобная активирующая аутофагию киназа) [46].

Похожие эффекты описаны для низкомолекулярного антиоксиданта пробуккола. Данное соединение снижает уровень холестерина, а также способно усиливать митофагию и предотвращать потерю дофаминергических нейронов у *Drosophila melanogaster* и *Danio rerio* [47]. При изучении механизма его действия было обнаружено, что пробуккол действует независимо от пути PINK/Parkin и основной его мишенью является ABCA1 (АТФ-связывающий кассетный транспортер), который подавляет митофагию [48].

Есть и другие способы инициации митофагии, например, дефицит железа. Функционирование митохондрий обеспечивает необходимый

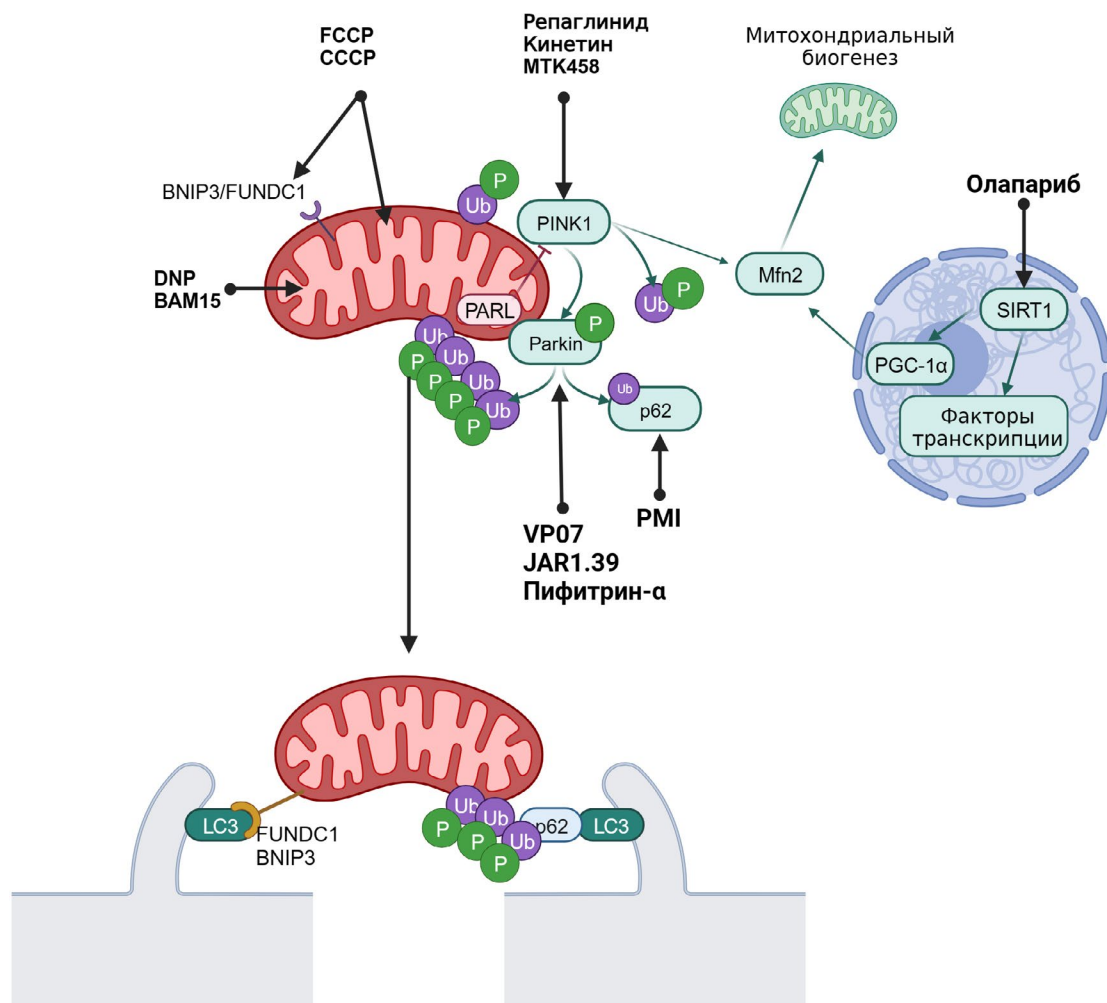


Рис. 2. Механизм действия синтетических веществ, активирующих митофагию. Ub – убиквитинирование, P – фосфорилирование, черные стрелки указывают на мишени действия активаторов аутофагии; в каскаде активации аутофагии зелеными стрелками показано активирующее действие белков, красными – подавляющее

гомеостаз железа, так как три основных пути утилизации железа (его запасание, биосинтез гема и железосерных кластеров) протекают в митохондриях [49]. Недавние исследования показывают, что дефицит железа приводит к митофагии в разных модельных организмах [50–53] за счет повышения экспрессии митохондриального ферритина, который, попадая на внешнюю мембрану митохондрий, привлекает адаптерный белок аутофагии NCOA4 [54]. Таким образом, хелаторы железа, такие как, например, деферипрон (DFP), индуцируют митофагию, не влияя на трансмембранный митохондриальный потенциал [50, 55], по PINK1/Parkin-независимому пути. DFP был одобрен FDA в 1994 г. для лечения талассемии [56].

Отдельно стоит упомянуть катионные соединения, которые могут играть роль мягких разобщителей окислительного фосфорилирования. Например, было показано, что проникающие катионы, нацеленные на митохондрии, например, 10-(6'-убихинонил) децилтрифенилфосфоний (MitoQ), сни-

жают потенциал на мембране митохондрий и являются разобщителями окислительного фосфорилирования, индуцируя ауто- и митофагию. MitoQ является известным антиоксидантом и используется в качестве пищевой добавки. В целом, соединения, проявляющие свойства мягких разобщителей окислительного фосфорилирования, являются крайне перспективными в контексте разработки препаратов, активирующих митофагию [57].

Таким образом, препараты, одобренные FDA и проявляющие свойства активаторов ауто- и митофагии, проявляют высокое разнообразие по механизмам своего действия. Подробнее с формулами приведенных соединений можно познакомиться в табл. 1. Стоит также отметить, что, несмотря на то что эти препараты уже используются человеком, для многих из них свойства активаторов аутофагии были обнаружены спустя продолжительное время после одобрения FDA. Это указывает на необходимость более тщательного исследования спектра побочных эффектов разрабатываемых препаратов.

Таблица 1. Синтетические индукторы ауто- и митофагии, одобренные FDA для применения

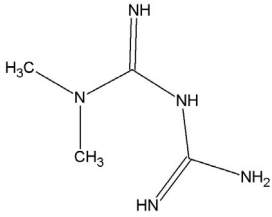
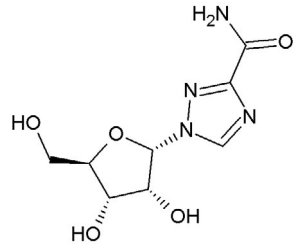
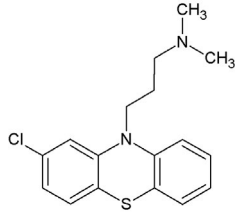
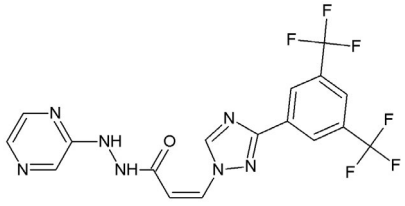
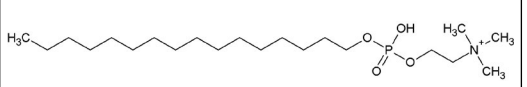
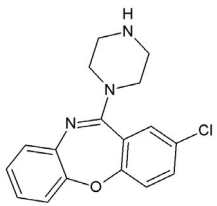
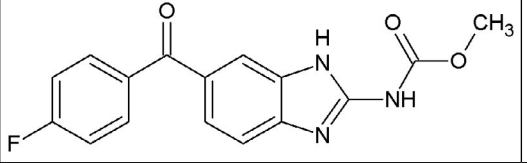
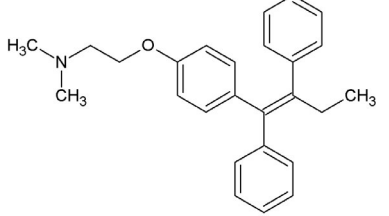
Название	Структура	Механизм действия	Одобен FDA
Метформин		активирует AMPK	сахароснижающий препарат
Рибоверин			противовирусный препарат
Хлорпромазин		активирует mTOR-зависимые пути	нейролептик
Селинексор			селективный ингибитор протоонкогена XPO1
Милтефозин			препарат против лейшманиоза
Амоксапин		ингибирует mTOR	антидепрессант
Флубендазол		вызывает деполимеризацию динамических микротрубочек и ингибирование mTOR	антигельминтный препарат
Тамоксифен		увеличивает экспрессию BECN1	гормональный препарат для лечения рака молочной железы

Таблица 1 (продолжение)

Название	Структура	Механизм действия	Одобен FDA
Итраконазол		увеличивает экспрессию генов <i>LC3</i> и <i>p62</i>	противогрибковый препарат
Верапамил			
Амиодарон		блокирует кальциевые каналы	антиангинальное и антиаритмическое средство
Пимозид			антипсихотическое средство
Карбамазепин			
Вальпроевая кислота		ингибирует мио-инозитол-1-фосфат синтазу	противоэпилептический препарат
Соли лития	Li^+		

Таблица 1 (продолжение)

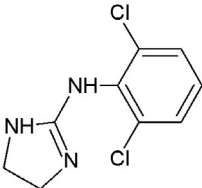
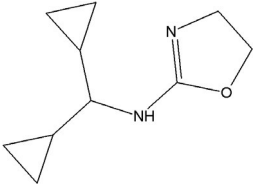
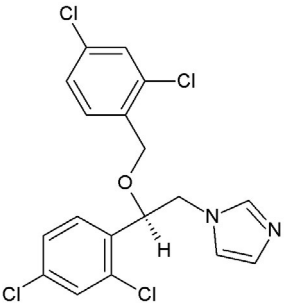
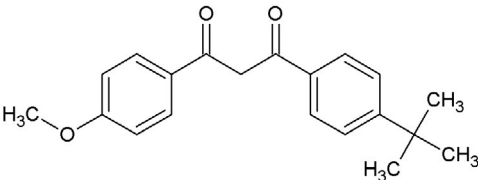
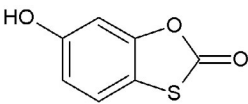
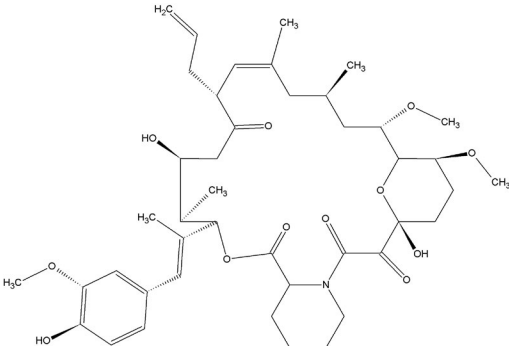
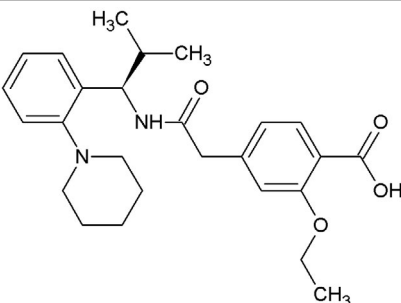
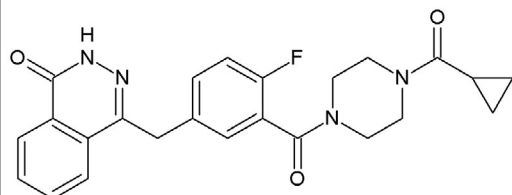
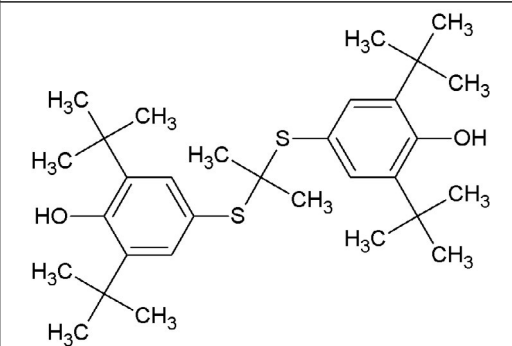
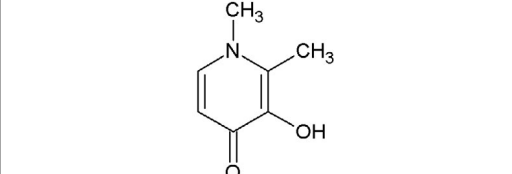
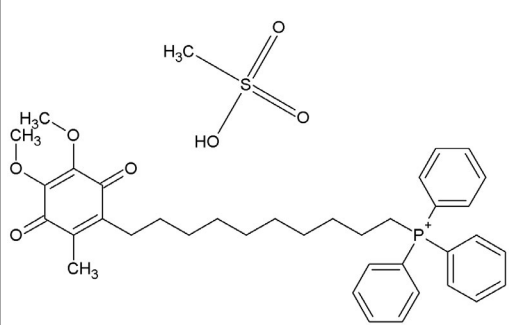
Название	Структура	Механизм действия	Одобен FDA
Клонидин		блокирует калиевые каналы	гипотензивный препарат
Рилменидин			
Миконазол		не известно	противогрибковый препарат
Авобензол			компонент солнцезащитных кремов
Тиоксолон			средства для лечения акне
Такролимус			иммуносупрессор
Репаглинид		увеличивает экспрессию генов, кодирующих PINK1 и BECN1	противодиабетический препарат

Таблица 1 (окончание)

Название	Структура	Механизм действия	Одобен FDA
Олапариб		ингибирует PARP-1	противоопухолевое средство
Пробукол		ингибирует ABCA1	гиперлипидемический препарат
Деферипрон		хелатирует железо	препарат против талассемии
MitoQ		мягкий разобщитель окислительного фосфорилирования	антиоксидант

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СИНТЕТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА**

Параллельно с поиском способности активировать аутофагию у уже одобренных препаратов ведется разработка новых молекул с такими свойствами. Так как многие активаторы обладают высокой токсичностью, лишь малая часть таких молекул доходит до клинических испытаний.

При разработке новых активаторов аутофагии используется два основных подхода: скрининг химических библиотек и рациональный дизайн молекул. В скрининговых подходах, как правило, используются библиотеки структурных аналогов известных активаторов аутофагии. В подходах рационального дизайна часто разрабатываются химерные молекулы, которые позволяют созда-

вать платформы для деградации разнообразных мишеней.

Вещества-активаторы аутофагии. Так же, как и лекарственные препараты, экспериментальные соединения, активирующие аутофагию, можно разделить на две группы: mTOR-зависимые и mTOR-независимые. Начнем рассмотрение этих соединений с веществ, действующих на mTOR, и посредников передачи сигнала по mTOR-зависимому механизму активации аутофагии.

Рассмотрим ингибиторы mTOR. В отличие от рапамицина и его аналогов, которые аллостерически ингибируют этот фермент [58], синтетические ингибиторы mTOR имеют конкурентный механизм связывания с каталитическим центром киназ mTORC1 и mTORC2 (мишени рапамицина млекопитающих, комплексы 1 и 2). Они являются более

активными ингибиторами mTOR, соответственно, их действие на активацию аутофагии выражено сильнее. Так, например, AZD8055 стимулирует и потенцирует аутофагию, вызванную химиотерапией, как показывает повышение конверсии LC3-I в LC3-II и снижение количества p62/SQSTM1 (секвестосома 1) [59]. CZ415 в *in vitro* экспериментах подавлял рост клеток папиллярной карциномы щитовидной железы [60] и плоскоклеточного рака головы и шеи [61]. К активаторам аутофагии с описанным механизмом действия и свойствами также относятся торин 1 [62], PP242 [63], KU-0063794, PtdIns-103 и NVP-BEZ235 [64].

Однако существенным недостатком большинства известных ингибиторов mTORC1 является низкая селективность. Воздействуя на активаторы mTORC1 и ингибируя передачу сигналов от них, удастся существенно повысить селективность. Так, в ходе скрининга библиотеки ковалентных лигандов, совмещенного с белковым профилированием, удалось обнаружить EN6 – низкомолекулярный активатор аутофагии, связывающийся с Cys-277 в ATP6V1A лизосомальной v-АТФазы. В присутствии EN6 mTORC1 не получает активирующий сигнал от v-АТФазы, и ее активность снижается [65].

Как было оговорено выше, иммуносупрессивный эффект рапамицина ограничивает его частое использование, поэтому требуется разработка более безопасных аналогов. В результате скрининга библиотеки из 50 729 соединений было идентифицировано три низкомолекулярных усилителя рапамицина (SMER), которые индуцируют аутофагию [66]: они тормозят агрегацию гентингина с высоким содержанием полиглутамина и α-синуклеина с мутацией A53T, которые ассоциированы с развитием болезни Хантингтона и болезни Паркинсона соответственно [67], индуцируя аутофагию по mTOR-независимым механизмам. Помимо этого, AUTEN-99, еще один представитель SMER, активирует аутофагию *in vitro* и *in vivo* и замедляет прогрессирование нейродегенеративных симптомов [68].

Помимо веществ, которые непосредственно влияют на работу комплекса mTOR, также известно множество веществ, вызывающих аутофагию при косвенном ингибировании mTOR и влияющих на работу участников сигнального каскада передачи сигнала инициации аутофагии. Например, в ходе высокопроизводительного скрининга было обнаружено соединение J3, которое показало себя эффективным активатором аутофагии. Это соединение проникает через гематоэнцефалический барьер и снижает уровень мутантного белка хантингтина у мышей HdhQ140, не влияя на уровень нормального белка. Также было показано, что J3 снижает уровень неверно свернутых белков в по-

лосоме. Известно, что J3 ингибирует mTOR-зависимый путь, активируя аутофагию по независимому от AMPK пути [69].

Для другого соединения, 9f, также было показано, что оно воздействует на PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь. Однако для 9f механизм его работы изучен более детально: например, известно, что он является селективным ингибитором Akt1, а также индуцирует накопление p62/SQSTM1 в клетке. Помимо этого, описано, что 9f вызывает гибель клеток гепатоцеллюлярной карциномы Huh-7 за счет индукции аутофагии [70]. После добавления ингибитора аутофагии 3-МА цитотоксический эффект 9f значительно снижается.

Интересный ингибитор Akt-сигнального пути был разработан с помощью подхода по созданию гибридных молекул с известными доступными активаторами аутофагии. Был получен гибрид производного ресвератрола, известного природного активатора аутофагии, и производного сложного эфира Ганса [71], для которого описаны противовоспалительные [72] и антиоксидантные свойства [73]. Полученное гибридное соединение ReNa-2 повышало уровень LC3-II и снижало уровень p62, что свидетельствует об активации аутофагии. Известно, что ReNa-2 способен активировать сигнальные пути MAPK и Akt. Также было показано, что ReNa-2 повышает продукцию АФК в линии клеток человека NCI-H460, что приводит к гибели клеток с помощью аутофагии.

Помимо вышеописанных соединений, активаторами аутофагии и митофагии могут служить вещества, регулирующие активность сиртуинов, а именно SIRT1. Например, известно, что 4-гидрокси-ауксарконъюгатин (4-HAB) ослабляет опосредованную кристаллами мочевой кислоты активность инфламмосомы NLPR3 в суставах при подагре. Это действие обусловлено SIRT1-зависимой индукцией аутофагии [74]. Это соединение приводит к устойчивой экспрессии маркеров аутофагии, включая активацию Atg, LC3-II и т.д. Кроме того, 4-HAB ослабляет подагрическое воспаление *in vitro* и *in vivo*.

Также было показано *in vivo*, что активатор SIRT1, SRT1720, стимулирует работу AMPK, ингибирует апоптоз, индуцированный гипоксией через IRE1α-сигналинг, и усиливает аутофагию в ишемизированных кардиомиоцитах [75]. Структурный аналог предыдущего соединения, SRT2183, ингибирует сигнальные пути Akt/mTOR/70S6K и p38 MAPK, что индуцирует созревание аутофагосом в клетках рака яичника OVCAR-3 и A2780 и ингибирует рост этих линий; при этом нокдаун генов *Atg5* и *Atg7* значительно нарушает противоопухолевую активность этого вещества [76]. Примечательно, есть подтверждение того, что ингибитор сиртуинов, MNU2256, вызывает апоптоз и остановку клеточного

цикла в фазе G1 клеток рака эндометрия; кроме того, он приводит к появлению вакуолей и накоплению LC3, что как будто говорит об активации, а не подавлении аутофагии. Это соединение также приводит к замедлению роста клеток колоректального рака HCT116, HT-29 и DLD-1 [77]. Важно также отметить, что сиртуиновый сигналинг не является строго специфичным для аутофагии: белки этого пути задействованы также в процессах митофагии и митохондриальном биогенезе (см. ниже).

Следующей распространенной мишенью для активации аутофагии по mTOR-зависимому пути является AMPK. Например, вещества, такие как AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-бета-D-рибофуранозид) и CRO15 (аналог метформина с большей биодоступностью), активируют AMPK, тем самым вызывая аутофагию за счет фосфорилирования и активации комплекса белков туберозного склероза 1 и 2 (TSC1/TSC2), который является негативным регулятором mTOR [78]. Причем AICAR может вызывать ингибирование аутофагии, нарушая формирование функционального комплекса BECN1 с PI3K, важного позитивного регулятора аутофагии. Что касается CRO15, то другой его механизм активации аутофагии – это ингибирование MELK, результатом чего является остановка клеточного цикла и запуск путей репарации ДНК за счет активации p53 и REDD1 [79].

Также распространенными мишенями активаторов и ингибиторов аутофагии являются ферменты, активность которых регулирует mTOR – Unc-51-подобная киназа 1 и каталитическая субъединица фосфотидилинозитол-3 киназы типа 3 (PIK3C3). При отсутствии аутофагии mTOR подавляет активность этих ферментов, соответственно активаторы ULK1 и PIK3C3 будут способствовать инициации аутофагии [80]. Так, например, активатор ULK1, LYN-1604, который был разработан в процессе рационального дизайна, вызывает аутофагию в *in vitro* и *in vivo* экспериментах на моделях трижды негативного рака молочной железы посредством сборки комплекса ULK1–mAtg13–FIP200–Atg101 [81]. Также известны активаторы PIK3C3; например, показано, что природный алкалоид кориноксин В эффективно запускает нейрональную аутофагию. Данное соединение обладает низкой проницаемостью через гематоэнцефалический барьер. При разработке потенциального препарата для терапии болезни Паркинсона было синтезировано производное кориноксина В – СВ6. СВ6 эффективно усиливал аутофагию *in vitro* и *in vivo*, а также проявлял нейротекторные свойства в модели болезни Паркинсона, вызванной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP), на мышах [82].

Помимо этого, также интересно, что по mTOR-зависимому механизму аутофагию запускают не-

которые соли органических кислот. Показан положительный эффект бутирата натрия в моделях животных с болезнью Паркинсона через активацию деградации α -синуклеина в процессе аутофагии [83]. Установлено участие пропионата и бутирата в регуляции аутофагии в раковых клетках толстой кишки человека [84, 85]. Бутират ингибировал пролиферацию клеток при гепатоклеточной карциноме в результате активации аутофагии [86]. Бутират запускал аутофагию в эпителиальных клетках кишечника через индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) [87]. Ацетат стимулировал синтез муцинов клетками T84, а образуемая γ -аминомасляная кислота (GABA) стимулировала выброс муцинов через влияние на процесс аутофагии и передачи Ca²⁺-сигнала [88]. Бутират индуцировал изменения в метаболизме макрофагов, сопровождающиеся снижением гликолиза, уменьшением активности киназы mTOR, повышением уровня LC3, увеличением синтеза антимикробных пептидов, и при этом без индукции цитокинового противовоспалительного ответа [89].

Как уже было описано выше, другая большая группа мишеней активаторов аутофагии не связана с mTOR-сигналингом. В качестве примеров таких белков можно привести BECN1 и взаимодействующие с ним антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2 и Bcl-XL) [90]. Нарушение белок-белкового взаимодействия между ВН3-доменом BECN1 и Bcl-2 при помощи ВН3-миметиков, например, АВТ737, приводит к повышению уровня аутофагии [91]. Однако ВН3-миметики не специфичны для аутофагии, так как запускают апоптоз, разрушая взаимодействие между белками семейства Bcl-2 и ВН3-доменами проапоптотических молекул; а потому, базирываясь на структурных детерминантах между ВН3-доменами BECN1 и проапоптотическими белками, есть возможность разработать ВН3-миметики, селективно индуцирующие аутофагию.

Интересный вариант принципиально другого способа активации аутофагии – регуляция транскрипции. Примером может служить гидроксипроизводное линолевой кислоты, АВТL0812, которое было разработано как индуктор аутофагии с цитотоксическим эффектом [92]. Это соединение связывается с PPAR α и PPAR γ (рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом) и активирует их транскрипционную активность, что приводит к повышению экспрессии гена *TRIB3*, который является ингибитором Akt [93]. По итогам фазы I клинических испытаний было показано, что АВТL0812 безопасен и имеет приемлемый профиль переносимости; это обуславливает возможность его перорального применения. На данный момент завершена фаза IIа испытаний, исследующая эффективность этого препарата в терапии

рака поджелудочной железы (номер клинических испытаний NCT04431258). Исследования данного препарата проводятся испанской компанией Ability Pharma, которая разрабатывает препараты, активирующие аутофагию, для лечения рака.

Также на активность аутофагии влияют транскрипционные факторы TFEB и TFE3 (транскрипционный фактор E3). Было показано, что на их активность влияет вещество MSL-7 – низкомолекулярный энхансер аутофагии, который был обнаружен при разработке препарата для терапии диабета 2-го типа. При этом заболевании человеческий островковый амилоидный полипептид (hIAPP) агрегирует с образованием олигомеров и фибрилл более сложной структуры, которые токсичны для β -клеток и вызывают воспаление. Аутофагия является основным механизмом удаления этих токсичных структур в β -клетках, однако при диабете 2-го типа работа этого процесса нарушается, что вызывает накопление hIAPP. Было обнаружено, что MSL-7 снижает уровень hIAPP у мышей. MSL-7 проникает в клетки и активирует фосфатазу кальциневрин А в цитоплазме. Кальциневрин А дефосфорилирует факторы транскрипции TFEB и TFE3, что приводит к их перемещению в ядро и активации экспрессии генов аутофагии и лизосом [94]. Аналогичный механизм активации аутофагии описан для другой молекулы, SMK-17, изначально разработанной как аллостерический ингибитор MAP2K1 и MAP2K2. SMK-17 индуцирует аутофагию и лизосомный биогенез посредством mTOR-независимой, но зависимой от PRKC активации TFEB, в отличие от других, структурно похожих на него ингибиторов MAP2K U0126 и PD184352 [95].

Среди экспериментальных соединений есть те, которые вызывают аутофагию пока по неизвестным механизмам. Так, производное катехола, соединение 6, индуцирует аутофагию в клетках HeLa и проявляет антифибротический эффект в эксперименте на крысах с поражением печени, вызванным диметилнитрозамином [96]. Активный и селективный обратный агонист ERR α , XCT-790, вызывает аутофагию, по всей видимости, mTOR-независимым путем, усиливает биогенез аутофагосом и проявляет нейропротективный эффект в дофаминергических нейронах черной субстанции [97]. Соединение 26b, производное списулозина, который сам по себе активирует апоптоз в раковых клетках, индуцирует устойчивую гибель клеток линии рака толстой кишки DLD-1 за счет аутофагии, что подтверждается образованием характерных аутофагических вакуолей, образованием локусов LC3 и экспрессией BECN1 и белков семейства Atg [98]. Гуманин, пептид митохондриального происхождения, усиливает аутофагию в некоторых типах клеток, а также усиливает экспрессию генов, связанных с аутофагией, и сни-

жает накопление белков с неправильной укладкой в скелетных мышцах мышей. Предполагают, что аутофагия, вызванная гуманином, потенциально способствует улучшению функции скелетных мышц. Более того, показано, что аутофагия играет ключевую роль в индуцированном гуманином увеличении продолжительности жизни у *C. elegans* [99].

Вещества-активаторы митофагии. Одним из центральных клеточных путей запуска митофагии является PINK1/Parkin-зависимый сигнальный путь. Вещества, влияющие на посредников этого каскада, являются эффективными активаторами митофагии. В ходе скрининга набора из 50 гетероциклических соединений [100] были выявлены два индуктора митофагии, активирующих ее по Parkin-зависимому механизму, – VP07 и JAR1.39. Для этих веществ было показано, что они способны проникать через гематоэнцефалический барьер [101], поэтому они представляют интерес в контексте изучения патологий центральной нервной системы.

Помимо этого, известны вещества, которые напрямую связываются с PINK1 и за счет этого активируют митофагию. Данное свойство характерно для N6-замещенных аденинов. Первым обнаруженным веществом с такими свойствами был кинетин. Известно, что в клетке он преобразуется в кинетинрибозидтрифосфат, который выполняет роль субстрата для PINK1 [102]. Однако данное соединение не имеет терапевтического потенциала, так как его действующая концентрация высока (50 мкМ). Для другого N6-замещенного аденина, MTK458, было показано, что он стабилизирует активную конформацию PINK1 [103]. Важно отметить, что MTK458 способен запускать митофагию только в низкой концентрации (0,5–1 мкМ) митохондриального стрессора, например карбонилцианида р-(трифторметокси) фенилгидразона (FCCP) и олигомицина, в то время как для кинетина показана способность активировать митофагию вне зависимости от состояния митохондрий [102].

Помимо этого, также были обнаружены соединения, которые влияют на регуляторы PINK1/Parkin-пути, например вещество UMI-77. Данное соединение проявляет свойства BH3-миметика для MCL1, усиливая его функцию рецептора митофагии, что, в свою очередь, улучшает способность MCL1 взаимодействовать с LC3. Ранее также было показано, что MCL1 инициирует аутофагию с помощью нарушения PINK1/PARK2-пути передачи сигналов. На мышинной модели болезни Альцгеймера было продемонстрировано, что UMI-77 оказывает положительный эффект на когнитивные функции [104].

Разобщители окислительного фосфорилирования, такие как карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (CCCP), FCCP, никлозамид и, в меньшей степени, 2,4-динитрофенол (DNP), стимулируют

общую аутофагию, а также индуцируют деградацию митохондрий, повышая проницаемость их внутренней мембраны для протонов и снижая ее трансмембранный потенциал, что также приводит к запуску митофагии по PINK1/Parkin-зависимому пути [105–107]. Также было показано, что СССР и FCCP могут запускать митофагию за счет NIX/VNIP3L- и FUNDC1-путей [7]. Несмотря на широкое использование в биологических экспериментах, эти соединения имеют нежелательные эффекты, которые не позволяют использовать их в клинической практике. Воздействие на всю популяцию митохондрий приводит к энергетическому кризису клеток и зачастую к их смерти [108], поэтому их хроническое применение может повлечь за собой полное разрушение всех митохондрий [106]. Они также нарушают работу белков плазматической мембраны и цитоскелета, подавляют активность лизосом [7]. Применение разобщителей окислительного фосфорилирования сопряжено с большим числом побочных эффектов и высокой цитотоксичностью. При этом цитотоксические свойства проявляются даже при концентрациях, недостаточных для индуцирования митофагии. Разобщитель окислительного фосфорилирования второго поколения, BAM15, найденный в процессе скрининга химических библиотек, проявляет более высокую селективность к внутренней мембране митохондрий и не вызывает деполяризации плазматической мембраны [109]. При этом эффективность BAM15 сопоставима с СССР и FCCP.

Также к запуску PINK1/Parkin-зависимого пути приводит накопление в клетке АФК. Большая группа веществ, в которую входят паракват, дикват, селенит натрия и МРТР, вызывает серьезный окислительный стресс: они посредством различных механизмов запускают генерацию АФК, которые повреждают митохондрии [7, 110–113]. Например, селенит натрия вызывает летальную форму митофагии в клетках глиомы человека, но не влияет на астроциты. По-видимому, механизм действия селенита натрия связан с активацией убиквитинлигазы E3 MUL1, которая, в свою очередь, рекрутирует ULK1 в митохондрии, облегчая тем самым их деградацию [7]. Паракват и дикват активируют митофагию за счет повышения концентрации супероксид-анион радикалов, влияющей на комплекс I электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). Митофагия в этом случае запускается в результате деполяризации митохондриальной мембраны и идет по PINK1/Parkin-зависимому пути [106, 107, 112]. MPP⁺ (активный метаболит МРТР) способствует фосфорилированию и накоплению в митохондриях ERK2, которая направляет митохондрии в аутофагосомы и способствует их деградации [111, 113]. Возможность активации аутофагии через индукцию АФК также не может быть применена в тера-

певтических целях, поскольку фактически вызывает повреждение митохондрий, что в конечном итоге и приводит к митофагии.

Известный ингибитор p53, пифитрин-α, вызывает Parkin-зависимую митофагию, которая защищает β-клетки поджелудочной железы и противодействует диабету [114], а также препятствует нарушению функции тканей миокарда [115] в мышечных моделях. Этот эффект связан с нарушением независимой от транскрипции цитоплазматической функции p53 [116].

Также митофагия может запускаться с помощью p62/SQSTM1. PMI (p62/SQSTM1-зависимый индуктор митофагии) – синтетическое соединение, запускающее p62-зависимую элиминацию митохондрий без влияния на мембранный потенциал или морфологию сети митохондрий [117]. PMI работает по нескольким механизмам: во-первых, увеличивает экспрессию и сигналинг от p62/SQSTM1, что стимулирует включение митохондрий в аутофагосомы; во-вторых, является ингибитором белок-белкового взаимодействия между Nrf2 и Keap1, стабилизируя Nrf2, который стимулирует биогенез митохондрий [7].

Таким образом, экспериментальные синтетические соединения также проявляют значительное разнообразие в механизмах активации ауто- и митофагии. В табл. 2 приведены структуры и мишени описанных веществ. Хотелось бы отметить, что, несмотря на большое количество исследований, проводимых в области аутофагии, для значительной части активаторов аутофагии так и не обнаружена конкретная мишень их действия. Данный факт отрицательно сказывается как на коммерческом потенциале молекул, так и на научном. При составлении химических библиотек для скрининга активаторов аутофагии многие научные группы используют признак структурного сходства молекул с известными активаторами аутофагии. Более детальные представления о механизме действия таких молекул позволили бы нам составлять более сфокусированные библиотеки.

КОММЕРЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ АУТОФАГИИ

В обзоре, посвященном природным активаторам аутофагии [10], были описаны компании, которые занимаются коммерциализацией биологически активных добавок на основе таких соединений, как уролитин А, спермидин, ресвератрол, куркумин и др. Для приема таких добавок, как правило, не нужны специальные показания и рекомендации врача, их применяют с целью увеличения продолжительности жизни и замедления старения.

Таблица 2. Экспериментальные и синтетические индукторы ауто- и митофагии

Название	Структура	Механизм
AZD8055		ингибирует mTOR
CZ415		
Торин 1		
PP242		
KU-0063794		
PtdIns-103		
NVP-BEZ235		

Таблица 2 (продолжение)

Название	Структура	Механизм
EN6		нарушает взаимодействие АТР6V1A и mTOR
SMERs	SMER10 SMER28 SMER18	активирует mTOR-независимые пути
AUTEN-99		
J3		ингибирует mTOR-зависимый путь
Бутират натрия		
9f		ингибирует Akt1
ReHa-2		ингибирует Akt-сигнальный путь

Таблица 2 (продолжение)

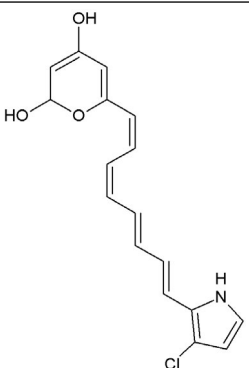
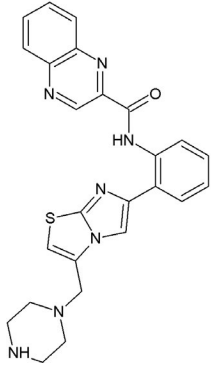
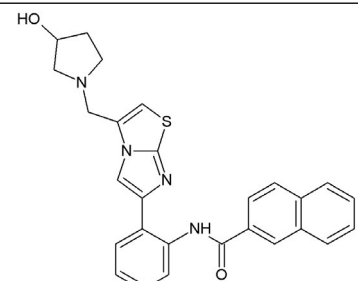
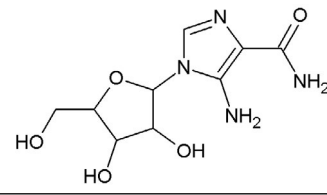
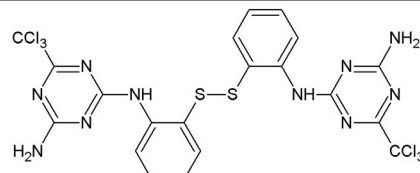
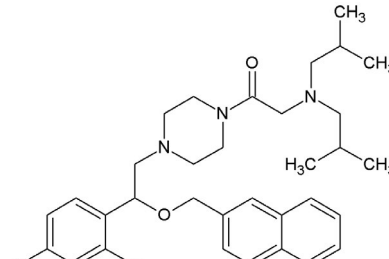
Название	Структура	Механизм
4-HAB		активирует SIRT1-зависимый путь
SRT1720		активирует SIRT1 и AMPK
SRT2183		ингибирует сигнальный путь Akt/mTOR/70S6K
AICAR		активирует AMPK
CRO15		активирует AMPK
LYN-1604		активирует ULK1

Таблица 2 (продолжение)

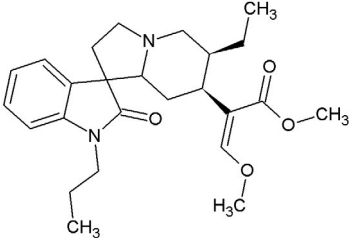
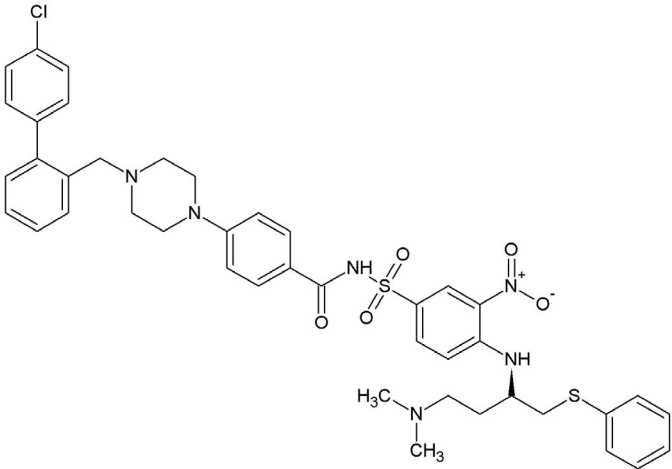
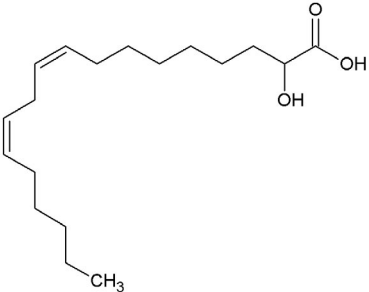
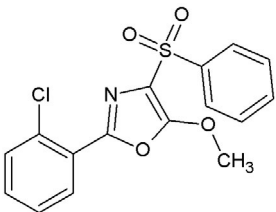
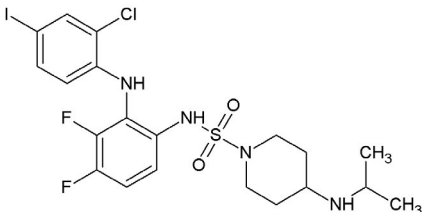
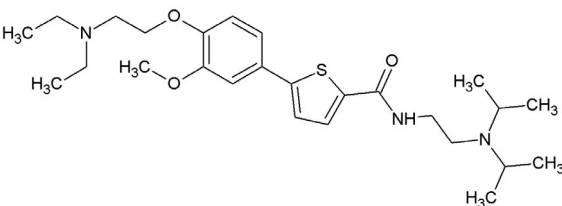
Название	Структура	Механизм
CB6		активирует PIK3C3
ABT737		нарушает взаимодействие BCR1 и Bcl-2
ABTL0812		активирует PPARα и PPARγ
MSL-7		активирует фосфатазу кальциневрин A
SMK-17		активирует TFEB
Производное катехола, соединение 6		не известно

Таблица 2 (продолжение)

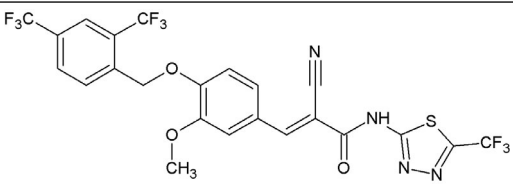
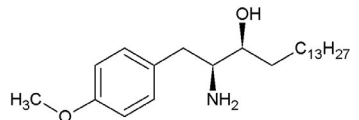
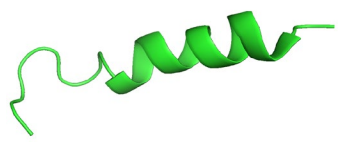
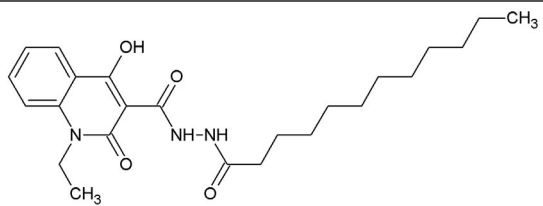
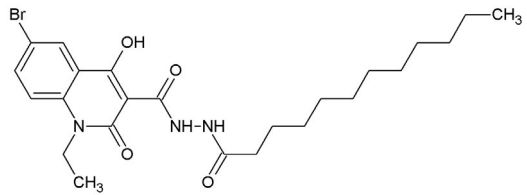
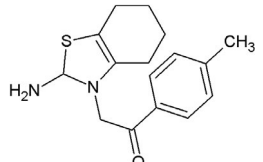
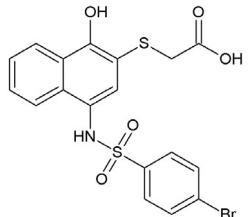
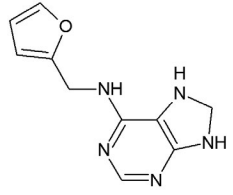
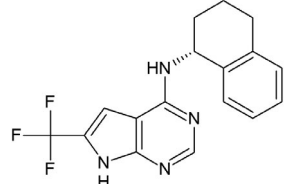
Название	Структура	Механизм
ХСТ-790		не известно
26b		
Гуманин [118]		
VP07		активирует Parkin-зависимые пути
JAR1.39		
Пифитрин-α		
UMI-77		субстрат PINK1
Кинетин		
MTK458		

Таблица 2 (окончание)

Название	Структура	Механизм
FCCP		снижает трансмембранный потенциал
CCCP		
DNP		
BAM15		
Паракват		вызывает окислительный стресс
Дикват		
Селенит натрия		
MPTP		
PMI		увеличивает экспрессию и сигналинг от p62/SQSTM1

Однако модулирование аутофагии является также подходом к лечению многих заболеваний. Такие компании, как AUTOTAC Bio Inc., Biophagy, Casma Therapeutics, Ability Pharma, Samsara Therapeutics, Retro Biosciences, Vincere, Libra Therapeutics, PAQ Therapeutics, разрабатывают активаторы аутофагии, нацеленные на лечение заболеваний, ассоциированных с аутофагией.

Данные компании занимаются более глубокими и сложными по своей природе исследованиями, поскольку, в отличие от компаний, которые использовали в своих добавках вещества природного происхождения, объекты разработок данных компаний – как правило, синтетические вещества, требующие более тщательных исследований на предмет токсичности, побочных эффектов и механизма действия.

Компании Biophagy, Samsara Therapeutics, Vincere, Libra Therapeutics, PAQ Therapeutics разрабатывают активаторы аутофагии для лечения заболеваний, связанных со старением, нейродегенерацией, раком, и пока находятся на стадии поиска и оптимизации формул активаторов или исследования механизмов их действия. Компании Casma Therapeutics и Retro Biosciences приближаются к стадии доклинических исследований, а более прогрессивные, такие как AUTOTAC Bio и Ability Pharma – уже находятся на стадии клинических испытаний.

Препарат компании Ability Pharma ABTL0812 уже прошел с положительными результатами испытания фазы IIa при раке эндометрия и раке легких [119] и в настоящее время проходит фазу IIb клинических испытаний при раке поджелудочной железы. Данное соединение индуцирует аутофагию за счет активации TRIB3, который является эндогенным ингибитором пути Atk/mTOR. Помимо этого, ABTL0812 также запускает стресс эндоплазматического ретикулума с помощью взаимодействия с ядерными рецепторами PPAR α и PPAR γ [119].

AUTOTAC Bio Inc. разрабатывает препараты на основе химер, нацеленных на аутофагию, для лечения нейродегенеративных заболеваний, рака, амилоидозов, мышечной дистрофии, инфекционных и метаболических заболеваний. В настоящее время несколько препаратов находятся на стадии доклинических испытаний, а один, направленный против болезни Альцгеймера, находится уже на стадии клинических испытаний. Компания AUTOTAC Bio Inc. имеет несколько патентов на свои химеры и опубликованное исследование, подтверждающие перспективность разработок [120].

Похожий подход разрабатывает компания Casma Therapeutics, которая создала платформу PHLYT™ (Phagosome-Lysosome Targeting) на основе соединений, позволяющих привлекать белки-

регуляторы аутофагии к мишеням, являющимся причинами некоторых болезней, что приводит к биогенезу аутофагосом вокруг мишени. Компания нацелена на лечение онкологических заболеваний, воспаления, нейродегенерации и метаболических нарушений. Несколько онкологических препаратов приближается к стадии доклинических исследований.

Платформу направленной деградации на основе соединений, связывающих аутофагосомы (ATTEC) [121], разрабатывает компания PAQ Therapeutics. В конце 2021 г. компания объявила о сотрудничестве с Insilico Medicine для разработки новых методов лечения посредством деградации, зависящей от аутофагии.

Таким образом, достаточно много иностранных компаний занимается разработкой в области аутофагии, используя различные методы и преследуя разные цели, что свидетельствует о перспективности данного направления как подхода к увеличению продолжительности жизни, замедлению, лечению или предотвращению ассоциированных с возрастом заболеваний. Вполне вероятно, что многие из описанных в данном обзоре активаторов аутофагии, которые активно исследуются на моделях различных заболеваний, в последующем также станут объектами коммерциализации и войдут в состав новых пищевых добавок или терапевтических средств.

Как и для всего мирового сообщества, для нашей страны крайне актуально изучение аутофагии, так как благодаря исследованиям в этом направлении потенциально может быть увеличена продолжительность жизни и отсрочено наступление возрастных заболеваний. Помимо этого, соединения, активирующие аутофагию, являются крайне перспективными молекулами для терапии злокачественных опухолей и нейродегенеративных заболеваний. Разработки в направлении активации аутофагии могли бы значительно расширить арсенал методов для терапии этих заболеваний, что крайне актуально, так как, в частности, одной из приоритетных задач в медицине для Российской Федерации является борьба с раком. В данный момент в нашей стране ведутся научные исследования в области изучения аутофагии [57, 122–124], однако, к сожалению, пока что проекты не доведены до практического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы наши представления об аутофагии значительно расширились, однако она остается все еще сложным процессом для изучения. В первую очередь это связано с тем, что участники каскада регуляции аутофагии задействованы

в различных смежных клеточных процессах. Помимо этого, большинство известных активаторов и ингибиторов аутофагии не обладают высокой специфичностью и воздействуют сразу на несколько ферментов, что, в свою очередь, приводит к появлению побочных эффектов в клетке.

В повседневной жизни источниками активаторов аутофагии для человека являются микробиота и пищевые продукты. Многие растения содержат в своем составе полифенольные соединения, которые затем под воздействием микробиоты превращаются, например, в уrolитин А, который является одним из наиболее известных активаторов митохондриальной аутофагии и уже сейчас используется в качестве пищевой добавки.

В связи с развитием молекулярной биологии и высоким терапевтическим потенциалом активаторов аутофагии за последние 2 года появились молекулы, механизм действия которых изучен детально, и определены конкретные мишени, среди которых встречаются AMPK, Akt и PINK1. Интересно также, что многие лекарственные препараты, которые уже применяются человеком, также запускают аутофагию, а значит, потенциально могут быть использованы, например, для терапии рака или нейродегенеративных заболеваний.

Немалое количество компаний в настоящее время ведет разработки активаторов аутофагии для лечения заболеваний, связанных со старением, раком, нейродегенерацией и другими ассоциированными с возрастом заболеваниями. Поэтому в скором времени активаторы аутофагии с большой вероятностью пополнят линейку терапевтических и профилактических средств, а также пищевых добавок против возраст-ассоциированных и других заболеваний.

Вклад авторов. Е.А. Гусева, Ю.А. Павлова – написание текста, О.А. Донцова – обсуждение материала, П.В. Сергиев – концепция и руководство работой, редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке компании ЭФКО.

Благодарности. Авторы благодарны коллективу лаборатории, а также академикам А.Г. Габинову и А.А. Макарову за обсуждение и дискуссии.

Конфликт интересов. Работа выполнена при финансовой поддержке компании ЭФКО.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., Puchalski, M., Rintz, E., Bartkowski, M., et al. (2018) Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases, *Metab. Brain. Dis.*, **33**, 989-1008, doi: 10.1007/s11011-018-0214-6.
2. Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature*, **402**, 672-676, doi: 10.1038/45257.
3. Marinković, M., Šprung, M., Buljubašić, M., and Novak, I. (2018) Autophagy modulation in cancer: current knowledge on action and therapy, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2018**, 8023821, doi: 10.1155/2018/8023821.
4. Campbell, G. R., and Spector, S. A. (2012) Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy, *PLoS Pathog.*, **8**, e1002689, doi: 10.1371/journal.ppat.1002689.
5. Xie, Z., Lau, K., Eby, B., Lozano, P., He, C., Pennington, B., et al. (2011) Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice, *Diabetes*, **60**, 1770-1778, doi: 10.2337/db10-0351.
6. Wang, B., Yang, Q., Sun, Y., Xing, Y., Wang, Y., Lu, X., et al. (2014) Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice, *J. Cell Mol. Med.*, **18**, 1599-1611, doi: 10.1111/jcmm.12312.
7. Georgakopoulos, N. D., Wells, G., and Campanella, M. (2017) The pharmacological regulation of cellular mitophagy, *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 136-146, doi: 10.1038/nchembio.2287.
8. Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017) Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease, *Circ. Res.*, **120**, 1812-1824, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311082.
9. ВОЗ (2020) 10 ведущих причин смерти в мире, *Всемирная организация здравоохранения*, URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
10. Павлова Ю. А., Гусева Е. А., Донцова О. А., Сергиев П. В. (2024) Природные активаторы аутофагии, *Биохимия*, **1**, 5-32, doi: 10.31857/S0320972524010018.
11. Levine, B., Packer, M., and Codogno, P. (2015) Development of autophagy inducers in clinical medicine, *J. Clin. Invest.*, **125**, 14-24, doi: 10.1172/JCI73938.
12. Russo, M., and Russo, G. L. (2018) Autophagy inducers in cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **153**, 51-61, doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.007.

13. Handschin, C., and Spiegelman, B. M. (2008) The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease, *Nature*, **454**, 463-469, doi: 10.1038/nature07206.
14. Varady, K. A., and Hellerstein, M. K. (2007) Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials, *Am. J. Clin. Nutr.*, **86**, 7-13, doi: 10.1093/ajcn/86.1.7.
15. Werner, E. A., and Bell, J. (1922) CCXIV. – The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively, *J. Chem. Soc. Trans.*, **121**, 1790-1794, doi: 10.1039/CT9222101790.
16. Cerezo, M., Tichet, M., Abbe, P., Ohanna, M., Lehraiki, A., Rouaud, F., et al. (2013) Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner, *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 1605-1615, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1226-T.
17. Hur, K. Y., and Lee, M.-S. (2015) New mechanisms of metformin action: focusing on mitochondria and the gut, *J. Diabetes Invest.*, **6**, 600-609, doi: 10.1111/jdi.12328.
18. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview, *Clin. Sci. (Lond.)*, **122**, 253-270, doi: 10.1042/CS20110386.
19. Diamanti-Kandarakis, E., Economou, F., Palimeri, S., and Christakou, C. (2010) Metformin in polycystic ovary syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1205**, 192-198, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05679.x.
20. Tomic, T., Botton, T., Cerezo, M., Robert, G., Luciano, F., Puissant, A., et al. (2011) Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms, *Cell Death Dis.*, **2**, e199, doi: 10.1038/cddis.2011.86.
21. Zhang, G., Liu, H., Xue, T., Kong, X., Tian, D., Luo, L., et al. (2023) Ribavirin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through AMPK-TOR signaling, *Eur. J. Pharmacol.*, **946**, 175548, doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175548.
22. Jhou, A.-J., Chang, H.-C., Hung, C.-C., Lin, H.-C., Lee, Y.-C., Liu, W., et al. (2021) Chlorpromazine, an antipsychotic agent, induces G2/ M phase arrest and apoptosis via regulation of the PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy pathways in human oral cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **184**, 114403, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114403.
23. Zhao, C., Yang, Z., Zhang, J., Li, O., Liu, S., Cai, C., et al. (2022) Inhibition of XPO1 with KPT-330 induces autophagy-dependent apoptosis in gallbladder cancer by activating the p53/mTOR pathway, *J. Transl. Med.*, **20**, 434, doi: 10.1186/s12967-022-03635-w.
24. Wang, J., Sha, J., Strong, E., Chopra, A. K., and Lee, S. (2022) FDA-approved amoxapine effectively promotes macrophage control of mycobacteria by inducing autophagy, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e02509-22, doi: 10.1128/spectrum.02509-22.
25. Takla, M., Keshri, S., and Rubinshtein, D. C. (2023) The post-translational regulation of transcription factor EB (TFEB) in health and disease, *EMBO Rep.*, **24**, e57574, doi: 10.15252/embr.202357574.
26. Chauhan, S., Ahmed, Z., Bradfute, S. B., Arko-Mensah, J., Mandell, M. A., Won Choi, S., et al. (2015) Pharmaceutical screen identifies novel target processes for activation of autophagy with a broad translational potential, *Nat. Commun.*, **6**, 8620, doi: 10.1038/ncomms9620.
27. Gu, Y., Chen, T., Li, G., Xu, C., Xu, Z., Zhang, J., et al. (2017) Lower Beclin 1 downregulates HER2 expression to enhance tamoxifen sensitivity and predicts a favorable outcome for ER positive breast cancer, *Oncotarget*, **8**, 52156-52177, doi: 10.18632/oncotarget.11044.
28. Wu, Q., and Sharma, D. (2023) Autophagy and breast cancer: connected in growth, progression, and therapy, *Cells*, **12**, 1156, doi: 10.3390/cells12081156.
29. Shen, P.-W., Chou, Y.-M., Li, C.-L., Liao, E.-C., Huang, H.-S., Yin, C.-H., et al. (2021) Itraconazole improves survival outcomes in patients with colon cancer by inducing autophagic cell death and inhibiting transketolase expression, *Oncol. Lett.*, **22**, 768, doi: 10.3892/ol.2021.13029.
30. Park, H.-W., and Lee, J. H. (2014) Calcium channel blockers as potential therapeutics for obesity-associated autophagy defects and fatty liver pathologies, *Autophagy*, **10**, 2385-2386, doi: 10.4161/15548627.2014.984268.
31. Kalonia, H., Kumar, P., and Kumar, A. (2011) Attenuation of proinflammatory cytokines and apoptotic process by verapamil and diltiazem against quinolinic acid induced Huntington like alterations in rats, *Brain Res.*, **1372**, 115-126, doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.060.
32. Miller, R. G., Smith, S. A., Murphy, J. R., Brinkmann, J. R., Graves, J., Mendoza, M., et al. (1996) A clinical trial of verapamil in amyotrophic lateral sclerosis, *Muscle Nerve*, **19**, 511-515, doi: 10.1002/mus.880190405.
33. Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., et al. (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase, *J. Cell Biol.*, **170**, 1101-1111, doi: 10.1083/jcb.200504035.
34. Fu, J., Shao, C.-J., Chen, F.-R., Ng, H.-K., and Chen, Z.-P. (2010) Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines, *Neuro. Oncol.*, **12**, 328-340, doi: 10.1093/neuonc/nop005.
35. Xia, Q., Zheng, Y., Jiang, W., Huang, Z., Wang, M., Rodriguez, R., et al. (2016) Valproic acid induces autophagy by suppressing the Akt/mTOR pathway in human prostate cancer cells, *Oncol. Lett.*, **12**, 1826-1832, doi: 10.3892/ol.2016.4880.

36. Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O’Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2008) A rational mechanism for combination treatment of Huntington’ s disease using lithium and rapamycin, *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 170-178, doi: 10.1093/hmg/ddm294.
37. Murphy, R., and Freedman, J. E. (2001) Morphine and clonidine activate different K⁺ channels on rat amygdala neurons, *Eur. J. Pharmacol.*, **415**, R1-R3, doi: 10.1016/s0014-2999(01)00797-x.
38. Lopez, A., Lee, S. E., Wojta, K., Ramos, E. M., Klein, E., Chen, J., et al. (2017) A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction, *Brain*, **140**, 1128-1146, doi: 10.1093/brain/awx005.
39. Jung, H.-J., Seo, I., Jha, B. K., Suh, S.-I., and Baek, W.-K. (2021) Miconazole induces autophagic death in glioblastoma cells via reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress, *Oncol. Lett.*, **21**, 335, doi: 10.3892/ol.2021.12596.
40. Prajapat, S. K., Subramani, C., Sharma, P., Vratil, S., and Kalia, M. (2022) Avobenzone, Guaiiazulene and Tioxolone identified as potent autophagy inducers in a high-throughput image based screen for autophagy flux, *Autophagy Rep.*, **1**, 523-536, doi: 10.1080/27694127.2022.2132075.
41. Yang, C., Lim, W., Bazer, F. W., and Song, G. (2018) Avobenzone suppresses proliferative activity of human trophoblast cells and induces apoptosis mediated by mitochondrial disruption, *Reproductive Toxicol.*, **81**, 50-57, doi: 10.1016/j.reprotox.2018.07.003.
42. Staatz, C. E., and Tett, S. E. (2004) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation, *Clin. Pharmacokinetics*, **43**, 623-653, doi: 10.2165/00003088-200443100-00001.
43. Nakagaki, T., Satoh, K., Ishibashi, D., Fuse, T., Sano, K., Kamatari, Y. O., et al. (2013) FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice, *Autophagy*, **9**, 1386-1394, doi: 10.4161/auto.25381.
44. Park, K., Sonn, S. K., Seo, S., Kim, J., Hur, K. Y., Oh, G. T., et al. (2023) Impaired TFEB activation and mitophagy as a cause of PPP3/calcineurin inhibitor-induced pancreatic β -cell dysfunction, *Autophagy*, **19**, 1444-1458, doi: 10.1080/15548627.2022.2132686.
45. Motawi, T. K., Al-Kady, R. H., Senousy, M. A., and Abdelraouf, S. M. (2023) Repaglinide elicits a neuroprotective effect in rotenone-induced Parkinson’ s disease in rats: emphasis on targeting the DREAM-ER stress BiP/ATF6/CHOP trajectory and activation of mitophagy, *ACS Chem. Neurosci.*, **14**, 180-194, doi: 10.1021/acscchemneuro.2c00656.
46. Iacano, A. J., Lewis, H., Hazen, J. E., Andro, H., Smith, J. D., and Gulshan, K. (2019) Miltefosine increases macrophage cholesterol release and inhibits NLRP3-inflammasome assembly and IL-1 β release, *Sci. Rep.*, **9**, 11128, doi: 10.1038/s41598-019-47610-w.
47. Moskal, N., and McQuibban, G. A. (2023) From jeopardy champion to drug discovery; semantic similarity artificial intelligence, *Autophagy*, doi: 10.1080/15548627.2023.2210995.
48. Moskal, N., Visanji, N. P., Gorbenko, O., Narasimhan, V., Tyrrell, H., Nash, J., et al. (2023) An AI-guided screen identifies probucol as an enhancer of mitophagy through modulation of lipid droplets, *PLoS Biol.*, **21**, e3001977, doi: 10.1371/journal.pbio.3001977.
49. Chen, C., and Paw, B. H. (2012) Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates, *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 1459-1467, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.003.
50. Allen, G. F. G., Toth, R., James, J., and Ganley, I. G. (2013) Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy, *EMBO Rep.*, **14**, 1127-1135, doi: 10.1038/embor.2013.168.
51. McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., et al. (2018) Basal mitophagy occurs independently of PINK1 in mouse tissues of high metabolic demand, *Cell Metab.*, **27**, 439-449.e5, doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.008.
52. Nagi, M., Tanabe, K., Nakayama, H., Ueno, K., Yamagoe, S., Umeyama, T., et al. (2016) Iron-depletion promotes mitophagy to maintain mitochondrial integrity in pathogenic yeast *Candida glabrata*, *Autophagy*, **12**, 1259-1271, doi: 10.1080/15548627.2016.1183080.
53. Schiavi, A., Maglioni, S., Palikaras, K., Shaik, A., Strappazzon, F., Brinkmann, V., et al. (2015) Iron-starvation-induced mitophagy mediates lifespan extension upon mitochondrial stress in *C. elegans*, *Curr. Biol.*, **25**, 1810-1822, doi: 10.1016/j.cub.2015.05.059.
54. Hara, Y., Yanatori, I., Tanaka, A., Kishi, F., Lemasters, J. J., Nishina, S., Sasaki, K., and Hino, K. (2020) Iron loss triggers mitophagy through induction of mitochondrial ferritin, *EMBO Rep.*, **21**, e50202, doi: 10.15252/embr.202050202.
55. Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H. I., Campbell, D. G., Gourlay, R., et al. (2012) PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65, *Open Biol.*, **2**, 120080, doi: 10.1098/rsob.120080.
56. Savulescu, J. (2004) Thalassaemia major: the murky story of deferiprone, *BMJ*, **328**, 358-359, doi: 10.1136/bmj.328.7436.358.

57. Lyamzaev, K. G., Tokarchuk, A. V., Panteleeva, A. A., Mulkidjanian, A. Y., Skulachev, V. P., and Chernyak, B. V. (2018) Induction of autophagy by depolarization of mitochondria, *Autophagy*, **14**, 921-924, doi: 10.1080/15548627.2018.1436937.
58. Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M. N. (2011) Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 868-880, doi: 10.1038/nrd3531.
59. Huang, S., Yang, Z. J., Yu, C., and Sinicrope, F. A. (2011) Inhibition of mTOR kinase by AZD8055 can antagonize chemotherapy-induced cell death through autophagy induction and down-regulation of p62/sequestosome 1, *J. Biol. Chem.*, **286**, 40002-40012, doi: 10.1074/jbc.M111.297432.
60. Li, X., Li, Z., Song, Y., Liu, W., and Liu, Z. (2018) The mTOR kinase inhibitor CZ415 inhibits human papillary thyroid carcinoma cell growth, *Cell Physiol. Biochem.*, **46**, 579-590, doi: 10.1159/000488625.
61. Xie, J., Li, Q., Ding, X., and Gao, Y. (2018) Targeting mTOR by CZ415 Inhibits Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells, *Cell Physiol. Biochem.*, **46**, 676-686, doi: 10.1159/000488724.
62. Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., et al. (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1, *J. Biol. Chem.*, **284**, 8023-8032, doi: 10.1074/jbc.M900301200.
63. Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D., et al. (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2, *PLoS Biol.*, **7**, e38, doi: 10.1371/journal.pbio.1000038.
64. Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy*, **8**, 445-544, doi: 10.4161/auto.19496.
65. Chung, C. Y.-S., Shin, H. R., Berdan, C. A., Ford, B., Ward, C. C., Olzmann, J. A., et al. (2019) Covalent targeting of the vacuolar H⁺-ATPase activates autophagy via mTORC1 inhibition, *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 776-785, doi: 10.1038/s41589-019-0308-4.
66. Floto, R. A., Sarkar, S., Perlstein, E. O., Kampmann, B., Schreiber, S. L., and Rubinsztein, D. C. (2007) Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages, *Autophagy*, **3**, 620-622, doi: 10.4161/auto.4898.
67. Seidel, K., Siswanto, S., Fredrich, M., Bouzrou, M., Brunt, E. R., van Leeuwen, F. W., et al. (2016) Polyglutamine aggregation in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 3: similar mechanisms in aggregate formation, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **42**, 153-166, doi: 10.1111/nan.12253.
68. Kovács, T., Billes, V., Komlós, M., Hotzi, B., Manzéger, A., Tarnóci, A., et al. (2017) The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms, *Sci. Rep.*, **7**, 42014, doi: 10.1038/srep42014.
69. Long, J., Luo, X., Fang, D., Song, H., Fang, W., Shan, H., et al. (2022) Discovery of an autophagy inducer J3 to lower mutant huntingtin and alleviate Huntington's disease-related phenotype, *Cell Biosci.*, **12**, 167, doi: 10.1186/s13578-022-00906-3.
70. Yu, M., Zeng, M., Pan, Z., Wu, F., Guo, L., and He, G. (2020) Discovery of novel akt1 inhibitor induces autophagy associated death in hepatocellular carcinoma cells, *Eur. J. Med. Chem.*, **189**, 112076, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112076.
71. Du, Y., Wang, H. L., Zhao, S.-Hu., and Zhang, X.-J. (2022) Discovery a novel hybrid with resveratrol and hans ester derivatives as activators induce autophagic cell death in tumoral NCI-H460 cells through production of ROS, *Res. Sq.*, doi: 10.21203/rs.3.rs-1329819/v1.
72. Hafez, H. N., Abbas, H.-A. S., and El-Gazzar, A.-R. B. A. (2008) Synthesis and evaluation of analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic activities of some triazolo- and 2-pyrazolyl-pyrido[2,3-d]-pyrimidines, *Acta Pharm.*, **58**, 359-378, doi: 10.2478/v10007-008-0024-1.
73. Sayed, H. H., Morsy, E. M. H., and Flefel, E. M. (2010) Synthesis and reactions of some novel Nicotinonitrile, Thiazolotriazole, and Imidazolotriazole derivatives for antioxidant evaluation, *Synthetic Commun.*, **40**, 1360-1370, doi: 10.1080/00397910903079631.
74. Hsieh, C.-Y., Li, L.-H., Lam, Y., Fang, Z., Gan, C. H., Rao, Y. K., et al. (2020) Synthetic 4-hydroxy Auxarconjugatin B, a novel autophagy inducer, attenuates gouty inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome, *Cells*, **9**, E279, doi: 10.3390/cells9020279.
75. Luo, G., Jian, Z., Zhu, Y., Zhu, Y., Chen, B., Ma, R., et al. (2019) Sirt1 promotes autophagy and inhibits apoptosis to protect cardiomyocytes from hypoxic stress, *Int. J. Mol. Med.*, **43**, 2033-2043, doi: 10.3892/ijmm.2019.4125.
76. Sun, T., Hu, Y., He, W., Shang, Y., Yang, X., Gong, L., et al. (2020) SRT2183 impairs ovarian cancer by facilitating autophagy, *Aging (Albany NY)*, **12**, 24208-24218, doi: 10.18632/aging.104126.
77. Kim, M. J., Kang, Y. J., Sung, B., Jang, J. Y., Ahn, Y. R., Oh, H. J., et al. (2020) Novel SIRT inhibitor, MHY2256, induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagic cell death in HCT116 human colorectal cancer cells, *Biomol. Ther. (Seoul)*, **28**, 561-568, doi: 10.4062/biomolther.2020.153.
78. Viana, R., Aguado, C., Esteban, I., Moreno, D., Viollet, B., Knecht, E., et al. (2008) Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 964-968, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.126.

79. Jaune, E., Cavazza, E., Ronco, C., Grytsai, O., Abbe, P., Tekaya, N., et al. (2021) Discovery of a new molecule inducing melanoma cell death: dual AMPK/MELK targeting for novel melanoma therapies, *Cell Death Dis.*, **12**, 64, doi: 10.1038/s41419-020-03344-6.
80. Pasquier, B. (2015) SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells, *Autophagy*, **11**, 725-726, doi: 10.1080/15548627.2015.1033601.
81. Zhang, L., Fu, L., Zhang, S., Zhang, J., Zhao, Y., Zheng, Y., et al. (2017) Discovery of a small molecule targeting ULK1-modulated cell death of triple negative breast cancer *in vitro* and *in vivo*, *Chem. Sci.*, **8**, 2687-2701, doi: 10.1039/c6sc05368h.
82. Zhu, Z., Liu, L.-F., Su, C.-F., Liu, J., Tong, B. C.-K., Iyaswamy, A., et al. (2022) Corynoxine B derivative CB6 prevents Parkinsonian toxicity in mice by inducing PIK3C3 complex-dependent autophagy, *Acta Pharmacol. Sin.*, **43**, 2511-2526, doi: 10.1038/s41401-022-00871-0.
83. Qiao, C.-M., Sun, M.-F., Jia, X.-B., Shi, Y., Zhang, B.-P., Zhou, Z.-L., et al. (2020) Sodium butyrate causes α -synuclein degradation by an Atg5-dependent and PI3K/Akt/mTOR-related autophagy pathway, *Exp. Cell Res.*, **387**, 111772, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111772.
84. Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., and Nie, D. (2011) Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death, *Cell Death Differ.*, **18**, 602-618, doi: 10.1038/cdd.2010.117.
85. Zhang, J., Yi, M., Zha, L., Chen, S., Li, Z., Li, C., et al. (2016) Sodium butyrate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in colorectal cells: implications for apoptosis, *PLoS One*, **11**, e0147218, doi: 10.1371/journal.pone.0147218.
86. Pant, K., Saraya, A., and Venugopal, S. K. (2017) Oxidative stress plays a key role in butyrate-mediated autophagy via Akt/mTOR pathway in hepatoma cells, *Chem. Biol. Interact.*, **273**, 99-106, doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.001.
87. Zhou, C., Li, L., Li, T., Sun, L., Yin, J., Guan, H., et al. (2020) SCFAs induce autophagy in intestinal epithelial cells and relieve colitis by stabilizing HIF-1 α , *J. Mol. Med. (Berl)*, **98**, 1189-1202, doi: 10.1007/s00109-020-01947-2.
88. Engevik, M. A., Luk, B., Chang-Graham, A. L., Hall, A., Herrmann, B., Ruan, W., et al. (2019) Bifidobacterium dentium fortifies the intestinal mucus layer via autophagy and calcium signaling pathways, *mBio*, **10**, e01087-19, doi: 10.1128/mBio.01087-19.
89. Schulthess, J., Pandey, S., Capitani, M., Rue-Albrecht, K. C., Arnold, I., Franchini, F., et al. (2019) The short chain fatty acid butyrate imprints an antimicrobial program in macrophages, *Immunity*, **50**, 432-445.e7, doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.018.
90. Levine, B., Sinha, S. C., and Kroemer, G. (2008) Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy, *Autophagy*, **4**, 600-606, doi: 10.4161/auto.6260.
91. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., et al. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1, *EMBO J.*, **26**, 2527-2539, doi: 10.1038/sj.emboj.7601689.
92. Escariba Ruiz, P. V., Busquetes Xaubet, X., Teres Jimenez, S., Barcelo Coblijn, G., Llado Canellas, V., Marcilla Etxenike, A., et al. (2010) Patent: Use of derivatives of polyunsaturated fatty acids as medicaments, WO2010106211, 23.09.2010.
93. Erazo, T., Lorente, M., López-Plana, A., Muñoz-Guardiola, P., Fernández-Nogueira, P., García-Martínez, J. A., et al. (2016) The new antitumor drug ABTL0812 inhibits the Akt/mTORC1 axis by upregulating Tribbles-3 pseudokinase, *Clin. Cancer Res.*, **22**, 2508-2519, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1808.
94. Bhagat, V., and Verchere, C. B. (2023) A small molecule improves diabetes in mice expressing human islet amyloid polypeptide, *Islets*, **15**, 12-15, doi: 10.1080/19382014.2022.2163829.
95. Kataura, T., Tashiro, E., Nishikawa, S., Shibahara, K., Muraoka, Y., Miura, M., et al. (2021) A chemical genomics-aggrephagy integrated method studying functional analysis of autophagy inducers, *Autophagy*, **17**, 1856-1872, doi: 10.1080/15548627.2020.1794590.
96. Han, S. and Lee, J.-H. (2020) Novel catechol derivatives or salt thereof, processes for preparing the same, and pharmaceutical compositions comprising the same. Patent: WO2020017878A1, 23.01.2020.
97. Suresh, S. N., Chavalmane, A. K., Pillai, M., Ammanathan, V., Vidyadhara, D. J., Yarreiphang, H., et al. (2018) Modulation of autophagy by a small molecule inverse agonist of ER α is neuroprotective, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 109, doi: 10.3389/fnmol.2018.00109.
98. Ganesh, A., Chaturvedi, P., Sahai, R., Meena, S., Mitra, K., Datta, D., et al. (2020) New Spisulosine Derivative promotes robust autophagic response to cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.*, **188**, 112011, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.112011.
99. Kim, S.-J., Devgan, A., Miller, B., Lee, S. M., Kumagai, H., Wilson, K. A., et al. (2022) Humanin-induced autophagy plays important roles in skeletal muscle function and lifespan extension, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1866**, 130017, doi: 10.1016/j.bbagen.2021.130017.
100. Maestro, I., de la Ballina, L. R., Simonsen, A., Boya, P., and Martinez, A. (2021) Phenotypic assay leads to discovery of mitophagy inducers with therapeutic potential for Parkinson's disease, *ACS Chem. Neurosci.*, **12**, 4512-4523, doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00529.

101. Palomo, V., Perez, D. I., Roca, C., Anderson, C., Rodríguez-Muela, N., Perez, C., et al. (2017) Subtly modulating glyco-
gen synthase kinase 3 β : allosteric inhibitor development and their potential for the treatment of chronic diseases,
J. Med. Chem., **60**, 4983-5001, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00395.
102. Mehellou, Y. (2023) Parkinson's disease: Are PINK1 activators inching closer to the clinic?, *ACS Med. Chem. Lett.*,
14, 870-874, doi: 10.1021/acsmedchemlett.3c00070.
103. Chin, R. M., Rakhit, R., Ditsworth, D., Wang, C., Bartholomeus, J., Liu, S., et al. (2023) Pharmacological PINK1 activa-
tion ameliorates pathology in Parkinson's disease models, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2023.02.14.528378.
104. Cen, X., Xu, X., and Xia, H. (2021) Targeting MCL1 to induce mitophagy is a potential therapeutic strategy for Alzhei-
mer disease, *Autophagy*, **17**, 818-819, doi: 10.1080/15548627.2020.1860542.
105. Gatliff, J., East, D., Crosby, J., Abeti, R., Harvey, R., Craigen, W., et al. (2014) TSPO interacts with VDAC1 and trig-
gers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control, *Autophagy*, **10**, 2279-2296, doi: 10.4161/15548627.
2014.991665.
106. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria
and promotes their autophagy, *J. Cell. Biol.*, **183**, 795-803, doi: 10.1083/jcb.200809125.
107. Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M., and Youle, R. J. (2010) p62/SQSTM1 is required for Parkin-
induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both, *Autophagy*, **6**, 1090-1106,
doi: 10.4161/auto.6.8.13426.
108. Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G. A., and Kim, P. K. (2012) ROS-induced mitochondrial depolarization
initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy, *Autophagy*, **8**, 1462-1476, doi: 10.4161/
auto.21211.
109. Kenwood, B. M., Weaver, J. L., Bajwa, A., Poon, I. K., Byrne, F. L., Murrow, B. A., et al. (2014) Identification of a novel
mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane, *Mol. Metab.*, **3**, 114-123, doi: 10.1016/
j.molmet.2013.11.005.
110. Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., et al. (2013) Cardiolipin externalization to the
outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells, *Nat. Cell. Biol.*, **15**,
1197-1205, doi: 10.1038/ncb2837.
111. Dagda, R. K., Zhu, J., Kulich, S. M., and Chu, C. T. (2008) Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and
autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease, *Autophagy*, **4**, 770-782, doi: 10.4161/auto.6458.
112. Palikaras, K., Lionaki, E., and Tavernarakis, N. (2015) Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis
during ageing in *C. elegans*, *Nature*, **521**, 525-528, doi: 10.1038/nature14300.
113. Zhu, J. H., Gusdon, A. M., Cimen, H., Van Houten, B., Koc, E., and Chu, C. T. (2012) Impaired mitochondrial biogenesis
contributes to depletion of functional mitochondria in chronic MPP⁺ toxicity: dual roles for ERK1/2, *Cell Death Dis.*,
3, e312, doi: 10.1038/cddis.2012.46.
114. Hoshino, A., Ariyoshi, M., Okawa, Y., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., et al. (2014) Inhibition of p53 preserves
Parkin-mediated mitophagy and pancreatic β -cell function in diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 3116-3121,
doi: 10.1073/pnas.1318951111.
115. Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., et al. (2013) Cytosolic p53 inhibits
Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart, *Nat. Commun.*, **4**, 2308,
doi: 10.1038/ncomms3308.
116. Bensaad, K., Cheung, E. C., and Vousden, K. H. (2009) Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls auto-
phagy, *EMBO J.*, **28**, 3015-3026, doi: 10.1038/emboj.2009.242.
117. East, D. A., Fagiani, F., Crosby, J., Georgakopoulos, N. D., Bertrand, H., Schaap, M., et al. (2014) PMI: a $\Delta\Psi_m$ indepen-
dent pharmacological regulator of mitophagy, *Chem. Biol.*, **21**, 1585-1596, doi: 10.1016/j.chembiol.2014.09.019.
118. Zhu, S., Hu, X., Bennett, S., Xu, J., and Mai, Y. (2022) The molecular structure and role of humanin in neural and
skeletal diseases, and in tissue regeneration, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 823354, doi: 10.3389/fcell.2022.823354.
119. Bosch-Barrera, J., Moran, T., Estévez-García, P., Martín-Martorell, P., Sabatier, R., Nadal, E., et al. (2023)
Phase 2 clinical trial of the proautophagic drug ABTL0812 combined with paclitaxel and carboplatin in
first-line patients with advanced squamous non-small cell lung carcinoma, *JCO*, **41**, 9059-9059, doi: 10.1200/
JCO.2023.41.16_suppl.9059.
120. Ji, C. H., Kim, H. Y., Lee, M. J., Heo, A. J., Park, D. Y., Lim, S., et al. (2022) The AUTOTAC chemical biology plat-
form for targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system, *Nat. Commun.*, **13**, 904, doi: 10.1038/
s41467-022-28520-4.
121. Li, Z., Zhu, C., Ding, Y., Fei, Y., and Lu, B. (2020) ATTEC: a potential new approach to target proteinopathies, *Autoph-
agy*, **16**, 185-187, doi: 10.1080/15548627.2019.1688556.
122. Korolenko, T. A., Ovsyukova, M. V., Bgatova, N. P., Ivanov, I. D., Makarova, S. I., Vavilin, V. A., et al. (2022) Trehalose
activates hepatic and myocardial autophagy and has anti-inflammatory effects in db/db diabetic mice, *Life (Basel)*,
12, 442, doi: 10.3390/life12030442.

123. Korolenko, T. A., Dubrovina, N. I., Ovsyukova, M. V., Bgatova, N. P., Tenditnik, M. V., Pupyshev, A. B., et al. (2021) Treatment with autophagy inducer trehalose alleviates memory and behavioral impairments and neuroinflammatory brain processes in db/db mice, *Cells*, **10**, 2557, doi: 10.3390/cells10102557.
124. Lipatova, A., Krasnov, G., Vorobyov, P., Melnikov, P., Alekseeva, O., Vershinina, Y., et al. (2021) Effects of Siberian fir terpenes extract Abisil on antioxidant activity, autophagy, transcriptome and proteome of human fibroblasts, *Aging (Albany NY)*, **13**, 20050-20080, doi: 10.18632/aging.203448.

SYNTHETIC ACTIVATORS OF AUTOPHAGY

Review

E. A. Guseva^{1,2,3*#}, J. A. Pavlova^{1,2,3#}, O. A. Dontsova^{1,2,3,4}, and P. V. Sergiev^{1,2,3,5*}

¹ Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology,
143025 Skolkovo, Russia; e-mail: petya@genebee.msu.ru; eguseva98@mail.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia

³ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁴ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁵ Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Autophagy is a central process for the degradation of intracellular components that work with disorders. The molecular mechanisms underlying this process are extremely difficult to study, since they involve a large number of participants. The main task of autophagy is the redistribution of cellular resources in response to environmental changes, such as starvation. Recent studies show that the regulation of autophagy may be the key to achieving healthy longevity, as well as to create therapeutic agents for the treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. Thus, the development of autophagy activators with a detailed mechanism of action is a really important direction for research. Several commercial companies are at various stages of development of such molecules, and some of them have already begun to use autophagy activators in practice.

Keywords: autophagy activators, mitophagy, mTOR, torin 1, FCCP

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО КОНТЕКСТА НА ПРОТЕКАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ Bst EHO-

© 2024 Р.Р. Гарафутдинов*, О.Ю. Купова, А.Р. Сахабутдинова

Институт биохимии и генетики

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
450054 Уфа, Башкортостан, Россия; электронная почта: garafutdinovr@gmail.com

Поступила в редакцию 11.09.2023

После доработки 30.11.2023

Принята к публикации 02.12.2023

В последние годы всё большее распространение приобретают методы амплификации нуклеиновых кислот, протекающие в изотермическом режиме и требующие использования ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Среди таковых наиболее популярной является полимеразы Bst ехо-, однако она склонна вести неспецифический синтез ДНК посредством мультимеризации. В данной работе показано влияние нуклеотидной последовательности на прочность связывания Bst ехо- с ДНК и на эффективность запуска мультимеризации. На моделях одноцепочечных три-нуклеотидов (sst) и динуклеотидных дуплексов (dst) методом молекулярного докинга выявлена предпочтительность связывания «закрытой» формы Bst ехо- с пури-н-богатыми последовательностями, особенно содержащими dG на 3'-конце растущей цепи. Данные, полученные *in silico*, подтверждены в экспериментах с использованием олигонуклеотидных матриц, различающихся структурой 3'- и 5'-концевых мотивов. Показано, что матрицы с олигопуриновым 3'-концевым фрагментом и олигопиримидиновой 5'-концевой частью способствуют более раннему запуску мультимеризации. Полученные данные могут быть использованы на этапе выбора оптимальных нуклеотидных последовательностей для изотермической амплификации, обеспечивающих получение более достоверных результатов. Так, для исключения мультимеризации следует избегать ДНК-матриц и праймеров, содержащих концевые нуклеотиды dA и/или dG.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-полимераза Bst ехо-, изотермическая амплификация, мультимеризация, специфичность, молекулярный докинг.

DOI: 10.31857/S0320972524010039 EDN: YRM1AM

ВВЕДЕНИЕ

Амплификация нуклеиновых кислот (НК) – основа молекулярно-биологических и генетических исследований, методов геномной инженерии, ДНК/РНК-диагностики. Наиболее используемым методом амплификации НК является полимеразная цепная реакция, однако в силу ряда причин, ограничивающих её применение, были разработаны подходы, не требующие термоциклирования (изотермическая амплификация) [1–3]. Для проведения изотермической амплификации необходимы ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, обеспечивающие денатурацию двуцепочечной ДНК при умеренной (50–60 °C) температуре.

В настоящее время коммерчески доступны различные ДНК- и РНК-полимеразы [4]. Среди цепь-вытесняющих полимераз чаще всего используется Bst ехо- (большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*), обладающая сильной цепь-вытесняющей активностью, умеренной термостабильностью и высокой процессивностью [5], но склонная вести синтез побочных продуктов посредством мультимеризации (ММ) [6, 7].

ММ – наиболее изученная реакция неспецифической изотермической амплификации, приводящая к наработке характерных продуктов (мультимеров): набора ампликонов кратной длины, состоящих из tandemных олигонуклеотидных повторов [7]. Согласно работе Wang et al. [8],

Принятые сокращения: а/к – аминокислоты; ЛМ – линейная матрица; ММ – мультимеризация; dst – двуцепочечный тринуклеотид; sb – ионные связи (солевые мостики); sst – одноцепочечный тринуклеотид.

* Адресат для корреспонденции.

ММ начинается с образования псевдоциклической ДНК-структуры благодаря частичной денатурации ампликонов («дыханию» цепей ДНК) с последующим изгибом свободных 3'-концов и их отжигом на противоположной части дуплекса. Показано, что этот процесс обусловлен ионным взаимодействием фосфатного остова синтезируемых цепей ДНК с поверхностными аминогруппами полимеразы [9]. Были определены условия, способствующие инициации ММ. Так, более ранний запуск ММ наблюдается при использовании полимеразы Bst 2.0 («New England Biolabs», США), для ДНК-матриц длиной около 50 нт, при наличии в реакционной смеси восстанавливающих агентов (например, β-меркаптоэтанола), при температуре 55–60 °С, при пониженном содержании интеркалирующих красителей [7]. Протекание ММ не позволяет дифференцировать результаты амплификации специфической мишени и реакции неспецифического синтеза, что резко снижает достоверность НК-анализа, основанного на изотермической амплификации [10, 11]. В частности, в условиях реакции EXPAR, протекающей под действием Bst эхо- в присутствии никующих эндонуклеаз (никаз) [12], тестовые образцы и образцы отрицательного контроля демонстрируют близкие значения порогового времени (Tt), соответствующего началу экспоненциальной стадии накопления детектируемого количества продуктов амплификации [13]. Для данной реакции было показано, что более ранний старт неспецифической амплификации наблюдается для ДНК-матриц, богатых пуриновыми нуклеотидами [14].

Хотя были предложены различные способы предотвращения ММ [9, 15–17], потребность в получении достоверных результатов обуславливает проведение дальнейших исследований, посвящённых подробному изучению свойств ДНК-полимеразы Bst эхо-. Целью данной работы стали изучение предпочтительности связывания ДНК-полимеразы Bst эхо- с определёнными нуклеотидными последовательностями и оценка влияния первичной структуры ДНК-матриц на эффективность запуска ММ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярный докинг проводился с использованием пакета программ Schrodinger Suite 2016-4 [18], как описано в работе Garafutdinov et al. [19]. Были взяты три пространственные структуры ДНК-полимеразы Bst эхо- из базы данных PDB: 1L3S («открытая»), 2HVI («полуоткрытая») и 1LV5 («закрытая»). Молекулярную структуру полимеразы подготавливали для расчётов с помощью модуля Protein Preparation Wizard [20, 21], устраняя такие неточности, как отсутствующие атомы водорода,

ошибочный порядок связей, неверная ориентация боковых групп. Исходные ДНК-дуплексы были удалены из структур комплексов. Одноцепочечные тринуклеотиды (sst) и двуцепочечные тринуклеотиды (dst) моделировали с помощью приложения Discovery Studio v.4.1 Visualizer («Dassault Systèmes», Франция) и далее подготавливали для расчётов с помощью модуля LigPrep. Комплексы «ДНК–ДНК-полимераза» рассчитывали с помощью модуля Glide Docking. Точность расчётов была выбрана как XP Docking.

Использованные реагенты: ДНК-полимераза Bst LF (Bst Large Fragment), буферы Thermopol и Isothermal, ДНК-маркер 50 bp DNA Ladder («New England Biolabs»), буфер для ДНК-полимеразы Taq («СибЭнзим», Россия), ДНТФ («Биолабмикс», Россия), интеркалирующий краситель dsGreen («Люми-проб», Россия), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, Tris, персульфат аммония, динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Sigma», Германия). Все растворы готовили на воде высшей категории качества (> 18 МОм) («Millipore», Франция).

Олигонуклеотидные матрицы и праймеры конструировали в инструменте OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) и анализировали с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на предмет отсутствия их гомологии с какими-либо известными нуклеотидными последовательностями. Олигонуклеотиды синтезировали в ООО «Синтол» (Россия), их последовательности приведены в табл. 1.

Амплификационные эксперименты проводили следующим образом. Образцы для амплификации готовили в ПЦР-боксе UVC/TM-AR («Biosan», Латвия), предварительно облучая рабочее пространство, дозаторы и пластиковую посуду ультрафиолетом в течение 20 мин. Реакцию ММ проводили в приборе iQ5 («Bio-Rad Laboratories», США). Образцы объёмом 10 мкл содержали 10⁷ копий ДНК-матрицы, 5 пмоль каждого праймера, 1 мкл смеси ДНТФ с концентрацией 2,5 мМ каждого, 3,0 ед. акт. ДНК-полимеразы Bst LF, 1× буфер ДНК-полимеразы, 0,1× dsGreen. Программа амплификации состояла из следующих этапов: 1) 70 °С – 30 с, 2) 65 °С – 60 с, 3) 60 °С – 3 ч. Каждый образец был представлен в трёх повторах. Результаты ММ анализировали дополнительно с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в системе GelDoc XR («Bio-Rad Laboratories»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при изучении ММ, протекающей под действием ДНК-полимеразы Bst эхо-, нами было

Таблица 1. Используемые олигонуклеотидные ДНК-матрицы и праймеры к ним*

№№	Шифр	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт	T _{отж.} **, °C
1	ЛМ1	GTCACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCTCGTCGACAGCCTACATTGCAGA	51	27,3/22,3
2	ЛМ2	CTCTCTCTCTCGCTGACGTGCTCAGTGTCTCGTCGACAGCCTAAGGAGAAGA	51	20,3/19,8
3	ЛМ3	AGGAGAAGACTGCTGACGTGCTCAGTGTCTCGTCGACAGCCTACTCTTCCTC	51	19,8/21,3
4	ЛМ4	CTGCCGCGACTGCTGACGTGCTCAGTGTCTCGTCGACAGCCTACTATTATTA	51	40,1/0,7
5	ЛМ5	ATTATTATACTGCTGACGTGCTCAGTGTCTCGTCGACAGCCTACGCGGCCGC	51	0,0/50,4
6	ЛМ6	CAGACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCTCGTCGACAGCCTACATTGCAGA	51	26,6/22/3
7	F1	GTCACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGT	26	61,6
8	F2	CTCTCTCTCTCGCTGACGTGCTCAGT	26	63,1
9	R2	TCTTCTCCTTAGGCTGTACGACGAC	25	59,5
10	F3	AGGAGAAGACTGCTGACGTGCTCAGT	26	63,1
11	R3	GAGGAAGAGTAGGCTGTACGACGAC	25	60,0
12	F4	CTGCCGCGACTGCTGACGTGCTCAGT	26	68,3
13	R4	TAATAATAGTAGGCTGTACGACGAC	25	53,6
14	F5	ATTATTATACTGCTGACGTGCTCAGT	26	56,0
15	R5	GCGGCCGCGTAGGCTGTACGACGAC	25	68,9
16	F6	CAGACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGT	26	61,4
17	R1/6	TCTGCAATGTAGGCTGTACGACGAC	25	60,5

* Подчёркиванием отмечена последовательность, общая для всех матриц, курсивом выделена последовательность, общая для матриц ЛМ2–ЛМ5.

** T_{отж.} – температура отжига 5'-/3'-концевых мотивов (выделены жирным шрифтом), найдена с помощью OligoAnalyzer.

обнаружено различие во времени начала экспоненциальной стадии данной реакции (соответствует началу накопления детектируемого количества продуктов) при использовании в качестве ДНК-матриц олигонуклеотидов одинаковой длины (около 50 нт), но разного нуклеотидного состава [7, 16]. На примере реакции EXPAR зарубежными авторами было показано, что величина порогового времени для образцов отрицательного контроля, в которых протекал неспецифический ДНК-синтез, также зависит от первичной структуры используемых ДНК-матриц [14]. Вероятно, сила взаимодействия (прочность связывания) полимеразы Bst *exo*- с теми или иными нуклеотидами для матриц с разным нуклеотидным составом варьирует настолько, что может обуславливать заметное различие в скорости образования и/или стабильности соответствующих фермент-субстратных комплексов, иницирующих запуск неспецифического ДНК-синтеза. Таким образом, изотермическая амплификация в этом случае будет контекстно-зависимой.

Для проверки справедливости данного предположения нами изучены комплексы полимеразы Bst *exo*- с ДНК с помощью молекулярного докинга и оценена эффективность запуска ММ, выраженная в значениях порогового времени T_t для матриц с различающимся нуклеотидным составом концевых мотивов. Для молекулярного докинга брали три конформационные формы Bst *exo*-: «открытую» (PDB: 1L3S), «полуоткрытую» (2HVI) и «закрытую» (1LV5). «Открытая» форма фермента соответствует состоянию связывания полимеразы с двуцепочечной ДНК, «полуоткрытая» – оптимизации конформации активного центра перед присоединением нуклеотида, «закрытая» – каталитическому событию, т.е. в момент присоединения конкретного нуклеотида к растущей цепи [22]. Для проведения *in silico* исследований использовали программный пакет Schrodinger Suite 2016-4, который позволяет вести расчёты для замороженных состояний молекул. Поскольку целью данной части работы было определение параметров связывания полимеразы

этот показатель имеет отрицательные значения. Для всех 384 структур были получены отрицательные значения *docking score* (приведены в табл. П1 дополнительных материалов). В случае *sst* величина *docking score* принимает значения от -8,147 до -3,150 для 1L3S, от -10,413 до -2,451 для 2HVI и от -11,485 до -6,179 для 1LV5, в случае *dst* – от -8,617 до -1,944, от -8,733 до -2,470 и от -10,969 до -1,626 соответственно. Бóльший диапазон значений в случае *dst* объясняется, по всей видимости, меньшим числом возможных для таких ДНК-структур степеней свободы ввиду их двуцепочечного строения, что приводит к снижению количества доступных конформационных состояний, в которых может реализоваться большее число химических взаимодействий в пределах комплекса. В целом, средние значения *docking score* как для *sst*, так и

для *dst* оказались достаточно близки и не наблюдалось явной предпочтительности связывания полимеразы с определёнными тринуклеотидами. Однако после нахождения средних значений *docking score* при рассмотрении только ключевых нуклеотидов (центрального, N2, как связанного с 3'-концевым нуклеотидом растущей цепи, и N3 (5'-концевого), как определяющего тип присоединяемого к растущей цепи нуклеотида) предпочтительность связывания проявилась чётче (табл. П2 дополнительных материалов). Более прочными оказались комплексы, содержащие в ДНК-структурах пиримидиновые нуклеотиды: dC и dT в положениях N2 и N3 для *sst* и dC в положении N2 для *dst* (рис. 2).

По-видимому, на прочность связывания ДНК с ферментом оказывает влияние гидрофобность азотистых оснований, которая максимальна у ци-

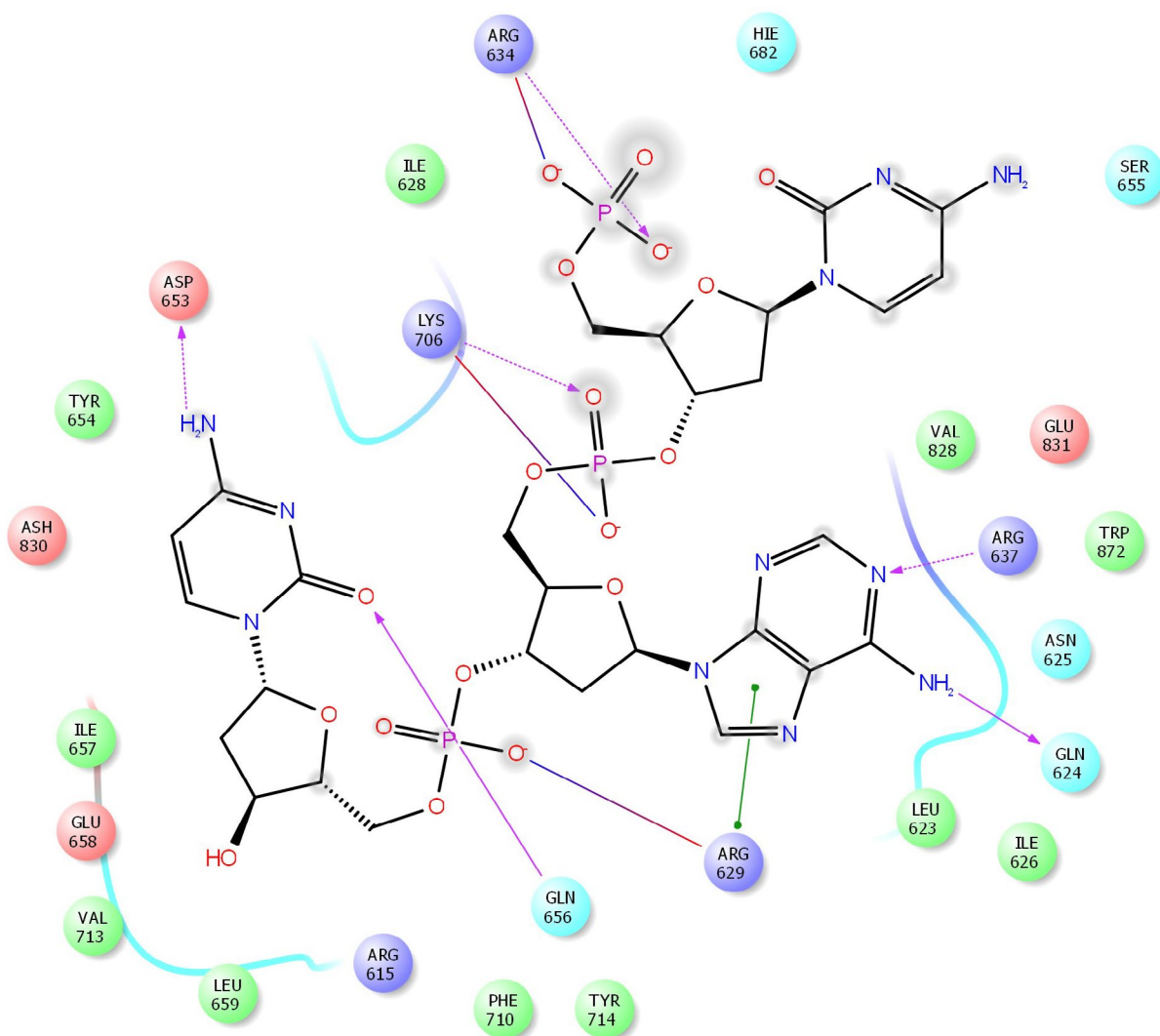


Рис. 3. Диаграмма взаимодействия лигандов на примере комплекса Bst *exo-* с *dst* (в качестве примера приведён тринуклеотид 5'-CAC-3'). В виде сфер представлены а/к: фиолетовые сферы – а/к, несущие положительно заряженные группы, голубые – содержащие полярные группы, зелёные – гидрофобные, красные – несущие отрицательно заряженные группы; цветными линиями и стрелками показаны химические взаимодействия между а/к и окружением: красные стрелки – ионные связи (солевые мостики, sb), синие – водородные связи (H), отсутствие стрелок – прочие слабые взаимодействия (+)

Таблица 2. Значения *docking score*, найденные для комплексов Bst *exo*- (форма 1LV5) с ДНК

Нуклеотид N3	Нуклеотид N2	Нуклеотид N1							
		dA		dC		dG		dT	
		sst	dst	sst	dst	sst	dst	sst	dst
dA	dA	-7,176	-4,592	-7,524	-6,289	-7,162	-8,920	-7,292	-7,423
	dC	-7,204	-9,459**	-7,445	-9,911	-7,161	-9,361	-8,170	-9,219
	dG	-7,251*	-6,117	-7,605	-5,776	-8,480	-10,329	-7,643	-5,280
	dT	-7,169	-3,223	-8,353	-6,137	-7,870	-4,545	-7,699	-1,626
dC	dA	-6,989	-6,114	-7,022	-3,971	-6,179	-6,095	-6,982	-7,335
	dC	-10,743	-9,838	-9,536	-10,034	-7,015	-10,022	-9,811	-10,043
	dG	-7,468	-9,298	-6,925	-9,571	-6,914	-10,119	-7,193	-5,506
	dT	-8,371	-10,969	-10,610	-6,381	-7,179	-6,600	-9,509	-4,097
dG	dA	-7,606	-7,354	-7,865	-6,139	-7,212	-6,759	-6,868	-4,806
	dC	-6,640	-9,926	-7,362	-4,841	-7,874	-9,628	-7,709	-4,541
	dG	-8,001	-5,318	-7,886	-7,772	-7,203	-8,030	-7,920	-6,616
	dT	-7,409	-6,771	-6,890	-6,879	-7,354	-7,786	-7,679	-4,856
dT	dA	-7,196	-6,585	-7,309	-5,102	-6,875	-8,494	-6,844	-3,993
	dC	-10,502	-9,848	-9,321	-3,713	-7,616	-10,628	-9,911	-10,399
	dG	-7,104	-6,306	-7,073	-3,752	-6,946	-3,774	-8,562	-3,832
	dT	-11,485	-4,870	-8,670	-3,092	-7,744	-9,705	-11,067	-8,361
Минимальное значение (MIN)		-11,485	-10,969	-10,610	-10,034	-8,480	-10,628	-11,067	-10,399
Максимальное значение (MAX)		-6,640	-3,223	-6,890	-3,092	-6,179	-3,774	-6,844	-1,626
Δ (MAX-MIN)		4,845	7,746	3,720	6,942	2,301	6,854	4,223	8,773
Среднее значение		-8,020	-7,287	-7,962	-6,210	-7,299	-8,175	-8,179	-6,121
Стандартное отклонение		1,500	2,314	1,073	2,204	0,530	2,096	1,256	2,486

* Жирным шрифтом выделены максимальные в группе (в четвёрках соответствующих тринуклеотидов с переменным N2) значения *docking score*.

** Серой заливкой выделены ячейки, соответствующие максимальному значению *docking score* для структур, содержащих dC в положении N2.

тозина и минимальна у аденина [23, 24]. Ранее уже было показано влияние структуры и состава полинуклеотидов на эффективность синтеза ДНК *in vitro* [25, 26], однако данный феномен требует дальнейшего более детального изучения.

Наиболее ярко зависимость взаимодействия фермента с ДНК от нуклеотидного контекста выражена для «закрытой» формы полимеразы 1LV5 с *dst*. Согласно расчётам, для данных комплексов

наблюдается наибольший разброс между минимальным и максимальным значениями *docking score* (табл. 2). Среди 16 структур, содержащих dC в положении N2, 10 структур характеризуются минимальной величиной *docking score* в своих группах (четвёрках тринуклеотидов *dst*). Такое строение соответствует наличию dG на 3'-конце противоположной цепи, что свидетельствует о предпочтительности связывания Bst *exo*- с dG-богатыми ДНК.

Природа химических взаимодействий, стабилизирующих комплексы, была определена на основании диаграмм взаимодействия лигандов (ДВЛ) – 2D-изображений, на которых аминокислоты (а/к) представлены в виде сфер, окрашенных в соответствии с их химическими свойствами (рис. 3).

ДВЛ не отображают расстояния между взаимодействующими группами или атомами и показывают только связи в комплексе между лигандом и рецептором. Оказалось, что Bst *exo*- связывается с модельными ДНК посредством ионных (sb) и водо-

родных (Н) связей и слабых взаимодействий (+). Для всех изученных комплексов ДВЛ позволили определить точки взаимодействия полимеразы с ДНК (данные для 10 наименее стабильных и 10 наиболее стабильных комплексов полимеразы с *dst* приведены в табл. 3, полные данные представлены в табл. ПЗ дополнительных материалов). В целом, количество а/к, образующих связи какого-либо из перечисленных типов, достигает нескольких десятков. Максимальное число sb составило 6 в комплексе Bst *exo*- с 5'-ТАА-3', однако

Таблица 3. Тип и количество химических связей в комплексах Bst *exo*- (форма 1LV5) с *dst* (приведены данные для 10 комплексов с наибольшим и 10 комплексов с наименьшим значением *docking score*)

№№	dst, 3'→5'	<i>docking score</i>	Тип и количество химических связей				Индекс связывания, R	Количество нуклеотидов			
			sb1*	sb2**	H**	(+)**		dA	dG	dC	dT
1	CTA	-10,97	1	2	7	25	35	1		1	1
2	TCG	-10,63	2	2	8	24	36		1	1	1
3	TCT	-10,40	2	4	6	20	32			1	2
4	AGG	-10,33	2	4	8	20	34	1	2		
5	CGG	-10,12	1	3	7	21	32		2	1	
6	CCT	-10,04	2	3	7	23	35			2	1
7	CCC	-10,03	1	3	7	23	34			3	
8	CCG	-10,02	1	3	9	22	35		1	2	
9	GCA	-9,926	1	2	5	23	31	1	1	1	
10	ACC	-9,911	2	2	7	22	33	1		2	
...								4	7	14	5
55	CTT	-4,097	1	3	2	20	26			1	2
56	TAT	-3,993		3	3	18	24	1			2
57	CAC	-3,971		3	3	19	25	1		2	
58	TGT	-3,832	1	3	2	22	28		1		2
59	TGG	-3,774	1	2	2	21	26		2		1
60	TGC	-3,752	1	3	2	21	27		1	1	1
61	TCC	-3,713	1	3	1	17	22			2	1
62	ATA	-3,223	1	2	5	14	22	2			1
63	TTC	-3,092	1	3	5	17	26			1	2
64	ATT	-1,626	1	2	3	21	27	1			2
								5	4	7	14

* sb1 – ионные связи между катионом металла (Mn²⁺) и ДНК.

** Химические связи между ДНК и а/к: sb – ионные связи, H – водородные связи, (+) – слабые взаимодействия.

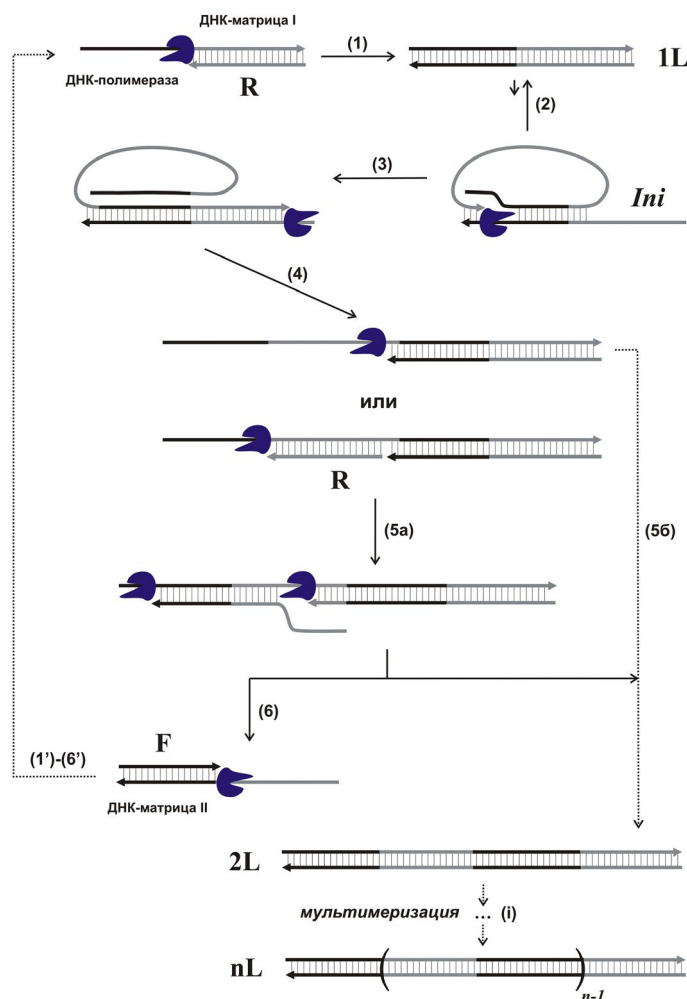


Рис. 4. Схема протекания мультимеризации: отжиг и удлинение праймера R на ДНК-матрице I, приводящие к образованию двуцепочечного продукта длиной 1L (этап 1), образование псевдоциклической ДНК-структуры *Ini* (этап 2), элонгация цепей в *Ini*, формирование двуцепочечного продукта длиной 2L (этапы 3, 4 и 5b) или отжиг и элонгация праймера R (этапы 3, 4 и 5a), образование матрицы II (этап 5a), вытеснение ДНК-матрицы I (этап 5b) и отжиг на ней праймера F (этап 6), формирование полноразмерных ампликонов с тандемными нуклеотидными последовательностями (этапы *i*). Праймер F и комплементарные ему участки показаны черным цветом, праймер R и комплементарные ему участки – серым

данная структура по величине *docking score* не входит в группу 10 наиболее стабильных. На основании данных о количестве взаимодействий были определены индексы связывания R по формуле: $R = sb + H + (+)$. R является интегральным показателем, характеризующим стабильность комплексов в целом. Оказалось, что для 10 наименее прочных комплексов Bst *exo*- с *dst* значения R не превышали 30 единиц, в то время как для 10 наиболее прочных они были выше этой величины (табл. 3). В наименее прочных структурах повышено содержание нуклеотида dT, а в наиболее прочных – dC в нижней трёхнуклеотидной цепи. При этом в *dst* первой из указанных групп в среднем положении триплета заметно чаще находятся dT (4 варианта из 10) и dG (3 варианта), в *dst* второй группы – dC (7 вариантов). В 6 структурах из 10, входящих в группу наиболее стабильных комплексов, верх-

няя цепь содержит 2 пуриновых нуклеотида (оба 3'-концевые), а в трёх присутствует хотя бы один пуриновый нуклеотид. Таким образом, согласно проведённому анализу химических взаимодействий, прочность связывания Bst *exo*- с ДНК зависит от вида нуклеотидов и для пурин-богатых последовательностей обеспечивает более эффективный запуск реакций побочного ДНК-синтеза. Результаты моделирования полностью коррелируют с ранее полученными экспериментальными данными [14]. По-видимому, для исключения протекания неспецифической амплификации следует избегать ДНК-структур, содержащих концевые нуклеотиды dA и/или dG.

Результаты *in silico* исследований свидетельствуют о несколько большей прочности связывания Bst *exo*- с пурин-богатыми ДНК-последовательностями. Такая предпочтительность связывания

фермента с ДНК не проявляется, по-видимому, в заметной степени при запуске обычных реакций амплификации и непосредственно в ходе синтеза ДНК, протекание которых чётко детерминировано образованием матриц и праймерами значительного количества прочных вторичных структур. Однако в случае ММ запуск реакции является событием, характеризующимся малой математической вероятностью, поскольку зависит от факторов, влияющих на образование триггерной молекулярной структуры (инициаторного комплекса). ММ протекает следующим образом (рис. 4). Сначала один из праймеров (обозначен как R) отжигается на исходной линейной матрице (ЛМ) I и удлинняется ДНК-полимеразой, в результате чего на первом этапе реакции образуется первичный короткий ДНК-дуплекс (этап 1). Далее за счёт «дыхания» цепей и ионного взаимодействия фосфатных групп ДНК с поверхностными аминогруппами фермента происходит изгиб свободных 3'-концов и их отжиг на противоположной части дуплекса, приводящий к образованию псевдоциклической ДНК-структуры – инициаторного комплекса *Ini* (этап 2). Элонгация *Ini* даёт продукт с удвоенной нуклеотидной последовательностью и запускает ММ (этапы 3–5, 6). Включение в реакцию второго праймера (обозначен как F) переводит её в экспоненциальный режим (этапы 6 и i).

Этап 2 лимитирует протекание ММ, поскольку формирование *Ini* – маловероятное событие. При определённых условиях, обеспечивающих «подвижность» концевых участков цепей ДНК и большую стабильность *Ini*, возможно смещение равновесия в сторону его образования. Одним из таких условий может служить, предположительно, более прочное связывание полимеразы с 3'-концевыми нуклеотидами цепей ДНК. Экспериментальную оценку данного предположения проводили с использованием шести линейных олигонуклеотидных матриц ЛМ1–ЛМ6 длиной 51 нт, различающихся составом 3'- и 5'-концевых мотивов и имеющих практически идентичную внутреннюю последовательность (табл. 1). Матрицы конструировали таким образом, чтобы исключить образование ими гомо- и гетеродимерных структур, способных к элонгации и ММ в отсутствие праймеров. ЛМ1 состояла из случайным образом перемежающихся пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Матрица ЛМ2 содержала на 5'-конце пиримидиновые, а на 3'-конце – пуриновые олигонуклеотидные фрагменты длиной 11 и 10 нт соответственно. В ЛМ3 расположение данных фрагментов было противоположным. ЛМ4 и ЛМ5 имели dA/dT- или dG/dC-богатые концы, а ЛМ6 содержала идентичные четырёхнуклеотидные мотивы на 5'- и 3'-концах. Такая структура обеспечивает максимальную стабильность *Ini* за счёт комплементарности 3'-концов

цепей и, как следствие, повышение вероятности запуска ММ, что было использовано нами ранее при разработке методов обнаружения микроРНК [27] и вирусной РНК [28]. Стоит отметить, что пуринопиримидиновый состав варьировали не только для 3', но и для 5'-конца матриц, поскольку при элонгации праймера R образуется комплементарная цепь, с которой также возможен запуск ММ.

Изотермическую амплификацию вели в условиях, способствующих, согласно нашим более ранним данным, эффективной инициации ММ (60 °C, пониженная концентрация интеркалирующего красителя SYBR Green I, реакционный буфер с β-меркаптоэтанолом) – для обеспечения её гарантированного протекания для всех матриц и более точной оценки влияния на неё их нуклеотидного состава. Эффективность запуска реакции оценивали по значениям порогового времени Tt. Следует отметить, что ММ, будучи реакцией неспецифической амплификации (протекает в отсутствие специфической мишени), характеризуется значительными величинами Tt (примерно 30–60 мин для «оптимальных» матриц) [7]. В целом, было обнаружено влияние состава 3'-концов ДНК-матриц на величину Tt (рис. 5), позволившее расположить их в следующем порядке: ЛМ6 > ЛМ2 >> ЛМ1 > ЛМ3 >> ЛМ4. Гель-электрофоретический анализ подтвердил образование характерных мультимерных продуктов (рис. 5, вставка). Матрица ЛМ1, имеющая случайный нуклеотидный состав, показала умеренную склонность к ММ. Наибольшую скорость запуска ММ (наименьшее значение Tt) обеспечила ЛМ6, содержащая идентичные мотивы по концам цепи. Чуть менее эффективно реакция инициируется для ЛМ2, несущей олигопуриновую 3'-концевую и олигопиримидиновую 5'-концевую последовательности. В то же время матрица ЛМ3, в которой данные типы фрагментов расположены в обратном порядке, продемонстрировала значительно меньшую склонность к запуску ММ. Показательно, что наименьшие значения Tt обеспечили ЛМ1, ЛМ2 и ЛМ6, содержащие пуриновые нуклеотиды на 3'-конце. Полученные результаты коррелируют с данными *in silico* исследований, согласно которым присутствие пуриновых нуклеотидов в качестве 3'-концевых обеспечивает наиболее высокую стабильность комплексов полимеразы с ДНК.

Для матрицы ЛМ5, имеющей на 3'-конце только нуклеотиды dC и dG (обеспечивают высокую температуру отжига концевого участка), а на 5'-конце – только dA и dT (низкая температура отжига), ММ не протекала, что связано, очевидно, с низкой эффективностью денатурации («дыхания») GC-богатого конца дуплекса. При обратном порядке расположения этих фрагментов (ЛМ4) запуск ММ всё же происходил, но спустя значительное время после начала реакции.

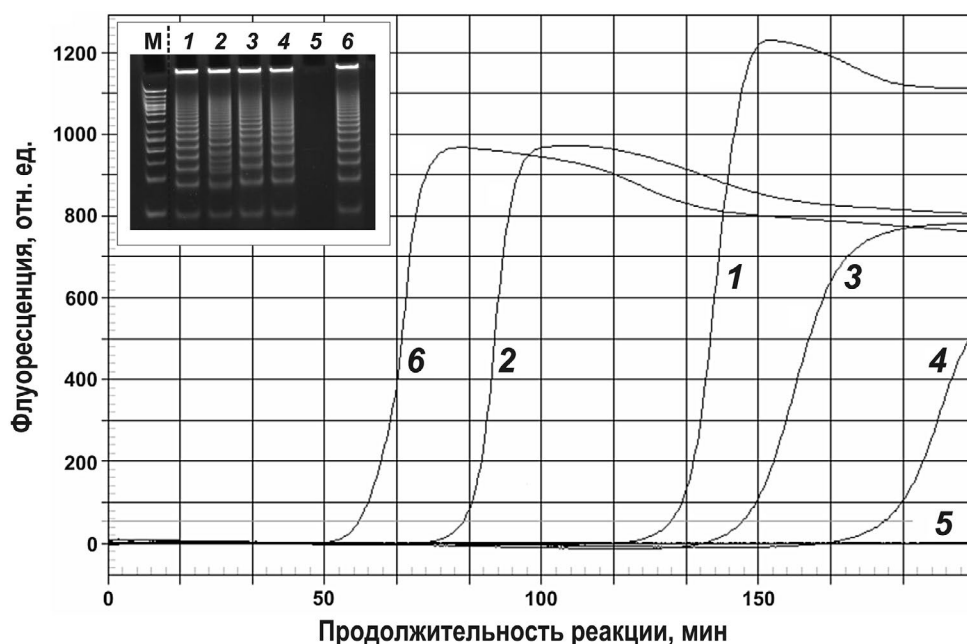


Рис. 5. Накопление продуктов мультимеризации для матриц с различающейся первичной структурой концевых фрагментов (приведены данные, полученные при использовании буфера Taq). Вставка: электрофоретическое разделение мультимеров: 1 – матрица ЛМ1, 2 – ЛМ2, 3 – ЛМ3, 4 – ЛМ4, 5 – ЛМ5, 6 – ЛМ6, М – маркер 50 bp DNA ladder

Состав буферной системы влиял на скорость инициации ММ. Тестировали три буфера: Thermopol (рекомендован для Bst LF), Isothermal (для Bst 2.0) и буфер к ДНК-полимеразе Taq производства «СибЭнзим». При равенстве значений pH, концентрации ионов Mg^{2+} и детергентов указанные буферы содержат разное количество KCl (10, 50 и 25 mM соответственно), а буфер Taq – дополнительно β-меркаптоэтанол. Наименьшие значения Tt найдены для образцов, содержащих буфер для ДНК-полимеразы Taq (табл. 4). Вероятно, наличие восстанавливающего агента (β-меркаптоэтанол) обуславливает повышение активности ДНК-полимеразы. В целом, результаты, полученные для разных буферных систем, полностью коррелировали с недавно представленными данными [7].

Интересными представляются результаты, полученные для ДНК-матриц в парах ЛМ2/ЛМ3 и ЛМ4/ЛМ5, имеющих зеркальный порядок расположения концевых мотивов. При равной длине и схожих термодинамических характеристиках образующихся на их основе двуцепочечных ДНК найденные для них значения Tt свидетельствуют о неравнозначности концов первичного дуплекса с точки зрения запуска ММ. Различия в величинах Tt указывают на то, что инициация ММ для использованной молекулярной системы происходит преимущественно со стороны отжига затравочного (R) праймера. По-видимому, после элонгации праймера R и достраивания второй цепи полимеразы, не успевая диссоциировать с первичного дуплекса, задерживается на его конце и далее уча-

ствует в формировании *Ini*. Таким образом, хотя «дыхание» цепей ДНК и оказывает некоторое влияние на скорость генерации *Ini*, в случае сравнимых термодинамических характеристик двуцепочечных структур оно не является определяющим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было показано, что ДНК-полимераза Bst *exo*-обеспечивает протекание реакции неспецифической изотермической амплификации – мультимеризации (ММ) – в условиях, способствующих «дыханию» цепей ДНК. В данной работе продемонстрировано влияние также и первичной структуры концевых фрагментов ДНК на запуск ММ. Методом молекулярного докинга выявлены различия в прочности комплексов Bst *exo*-с ДНК, а для модельных двуцепочечных ДНК обнаружена выраженная предпочтительность её связывания с пурин-богатыми последовательностями, в особенности содержащими dG. Принимая во внимание механизм ММ, повышение стабильности комплекса «ДНК–ДНК-полимераза» должно обеспечивать смещение равновесия в сторону образования псевдоциклической вторичной ДНК-структуры (*Ini*) и тем самым более ранний запуск реакции.

С данными *in silico* исследований хорошо коррелируют результаты амплификационных экспериментов, проведённых с использованием ДНК-матриц с различающимися 3'- и 5'-концевыми мотивами. Хотя наибольшую скорость запуска ММ

Таблица 4. Зависимость скорости запуска ММ (в значениях порогового времени T_t , мин) от состава буферной системы

ДНК-матрица	$T_{отж.}, ^\circ\text{C}$	Среднее пороговое время		
		буфер Thermopol: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 мМ KCl, 2 мМ MgSO_4 , 0,1% Triton X-100	буфер Isothermal: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 мМ KCl, 2 мМ MgSO_4 , 0,1% Tween 20	буфер Taq: 60 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 25 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ β -меркаптоэтанола, 0,1% Triton X-100
ЛМ1	27,3/22,3	> 160	139 $\pm$ 41	120 $\pm$ 11
ЛМ2	20,3/19,8	147 $\pm$ 38	113 $\pm$ 42	75 $\pm$ 8
ЛМ3	19,8/21,3	–	> 160	134 $\pm$ 24
ЛМ4	40,1/0,7	–	–	> 160
ЛМ5	0,0/50,4	–	–	–
ЛМ6	26,6/22/3	84 $\pm$ 15	75 $\pm$ 23	53 $\pm$ 6

обеспечила матрица, содержащая идентичные фрагменты по концам цепи и приводящая за счёт этого к формированию самой прочной *Ini*, среди прочих матриц максимальная скорость инициации ММ наблюдалась для ДНК с олигопуриновой 3'-концевой и олигопиримидиновой 5'-концевой последовательностями. Стоит отметить, что зависимость прочности связывания Bst *exo*- с ДНК от нуклеотидного контекста является только одним из факторов, оказывающих влияние на протекание ММ; определённый вклад вносит также эффективность «дыхания» цепей ДНК, зависящая от их GC-состава. Однако в случае сравнимых термодинамических характеристик двуцепочечных структур пурипиримидиновый состав нуклеотидных последовательностей становится, по всей видимости, определяющим при запуске ММ. Таким образом, для исключения неспецифической изотермической амплификации следует избегать ДНК-структур, содержащих концевые нуклеотиды dA и/или dG. В то же время возможно использование ММ для обнаружения специфических НК-мишеней, и в этом случае необходимо конструировать ДНК-матрицы с dA/dG-обогащёнными

терминальными мотивами, обеспечивающие более высокую эффективность запуска ММ.

Вклад авторов. Р.Р. Гарафутдинов – концепция и общее руководство работой, проведение экспериментов, оформление конечного варианта статьи; О.Ю. Купова – проведение *in silico* исследований, обработка, анализ и обсуждение результатов; А.Р. Сахабутдинова – проведение экспериментов, обсуждение результатов, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00235).

Благодарности. В работе использовано оборудование Регионального центра коллективного пользования «Агидель» и Центра коллективного пользования «Биомика».

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. Бодулев О. Л., Сахаров И. Ю. (2020) Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе, *Биохимия*, **85**, 174-196, doi: 10.31857/S0320972520020037.
2. Soroka, M., Wasowicz, B., and Rymaszewska, A. (2021) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? *Cells*, **10**, 1931, doi: 10.3390/cells10081931.
3. Гарафутдинов Р. Р., Сахабутдинова А. Р., Гильванов А. Р., Чемерис А. В. (2021) Амплификация нуклеиновых кислот «катящимся кольцом» – универсальный метод анализа широкого круга биологических мишеней, *Биоорг. Химия*, **47**, 721-740, doi: 10.31857/S0132342321060075.
4. Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2022) Structural and molecular kinetic features of activities of DNA polymerases, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 6373, doi: 10.3390/ijms23126373.

5. Ocorbin, I., and Filipenko, M. (2023) Bst polymerase – a humble relative of Taq polymerase, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **21**, 4519-4535, doi: 10.1016/j.csbj.2023.09.008.
6. Hafner, G. J., Yang, I. C., Wolter, L. C., Stafford, M. R., and Giffard, P. M. (2001) Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase, *BioTechniques*, **30**, 852-886, doi: 10.2144/01304rr03.
7. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **190**, 758-771, doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
8. Wang, G., Ding, X., Hu, J., Wu, W., Sun, J., and Mu, Y. (2017) Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities, *Sci. Rep.*, **7**, 13928, doi: 10.1038/s41598-017-13324-0.
9. Sakhabutdinova, A. R., Kamalov, M. I., Salakhieva, D. V., Mavzyutov, A. R., and Garafutdinov, R. R. (2021) Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte, *Anal. Biochem.*, **628**, 114267, doi: 10.1016/j.ab.2021.114267.
10. Зырина Н. В., Антипова В. Н. (2021) Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации, *Биохимия*, **86**, 1066-1077, doi: 10.31857/S0320972521070101.
11. Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., and Ismagilov, R. F. (2020) Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification, *Nucleic Acids Res.*, **48**, e42, doi: 10.1093/nar/gkaa099.
12. Reid, M. S., Le, X. C., and Zhang, H. (2018) Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: an EXPAR example, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **57**, 11856-11866, doi: 10.1002/anie.201712217.
13. Tan, E., Erwin, B., Dames, S., Ferguson, T., Buechel, M., Irvine, B., Voelkerding, K., and Niemz, A. (2008) Specific versus nonspecific isothermal DNA amplification through thermophilic polymerase and nicking enzyme activities, *Biochemistry*, **47**, 9987-9999, doi: 10.1021/bi800746p.
14. Qian, J., Ferguson, T. M., Shinde, D. N., Ramírez-Borrero, A. J., Hintze, A., Adami, C., and Niemz, A. (2012) Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR, *Nucleic Acids Res.*, **40**, e87, doi: 10.1093/nar/gks230.
15. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Kupryushkin, M. S., and Pyshnyi, D. V. (2020) Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase, *Biochimie*, **168**, 259-267, doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
16. Сахабутдинова А. Р., Мирсаева Л. Р., Оскорбин И. П., Филипенко М. Л., Гарафутдинов Р. Р. (2020) Устранение мультимеризации ДНК, возникающей при изотермической амплификации в присутствии ДНК полимеразы Bst exo⁻, *Биоорг. Химия*, **46**, 56-64, doi: 10.31857/S0132342320010091.
17. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., Kupova, O. Y., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 1447-1455, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028.
18. Schrödinger Suite, Small-Molecule Drug Discovery Suite 2016-4, Schrödinger, LLC, New York, 2016.
19. Garafutdinov, R. R., Kupova, O. Y., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) Data on molecular docking simulations of quaternary complexes 'Bst exo⁻ polymerase-DNA-dCTP-metal cations', *Data-in-Brief*, **33**, 106549, doi: 10.1016/j.dib.2020.106549.
20. Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.
21. Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013) Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **27**, 221-234, doi: 10.1007/s10822-013-9644-8.
22. Wu, E. Y., and Beese, L. S. (2011) The structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a mismatched nucleotide reveals an "ajar" intermediate conformation in the nucleotide selection mechanism, *J. Biol. Chem.*, **286**, 19758-19767, doi: 10.1074/jbc.M110.191130.
23. Knorre, D. G., Lavrik, O. I., and Nevinsky, G. A. (1988) Protein-nucleic acid interaction in reactions catalyzed with DNA polymerases, *Biochimie*, **70**, 655-661, doi: 10.1016/0300-9084(88)90250-7.
24. Kolocheva, T. I., Nevinsky, G. A., Levina, A. S., Khomov, V. V., and Lavrik, O. I. (1991) The mechanism of recognition of templates by DNA polymerases from pro- and eukaryotes as revealed by affinity modification data, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **9**, 169-186, doi: 10.1080/07391102.1991.10507901.
25. Doronin, S. V., Nevinsky, G. A., Malygina, T. O., Podust, V. N., Khomov, V. V., and Lavrik, O. I. (1989) The efficiency of interaction of deoxyribonucleoside-5'-mono-, di- and triphosphates with the active center of *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment, *FEBS Lett.*, **259**, 83-85, doi: 10.1016/0014-5793(89)81500-5.
26. Kolocheva, T. I., Nevinsky, G. A., Volchkova, V. A., Levina, A. S., Khomov, V. V., and Lavrik, O. I. (1989) DNA polymerase I (Klenow fragment): role of the structure and length of a template in enzyme recognition, *FEBS Lett.*, **248**, 97-100, doi: 10.1016/0014-5793(89)80439-9.

27. Garafutdinov, R. R., Burkhanova, G. F., Maksimov, I. V., Sakhabutdinova, A. R. (2023) New method for microRNA detection based on multimerization, *Anal. Biochem.*, **664**, 115049, doi: 10.1016/j.ab.2023.115049.
28. Сахабутдинова А. Р., Чемерис А. В., Гарафутдинов Р. Р. (2023) Обнаружение специфических РНК-мишеней с помощью мультимеризации, *Биохимия*, **88**, 832-840, doi: 10.31857/S032097252305010X.

THE INFLUENCE OF NUCLEOTIDE CONTEXT ON NON-SPECIFIC AMPLIFICATION OF DNA WITH BST EXO- DNA POLYMERASE

R. R. Garafutdinov*, O. Yu. Kupova, and A. R. Sakhabutdinova

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
450054 Ufa, Bashkortostan, Russia; e-mail: garafutdinovr@gmail.com*

In recent years, nucleic acid amplification methods that proceed in isothermal mode and require the use of DNA polymerases with strand-displacement activity have become increasingly widespread. Among these, the most popular is the Bst exo- polymerase, but it tends to carry out nonspecific DNA synthesis through multimerization. This study shows the influence of the nucleotide sequence on the binding of Bst exo- with DNA and on the efficiency of multimerization initiation. On single-stranded trinucleotides (sst) and dinucleotide duplexes (dst), molecular docking revealed the preference for binding of the “closed” form of Bst exo- to purine-rich sequences, especially those containing dG at the 3' end of the synthesized strand. The data obtained *in silico* were confirmed in experiments using oligonucleotide templates that differ in the structure of the 3'- and 5'-terminal motifs. It has been shown that templates with an oligopurine 3'-terminal fragment and an oligopyrimidine 5'-terminal part contribute to an earlier start of multimerization. The obtained data can be used at the stage of selecting optimal nucleotide sequences for isothermal amplification, ensuring more reliable results. Thus, to avoid multimerization, DNA templates and primers containing terminal dA and/or dG nucleotides should be excluded.

Keywords: Bst exo- DNA polymerase, isothermal amplification, multimerization, specificity, molecular docking

ИММУНОЛОГИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

Обзор

© 2024 А.Г. Габдулхакова^{1,2*}, Р.Н. Мингалеева¹, А.М. Ромозанова¹,
А.Р. Сагъдеева¹, Ю.В. Филина¹, А.А. Ризванов^{1,3}, Р.Р. Мифтахова¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Казань, Россия; электронная почта: AiGGabdulhakova@kpfu.ru

² РМАНПО, Казанская государственная медицинская академия Минздрава России,
420012 Казань, Россия

³ Академия наук Республики Татарстан,
Отделение медицинских и биологических наук, 420111 Казань, Россия

Поступила в редакцию 14.09.2023

После доработки 17.11.2023

Принята к публикации 18.11.2023

По данным ВОЗ к середине 2023 г. около 800 млн жителей планеты переболело коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. Свойства данного вируса позволили ему длительное время циркулировать в популяции людей, совершенствуя механизмы защиты от иммунной системы хозяина. Тяжесть заболевания во многом зависит от степени активации системного иммунного ответа, в том числе чрезмерной стимуляции макрофагов и моноцитов, выработки цитокинов и запуска адаптивных Т- и В-клеточных реакций при одновременном уклонении SARS-CoV-2 от действия иммунной системы. В данном обзоре обсуждаются механизмы проникновения вируса в клетку, реакции звеньев врожденной и адаптивной иммунной системы, запускаемой в ответ на инфицирование, и сбои в её регуляции, приводящие к развитию тяжёлого заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: врожденный и адаптивный иммунитет, SARS-CoV-2, шиповый белок, ACE2, цитокиновый шторм, протеазы, слияние мембран, полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0320972524010042 EDN: YRLNZE

ВВЕДЕНИЕ

В начале 2020 г. мир настигла пандемия нового вирусного заболевания, получившего позже название «КОВИД-19» (от англ. COVID-19, COroNaVirus Disease 2019 – коронавирусная инфекция 2019 года). Причиной стало появление нового вида коронавируса SARS-CoV-2. Ранее было описано несколько коронавирусов (CoV), способных заражать людей.

Принятые сокращения: АПК – антигенпрезентирующие клетки; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; МНС – главный комплекс гистосовместимости; СВИЦ – синдром высвобождения цитокинов; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; ADE – антителозависимое усиление; RBD – рецептор-связывающий домен; SARS-CoV-2 – коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром; ТЕМ – плазматические мембраны, обогащённые тетраспанинами; TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2.

* Адресат для корреспонденции.

Четыре из них, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, были описаны у людей с заболеванием верхних дыхательных путей лёгкой степени тяжести. Три вспышки эпидемий, вызванные коронавирусами, сопровождались тяжёлыми респираторными симптомами, системными осложнениями и значительным уровнем летальности. Первая вспышка, вызванная SARS-CoV-1, возникла в Китае в 2002 г. и затронула несколько стран мира; в 2012 г. в Саудовской Аравии началась очередная вспышка, вызванная MERS-CoV. В декабре 2019 г. в Ухане (Китай) началась третья вспышка, вызванная SARS-CoV-2, который антигенно и генетически подобен SARS-CoV. Благодаря современному уровню развития технологий исследователи практически в режиме реального времени отслеживали, как мутации в геноме SARS-CoV-2 (коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром) вели к изменению структуры вирусных белков и влияли на проникновение вируса в клетку, его репликацию и высвобождение.

Выявление иммуногенных эпитопов вируса и разработка эффективных методов введения антигена позволили разработать разнообразные вакцины, что способствовало остановке эпидемии. Вместе с тем, вероятно, даже сейчас вирус продолжает свою эволюцию, возникают новые мутации, одни из них закрепляются, другие реверсивно меняются. Это модифицирует структуру шипового и других белков вируса SARS-CoV-2, балансируя между повышением аффинности к клеточным белкам-рецепторам, появлением тропизма к новым мишеням и избеганием действия нейтрализующих антител. В нашем обзоре мы объединили разрозненные данные о механизмах проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку и развитии иммунного ответа. Выявленные аминокислотные замены в структуре шипового белка мы разделили на 4 условных кластера: 1) по способности к связыванию с основным рецептором – ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), 2) по доступности шипового белка к расщеплению протеазами, 3) по способности к слиянию с мембранами и 4) по изменению структуры белков для ухода от действия антител. Комбинация приобретённых мутаций определяет вирулентность штамма вируса, но, кроме этого, тяжесть COVID-19 зависит от эффективности развития противовирусного иммунного ответа. Нарушения в регуляции иммунного ответа, преобладание интерферонного ответа второго типа и гиперпродукция провоспалительных цитокинов вызывают развитие осложнений вплоть до летальных исходов.

«ВХОДНЫЕ ВОРОТА» ВИРУСА, МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ В КЛЕТКИ

Мишенями SARS-CoV-2 и других бетакоронавирусов являются клетки, несущие на своей поверхности молекулы ACE2: это клетки слизистой оболочки рта и носоглотки, лёгких, желудка, кишечника, лимфатических узлов, костного мозга, тимуса, селезёнки, печени, почек и мозга [1, 2]. Наиболее высокая плотность ACE2 наблюдается на поверхности эпителиальных клеток альвеол и энтероцитов тонкого кишечника, что обуславливает поражение лёгких и развитие гастроэнтероколитов.

На начальном этапе проникновения SARS-CoV-2 в клетку происходит узнавание поверхностного S-белка вируса (шипового белка) рецептором ACE2 и прикрепление вируса к мембране. Исключение составляют фагоциты, инфицирование которых может происходить без прямого контакта с вирусом за счёт эффероцитоза (фагоцитоза) инфицированных/апоптотических клеток [3]. Также возможно поглощение опсонизированных вирусных частиц за счёт взаимодействия

с Fc-рецепторами [4]. Такой антителозависимый путь проникновения вируса зависит от уровня экспрессии CD16 (FcγRIII). CD16 макрофагов связывает Fc-фрагмент иммуноглобулина G, несущего вирусную частицу [5]. Описан также феномен транскитоza вирусных частиц SARS-CoV-2 через эпителиальные клетки [4]. Показано, что при низком уровне антител в сыворотке или при их низкой нейтрализующей способности опсонизированные вирусные частицы лучше проникают в клетки через эпителиальный барьер кишечника. Это явление известно под названием антителозависимое усиление (англ. Antibody-dependent enhancement, ADE), при котором связывание вируса с неоптимальными антителами усиливает его проникновение в клетки хозяина [6].

После узнавания и прикрепления вируса возможны два варианта развития событий (рис. 1): непосредственное слияние вирусной и плазматической мембран или формирование эндосом с последующим захватом и интернализацией вирусной частицы.

Слияние вирусной и клеточной мембраны зависит от белков слияния, дестабилизирующих мембрану и формирующих пору, по которой содержимое вириона высвобождается в цитозоль клетки. S-Белок SARS-CoV-2 принадлежит к первому классу белков слияния – для его активации необходимо протеолитическое расщепление, в результате которого происходит конформационная перестройка, формирование N-концевой суперспирали, экспонирование и встраивание вирусного белка в мембрану клетки-хозяина.

В структуре S-белка вируса имеется несколько сайтов расщепления протеазами: полиосновный сайт S1/S2 678-TNSPRRAR↓SVA-688 и одноосновный сайт S2' 812-PSKR↓SFIEDL-821, которые являются мишенями трансмембранной сериновой протеазы 2 (англ. transmembrane serine protease 2, TMPRSS2) и фуриновых протеаз. S1/S2 также может расщепляться под действием трипсина и мембранных протеаз TMPRSS2/4/13, а сайт S2' – трипсина и TMPRSS2/4 [11]. Кроме этого, было показано, что расщепление S-белка может идти по другим сайтам в рецептор-связывающем домене, N-терминальном домене, в области белка слияния, а также вблизи сайтов S1/S2 и S2' [12], которые являются мишенями катепсинов K, L, B, V и S, трипсиноподобной протеазы дыхательных путей человека (англ. human airway trypsin-like protease, HAT), TMPRSS4, TMPRSS11A, TMPRSS11E и матрипазы. Показано, что полиосновный сайт расщепляется в основном фуриновой протеазой, а катепсин G и нейтрофильная эластаза действуют по альтернативным сайтам: 684AR685, 687VA688, 688AS689 [13]. Удаление полиосновного сайта del-682-RRAR-685 или точечная мутация внутри 682-PRAA-685 пред-

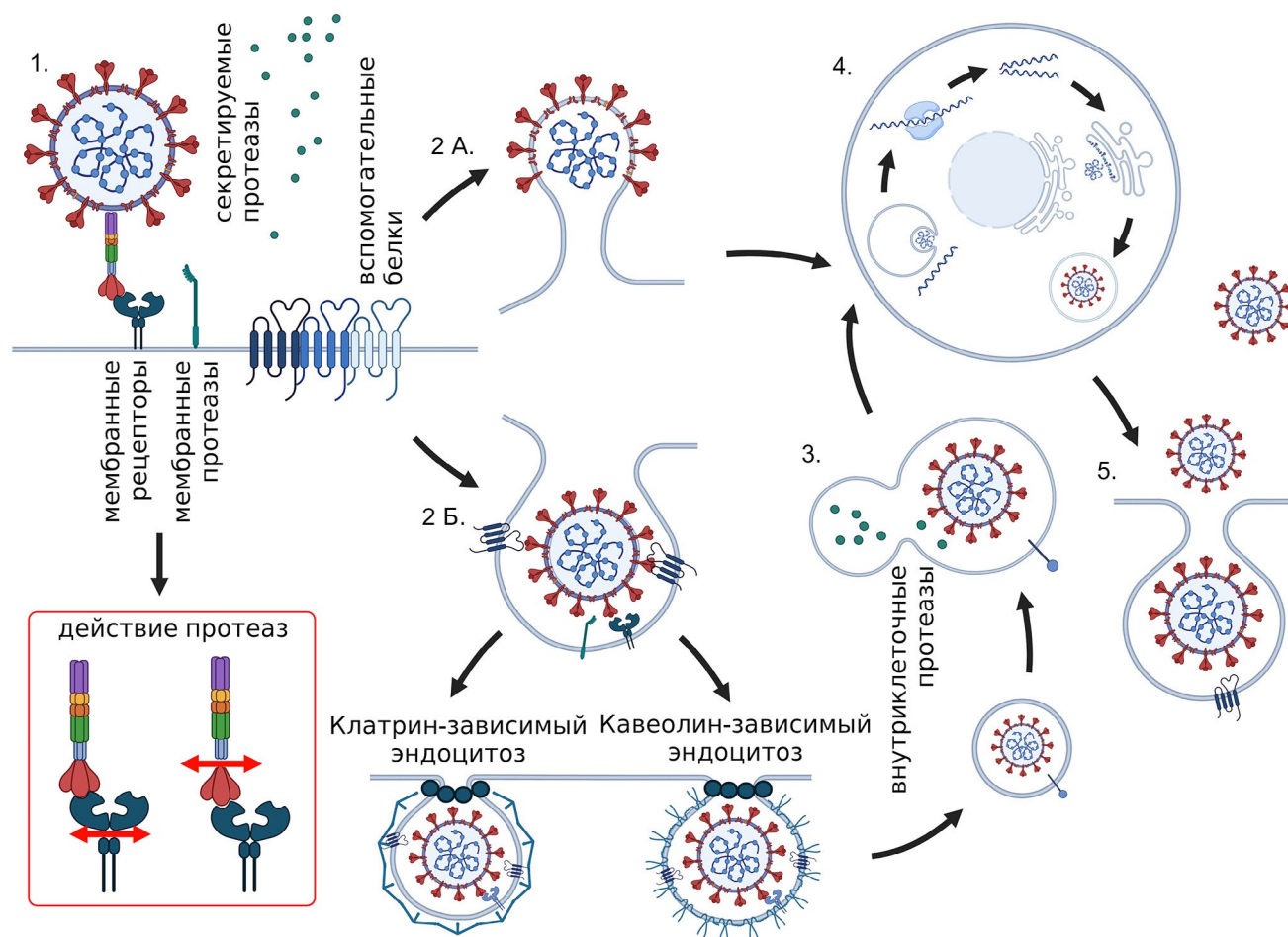


Рис. 1. Механизм входа и выхода вируса SARS-CoV/SARS-CoV-2 в клетку. Первый этап взаимодействия включает распознавание S-белка вируса рецептором ACE2 (1), второй этап может различаться и пойти либо по пути слияния мембран (2 А), либо по пути формирования эндосом (2 Б). Эндосомы могут сливаться с лизосомами, содержащими катепсин L и В и другие протеазы, что обеспечивает расщепление S-белка и далее слияние мембраны эндосомы и вируса (3). Выход вирусной РНК в цитозоль ведёт к трансляции вирусной полимеразы и других вирусных белков (4), сборке и высвобождению вирионов (5). Мишенями для протеаз могут быть как шиповый белок, так и ACE2, когда происходит так называемый сброс (англ. «shedding») внеклеточного домена ACE2 с поверхности клетки (составлено по [7–10])

отвращает расщепление фуриновыми протеазами [14]. Мутации P681N и P681R в вариантах Альфа и Дельта, напротив, усиливают узнавание и расщепление фуриновыми протеазами [15]; замена P681R также повышает слияние мембран [16].

Процесс расщепления идёт поэтапно; на первом этапе происходит процессинг S-белка в сайте S1/S2 (678-TNSPRRAR↓SVA-688) под действием фуриновых протеаз, приводящий к открытию рецептор-связывающего домена [11]. На следующем этапе расщепление по сайту S2' (812-PSKR↓SFIEDL-821) запускает процесс реорганизации шипового белка и слияние мембран. После инфицирования клетки и запуска синтеза вирусных белков расщепление S-белка в сайте S1/S2 может происходить внутриклеточно благодаря наличию протеаз семейства TMPRSS на мембране везикул *транс*-области аппарата Гольджи в эпителиальных клетках дыхательных путей [17]. Таким образом, предполагает-

ся, что в формирующиеся вирионы встраиваются «праймированные», т.е. готовые к связыванию с ACE2 S-белки. Это может значительно ускорить инфицирование соседних клеток за счёт выброса вирионов с «праймированными» S-белками, у которых в результате расщепления повышено сродство к рецептору ACE2, а также открыт сайт S2' для дальнейшего расщепления фуриновыми протеазами и/или TMPRSS2 [11, 18].

Слияние мембран может происходить не только между вирусом и клеткой, но и между клетками хозяина, которые образуют синцитий (рис. 2). Необходимым условием для его формирования является представление ACE2 и S-белка на поверхности соседних клеток. Непосредственное встраивание S-белка в плазматическую мембрану эукариотической клетки происходит при слиянии с вирусной мембраной (рис. 2 А) либо после инфицирования клетки и синтеза вирусных белков, когда

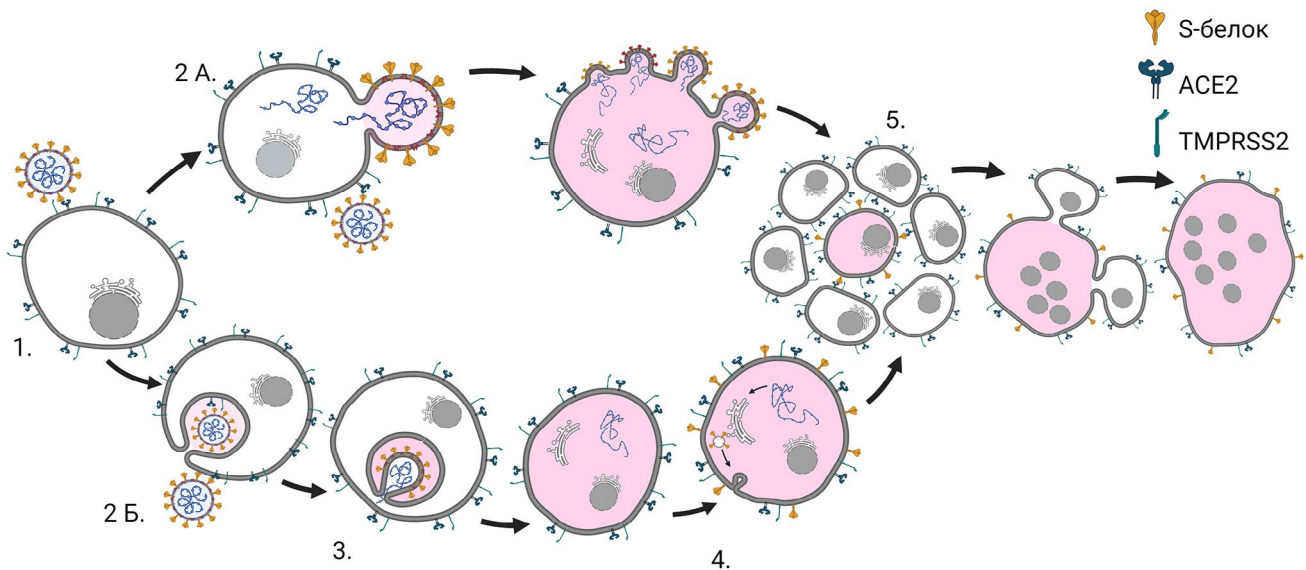


Рис. 2. Схематическое представление формирования многоядерного синцития при инфицировании клеток SARS-CoV-2. Вход вируса в клетки запускается в результате взаимодействия между S-белком вируса и рецептора ACE2 клетки (1). Появление S-белка на плазматической мембране происходит при слиянии вириона с клеткой (2 А) либо при инфицировании по эндоцессальному пути (2 Б). В этом случае благодаря низкому pH в эндосоме происходит протеолитическое расщепление S-белка (3), высвобождение генома, его репликация и синтез вирусных белков в эндоплазматическом ретикулуме (4). Часть S-белка ввиду его структурных особенностей транспортируется и встраивается в плазматическую мембрану. Таким образом, наличие на мембранах соседних клеток молекул слияния ACE2 и S-белка способствует их слиянию (5). Сокращения: ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2, TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2

часть зрелых S-белков перемещается по секреторному пути к плазматической мембране (рис. 2 Б). Это происходит благодаря структурной организации цитоплазматического хвоста S-белка, которая позволяет ему вклиниться в транспортные пути клетки-хозяина [19, 20]. Таким образом, встроившись в плазматическую мембрану, эти белки опосредуют слияние инфицированных и неинфицированных клеток с образованием многоядерных гигантских клеток, что может способствовать прямому распространению SARS-CoV-2 между клетками. Любопытно, что в исследованиях *in vitro* одиночная замена R815A предотвращала расщепление S-белка по этому сайту, также вирус терял способность к формированию синцития при инфицировании клеток HEK293T-ACE2, Vero E6-ACE2 и Caco-2 [14]. Было показано, что именно наличие биаргининового мотива в сайте расщепления фуриновыми протеазами (RRAR) обеспечивает формирование синцития, тогда как делеции этого участка лишают вирус такой способности [21].

Исследования пациентов с COVID-19 выявили в их лёгких как гигантские многоядерные клетки, образующие псевдосинцитии, так и настоящие синцитии, которые экспрессировали маркеры пневмоцитов Surfactant-A, TTF1 и Napsin, что указывает на их эпителиальное происхождение [22]. В лёгких пациентов с COVID-19 также встречались CD163⁺-синцитии гистиоцитарного/моноцитарного происхождения. Предполагается, что в такие

многоядерные образования могут интернализироваться лейкоциты и лимфоциты, поскольку в структуре синцития встречаются CD45⁺-клетки. Более того, выявлена обратная корреляция между количеством лимфоцитов периферической крови и количеством CD45⁺-клеток в синцитии [21]. Впрочем, можно предположить, что клетки любого типа, экспрессирующие на поверхности ACE2 и S-белок, могут слиться, образовав гетерогенный синцитий.

Важную роль в процессе слияния вирусной и клеточной мембран играют вспомогательные белки клетки-хозяина. Так, в связывании с вирусами могут участвовать рецепторы распознавания патогенных образцов [23] и рецепторы иммуноглобулинов (FcR). В организацию и формирование эндосом, их перемещение и высвобождение вирионов вносят вклад тетраспанины, малые G-белки семейства Rab и другие белки [24, 25]. Участки плазматической мембраны, обогащённые тетраспанинами (англ. tetraspanin-enriched membrane, TEM), участвуют в реорганизации и слиянии мембран. Тетраспанины регулируют формирование мембранных инвагинаций/искривлений и экстраклеточных везикул, а также влияют на активность мембранных металлопротеиназ ADAM17 и ADAM10, которые, в свою очередь, расщепляют белок ACE2, отщепляя его каталитическую часть. Тетраспанин CD9 участвует в формировании эндосомы и проникновении вируса, CD81 и CD63 – в высвобождении зрелых вирионов.

Предполагается, что CD9-содержащие ТЕМ могут способствовать входу вируса в клетку за счёт подавления расщепления ACE2 протеазой ADAM17 и её высвобождения [8]. При отсутствии CD81 на мембране клетки вирионы формируются, но не способны высвобождаться из клетки. Тетраспанины также могут выполнять функцию скаффолд-белков. При запуске противовирусного интерферонного ответа I типа (I type interferon response, IFN-I) возможна активация синтеза и высвобождения интерферон-индуцируемых мембранных белков (англ. interferon-induced transmembrane proteins, IFITM) – небольших альфа-спиральных белков, которые встраиваются в ТЕМ и разобщают факторы входа вируса [9].

Таким образом, вероятность инфицирования любой клетки, прежде всего, определяется набором и количеством мембранных рецепторов ACE2 и других белков, способных связываться с S-белком – они обеспечивают первоначальное взаимодействие вируса и клетки. В базе данных BioGRID [26] к настоящему времени приведены данные более чем о 1000 белков человека, для которых было показано взаимодействие с S-белком SARS-CoV-2. Связывание с альтернативными мишенями может способствовать развитию системного поражения организма при коронавирусной инфекции. Список мишеней, особенности экспрессии в организме человека и взаимодействия с SARS-CoV-2 приведены в таблице П1 в Приложении. Другим важным фактором, без помощи которого невозможно слияние мембран, является наличие в клетке мембранных или секретируемых протеаз. Как правило, в клетках, которые не экспрессируют TMPRSS2, инфицирование происходит путём эндоцитоза [11]. Обобщая вышесказанное, мы можем заключить, что, во-первых, чем больше точек взаимодействия между вирусом и клеткой, т.е. чем выше плотность рецепторов на поверхности клетки, тем выше шансы на проникновение вируса в клетку, и, во-вторых, выбор способа проникновения вируса путём эндоцитоза либо посредством слияния мембран определяется уровнем экспрессии мембранных протеаз на клетке-мишени.

ВРОЖДЁННЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Основное свойство вируса – проникновение в клетку и воспроизведение собственного генома. В ответ на внедрение вируса в клетку и трансляцию вирусных белков организм запускает механизмы защиты. Иммунный ответ реализуется активацией двух звеньев иммунной системы: врождённой и адаптивной. Как упоминалось выше, первыми с SARS-CoV-2 контактируют эпителиальные клетки дыхательных путей и резидентные

макрофаги. Врождённый противовирусный ответ запускает экспрессию генов, относящихся к IFN-I, в течение нескольких часов после начала заражения. Синтез IFN-α и запускаемые им нисходящие сигнальные каскады модулируют ответ клеток и перепрограммируют их на борьбу с вирусом. В результате происходит ограничение репликации вируса в инфицированных клетках, к очагу инфицирования привлекаются клетки врождённого иммунитета, и происходит стимуляция адаптивного иммунного ответа за счёт представления вирусных антигенов с помощью белков главного комплекса гистосовместимости первого типа МНС-I (англ. major histocompatibility complex). Антигенпрезентирующие иммунные клетки (АПК) способны выставлять антигены, используя оба типа комплексов, МНС-I и МНС-II. Не менее важную роль в инициации иммунного ответа играет активация паттерн-распознающих рецепторов, функция которых – находить высвобождаемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, РНК вируса и связываться с ними [27]. Вирусы распознаются Toll-подобными рецепторами в эндосомах, в том числе TLR-3 и TLR-7 и цитозольными сенсорами РНК (RIG-I-подобными рецепторами, RIG-I и MDA5). Активация TLR-3/TLR-7 приводит к ядерной транслокации факторов транскрипции NF-κB и IRF3, в частности, к RIG-1/MDA5-зависимой активации IRF3. IFN-α и другие провоспалительные цитокины усиливают собственную продукцию: IFN-α активирует рецепторный комплекс IFNAR, что приводит к активации транскрипционных факторов STAT1/2, а активация рецепторов IL-1, IL-6 и TNF-α приводит к синтезу провоспалительных цитокинов через транскрипционный фактор NF-κB [28–30]. Таким образом, при активации внутриклеточных TLR-3, распознающих нуклеиновые кислоты, развиваются ответы IFN-I и IFN-III типов, происходит очистка организма от вируса; тогда как при распознавании S-белка рецептором TLR-4 происходит активация MyD88-зависимого сигнального пути, активация провоспалительного пути с вероятным развитием синдрома высвобождения цитокинов (СВИ), так называемого «цитокинового шторма» [31].

Как же инфицирование меняет профиль активности макрофагов? Анализ транскриптома активированных и инфицированных макрофагов показал повышение уровня транскрипции гена хемокина CXCL10 и ассоциированных с ним генов, кодирующих CXCL11, CCL18, CCL8, ISG15, CD83, рецептор IL-7, активацию инфламماسом и пироптоза (NLRP3 и каспазы-1 соответственно) [32]. Наряду с этим было отмечено повышение синтеза IL-18 и рецептора IL-1β/IL-1, которое коррелировало с активностью макрофагов (рис. 3). В лёгких людей, умерших от COVID-19, было выявлено снижение

количества резидентных альвеолярных макрофагов («феномен исчезновения») и повышение количества привлечённых макрофагов, которые можно было разделить на три кластера на основании профилей транскрипции: кластер 1 экспрессировал типичные маркеры моноцитов (например, *S100A8*/*MRP8*, *FCN1* и *CD14*); кластер 2 имел высокий уровень экспрессии генов хемокинов (например, *CCL2*, *CCL3*, *CXCL10*), а кластер 3 экспрессировал иммунорегуляторные (*A2M*, *GPR183* и *CCL13*) и профибротические гены (*SPP1*, *TREM2* и *TGFB1*). Первые два кластера были наиболее близки к подтипу макрофагов M1, а третий – к M2 [33]. В результате этого в лёгких пациентов увеличивалось количество фибробластов и коллагена. Предполагается, что макрофаги, инфицированные SARS-CoV-2, дифференцируются в подтип M1 и затем продуцируют провоспалительный цитокин IL-6, поддерживая провоспалительный статус [34, 35]. Таким образом, поглощение апоптотических клеток, инфицированных SARS-CoV-2, усиливает продукцию провоспалительных цитокинов, подавляет экспрессию эффероцитарных рецепторов и нарушает непрерывный эффероцитоз макрофагами, что в дальнейшем ведёт к накоплению повреждённых тканей.

В ответ на выброс хемокинов из активированных макрофагов или повреждённых инфицированием клеток в очаг прибывают гранулоциты из кровеносного русла. При значительной вирусной нагрузке разрушение инфицированных клеток сопровождается усиленным высвобождением множества факторов, включая провоспалительные цитокины и хемокины (рис. 3), что привлекает в очаг инфицирования ещё большее количество гранулоцитов и моноцитов. У пациентов с тяжёлым течением КОВИД-19 отмечена высокая инфильтрация лёгких гранулоцитами, особенно незрелыми [36]. Было показано повышение количества гранулоцитов низкой плотности (англ. low-density granulocytes, LDG), которое также характерно для аутоиммунных, онкологических заболеваний, микобактериальной и других инфекций. У пациентов с тяжёлым течением КОВИД-19 повышен нетоз LDG и агрегация с тромбоцитами по сравнению с LDG пациентов с лёгким течением заболевания [37]. Более того, количество циркулирующей в крови ДНК, образовавшейся из нетозных ловушек, коррелирует с тяжестью заболевания и является предиктором летальности [38].

Довольно интересный вопрос – может ли вирус реплицироваться в клетках врождённой иммунной системы? В экспериментах *in vitro* SARS-CoV-2 оказался способен инфицировать все культивируемые макрофаги, но размножался и вызывал противовирусный цитокиновый ответ только в макрофагах, экспрессирующих ACE2 [39]. TNP-1, экспрессирую-

щие ACE2, в ответ на репликацию вируса запускали противовирусные ответы, опосредованные киназой TBK-1 (TANK-binding kinase 1), что ограничивало размножение и высвобождение вирионов. Как упоминалось выше, вход SARS-CoV-2 в макрофаги может происходить независимо от ACE2, например, через лектиновые рецепторы С-типа и CD169; макрофаги, не экспрессирующие ACE2, не выделяли провоспалительные цитокины или противовирусные медиаторы при инфицировании SARS-CoV-2. Блокада цитокинов в ACE2-экспрессирующих макрофагах продлевала период продукции и выхода вирионов [39]. Показано, что при CD169-опосредованной/ACE2-независимой (CD169⁺/ACE2⁻) инфекции в макрофагах происходила репликация вирусной геномной и субгеномной РНК, что стимулировало RIG-I, MDA-5 и MAVS-зависимую экспрессию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β [40]. Данных о репликации SARS-CoV-2 в гранулоцитах мы не обнаружили; по-видимому, вследствие финальной стадии дифференцировки гранулоцитов их репликационный аппарат редуцируется и недостаточен для воспроизведения вируса.

При тяжёлом течении КОВИД-19 моноциты периферической крови характеризовались гиперактивированным статусом и значительным снижением экспрессии HLA-DR, высоким уровнем экспрессии генов, характерных для фенотипа противовоспалительных и незрелых клеток, включая *SELL* (*CD62L*), *CD163*, *MPO* и *PLAC8*, а также повышенной экспрессией генов белков семейства S100A, например, *S100A12* [41]. При КОВИД-19 средней тяжести в моноцитах наблюдался высокий уровень HLA-DR и CD11, а альвеолярные макрофаги секретировали хемокин CXCL16, который привлекал популяцию Т-лимфоцитов в лёгкие инфицированных людей. Основное различие между КОВИД-19 с тяжёлым течением и средней тяжести может быть связано с тем, что в первом случае в лёгкие привлекаются моноциты и гранулоциты, а во втором – Т-лимфоциты [41].

АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

При развёртывании адаптивного иммунного ответа происходит отбор вирус-специфичных Т-клеток из пула наивных клеток и пролиферация клона до достижения уровня, необходимого для обеспечения противовирусной защиты. Этот процесс обычно занимает от 6 до 10 дней. При средней степени тяжести КОВИД-19 формирование плазматических клеток и В-клеток памяти происходит в герминальных центрах, тогда как при тяжёлом течении активация В-лимфоцитов чаще всего происходит вне фолликулов [42].

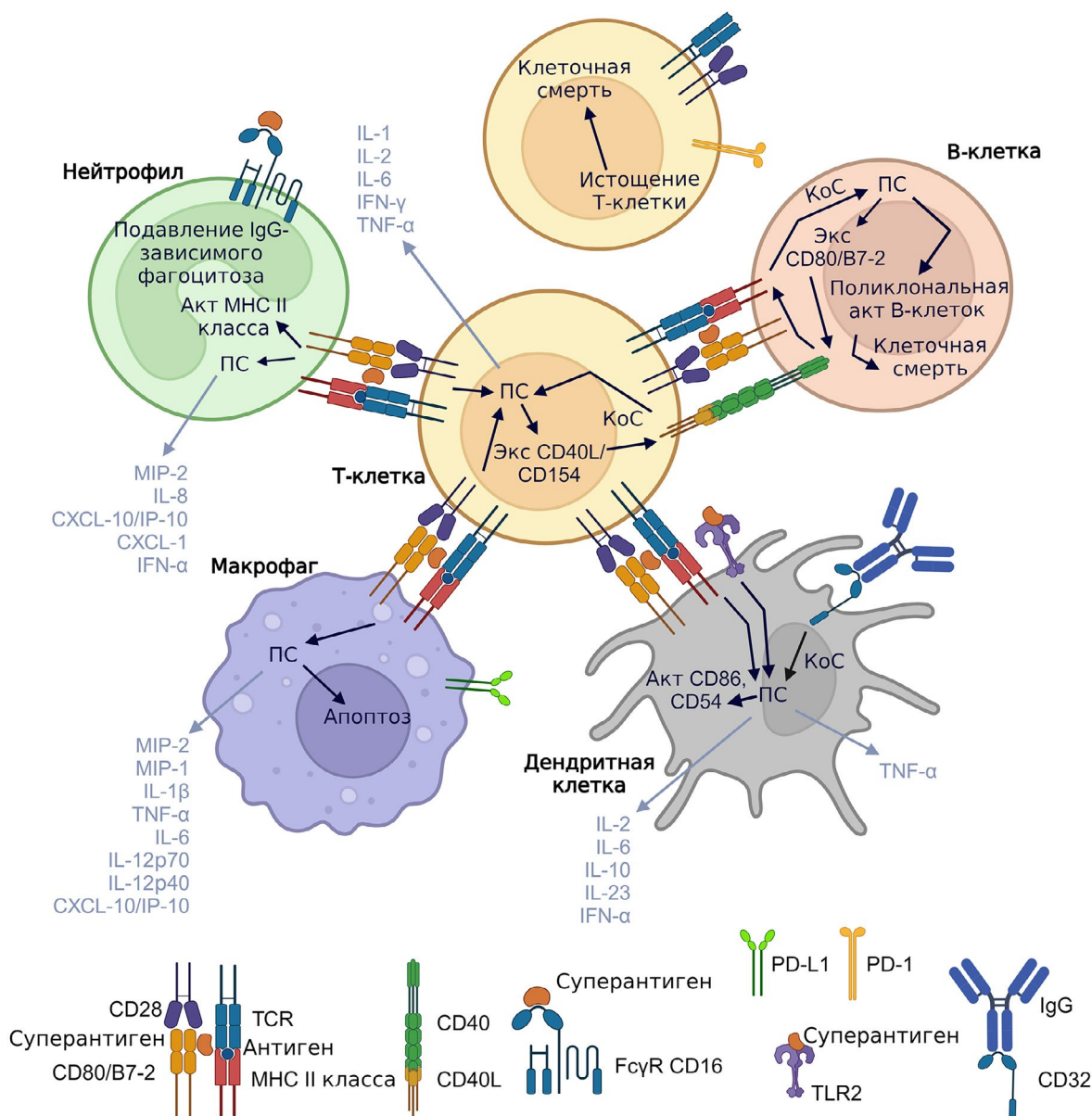


Рис. 3. Схематическое представление взаимной активации иммунных клеток при инфицировании SARS-CoV-2. Врождённый иммунный ответ активируется в течение нескольких часов после заражения вирусом и сопровождается высвобождением ряда антивирусных молекул. АПК (макрофаги, дендритные клетки и отчасти гранулоциты) фагоцитируют патоген, фрагментируют его на мелкие пептиды, которые представляют на своей поверхности с помощью главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II). Взаимодействие МНС-II и Т-клеточного рецептора активирует CD4⁺ Т-хелперные клетки, а также В- и CD8⁺-клетки. Активация Т-хелперных клеток приводит к их дифференцировке в различные подтипы со специфическими функциями, опосредованными секрецией цитокинов и контактами «клетка-клетка» (cell-to-cell). В-Клетки, дифференцирующиеся в плазматические клетки, выделяют антитела, которые препятствуют проникновению вирусной частицы в здоровые клетки. Т_{H2}-Лимфоциты способствуют реализации гуморального ответа, обеспечивая второй сигнал для В-клеток, в основном, за счёт секреции IL-4 и взаимодействия CD40/CD40L. Некоторые CD4⁺-клетки становятся фолликулярными хелперными клетками (Т_{fh}), которые регулируют важные взаимодействия в герминальных центрах, необходимые для созревания В-клеток памяти и долгоживущих высокоаффинных антителопродуцирующих плазматических клеток. Другой пул CD4⁺ Т-клеток дифференцируется в пул Т-хелперных клеток памяти (Т_{mem}). Т_{H1} играют важнейшую роль в формировании клеточного ответа. Они инициируют активацию МНС-I CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (Т_{eff}), одновременно взаимодействуя с АПК. Активированные Т_{eff} вызывают апоптоз клеток, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Часть Т_{eff} дифференцируется в цитотоксические Т-клетки памяти (Т_{em}), на которые возлагается роль быстрого восстановления клеточного иммунного ответа при вторичных контактах с антигеном. Аналогичный механизм разрушения происходит при взаимодействии NK-клеток с инфицированной вирусом клеткой. Однако чрезмерная активация иммунных клеток ведёт к снижению количества лимфоцитов за счёт клеточной гибели, более того, лимфоциты часто демонстрируют фенотип истощения с экспрессией более высоких уровней маркеров истощения PD-1, Tim-3 или NKG2A. Сокращения: Акт – активация, ПС – передача сигнала, КоС – ко-стимуляция, Экс – экспрессия

Выброс хемокинов и цитокинов активированными макрофагами, моноцитами и гранулоцитами привлекает большое количество лимфоцитов в очаг воспаления, где вследствие взаимодействия Т-клеточного рецептора лимфоцитов с комплексом антиген/МНС-I/II запускается активация и пролиферация Т-лимфоцитов (рис. 3). Одновременно с активацией лимфоцитов в очаге происходит их инфицирование. В исследованиях *in vitro* SARS-CoV-2 предпочтительно инфицировал активированные CD4⁺ Т-клетки [43], в этих клетках были обнаружены вирусные геномные, субгеномные РНК, вирусные белки и вирионы. С помощью экспериментов по нокдауну ACE2 или блокаде S-белка авторы выяснили, что инфицирование происходило без участия S-белка/ACE2/TMPRSS2. Более того, инфицирование Т-клеток *in vitro* вызывало их апоптоз (возможная причина лимфопении у пациентов), который, вероятно, был связан с активацией NIF-1α-зависимых путей в митохондриях. Также авторы полагают, что входной молекулой для SARS-CoV-2 в лимфоцитах может служить белок LFA-1.

Анализ данных невакцинированных пациентов показал, что CD8⁺ Т-клетки, полученные после бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) пациентов с тяжёлой/критической инфекцией, были менее многочисленными, более пролиферативно активными и фенотипически гетерогенными, тогда как в БАЛ пациентов с заболеванием средней тяжести присутствовала большая доля эффекторных CD8⁺ Т-клеток с тканевыми свойствами и высокой степенью экспансии [33]. В то же время было обнаружено, что после вирусной инфекции в лёгких пациентов увеличивается количество CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных и тканевых Т-клеток памяти (T_{RM}), а также секреция провоспалительных цитокинов, таких как IFN-γ.

Особый интерес вызывает вопрос об антигенной специфичности адаптивного иммунного ответа. Предполагается, что ответ иммунной системы на SARS-CoV-2 гетерогенен. На начальных этапах инфицирования клеток представление антигена реализуется через МНС-I. Сначала презентруются фрагменты неструктурных белков, которые первыми начинают синтезироваться в инфицированной клетке. Часть вирусных белков разрушается в протеасомах и попадает в эндоплазматический ретикулум/аппарат Гольджи, где связывается с новосинтезированными комплексами МНС-I. Представление антигенов комплексом МНС-II происходит после деградации вирусных белков в фагосомах и потому может содержать более разнообразные фрагменты структурных и неструктурных белков. В связи с этим в кровеносном русле могут циркулировать полиспецифичные Т-лимфоциты. Более того, характеристика антиген-специфичных Т-клеток SARS-CoV-2 на периферии показала, что различные эпитопы поляризуют

CD4⁺ Т-клетки по-разному: анти-S CD4⁺ Т-клетки в основном демонстрируют фенотип фолликулярного хелпера T_{fh}, тогда как поляризация Т-клеток, специфичных к мембранному (М) и нуклеокапсидному (N) белкам коронавируса приводит к формированию фенотипа T_{h1}/T_{h17} [44]. Полагают, что CD8⁺ Т-клетки, специфичные к М- и N-белкам, полифункциональны, и это необходимо учитывать при создании антигенных вакцин [45]. Нужно отметить, что авторы исследования не выявили истощения активированных антиген-специфичных Т-клеток во время острой инфекции и дальнейшего выздоровления. В то же время при секвенировании РНК одиночных клеток пациентов показано, что у пациентов с тяжёлым течением КОВИД-19 M₁₉₈₋₂₀₆-специфичные CD8⁺ Т-клетки характеризуются истощённым фенотипом и более низкой степенью дифференцировки по сравнению с пациентами со средней тяжестью заболевания [46]. Отсутствие ответа CD4⁺ Т-клеток часто ассоциировано с летальным исходом, что подчёркивает решающую роль этих клеток в контроле КОВИД-19. Повышение уровня PD-1 (белок программируемой клеточной смерти 1, англ. Programmed cell death 1) было обнаружено во всех CD4⁺ Т-клетках, за исключением наивных Т-клеток (рис. 3).

Цитотоксические CD8⁺ Т-клетки необходимы для очистки организма от вируса. Они уничтожают инфицированные клетки, представляющие вирусные антигены, при помощи МНС-I. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфичные к SARS-CoV-2, выявляются уже в первые несколько дней после появления симптомов [47]. Более высокая частота истощённых HLA-DR⁺CD38⁺CD8⁺ Т-клеток и нефункциональных CD4⁺ наивных Т-клеток и Т-клеток памяти наблюдалась у пациентов с тяжёлым течением КОВИД-19 [48].

В работе Cheng et al. [49] встречается любопытное предположение о наличии суперантигенной последовательности в структуре S-белка. Фрагмент S-белка SARS-CoV-2 678-TNSPRRRARSVASQ-690 структурно сходен с фрагментом 150-TN-KKKATVQELD-161 суперантигенного пептида SEB (staphylococcal enterotoxins B). Пептид 674-QTQTNSPRRAR-685, который содержит уникальный для SARS-CoV-2 мотив PRRA, может взаимодействовать с α- и β-цепями Т-клеточного рецептора, активируя Т-лимфоциты, минуя АПК и вызывая мультисистемный воспалительный синдром, ассоциированный с КОВИД-19 (рис. 3 и 4).

ИЗБЕГАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА

Известно, что SARS-CoV-2 обходит механизмы врождённой иммунной защиты и выработки противовирусных цитокинов различными путями.

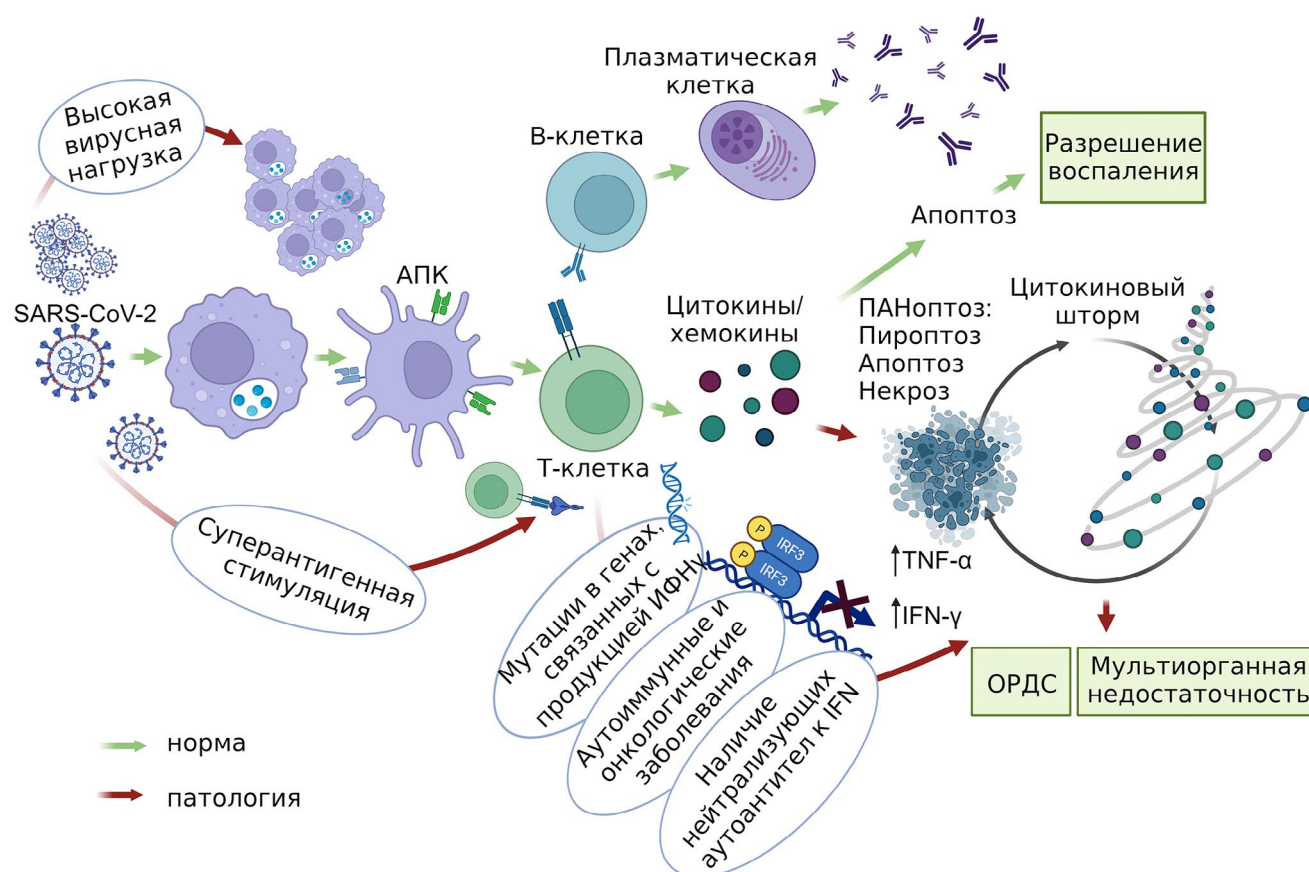


Рис. 4. Схематическое представление развития гипервоспаления и синдрома высвобождения цитокинов при тяжёлой форме COVID-19. SARS-CoV-2 инфицирует эпителиальные и иммунные клетки, вызывая повреждение тканей и высвобождение воспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-12 и TNF-α. Вирусные антигены и воспалительные цитокины привлекают клетки врождённого иммунитета (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные и NK-клетки) в очаг воспаления и активируют клетки адаптивного иммунитета (CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки), вызывая миелопоэз и гранулопоэз, а также устойчивую продукцию избыточного количества циркулирующих цитокинов, что ещё больше усугубляет повреждение эпителия. Иммунопатологические проявления COVID-19 включают лимфопению, дисрегуляцию моноцитов и макрофагов, нейтрофилию, ADE, снижение или задержку IFN-I и развитие СВИ. Периферические моноциты демонстрируют сдвиг фенотипа с CD16⁺ на CD14⁺, а количество макрофагов, выделяемых в БАЛ, увеличивается в связи с их переходом из крови в лёгкие. Снижение интенсивности или задержка IFN-I затрудняет клиренс вируса и вызывает парадоксальное гиперинтенсивное воспаление, что приводит к ухудшению прогноза у пациентов с COVID-19. Избыточная продукция системных цитокинов вызывает активацию макрофагов и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, что приводит к анемии, а также вызывает нарушение сосудистого гемостаза, приводящее к синдрому капиллярной утечки, тромбозу и синдрому внутрисосудистого свёртывания крови. В совокупности эти события приводят к острому респираторному дистресс-синдрому, мультиорганной недостаточности и смерти (составлено по [61–63]). Сокращение: ОРДС – острый респираторный дистресс синдром

Белки вируса могут нарушать распознавание патоген-ассоциированных молекулярных образов вирусной РНК путём предотвращения передачи сигналов посредством ТВК-1/ингибитора субъединицы ε киназы транскрипционных факторов NF-κB (IKKε), TRAF3 и IRF3. Это предотвращает передачу сигналов рецептора интерферона через STAT1 и способствует деградации мРНК хозяина, ингибируя трансляцию белка. Подавление интерферонного ответа способствует репликации вируса, пироптозу клетки-хозяина и усилению воспалительного ответа [50].

Вирусный белок ORF8 способен снижать презентацию антигенов МНС-I, напрямую взаимо-

действуя с этой молекулой [51] и стимулируя её лизосомальную деградацию за счёт активации Beclin 1-опосредованной аутофагии [52]. Белки ORF7a и ORF3a снижают уровень экспрессии МНС-I на поверхности клеток, причём ORF7a связывается с тяжёлой цепью МНС-I, мимикрируя под β2-микроглобулин [53]. Белки ORF3b, ORF6, ORF7a и ORF8 SARS-CoV-2 являются мощными антагонистами интерферона [54], а ORF6 подавляет IFN-γ-опосредованную сигнализацию STAT1/IRF1/NLRC5 (или IFN-II) и, как следствие, транскрипцию и экспрессию МНС-I [55]. В результате инфицированные клетки становятся менее чувствительными к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами, позволяя

SARS-CoV-2 избегать иммунного ответа. ORF3a взаимодействует с иммунной системой хозяина, активируя экспрессию гена про-IL-1 β и секрецию IL-1 β , тем самым активируя сигнальные пути NF- κ B и NLRP3 инфламмосомы и способствуя развитию СБЦ [56].

Эндонуклеаза Nsp15 расщепляет 5'-полиуридиновую РНК (PUN RNA) – они стимулируют мощный MDA5-зависимый интерфероновый ответ, а удаление полиуридинового участка РНК гасит этот ответ [57]. Nsp15 вовлечён в уклонение от врождённого иммунитета, возможно, путём укорачивания полиуридиновых участков, которые присутствуют на 5'-конце вирусных (–)РНК. SARS-CoV-2 влияет на убиквитинирование и деградацию сенсоров РНК RIG-I и MDA5. Происходит подавление активации митохондриального антивирусного сигнального белка MAVS, который необходим для стимуляции и ядерной транслокации IRF3 в ответ на активацию сенсора цитоплазматической РНК [58]. SARS-CoV-2 эффективно ингибируют интерфероновый ответ, подавляя активацию факторов, ассоциированных с рецептором TNF- α – TRAF3 и TRAF6, тем самым ограничивая стимуляцию факторов транскрипции NF- κ B, IRF3, IRF7, что приводит к снижению секреции провоспалительных эффекторных цитокинов IL-1, IL-6 и TNF- α . Кроме того, SARS-CoV-2 в ответ на активацию рецепторов IFN- α может ингибировать их сигнальный каскад через ингибирование фосфорилирования транскрипционных факторов. Ингибирование передачи сигналов IFN- α подавляет противовирусный ответ, в то время как увеличение экспрессии IL-1, IL-6 и TNF- α усиливает воспаление и выработку цитокинов посредством положительной обратной связи.

В целом, подавление механизмов врождённого иммунитета в инфицированных эпителиоцитах, моноцитах и макрофагах позволяет SARS-CoV-2 размножаться, не запуская механизмы адаптивного противовирусного ответа [30, 59]. Размножение вирусов приводит к гибели множества клеток и локальному воспалению с высвобождением провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-6, IFN- γ , моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), IL-2, IL-7, IL-10, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IP-10, макрофагальный воспалительный белок 1 α (MIP-1 α) и TNF- α . Эти цитокины вызывают поляризационный ответ Т-хелперов типа 1, привлекая клетки адаптивного иммунного ответа, в частности, CD14⁺/CD16⁺ воспалительные моноциты и Т-лимфоциты. Вирусы могут обходить данные механизмы путём индукции апоптоза Т-клеток [43].

Пул лимфоцитов также может быть истощён вследствие экспрессии провоспалительных цитокинов клетками врождённого иммунитета, которые проникают в лёгкие и запускают гипер-

воспаление и СБЦ (рис. 4). Неконтролируемая воспалительная клеточная инфильтрация может приводить к повреждению лёгких из-за высвобождения протеаз, активных форм кислорода и TNF- α , вызывая септический шок и полиорганную недостаточность [29]. СБЦ сопровождается значительными системными нарушениями и гибелью клеток вследствие ПАОптоза. Продукция и высвобождение TNF- α и IFN- γ активирует белки CARD, ключевые белки ПАОптосомы; блокада TNF- α - и IFN- γ -опосредованного запуска ПАОптоза предотвращает развитие «цитокинового шторма», лимфогистиоцитоза и септического шока у мышей при инфицировании SARS-CoV-2 [60].

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВИРУСА

Контагиозность, трансмиссивность, вирулентность – все эти свойства определяются набором вирусных белков, закодированных в единственной молекуле геномной РНК. Варианты SARS-CoV-2 имеют разную способность к инфицированию клеток или слиянию с мембраной эукариотической клетки. Сродство к ACE2 варьирует у различных вариантов вируса SARS-CoV-2. В одной из первых работ по SARS-CoV-2 было показано, что при однократном инфицировании клеток линии HEK293T, стабильно экспрессирующих ACE2, наибольшей способностью к инфицированию обладает вирус с мутацией D614G по сравнению с исходным Уханьским вариантом [64, 65]. Варианты вируса с дополнительной заменой N501W/Y (Альфа, В.1.1.7) имели ещё более высокое сродство S-белка к рецептору ACE2 [66]. Во время репликации в организме человека/животного вирус приобретает новые мутации, и это чаще всего происходит при ослабленном иммунитете, поскольку в таких условиях вирус может существовать в организме достаточно длительное время. Варианты вируса, возникающие внутри одного организма, обозначают как iSNVs (англ. intrahost single nucleotide variants) [67]. Были определены нуклеотидные последовательности 1313 образцов, при анализе которых было обнаружено, что при низкой вирусной нагрузке выявляется большее количество iSNVs. Наибольшая вариабельность была показана в участках, кодирующих белки ORF (3a, 7a, и 8) и N-белок. Сравнение в динамике (6 дней разницы) показало возникновение и потерю iSNVs. За небольшим исключением образцы с высокой вирусной нагрузкой показали ограниченное разнообразие iSNVs. Как полагают авторы данного исследования, при трансмиссии вируса большинство вариантов теряется либо фиксируются в момент передачи. Другими словами, мутации возникают, но только небольшое

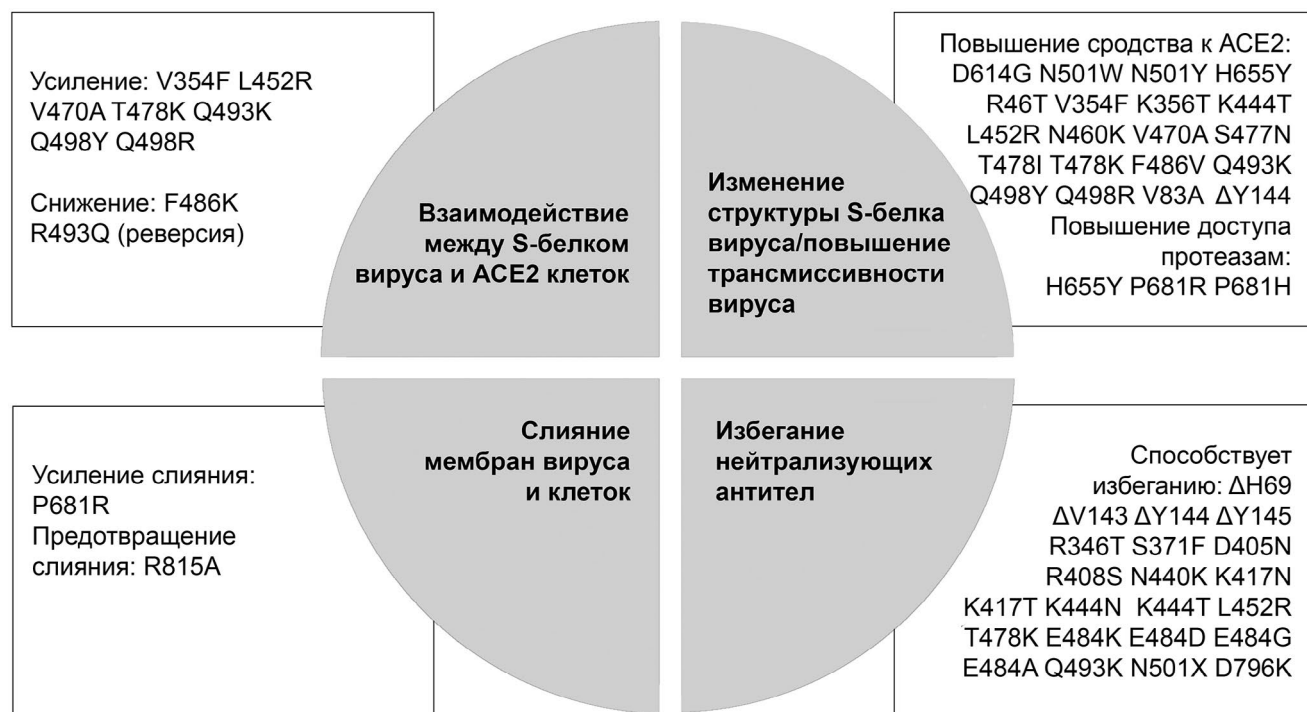


Рис. 5. Аминокислотные замены в шиповом белке SARS-CoV-2, влияющие на трансмиссивность вируса и способность уходить от иммунного ответа. (Ссылки на данные приведены в тексте)

их количество передаётся другому индивиду – правило бутылочного горлышка в эволюции. Большее количество вариантов будет возникать при низкой вирусной нагрузке и длительной персистенции вируса внутри одного организма, что подтверждается данными при инфицировании хронически больных людей или пациентов с иммунодефицитами [68–70].

Были проанализированы выявленные в различных вариантах вируса и потенциально возможные мутации S-белка (рис. 5). Показано, что замена T478I может повысить сродство S-белка к рецептору ACE2 человека и вероятность взаимодействия с рецептором ACE2 домашних животных (кур, кроликов, грызунов) [71]. Сродство шипового белка к ACE2 также повышают замены V354F, V470A [72], T478K и L452R [15] и Q498Y [73]; тройная замена (T478K, Q493K и Q498R), выявленная в варианте Омикрон, усиливает электростатическое взаимодействие между шиповым белком и рецептором ACE2 [74]. В то же время показано, что по способности к слиянию с мембраной, в целом, наиболее эффективны варианты Альфа, Гамма и Дельта, тогда как Омикрон сопоставим с исходным вариантом вируса [75]. Вирус варианта Омикрон (B.1.1.529) входит в клетки за счёт связывания с рецептором ACE2, но при этом независимо от мембранной протеазы TMPRSS2. Как показывают исследования на животных моделях, он в большей степени оседает в верхних отделах дыхательных путей, где происходит его репликация и наработка

вирусных частиц [76]. Возможно, это отчасти объясняет его высокую трансмиссивность (практически равную трансмиссивности кори), когда вирус воспроизводится в верхних дыхательных путях, откуда затем легко выделяется.

Замена E484K приводит к тому, что S-белок не распознаётся антителами к рецептор-связывающему (RBD) и N-терминальному (NTD) доменам. Так, B.1.351 (Бета) вариант вируса стал в 9 раз более устойчивым к нейтрализации конвалесцентной сывороткой и в 10–12 раз более устойчивым к нейтрализации сывороткой вакцинированных доноров [77]. Мутация S477N вызывает повышение сродства S-белка к рецептору ACE2 и приводит к повышению вирусной инфекционности [78, 79]. Мутационные изменения в NTD- и RBD-доменах S-белка вируса варианта Гамма (P.1) позволили ему уклониться от иммунного ответа, вызванного предшествующей естественной инфекцией и вакцинальной защитой. Основными заменами в этом варианте являются E484K и K417T, которые могут привести к неэффективности вакцины и высокой вероятности повторного заражения.

Первые три волны эпидемии SARS-CoV-2, обусловленные вариантами Альфа, Бета и Дельта, сопровождались высокими показателями смертности. Когда появился Омикрон, несмотря на его высокую трансмиссивность и контагиозность, количество смертельных исходов пошло на убыль. По способности к инфицированию, репликации внутри клеток, способности к слиянию

с клеточной мембраной Омикрон уступает варианту Дельта [80]. Как полагают многие исследователи, эволюция вируса направлена на селекцию такого варианта, который стремится к поражению наибольшего количества носителей, но при этом не вызывает их гибель. В варианте Омикрон «зафиксированы» все мутации, повышающие аффинность S-белка, произошедшие в более ранних вариантах SARS-CoV-2, и теперь эволюция вируса идёт в направлении приобретения мутаций, способствующих уходу от антител и ослаблению (буферизации) аффинности; дальнейшую эволюцию вируса могут запустить эпистатические мутации, например, замены в положениях 501, 493, 453 и 455 [81].

Благодаря заменам S371F, D405N и R408S варианты вируса Омикрон BA.2/BA.4/BA.5 приобрели способность избегать воздействия нейтрализующих антител, возникших против предыдущего варианта Омикрон BA.1 [82]. Антитела высокочувствительны к заменам N501, N440, K417 и E484. Garcia-Beltran et al. [83] провели исследования по оценке нейтрализующего потенциала против псевдовирuses 10 наиболее циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 у добровольцев, получивших вакцину BNT162b2 или mRNA-1273. Как выяснилось, псевдовирuses, которые несли мутации K417N/T, E484K и N501Y, были наиболее устойчивыми к нейтрализующим антителам.

Из протестированных вариантов Омикрон (BA.5) штаммы BQ.1.1.10, BA.4.6.3, XBB и CH.1.1 являются наиболее уклоняющимися от антител, намного превосходящими BA.5 и приближающимися к уровню SARS-CoV [84]. Штаммы варианта Омикрон BA.2.3.20, BA.2.75.2, CA.1, BR.2, BN.1, BM.1.1.1, BU.1, BQ.1.1 и XBB показывают преимущество в скорости роста по сравнению с BA.5. Тем не менее, несмотря на их расходящиеся эволюционные пути, мутации в RBD сходятся в нескольких ключевых точках, включая аминокислоты в положениях R346, K356, K444, L452, N460K, F486, F490 и R493. Замены K444N/T и K417N/T проявляют приблизительно одинаковую способность избегать нейтрализующее действие антител, в то время как замена R493Q влияет на связывание с рецептором ACE2 [84]. Эти данные указывают на потенциальную возможность возникновения штамма, способного уходить от действия нейтрализующих антител при сохранении способности связывать ACE2. Поскольку до сих пор остаётся открытым вопрос о вероятности возникновения опасных вариантов/штаммов вируса SARS-CoV-2, то исследователи пытаются предсказать такие риски; так, предсказанные псевдовирuses предвосхитили появившиеся позднее варианты/штаммы [84].

В связи с уклонением новых подвариантов Омикрона от действия нейтрализующих антител

исследователи и фармакологические компании направили свои усилия на разработку новых вакцин, в том числе двухвалентных адаптированных вакцин к BA.4/BA.5 подвариантам Омикрона, например, мРНК-вакцина COMIRNATY® от Pfizer-BioNTech, или к другим вариантам Омикрона. При этом остаётся несколько актуальных вопросов: нужна ли ревакцинация исходными вакцинами и как иммунная система реализует свой ответ на новые варианты/вакцины – «привлечёт новых солдат или переобучит старых»? То есть преодолеет ли иммунная система импринтинг и возникнут новые В-клетки памяти, специфичные к новым антигенам, или произойдёт модификация существующих антител. Известный феномен иммунного импринтинга заключается в том, что иммунная система «фиксируется» на первой версии антигена, с которой она сталкивается, независимо от последующих атак другими вариантами патогена. В работе Kaku et al. [85] показано, что ревакцинация или бустерная вакцинация мРНК-вакцинами вызывает минимальную активацию *de novo* Омикрон-специфического ответа, вместо этого запускает созревание сродства уже существующих кросс-реактивных В-клеток памяти (affinity maturation of pre-existing cross-reactive memory B cells). В то же время другими исследователями обнаружено, что вакцины против вариантов Омикрон вызвали появление моноклональных антител против S-белка вируса с новыми эпитопами, что, как полагают авторы, говорит об активации наивных В-клеток [86]. Считается, что воздействие гетерологичных вариантов SARS-CoV-2 стимулирует эволюцию В-клеток памяти и предполагает, что конвергентные реакции нейтрализующих антител продолжают формировать эволюцию вируса, т.е. идёт двусторонняя эволюция: антител и вируса. Непосредственно после инфекции идёт развитие ответа В-клеток памяти (их количества и силы ответа), тогда как гуморальный ответ продолжает развиваться даже после разрешения инфекции, приводя к повышению специфичности антител [58].

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ТЕЧЕНИЕ КОВИД-19

Течение КОВИД-19 значительно варьирует: от бессимптомных заболеваний до летальной пневмонии. Известно, что чаще в тяжёлой форме это заболевание переносят пожилые люди, люди с ослабленным иммунитетом и с уже имеющимися патологиями. Однако были зафиксированы редкие случаи, когда у ранее не имевших жалоб на здоровье и не пожилых людей развивался КОВИД-19 в тяжёлой форме, что позволило сделать предположение о наличии врождённых особенностей

Полиморфизмы генов человека, влияющие на инфицирование SARS-CoV-2 и тяжесть течения КОВИД-19

Ген	Эффект	Ссылка
<i>SLC6A20</i>	низкий риск заражения, бессимптомное или лёгкое течение у носителей генотипа СТ (rs139940581)	[88]
<i>TMPRSS2</i>	носители генотипа АА (rs12329760) чаще болели бессимптомно или КОВИД-19 средней тяжести	[88]
<i>IFNAR2</i>	высокий риск заражения у носителей генотипа ТС (rs2229207) и аллели Т (rs17860118)	[88]
<i>ADAM17</i>	у носителей rs4622692 (генотип ТG) и rs1048610 (генотип ТС) чаще наблюдается КОВИД-19 средней тяжести	[88]
<i>IFNAR2</i>	высокие риски госпитализации (rs13050728) и интенсивной терапии (rs2236757, rs17860115)	[87, 88]
<i>SLC6A20</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs73062389)	[88]
<i>FOXP4</i>	среднее и тяжёлое течение с необходимостью госпитализации (rs1886814)	[87]
<i>ABO</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs912805253/rs529565)	[87]
<i>SFTPD</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs721917)	[87]
<i>ELF5</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs766826)	[87, 89]
<i>FBRSL1</i>	тяжёлое, критическое течение КОВИД-19 (rs12809318)	[87, 90, 91]
<i>DPP9</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs2109069); вариант ассоциирован с идиопатическим пульмонарным фиброзом	[87, 92]
<i>DPP9</i>	тяжёлое течение, фатальный исход (rs2277735, генотип АG); высокий риск необходимости интенсивной терапии (rs12610495)	[88]
<i>TMPRSS2</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs3787946)	[87, 93, 94]
<i>MUC5B</i>	наличие полиморфизма rs35705950 (аллель Т) является фактором риска развития лёгочного фиброза, но вместе с тем снижает риск развития тяжёлого КОВИД-19 и госпитализации	[87, 95]
<i>TYK2</i>	rs2304255 (генотип СТ) – тяжёлое течение, фатальный исход; высокий риск необходимости кардиоваскулярного мониторинга и интенсивной терапии (rs34536443), показана связь с развитием аутоиммунных заболеваний	[87, 88]
<i>FBRSL1</i>	высокий риск госпитализации и смерти вследствие КОВИД-19 (rs12809318); высокий риск необходимости кардиоваскулярного мониторинга и интенсивной терапии (rs56106917)	[87]
<i>ABO</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs657152)	[87]
<i>HLA-G</i>	высокий риск необходимости кардиоваскулярного мониторинга и интенсивной терапии (rs9380142)	[87]
<i>CCHCR1</i>	высокий риск необходимости кардиоваскулярного мониторинга и интенсивной терапии (rs143334143)	[87]
<i>NOTCH4</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs3131294)	[87]
<i>EFNA4</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs114301457)	[87]
<i>BCL11A</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs1123573)	[87]
<i>SLC6A20</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs2271616)	[87]
<i>ELF5</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs61882275)	[87]
<i>IL10RB</i>	среднее и тяжёлое течение КОВИД-19 (rs8178521)	[87]

иммунной системы, влияющих на инфицирование SARS-CoV-2 и тяжесть течения заболевания. В обзоре Van der Made et al. [87] приведены данные анализа нескольких проектов по полногеномному секвенированию 50 000 пациентов, перенёсших КОВИД-19. Наиболее критичными в определении тяжести течения заболевания оказались полиморфизмы в генах *IFNAR1* и *IFNAR2*, поскольку ранний выброс IFN- α запускает мощный противовирусный ответ (таблица).

Ответ на вопрос о причине индивидуальных особенностей течения КОВИД-19 искали также в изменении метилирования генов в клетках крови. Достоверные изменения были выявлены всего в нескольких генах: *FBXO16*, *PSD3*, *RAE1*, *NIPAL2*, *SHANK2* и *PGM1*, все они играют важную роль в развитии иммунного ответа [96].

Любопытно, что у носителей первой группы крови реже развивалось тяжёлое течение КОВИД-19 [88, 97]. Возможно, эта связь имеет под собой молекулярное обоснование, поскольку известно, что группы крови также влияют на факторы тромбообразования и адгезии [98]. Как показали исследования, носители группы крови A(II) имеют более высокий риск заражения, поскольку вирус SARS-CoV-2 преимущественно инфицировал клетки, экспрессирующие гликопротеины – антигены второй группы крови [99]. По предположению авторов, механизм заключается в том, что рецептор-связывающий домен S-белка имеет высокую гомологию с галектинами и схожий с ними профиль связывания гликанов. Вполне закономерно, что тяжело протекает КОВИД-19 у лиц, имеющих врождённые мутации в системе регуляции иммунитета, например, при нарушениях в сигнальных путях TLR3 и IRF7 (гены *IRF7*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *TLR3*, *TICAM1*, *TBK1*, *IRF3* и *UNC93B1*), приводящие к потере функциональности и нарушению иммунного ответа IFN-I.

Структурные особенности ACE2 также играют роль в инфицировании вирусом SARS-CoV-2. Были обнаружены варианты рецептора ACE2, не связывающие S-белок (D355N), варианты с низкой аффинностью к S-белку (E35K, E37K, Y50F, N51S, M62V, F72V, G352V, D355N и P389H) и варианты, имеющие повышенное сродство к S-белку (S19P, I21V, E23K, K26R, N64K, T92I, Q102P, D206G, G211R, R219C, E329G, H378R, V447F, I468V, A501T, H505R, Y515C и N720D) [100–102]. Эти и другие варианты вносят вклад в индивидуальные особенности течения КОВИД-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный уровень технического развития позволил человечеству внимательно присмо-

треться к возбудителю пандемии КОВИД-19, вирусу SARS-CoV-2, чтобы понять его биологию и взаимодействие с организмом-хозяином. При помощи полногеномного секвенирования, модельных исследований на изолированных клетках и животных получены огромные массивы данных, позволившие оценить вклад мутаций вирусных белков в способность вируса к инфицированию клеток. Все эти данные показали, что вирус достаточно быстро и много мутирует, однако не все его мутации закрепляются в популяции. Иммунная система человека формирует иммунитет к возбудителю, важными особенностями которого являются гетерогенность и кросс-реактивность. В то же время вирус стремится избежать действия нейтрализующих антител и «усилить» или варьировать свои способы прикрепления и проникновения в клетки. На примере вируса SARS-CoV-2 мы видим, что в вирусный геном могут встраиваться относительно большие нуклеотидные фрагменты, которые кодируют функциональные домены (например, полиосновный сайт расщепления протеазами) и придают вирусу новые свойства. Условиями возникновения таких модификаций могут быть длительная персистенция вирусов в организме, коинфекции и ослабленная иммунная система – всё это повышает риски возникновения новых рекомбинантных штаммов с повышенной вирулентностью. Остаётся надежда, что приобретённые знания о функционировании вируса SARS-CoV-2 помогут исследователям в разработке методов профилактики и лечения заболеваний, вызванных респираторными вирусами.

Вклад авторов. Габдулхакова А.Г., Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А. – концепция и структура работы, редактирование текста; Мингалеева Р.Н., Ромозанова А.М., Сагъдеева А.Р., Габдулхакова А.Г., Филина Ю.В. – анализ литературы, написание текста, подготовка иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2023-0011).

Благодарность. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского (Приволжского) федерального университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G., and van Goor, H. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis, *J. Pathol.*, **203**, 631-637, doi: 10.1002/path.1570.
2. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., and Choe, H. (2022) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 3-20, doi: 10.1038/s41580-021-00418-x.
3. Bohan, D., Van Ert, H., Ruggio, N., Rogers, K. J., Badreddine, M., Aguilar Briseno, J. A., Elliff, J. M., Rojas Chavez, R. A., Gao, B., Stokowy, T., Christakou, E., Kursula, P., Micklem, D., Gausdal, G., Haim, H., Minna, J., Lorens, J. B., and Maury, W. (2021) Phosphatidylserine receptors enhance SARS-CoV-2 infection, *PLoS Pathog.*, **17**, e1009743, doi: 10.1371/journal.ppat.1009743.
4. Knyazev, E., Nersisyan, S., and Tonevitsky, A. (2021) Endocytosis and transcytosis of SARS-CoV-2 across the intestinal epithelium and other tissue barriers, *Front. Immunol.*, **12**, 636966, doi: 10.3389/fimmu.2021.636966.
5. Sefik, E., Qu, R., Junqueira, C., Kaffé, E., Mirza, H., Zhao, J., Brewer, J. R., Han, A., Steach, H. R., Israelow, B., Blackburn, H. N., Velazquez, S. E., Chen, Y. G., Halene, S., Iwasaki, A., Meffre, E., Nussenzweig, M., Lieberman, J., Wilen, C. B., Kluger, Y., et al. (2022) Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology, *Nature*, **606**, 585-593, doi: 10.1038/s41586-022-04802-1.
6. Lee, W. S., Wheatley, A. K., Kent, S. J., and DeKosky, B. J. (2020) Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1185-1191, doi: 10.1038/s41564-020-00789-5.
7. Koch, J., Uckele, Z. M., Doldan, P., Stanifer, M., Boulant, S., and Lozach, P. Y. (2021) TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells, *EMBO J.*, **40**, e107821, doi: 10.15252/embj.2021107821.
8. Healy, E. F. (2022) How tetraspanin-mediated cell entry of SARS-CoV-2 can dysregulate the shedding of the ACE2 receptor by ADAM17, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **593**, 52-56, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.01.038.
9. Hantak, M. P., Qing, E., Earnest, J. T., and Gallagher, T. (2019) Tetraspanins: architects of viral entry and exit platforms, *J. Virol.*, **93**, doi: 10.1128/JVI.01429-17.
10. New, C., Lee, Z. Y., Tan, K. S., Wong, A. H., Wang, Y., and Tran, T. (2021) Tetraspanins: host factors in viral infections, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11609, doi: 10.3390/ijms22111609.
11. Luan, B., Huynh, T., Cheng, X., Lan, G., and Wang, H. R. (2020) Targeting proteases for treating COVID-19, *J. Proteome Res.*, **19**, 4316-4326, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00430.
12. Bollavaram, K., Leeman, T. H., Lee, M. W., Kulkarni, A., Upshaw, S. G., Yang, J., Song, H., and Platt, M. O. (2021) Multiple sites on SARS-CoV-2 spike protein are susceptible to proteolysis by cathepsins B, K, L, S, and V, *Protein Sci.*, **30**, 1131-1143, doi: 10.1002/pro.4073.
13. Mustafa, Z., Kalbacher, H., and Burster, T. (2022) Occurrence of a novel cleavage site for cathepsin G adjacent to the polybasic sequence within the proteolytically sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 Omicron variant: the amino acid substitution N679K and P681H of the spike protein, *PLoS One*, **17**, e0264723, doi: 10.1371/journal.pone.0264723.
14. Yu, S., Zheng, X., Zhou, B., Li, J., Chen, M., Deng, R., Wong, G., Lavillette, D., and Meng, G. (2022) SARS-CoV-2 spike engagement of ACE2 primes S2' site cleavage and fusion initiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2111199119, doi: 10.1073/pnas.2111199119.
15. Cheng, M. H., Krieger, J. M., Banerjee, A., Xiang, Y., Kaynak, B., Shi, Y., Arditi, M., and Bahar, I. (2022) Impact of new variants on SARS-CoV-2 infectivity and neutralization: A molecular assessment of the alterations in the spike-host protein interactions, *iScience*, **25**, 103939, doi: 10.1016/j.isci.2022.103939.
16. Rajah, M. M., Bernier, A., Buchrieser, J., and Schwartz, O. (2022) The mechanism and consequences of SARS-CoV-2 spike-mediated fusion and syncytia formation, *J. Mol. Biol.*, **434**, 167280, doi: 10.1016/j.jmb.2021.167280.
17. Bottcher-Friebertshauser, E., Klenk, H. D., and Garten, W. (2013) Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium, *Pathog. Dis.*, **69**, 87-100, doi: 10.1111/2049-632X.12053.
18. Seidah, N. G., Pasquato, A., and Andreo, U. (2021) How do enveloped viruses exploit the secretory proprotein convertases to regulate infectivity and spread? *Viruses*, **13**, 1229, doi: 10.3390/v13071229.
19. Li, Q., Liu, Y., and Zhang, L. (2022) Cytoplasmic tail determines the membrane trafficking and localization of SARS-CoV-2 spike protein, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1004036, doi: 10.3389/fmolb.2022.1004036.
20. Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y., and Wang, H. (2020) The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens, *Front. Immunol.*, **11**, 576622, doi: 10.3389/fimmu.2020.576622.
21. Zhang, Z., Zheng, Y., Niu, Z., Zhang, B., Wang, C., Yao, X., Peng, H., Franca, D. N., Wang, Y., Zhu, Y., Su, Y., Tang, M., Jiang, X., Ren, H., He, M., Wang, Y., Gao, L., Zhao, P., Shi, H., Chen, Z., et al. (2021) SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination, *Cell Death Differ.*, **28**, 2765-2777, doi: 10.1038/s41418-021-00782-3.

22. Bussani, R., Schneider, E., Zentilin, L., Collesi, C., Ali, H., Braga, L., Volpe, M. C., Colliva, A., Zanconati, F., Berlot, G., Silvestri, F., Zacchigna, S., and Giacca, M. (2020) Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology, *EBioMedicine*, **61**, 103104, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103104.
23. Manan, A., Pirzada, R. H., Haseeb, M., and Choi, S. (2022) Toll-like receptor mediation in SARS-CoV-2: a therapeutic approach, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10716, doi: 10.3390/ijms231810716.
24. Hou, W., Wang, S., Wu, H., Xue, L., Wang, B., Wang, S., and Wang, H. (2022) Small GTPase-a key role in host cell for coronavirus infection and a potential target for coronavirus vaccine adjuvant discovery, *Viruses*, **14**, 2044, doi: 10.3390/v14092044.
25. Dimitrov, D. S. (2004) Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 109-122, doi: 10.1038/nrmicro817.
26. Oughtred, R., Rust, J., Chang, C., Breitkreutz, B. J., Stark, C., Willems, A., Boucher, L., Leung, G., Kolas, N., Zhang, F., Dolma, S., Coulombe-Huntington, J., Chatr-Aryamontri, A., Dolinski, K., and Tyers, M. (2021) The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions, *Protein Sci.*, **30**, 187-200, doi: 10.1002/pro.3978.
27. Schiuma, G., Beltrami, S., Bortolotti, D., Rizzo, S., and Rizzo, R. (2022) Innate Immune Response in SARS-CoV-2 Infection, *Microorganisms*, **10**, 501, doi: 10.3390/microorganisms10030501.
28. Zhang, S., Wang, L., and Cheng, G. (2022) The battle between host and SARS-CoV-2: Innate immunity and viral evasion strategies, *Mol. Ther.*, **30**, 1869-1884, doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.014.
29. Farrag, M. A., Amer, H. M., Bhat, R., Hamed, M. E., Aziz, I. M., Mubarak, A., Dawoud, T. M., Almalki, S. G., Alghofaili, F., Alnemare, A. K., Al-Baradi, R. S., Alosaimi, B., and Alturaiki, W. (2021) SARS-CoV-2: an overview of virus genetics, transmission, and immunopathogenesis, *Int. J. Environ Res. Public Health*, **18**, 6312, doi: 10.3390/ijerph18126312.
30. Sette, A., and Crotty, S. (2021) Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19, *Cell*, **184**, 861-880, doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
31. Mabrey, F. L., Morrell, E. D., and Wurfel, M. M. (2021) TLRs in COVID-19: how they drive immunopathology and the rationale for modulation, *Innate Immun.*, **27**, 503-513, doi: 10.1177/17534259211051364.
32. Bain, C. C., Lucas, C. D., and Rossi, A. G. (2022) Pulmonary macrophages and SARS-Cov2 infection, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **367**, 1-28, doi: 10.1016/bs.ircmb.2022.01.001.
33. Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., Liu, L., Amit, I., Zhang, S., and Zhang, Z. (2020) Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19, *Nat. Med.*, **26**, 842-844, doi: 10.1038/s41591-020-0901-9.
34. Wang Chau, C., and Sugimura, R. (2022) Locked in a pro-inflammatory state, *Elife*, **11**, e80699, doi: 10.7554/eLife.80699.
35. Salina, A. C. G., Dos-Santos, D., Rodrigues, T. S., Fortes-Rocha, M., Freitas-Filho, E. G., Alzamora-Terrel, D. L., Castro, I. M. S., Fraga da Silva, T. F. C., de Lima, M. H. F., Nascimento, D. C., Silva, C. M., Toller-Kawahisa, J. E., Becerra, A., Oliveira, S., Caetite, D. B., Almeida, L., Ishimoto, A. Y., Lima, T. M., Martins, R. B., Veras, F., et al. (2022) Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells, *Elife*, **11**, e74443, doi: 10.7554/eLife.74443.
36. Georgakopoulou, V. E., Makrodimitri, S., Triantafyllou, M., Samara, S., Voutsinas, P. M., Anastasopoulou, A., Papageorgiou, C. V., Spandidos, D. A., Gkoufa, A., Papalexis, P., Xenou, E., Chelidonis, G., Sklapani, P., Trakas, N., and Sipsas, N. V. (2022) Immature granulocytes: Innovative biomarker for SARSCoV2 infection, *Mol. Med. Rep.*, **26**, 217, doi: 10.3892/mmr.2022.12733.
37. Dean, L. S., Devendra, G., Jiyarom, B., Subia, N., Tallquist, M. D., Nerurkar, V. R., Chang, S. P., Chow, D. C., Shikuma, C. M., and Park, J. (2022) Phenotypic alteration of low-density granulocytes in people with pulmonary post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection, *Front. Immunol.*, **13**, 1076724, doi: 10.3389/fimmu.2022.1076724.
38. Воробьева, Н. В. (2020) Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты, *Вестник Московского университета, Серия 16, Биология*, **75**, 16.
39. Labzin, L. I., Chew, K. Y., Eschke, K., Wang, X., Esposito, T., Stocks, C. J., Rae, J., Patrick, R., Mostafavi, H., Hill, B., Yordanov, T. E., Holley, C. L., Emming, S., Fritzlar, S., Mordant, F. L., Steinfert, D. P., Subbarao, K., Nefzger, C. M., Lagendijk, A. K., Gordon, E. J., et al. (2023) Macrophage ACE2 is necessary for SARS-CoV-2 replication and subsequent cytokine responses that restrict continued virion release, *Sci. Signal.*, **16**, eabq1366, doi: 10.1126/scisignal.abq1366.
40. Jalloh, S., Olejnik, J., Berrigan, J., Nisa, A., Suder, E. L., Akiyama, H., Lei, M., Ramaswamy, S., Tyagi, S., Bushkin, Y., Muhlberger, E., and Gummuluru, S. (2022) CD169-mediated restrictive SARS-CoV-2 infection of macrophages induces pro-inflammatory responses, *PLoS Pathog.*, **18**, e1010479, doi: 10.1371/journal.ppat.1010479.
41. Knoll, R., Schultze, J. L., and Schulte-Schrepping, J. (2021) Monocytes and macrophages in COVID-19, *Front. Immunol.*, **12**, 720109, doi: 10.3389/fimmu.2021.720109.
42. Laidlaw, B. J., and Ellebedy, A. H. (2022) The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Immunol.*, **22**, 7-18, doi: 10.1038/s41577-021-00657-1.

43. Shen, X. R., Geng, R., Li, Q., Chen, Y., Li, S. F., Wang, Q., Min, J., Yang, Y., Li, B., Jiang, R. D., Wang, X., Zheng, X. S., Zhu, Y., Jia, J. K., Yang, X. L., Liu, M. Q., Gong, Q. C., Zhang, Y. L., Guan, Z. Q., Li, H. L., et al. (2022) ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **7**, 83, doi: 10.1038/s41392-022-00919-x.
44. Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O., Stralin, K., Gorin, J. B., Olsson, A., Llewellyn-Lacey, S., Kamal, H., Bogdanovic, G., Muschiol, S., Wullimann, D. J., Kammann, T., Emgard, J., Parrot, T., Folkesson, E., Karolinska, C.-S. G., Rooyackers, O., Eriksson, L. I., Henter, J. I., Sonnerborg, A., et al. (2020) Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19, *Cell*, **183**, 158-168 e114, doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017.
45. Shakiba, M. H., Gemund, I., Beyer, M., and Bonaguro, L. (2023) Lung T cell response in COVID-19, *Front. Immunol.*, **14**, 1108716, doi: 10.3389/fimmu.2023.1108716.
46. Ogura, H., Gohda, J., Lu, X., Yamamoto, M., Takesue, Y., Son, A., Doi, S., Matsushita, K., Isobe, F., Fukuda, Y., Huang, T. P., Ueno, T., Mambo, N., Murakami, H., Kawaguchi, Y., Inoue, J. I., Shirai, K., Yamasaki, S., Hirata, J. I., and Ishido, S. (2022) Dysfunctional Sars-CoV-2-M protein-specific cytotoxic T lymphocytes in patients recovering from severe COVID-19, *Nat. Commun.*, **13**, 7063, doi: 10.1038/s41467-022-34655-1.
47. Moss, P. (2022) The T cell immune response against SARS-CoV-2, *Nat. Immunol.*, **23**, 186-193, doi: 10.1038/s41590-021-01122-w.
48. Du, J., Wei, L., Li, G., Hua, M., Sun, Y., Wang, D., Han, K., Yan, Y., Song, C., Song, R., Zhang, H., Han, J., Liu, J., and Kong, Y. (2021) Persistent high percentage of HLA-DR⁺CD38(high) CD8⁺ T cells associated with immune disorder and disease severity of COVID-19, *Front. Immunol.*, **12**, 735125, doi: 10.3389/fimmu.2021.735125.
49. Cheng, M. H., Zhang, S., Porritt, R. A., Noval Rivas, M., Paschold, L., Willscher, E., Binder, M., Ardit, M., and Bahar, I. (2020) Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 25254-25262, doi: 10.1073/pnas.2010722117.
50. Tay, M. Z., Poh, C. M., Renia, L., MacAry, P. A., and Ng, L. F. P. (2020) The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 363-374, doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
51. Flower, T. G., Buffalo, C. Z., Hooy, R. M., Allaire, M., Ren, X., and Hurley, J. H. (2021) Structure of SARS-CoV-2 ORF8, a rapidly evolving immune evasion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2021785118, doi: 10.1073/pnas.2021785118.
52. Zhang, Y., Chen, Y., Li, Y., Huang, F., Luo, B., Yuan, Y., Xia, B., Ma, X., Yang, T., Yu, F., Liu, J., Liu, B., Song, Z., Chen, J., Yan, S., Wu, L., Pan, T., Zhang, X., Li, R., Huang, W., et al. (2021) The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-Iota, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2024202118, doi: 10.1073/pnas.2024202118.
53. Arshad, N., Laurent-Rolle, M., Ahmed, W. S., Hsu, J. C., Mitchell, S. M., Pawlak, J., Sengupta, D., Biswas, K. H., and Cresswell, P. (2023) SARS-CoV-2 accessory proteins ORF7a and ORF3a use distinct mechanisms to down-regulate MHC-I surface expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2208525120, doi: 10.1073/pnas.2208525120.
54. Redondo, N., Zaldivar-Lopez, S., Garrido, J. J., and Montoya, M. (2021) SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns, *Front. Immunol.*, **12**, 708264, doi: 10.3389/fimmu.2021.708264.
55. Yoo, J. S., Sasaki, M., Cho, S. X., Kasuga, Y., Zhu, B., Ouda, R., Orba, Y., de Figueiredo, P., Sawa, H., and Kobayashi, K. S. (2021) SARS-CoV-2 inhibits induction of the MHC class I pathway by targeting the STAT1-IRF1-NLRC5 axis, *Nat. Commun.*, **12**, 6602, doi: 10.1038/s41467-021-26910-8.
56. Zandi, M., Shafaati, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Pourghadamyari, H., Fani, M., Soltani, S., Kaleji, H., and Abbasi, S. (2022) The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion, *Biomed. Pharmacother.*, **156**, 113889, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113889.
57. Hackbart, M., Deng, X., and Baker, S. C. (2020) Coronavirus endoribonuclease targets viral polyuridine sequences to evade activating host sensors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 8094-8103, doi: 10.1073/pnas.1921485117.
58. Wang, Z., Zhou, P., Muecksch, F., Cho, A., Ben Tanfous, T., Canis, M., Witte, L., Johnson, B., Raspe, R., Schmidt, F., Bednarski, E., Da Silva, J., Ramos, V., Zong, S., Turroja, M., Millard, K. G., Yao, K. H., Shimeliovich, I., Dizon, J., Kaczynska, A., et al. (2022) Memory B cell responses to Omicron subvariants after SARS-CoV-2 mRNA breakthrough infection in humans, *J. Exp. Med.*, **219**, e20221006, doi: 10.1084/jem.20221006.
59. Felsenstein, S., Herbert, J. A., McNamara, P. S., and Hedrich, C. M. (2020) COVID-19: Immunology and treatment options, *Clin. Immunol.*, **215**, 108448, doi: 10.1016/j.clim.2020.108448.
60. Karki, R., Sharma, B. R., Tuladhar, S., Williams, E. P., Zalduendo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banoth, B., Malireddi, R. K. S., Schreiner, P., Neale, G., Vogel, P., Webby, R., Jonsson, C. B., and Kanneganti, T. D. (2021) Synergism of TNF-alpha and IFN-gamma triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes, *Cell*, **184**, 149-168.e117, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.025.
61. Meng, Q. F., Tian, R., Long, H., Wu, X., Lai, J., Zharkova, O., Wang, J. W., Chen, X., and Rao, L. (2021) Capturing cytokines with advanced materials: a potential strategy to tackle COVID-19 cytokine storm, *Adv. Mater.*, **33**, e2100012, doi: 10.1002/adma.202100012.
62. Yang, L., Liu, S., Liu, J., Zhang, Z., Wan, X., Huang, B., Chen, Y., and Zhang, Y. (2020) COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **5**, 128, doi: 10.1038/s41392-020-00243-2.

63. Yang, L., Xie, X., Tu, Z., Fu, J., Xu, D., and Zhou, Y. (2021) The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **6**, 255, doi: 10.1038/s41392-021-00679-0.
64. Zhu, Y., Dong, X., Liu, N., Wu, T., Chong, H., Lei, X., Ren, L., Wang, J., and He, Y. (2022) SARS-CoV-2 fusion-inhibitory lipopeptides maintain high potency against divergent variants of concern including Omicron, *Emerg. Microbes Infect.*, **11**, 1819-1827, doi: 10.1080/22221751.2022.2098060.
65. Peacock, T. P., Brown, J. C., Zhou, J., Thakur, N., Newman, J., Kugathasan, R., Sukhova, K., Kaforou, M., Bailey, D., and Barclay, W. S. (2022) The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.12.31.474653.
66. Chan, K. K., Tan, T. J. C., Narayanan, K. K., and Procko, E. (2021) An engineered decoy receptor for SARS-CoV-2 broadly binds protein S sequence variants, *Sci. Adv.*, **7**, doi: 10.1126/sciadv.abf1738.
67. Lythgoe, K. A., Hall, M., Ferretti, L., de Cesare, M., MacIntyre-Cockett, G., Trebes, A., Andersson, M., Otecko, N., Wise, E. L., Moore, N., Lynch, J., Kidd, S., Cortes, N., Mori, M., Williams, R., Vernet, G., Justice, A., Green, A., Nicholls, S. M., Ansari, M. A., et al. (2021) SARS-CoV-2 within-host diversity and transmission, *Science*, **372**, doi: 10.1126/science.abg0821.
68. Mendes-Correa, M. C., Salomao, M. C., Ghilardi, F., Tozetto-Mendoza, T. R., Santos Villas-Boas, L., de Paula, A. V., Paiao, H. G. O., da Costa, A. C., Leal, F. E., Ferraz, A. B. C., Sales, F. C. S., Claro, I. M., Ferreira, N. E., Pereira, G. M., da Silva, A. R., Jr, Freire, W., Espinoza, E. P. S., Manuli, E. R., Romano, C. M., de Jesus, J. G., et al. (2023) SARS-CoV-2 detection and culture in different biological specimens from immunocompetent and immunosuppressed COVID-19 patients infected with two different viral strains, *Viruses*, **15**, 1270, doi: 10.3390/v15061270.
69. Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M., Lythgoe, K., Simmonds, P., Stilianakis, N. I., and Katzourakis, A. (2023) The evolution of SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 361-379, doi: 10.1038/s41579-023-00878-2.
70. Leitao, I. C., Calil, P. T., Galliez, R. M., Moreira, F. R. R., Mariani, D., Castineiras, A. C. P., da Silva, G. P. D., Maia, R. A., Correa, I. A., Monteiro, F. L. L., de Souza, M. R. M., Goncalves, C. C. A., Higa, L. M., de Jesus Ribeiro, L., Fonseca, V. W. P., Bastos, V. C., Voloch, C. M., Faffe, D. S., da Costa Ferreira, O., Jr, Tanuri, A., et al. (2021) Prolonged SARS-CoV-2 positivity in immunocompetent patients: virus isolation, genomic integrity, and transmission risk, *Microbiol. Spectr.*, **9**, e0085521, doi: 10.1128/Spectrum.00855-21.
71. Wang, Q., Ye, S. B., Zhou, Z. J., Li, J. Y., Lv, J. Z., Hu, B., Yuan, S., Qiu, Y., and Ge, X. Y. (2023) Key mutations on spike protein altering ACE2 receptor utilization and potentially expanding host range of emerging SARS-CoV-2 variants, *J. Med. Virol.*, **95**, e28116, doi: 10.1002/jmv.28116.
72. Shu, C. J., Huang, X., Tang, H. H., Mo, D. D., Zhou, J. W., and Deng, C. (2021) Mutations in spike protein and allele variations in ACE2 impact targeted therapy strategies against SARS-CoV-2, *Zool. Res.*, **42**, 170-181, doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.301.
73. Erausquin, E., Glaser, F., Fernandez-Recio, J., and Lopez-Sagaseta, J. (2022) Structural bases for the higher adherence to ACE2 conferred by the SARS-CoV-2 spike Q498Y substitution, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **78**, 1156-1170, doi: 10.1107/S2059798322007677.
74. Shah, M., and Woo, H. G. (2021) Omicron: a heavily mutated SARS-CoV-2 variant exhibits stronger binding to ACE2 and potently escapes approved COVID-19 therapeutic antibodies, *Front. Immunol.*, **12**, 830527, doi: 10.3389/fimmu.2021.830527.
75. Huang, C., Yang, Y., Yang, P., Wang, F., Li, X., Song, X., Wang, Y., Yu, C., Wang, X., and Wang, S. (2022) A robust reporting system for measurement of SARS-CoV-2 spike fusion efficiency, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **7**, 179, doi: 10.1038/s41392-022-01037-4.
76. McMahan, K., Giffin, V., Tostanoski, L. H., Chung, B., Siamatu, M., Suthar, M. S., Halfmann, P., Kawaoka, Y., Piedra-Mora, C., Jain, N., Ducat, S., Kar, S., Andersen, H., Lewis, M. G., Martinot, A. J., and Barouch, D. H. (2022) Reduced pathogenicity of the SARS-CoV-2 omicron variant in hamsters, *Med*, **3**, 262-268.e264, doi: 10.1016/j.medj.2022.03.004.
77. Wang, P., Nair, M. S., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., Wang, M., Yu, J., Zhang, B., Kwong, P. D., Graham, B. S., Mascola, J. R., Chang, J. Y., Yin, M. T., Sobieszczyk, M., Kyratsous, C. A., Shapiro, L., Sheng, Z., Huang, Y., and Ho, D. D. (2021) Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7, *Nature*, **593**, 130-135, doi: 10.1038/s41586-021-03398-2.
78. Singh, A., Steinkellner, G., Kochl, K., Gruber, K., and Gruber, C. C. (2021) Serine 477 plays a crucial role in the interaction of the SARS-CoV-2 spike protein with the human receptor ACE2, *Sci. Rep.*, **11**, 4320, doi: 10.1038/s41598-021-83761-5.
79. Mondeali, M., Etemadi, A., Barkhordari, K., Mobini Kesheh, M., Shavandi, S., Bahavar, A., Tabatabaie, F. H., Mahmoudi Gomari, M., and Modarressi, M. H. (2023) The role of S477N mutation in the molecular behavior of SARS-CoV-2 spike protein: an *in silico* perspective, *J. Cell Biochem.*, **124**, 308-319, doi: 10.1002/jcb.30367.
80. Zhao, H., Lu, L., Peng, Z., Chen, L. L., Meng, X., Zhang, C., Ip, J. D., Chan, W. M., Chu, A. W., Chan, K. H., Jin, D. Y., Chen, H., Yuen, K. Y., and To, K. K. (2022) SARS-CoV-2 Omicron variant shows less efficient replication and fusion

- activity when compared with Delta variant in TMPRSS2-expressed cells, *Emerg. Microbes Infect.*, **11**, 277-283, doi: 10.1080/22221751.2021.2023329.
81. Starr, T. N., Greaney, A. J., Stewart, C. M., Walls, A. C., Hannon, W. W., Veelsler, D., and Bloom, J. D. (2022) Deep mutational scans for ACE2 binding, RBD expression, and antibody escape in the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 receptor-binding domains, *PLoS Pathog.*, **18**, e1010951, doi: 10.1371/journal.ppat.1010951.
 82. Cao, Y., Yisimayi, A., Jian, F., Song, W., Xiao, T., Wang, L., Du, S., Wang, J., Li, Q., Chen, X., Yu, Y., Wang, P., Zhang, Z., Liu, P., An, R., Hao, X., Wang, Y., Wang, J., Feng, R., Sun, H., et al. (2022) BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection, *Nature*, **608**, 593-602, doi: 10.1038/s41586-022-04980-y.
 83. Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., St Denis, K., Nitido, A. D., Garcia, Z. H., Hauser, B. M., Feldman, J., Pavlovic, M. N., Gregory, D. J., Poznansky, M. C., Sigal, A., Schmidt, A. G., Iafate, A. J., Naranbhai, V., and Balazs, A. B. (2021) Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity, *Cell*, **184**, 2372-2383.e2379, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.013.
 84. Cao, Y., Jian, F., Wang, J., Yu, Y., Song, W., Yisimayi, A., Wang, J., An, R., Chen, X., Zhang, N., Wang, Y., Wang, P., Zhao, L., Sun, H., Yu, L., Yang, S., Niu, X., Xiao, T., Gu, Q., Shao, F., et al. (2023) Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution, *Nature*, **614**, 521-529, doi: 10.1038/s41586-022-05644-7.
 85. Kaku, C. I., Starr, T. N., Zhou, P., Dugan, H. L., Khalife, P., Song, G., Champney, E. R., Mielcarz, D. W., Geoghegan, J. C., Burton, D. R., Raiees, A., Bloom, J. D., and Walker, L. M. (2022) Evolution of antibody immunity following Omicron BA.1 breakthrough infection, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2022.09.21.508922.
 86. Alsoussi, W. B., Malladi, S. K., Zhou, J. Q., Liu, Z., Ying, B., Kim, W., Schmitz, A. J., Lei, T., Horvath, S. C., Sturtz, A. J., McIntire, K. M., Evavold, B., Han, F., Scheaffer, S. M., Fox, I. F., Mirza, S. F., Parra-Rodriguez, L., Nachbagauer, R., Nestorova, B., Chalkias, S., et al. (2023) SARS-CoV-2 Omicron boosting induces de novo B cell response in humans, *Nature*, **617**, 592-598, doi: 10.1038/s41586-023-06025-4.
 87. Van der Made, C. I., Netea, M. G., van der Veerdonk, F. L., and Hoischen, A. (2022) Clinical implications of host genetic variation and susceptibility to severe or critical COVID-19, *Genome Med.*, **14**, 96, doi: 10.1186/s13073-022-01100-3.
 88. Nhung, V. P., Ton, N. D., Ngoc, T. T. B., Thuong, M. T. H., Hai, N. T. T., Oanh, K. T. P., Hien, L. T. T., Thach, P. N., Hai, N. V., and Ha, N. H. (2022) Host genetic risk factors associated with COVID-19 susceptibility and severity in Vietnamese, *Genes (Basel)*, **13**, 1884, doi: 10.3390/genes13101884.
 89. Pietzner, M., Chua, R. L., Wheeler, E., Jechow, K., Willett, J. D. S., Radbruch, H., Trump, S., Heidecker, B., Zeberg, H., Heppner, F. L., Eils, R., Mall, M. A., Richards, J. B., Sander, L. E., Lehmann, I., Lukassen, S., Wareham, N. J., Conrad, C., and Langenberg, C. (2022) ELF5 is a potential respiratory epithelial cell-specific risk gene for severe COVID-19, *Nat. Commun.*, **13**, 4484, doi: 10.1038/s41467-022-31999-6.
 90. Smatti, M. K., Alkhatib, H. A., Al Thani, A. A., and Yassine, H. M. (2022) Will host genetics affect the response to SARS-CoV-2 vaccines? Historical precedents, *Front. Med. (Lausanne)*, **9**, 802312, doi: 10.3389/fmed.2022.802312.
 91. Cappadona, C., Rimoldi, V., Paraboschi, E. M., and Asselta, R. (2023) Genetic susceptibility to severe COVID-19, *Infect. Genet. Evol.*, **110**, 105426, doi: 10.1016/j.meegid.2023.105426.
 92. Delanghe, J. R., and Speeckaert, M. M. (2022) Host polymorphisms and COVID-19 infection, *Adv Clin Chem*, **107**, 41-77, doi: 10.1016/bs.acc.2021.07.002.
 93. Andolfo, I., Russo, R., Lasorsa, V. A., Cantalupo, S., Rosato, B. E., Bonfiglio, F., Frisso, G., Abete, P., Cassese, G. M., Servillo, G., Esposito, G., Gentile, I., Piscopo, C., Villani, R., Fiorentino, G., Cerino, P., Buonerba, C., Pierri, B., Zollo, M., Iolascon, A., et al. (2021) Common variants at 21q22.3 locus influence MX1 and TMPRSS2 gene expression and susceptibility to severe COVID-19, *iScience*, **24**, 102322, doi: 10.1016/j.isci.2021.102322.
 94. Zguro, K., Fallerini, C., Fava, F., Furini, S., and Renieri, A. (2022) Host genetic basis of COVID-19: from methodologies to genes, *Eur. J. Hum. Genet.*, **30**, 899-907, doi: 10.1038/s41431-022-01121-x.
 95. Verma, A., Minnier, J., Wan, E. S., Huffman, J. E., Gao, L., Joseph, J., Ho, Y. L., Wu, W. C., Cho, K., Gorman, B. R., Rajeevan, N., Pyarajan, S., Garcon, H., Meigs, J. B., Sun, Y. V., Reaven, P. D., McGeary, J. E., Suzuki, A., Gelernter, J., Lynch, J. A., et al. (2022) A MUC5B gene polymorphism, rs35705950-T, confers protective effects against COVID-19 hospitalization but not severe disease or mortality, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **206**, 1220-1229, doi: 10.1164/rccm.202109-2166OC.
 96. Arnold, C. G., Konigsberg, I., Adams, J. Y., Sharma, S., Aggarwal, N., Hopkinson, A., Vest, A., Campbell, M., Boorgula, M., Yang, I., Gignoux, C., Barnes, K. C., and Monte, A. A. (2022) Epigenetics may characterize asymptomatic COVID-19 infection, *Hum. Genomics*, **16**, 27, doi: 10.1186/s40246-022-00401-3.
 97. Zietz, M., Zucker, J., and Tatonetti, N. P. (2020) Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death, *Nat. Commun.*, **11**, 5761, doi: 10.1038/s41467-020-19623-x.
 98. Franchini, M., Capra, F., Targher, G., Montagnana, M., and Lippi, G. (2007) Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications, *Thromb. J.*, **5**, 14, doi: 10.1186/1477-9560-5-14.

99. Wu, S. C., Arthur, C. M., Jan, H. M., Garcia-Beltran, W. F., Patel, K. R., Rathgeber, M. F., Verkerke, H. P., Cheedarla, N., Jajosky, R. P., Paul, A., Neish, A. S., Roback, J. D., Josephson, C. D., Wesemann, D. R., Kalman, D., Rakoff-Nahoum, S., Cummings, R. D., and Stowell, S. R. (2023) Blood group A enhances SARS-CoV-2 infection, *Blood*, **142**, 742-747, doi: 10.1182/blood.2022018903.
100. MacGowan, S. A., Barton, M. I., Kutuzov, M., Dushek, O., van der Merwe, P. A., and Barton, G. J. (2022) Missense variants in human ACE2 strongly affect binding to SARS-CoV-2 Spike providing a mechanism for ACE2 mediated genetic risk in Covid-19: A case study in affinity predictions of interface variants, *PLoS Comput. Biol.*, **18**, e1009922, doi: 10.1371/journal.pcbi.1009922.
101. Chen, F., Zhang, Y., Li, X., Li, W., Liu, X., and Xue, X. (2021) The impact of ACE2 polymorphisms on COVID-19 disease: susceptibility, severity, and therapy, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **11**, 753721, doi: 10.3389/fcimb.2021.753721.
102. Hattori, T., Saito, T., Okuya, K., Takahashi, Y., Miyamoto, H., Kajihara, M., Igarashi, M., and Takada, A. (2022) Human ACE2 genetic polymorphism affecting SARS-CoV and SARS-CoV-2 entry into cells, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0087022, doi: 10.1128/spectrum.00870-22.

IMMUNOLOGY OF SARS-CoV-2 INFECTION

Review

**A. G. Gabdoulkhakova^{1,2*}, R. N. Mingaleeva¹, A. M. Romozanova¹, A. R. Sagdeeva¹,
Yu. V. Filina¹, A. A. Rizvanov^{1,3}, and R. R. Miftakhova¹**

¹ Kazan (Volga region) Federal University, 420008 Kazan, Russia

² Kazan State Medical Academy, Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 420012 Kazan, Russia

³ Department of Medical and Biological Sciences, Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan, 420111 Kazan, Russia

According to WHO data, about 800 million of the world population had contracted a coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 by mid-2023. The properties of this virus allowed it to circulate in the human population for a long time, evolving defense mechanisms against the host immune system. The severity of the disease depends largely on the degree of activation of the systemic immune response, including overstimulation of macrophages and monocytes, cytokine production, and triggering of adaptive T- and B-cell responses while SARS-CoV-2 evading from the immune system action. In the review we discussed the immune responses triggered in response to SARS-CoV-2 virus entry into the cell and the malfunctions of the immune system leading to the development of severe disease.

Keywords: innate and adaptive immunity, SARS-CoV-2, spike protein, ACE2 receptor, cytokine storm, proteases, membrane fusion, polymorphism

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ И СЛУЧАЙНАЯ МОНОАЛЛЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ

Обзор

© 2024 Я.В. Лобанова^{1,2}, С.В. Женило^{1*}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: szhenilo@gmail.com

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.10.2023

После доработки 08.12.2023

Принята к публикации 08.12.2023

В данном обзоре мы рассматриваем механизмы моноаллельной экспрессии: геномного импринтинга, при котором транскрипция генов зависит от родительского происхождения аллеля, и случайной моноаллельной транскрипции. Мы суммируем данные о регуляции активности импринтированных областей. Особое внимание уделено районам, контролирующим импринтинг. Рассматриваются факторы, которые могут влиять на изменчивость импринтома. Также обсуждаются перспективы, стоящие за исследованием моноаллельной экспрессии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: импринтинг, случайная моноаллельная экспрессия, метилирование ДНК, ZNF57, эпигенетика.

DOI: 10.31857/S0320972524010057 EDN: YRLEJX

ВВЕДЕНИЕ

У диплоидных организмов по половине генетического материала получено от каждого из родителей, что приводит к экспрессии генов как с материнского, так и с отцовского аллелей. Однако у растений, сумчатых, плацентарных млекопитающих и у некоторых насекомых есть пул генов, которые в зависимости от стадии развития, типа ткани экспрессируются только с материнского или отцовского аллеля. Такое явление получило название геномного импринтинга. По своей сути, геномный импринтинг представляет собой эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, приводящую к их транскрипции в зависимости от родительского происхождения аллеля. У растений геномный импринтинг характерен для ткани эндосперма, у насекомых – вовлечен в элиминацию отцовской X-хромосомы [1, 2]. У млекопитающих геномный импринтинг является необходимым для нормаль-

ного развития эмбриона, плаценты, регуляции метаболизма, функционирования нервной системы. У амфибий, пресмыкающихся геномный импринтинг не обнаружен, за исключением одного гена у лягушки (рис. 1).

Существует несколько теорий возникновения и эволюции импринтинга: теория коадаптации матери и потомства, теория родства и теория полового антагонизма [3]. Эти теории основаны на разных гипотезах, но каждая из теорий рассматривает геномный импринтинг как процесс отбора в пользу одного из аллелей за счет селективной асимметрии между отцовским и материнским аллелями. Появление геномного импринтинга у млекопитающих в первую очередь связывают с развитием плаценты и возникновением конфликта между матерью и эмбрионом: матери важно сохранить возможность воспроизводить потомство в дальнейшем, а отец заинтересован в том, чтобы эмбрион получил как можно больше материнских ресурсов, не учитывая возможность появления нового потомства. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что геномный импринтинг широко представлен в органах, отвечающих за питание и рост эмбриона. Так, в плаценте было найдено множество импринтированных факторов (Igf2, H19, Cdkn1c, Slc22a2, Slc22a3, Slc38a4),

Принятые сокращения: ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; нкРНК – некодирующие РНК; DMR – дифференциально метилированный участок; ICR – район, контролирующий импринтинг.

* Адресат для корреспонденции.

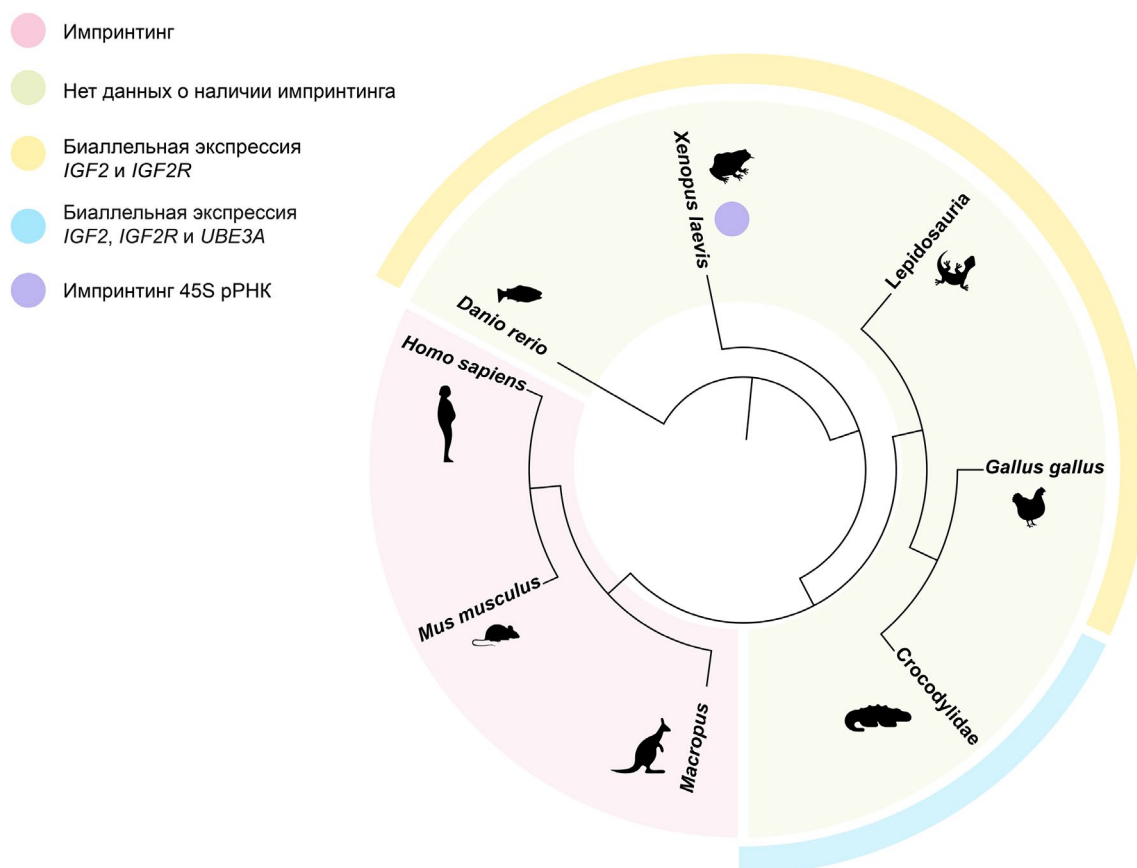


Рис. 1. Распространенность импринтинга среди различных групп позвоночных

участвующих в регуляции роста и питания эмбриона. Например, ген *Igf2* в плаценте подвергается материнскому импринтингу. *Igf2* является положительным регулятором роста эмбриона, влияя на доставку питательных веществ через плаценту [4]. Неудивительно, что мутации в импринтированных генах, неправильная их регуляция приводят к разнообразным нарушениям и патогенетическим состояниям при развитии организма [5]. У человека нарушение моноаллельной экспрессии генов приводит к гибели плода [6] или же проявляется в виде различных синдромов, например, синдромы Видемана–Беквита (H19, *IGF2*, *KCNQ1OT1*), Рассела–Сильвера (H19, *IGF2*, *KCNQ1OT1*), Ангельмана (*Ube3a*), Прадера–Вилли (кластер *15q11-13*) и др [7]. Одними из первых были открыты два синдрома: Ангельмана и Прадера–Вилли, которые представляют собой яркие примеры влияния мутаций и делеций, локализованных в одном и том же локусе, но расположенных на разных родительских аллелях. Синдромы Ангельмана и Прадера–Вилли связаны с нарушениями в локусе *15q11-13* – мутацией или потерей гена *Ube3a*, или продолжительной делеции соответственно. В зависимости от того, структура какого аллеля в локусе *15q11-13* (материнского или отцовского) была нарушена, различаются и клинические проявления [7].

Неожиданный эффект был получен при нарушении отцовского импринтинга локусов *Igf2/H19* и *Dlk1/Meg3*, а также при удалении импринтированного гена *RasGrf1*: у мышей наблюдалось уменьшение размера импринтированных локусов наряду с увеличением продолжительности жизни [8, 9]. Более того, нарушение импринтинга в локусах *Igf2/H19* и *Dlk1/Meg3* позволяет получить мышей с двумя материнскими геномами. То есть импринтированные гены являются регуляторами двуполого размножения [10, 9]. На данный момент времени наиболее полно изучен геномный импринтинг у человека и мыши. Обнаружено около 200 белок-кодирующих импринтированных генов в этих организмах. Наибольшее отличие в импринтированных генах между человеком и мышью наблюдается в плаценте, что говорит о важном вкладе эволюции в установление геномного импринтинга [11]. Помимо плаценты, геномный импринтинг затрагивает различные ткани и органы как эмбриона, так и взрослого организма. Так, исследование импринтированных генов в мозге показало, что геномный импринтинг является одним из регуляторов, влияющих на выживание и судьбу определенных популяций нейрональных клеток [12, 13].

Современные возможности полногеномного секвенирования позволили выявить интересную

особенность геномного импринтинга. Если ранее геномный импринтинг рассматривался как пример моноаллельной экспрессии, характерной для конкретной ткани, органа, то теперь появляются исследования, показывающие, что статус импринтированных генов в мозге может меняться при эмбриогенезе, онтогенезе, в ходе обучения [12, 14, 15]. Также были детектированы гены со сдвигом в биаллельной транскрипции в зависимости от происхождения родительской хромосомы, для которых сдвиг транскрипции соответствовал определенной стадии развития и локализации нейрональных клеток. Такие гены в большинстве своем являлись белок-кодирующими [14, 15]. Это позволяет говорить о сдвиге биаллельной транскрипции как о регуляторе уровня транскриптов в процессе онтогенеза и обучения.

Параллельно с исследованиями геномного импринтинга были обнаружены гены с моноаллельной экспрессией, которая не зависела от родительской принадлежности аллеля и была характерна для клеток иммунной и хемосенсорной систем. Позже появились данные о большом количестве генов со случайным сдвигом биаллельной транскрипции. Так, в клетках печени и фибробластах мышцы дисбаланс транскрипции с двух аллелей затрагивает 10–20% экспрессирующихся генов [16].

Данные о гибкости регуляции импринтинга, существование различных видов инактивации: случайной или зависимой от родительского происхождения хромосом, позволяют утверждать, что геномный импринтинг, моноаллельная экспрессия и сдвиг биаллельной транскрипции являются распространенными механизмами для регуляции эмбриогенеза, и в первую очередь нервной и иммунной систем.

В данном обзоре мы рассмотрим факторы, участвующие в установлении и поддержании геномного импринтинга, а также случайной моноаллельной транскрипции, и попытаемся ответить на вопрос, есть ли что-то общее в механизмах случайной моноаллельной экспрессии и эпигенетической регуляции геномного импринтинга. Также нами будут рассмотрены трудности, которые возникают при анализе моноаллельной экспрессии.

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА

Насекомые. У насекомых импринтингу подвергаются целые хромосомы. Так, у сциарид (семейство двукрылых насекомых) зиготы содержат две отцовские X-хромосомы и одну материнскую X-хромосому. Пол эмбриона определяется по количеству элиминированных отцовских X-хромосом в соматических клетках. У особей женского пола элиминируется одна отцовская X-хромосома,

у особей мужского пола – две отцовские X-хромосомы. При сперматогенезе у особей мужского пола наблюдается полная потеря всех отцовских X-хромосом [17]. Предполагается, что регуляция элиминации хромосом координируется модификациями гистонов: для материнских X-хромосом характерен высокий уровень ацетилирования гистонов H3 и H4 [18, 19].

Растения. У растений импринтированные гены редко формируют большие кластеры, чаще всего импринтингу подвергаются отдельные гены [20, 21]. Основным механизмом регуляции импринтинга у растений является метилирование ДНК [22]. У покрытосеменных растений происходит двойное оплодотворение, один спермий оплодотворяет яйцеклетку и образуется диплоидная зигота, другой спермий сливается с центральной клеткой, образуя клетку эндосперма с тройным набором хромосом. Эндосперм осуществляет транспорт питательных веществ в зародыш. До оплодотворения в центральной клетке и яйцеклетке происходит снижение экспрессии поддерживающей ДНК-метилтрансферазы MET1, что приводит к появлению полуметилированной ДНК. Снижение экспрессии MET1 в центральной клетке и яйцеклетке обусловлено формированием в промоторной области MET1 комплекса белка RBR (retinoblastoma related) и MSI1 (multicopy suppressor of IRA1), относящегося к группе Polycomb-белков. В центральной клетке, в отличие от яйцеклетки, активно экспрессируется ДНК-гликозилаза Demeter (DME), субстратом для связывания которой является полуметилированная ДНК. Это приводит к деметилированию обоих аллелей импринтированных генов в центральной клетке. В то время как в яйцеклетке метилирование восстанавливается благодаря активности *de novo* ДНК-метилтрансферазы DRM1 [22–24]. Таким образом, после оплодотворения в триплоидной клетке эндосперма два материнских аллеля активны и неметилированы, в то время как отцовский аллель импринтированных генов метилирован. В клетках зиготы и материнский, и отцовский аллели метилированы (рис. 2).

Млекопитающие. В отличие от насекомых и растений, большинство импринтируемых генов млекопитающих локализуется в кластерах, содержащих от 3 до 12 генов и имеющих общий регуляторный центр, называемый районом, контролирующим импринтинг (ICR). При этом в импринтированных кластерах могут присутствовать и неимпринтированные гены, т.е. экспрессирующиеся с обоих аллелей [25]. Длина одного и того же импринтированного кластера может меняться в зависимости от типа клеток. Особенно четко разница в размере импринтированных локусов просматривается между плацентой и эмбрионом/взрослым организмом. Так, размер импринтиро-

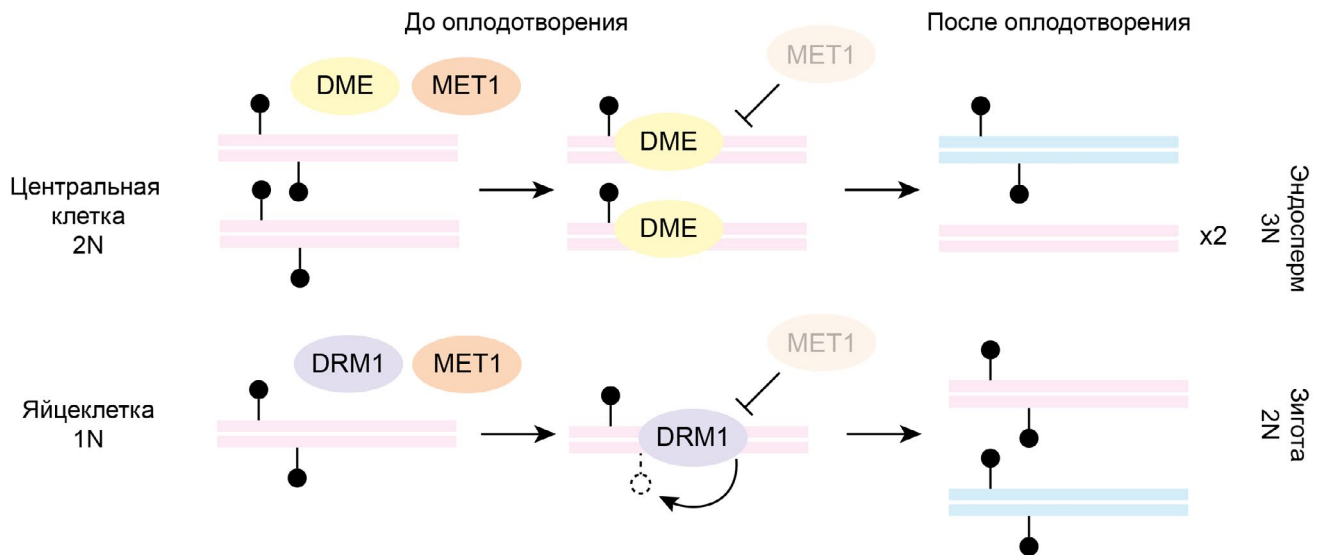


Рис. 2. Общий механизм импринтинга генов покрытосеменных растений. 3N – триплоидный геном; 2N – диплоидный геном; 1N – гаплоидный геном; DME – гликозилаза Demeter; MET1 – ДНК-метилтрансфераза; DRM1 – *de novo* ДНК-метилтрансфераза; черные закрашенные круги – метилирование ДНК

ванного кластера *Igf2r* составляет 120 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) в тканях эмбриона и у взрослого организма, в то время как в плаценте размер этого локуса достигает 10 млн п.н. [26].

Важно отметить, что большинство импринтированных генов млекопитающих являются генами некодирующих РНК (нкРНК) [27]. Среди известных 110 импринтированных кластеров было детектировано около 4000 генов разнообразных нкРНК, большую часть которых составляют рiРНК (РНК, образующая комплекс с белками семейства Piwi), в то время как количество импринтированных генов, кодирующих белки, у мыши и человека – около 200 [27]. Импринтированные нкРНК чаще выполняют нетипичную для себя функцию. Так, snoРНК (малые ядрышковые РНК) обычно участвуют в процессировании рРНК и ее модификации, однако импринтированная snoРНК H/MBII-52 регулирует сплайсинг 5htr2c (серотонинового рецептора 2C) [28]. Отметим, что многие белок-кодирующие импринтированные гены были найдены и в организмах, в которых отсутствует импринтинг, в то время как последовательности импринтированных генов нкРНК характерны только для организмов с геномным импринтингом [29] (рис. 1).

Эпигенетические модификации (метилирование ДНК или модификации гистонов) последовательностей ICR, являющихся ключевым регулятором импринтированных генов, зависят от родительского происхождения аллеля. Они устанавливаются на ICR в гаметах и после образования зиготы избегают волны деметилирования, которая затрагивает весь геном в предимплантационном периоде. Удаление модификаций в этих областях в дальнейшем происходит только в клетках гонад

эмбрионов до определения их пола. При развитии эмбриона в особь одного или другого пола гонады организма дифференцируются в семенники или яичники, которые производят гаплоидные половые клетки, приобретающие соответствующий паттерн геномного импринтинга. Дифференциально метилированные участки зародышевого происхождения (gDMR) или первичные DMR – это участки ДНК, расположенные в ICR, метилирование которых осуществляется и поддерживается при помощи ДНК-метилтрансфераз в половых клетках гонад эмбриона и сохраняется только на одной родительской хромосоме в диплоидных клетках после оплодотворения. Например, кластер *Igf2/H19* имеет gDMR, расположенный на 2 т.п.н. выше промотора длинной нкРНК *H19*, который метилируется только в отцовских гаметах (рис. 3, а).

Метилирование этого gDMR сохраняется во всех соматических тканях. Важность метилирования в установлении и поддержании импринтинга подтверждается в экспериментах по снижению уровня полногеномного метилирования ДНК, вызванному мутациями в ферментах семейства ДНК-метилтрансфераз, которое приводит к изменению экспрессии импринтированных генов.

В отличие от метилирования ДНК, модификации гистонов в импринтированных локусах в зиготах преимущественно наследуются от ооцитов. При исследовании локусов моноаллельно экспрессирующихся генов было показано, что лишь часть отцовско-специфичных открытых участков хроматина была связана с метилированием ДНК в ооците, что говорило о наличии альтернативного метилированию механизма по поддержанию материнского аллеля в молчащем состоянии [30].

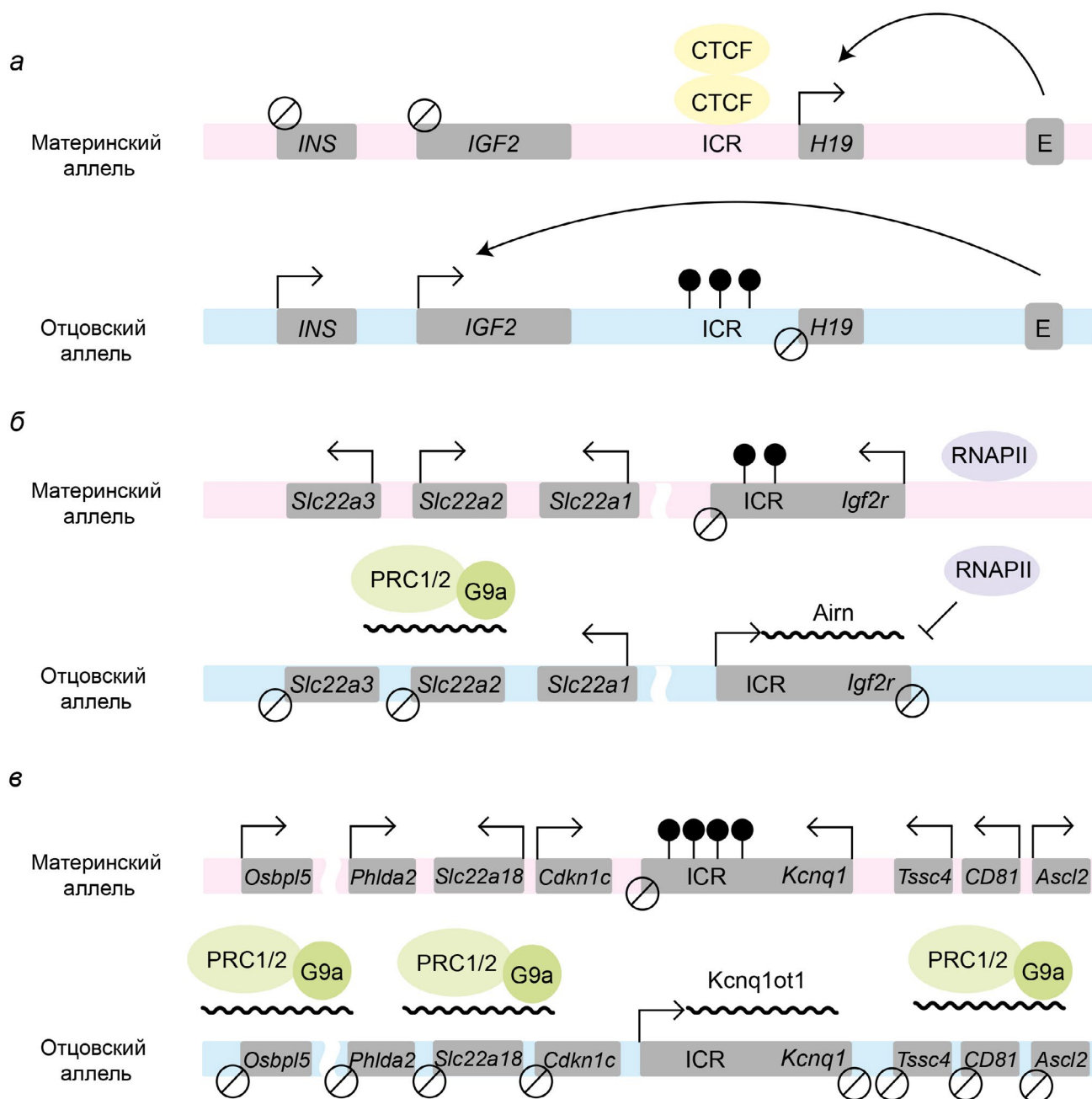


Рис. 3. Строение и механизм функционирования импринтированных локусов. Регуляция экспрессии в импринтированном локусе с помощью инсультатора на примере локуса *Igf2/H19* (а), длинных некодирующих РНК на примере локуса *Igf2r/Airn* (б) и локуса *Kcnq1* (в). Е – энхансер; черные закрашенные круги – метилирование ДНК; ICR – район, контролирующий импринтинг

Анализ модификаций гистонов в импринтированных локусах в ооцитах выявил обогащение триметилированных H3K27 и H3K9. Удаление H3K27me3 при помощи гистоновых деметилаз приводило к нарушению импринтинга [31]. Для подтверждения важности модификаций гистонов при установлении импринтированного состояния были предприняты попытки инактивировать ферменты, участвующие в установлении H3K27me3. Триметилирование H3K27 осуществляется PRC2, белковым комплексом из группы белков Polycomb. Мутация

в гене *Eed*, кодирующем субъединицу PRC2 приводит к биаллельной экспрессии ряда импринтированных генов (*Ascl2*, *Grb10*, *Cdkn1c*, *Gtl2*) без изменения уровня метилирования их регуляторных элементов [32]. Триметилированный H3K9 также присутствует в областях ICR хроматина импринтированных локусов, наряду с метилированием ДНК в предимплантационном зародыше, и необходим для предотвращения деметилирования ДНК, которое наблюдается в этот период для всего генома [33].

Известны два механизма, обеспечивающие регуляцию функционирования импринтированных локусов. Первый механизм связан с функционированием инсуляторов. В основе второго механизма лежит воздействие длинных нкРНК. Так, в ICR кластера *Igf2/H19* расположен DMR, метилирование которого поддерживается на отцовской хромосоме, что препятствует связыванию единственного известного для млекопитающих инсуляторного белка CTCF, способного проявлять энхансер-блокирующую активность. Это приводит к стерическим затруднениям во взаимодействии промоторов генов *Igf2* и *INS* с энхансером, что препятствует активации этих генов. Таким образом, гены кластера *Igf2* экспрессируются только с отцовской хромосомы, в то время как длинная нкРНК *H19* – с материнской, где отсутствует метилирование ее промотора, перекрывающегося с ICR (рис. 3, а).

В основе второго механизма лежит действие длинных нкРНК [5]. Как правило, длинные нкРНК расположены в регуляторных областях: в промоторах или энхансерах, а также внутри кодирующей последовательности импринтированных генов. Это приводит к тому, что длинные нкРНК могут влиять как на инициацию транскрипции, так и на процесс элонгации импринтированных генов [34, 35]. Например, в импринтированном локусе *Igf2r/Airn* на отцовском аллеле происходит антисмысловая, по отношению к *Igf2r*, транскрипция гена *Airn*, что предотвращает связывание РНК-полимеразы II с промотором *Igf2r* [35]. На материнском аллеле ICR заметилирован, что приводит к инактивации промотора *Airn* и транскрипции *Igf2r*. С другой стороны, длинные нкРНК могут участвовать в регуляции импринтированных генов как нкРНК. К своим участкам связывания импринтированного локуса они привлекают репрессивные комплексы, которые метилируют ДНК, приводя к появлению модификаций гистонов, ассоциированных с репрессией: триметилирование H3K27, убиквитинирование H2AK119. Классическим примером влияния длинных нкРНК на установление этих модификаций является длинная нкРНК *KCNQ1OT1* (рис. 3, в). Также импринтированные длинные нкРНК могут регулировать транскрипцию генов, расположенных вовне импринтированных локусов. Так, транскрипция генов *Slc22a2* и *Slc22a3*, расположенных на расстоянии 100 и 300 т.п.н выше локуса *Igf2r/Airn* соответственно, подавляется за счет связывания длинной нкРНК *Airn* с их промоторными участками и привлечения репрессивных Polycomb-комплексов PRC1 и PRC2, а также гистоновой метилтрансферазы H3K9 G9a (рис. 3, б) [36, 37].

Сходства и отличия регуляции геномного импринтинга у растений и млекопитающих. У млекопитающих инактивация импринтирован-

ного аллеля происходит при гаметогенезе преимущественно за счет метилирования ДНК, а также триметилирования гистонов H3K9 и H3K27, которое поддерживается в дальнейшем в соматических клетках. Активное состояние аллеля сопряжено с отсутствием метилирования. У растений наблюдается принципиально иная стратегия механизма геномного импринтинга. Метилирование ДНК является ключевым регулятором геномного импринтинга у растений, однако, в отличие от млекопитающих, у которых импринтированный аллель метилирован и активен, у растений импринтированный аллель активируется за счет деметилирования ДНК. У растений геномный импринтинг характерен для эндосперма, функция которого связана с запасанием питательных веществ и питанием зародыша, но не дает начало новой особи. Поэтому в дальнейшем нет необходимости стирать импринтинг в эндосперме. Другая ситуация наблюдается у млекопитающих: у них деметилирование импринтированных участков происходит в гонадах, где устанавливается новый профиль импринтинга в соответствии с полом животного. Тем не менее у растений есть гены, для которых показано, что они биаллельно экспрессируются в других тканях, т.е. были деметилированы оба аллеля, а в эндосперме импринтированы, т.е. был деметилирован только один аллель. Например, ген *MEA* у *Arabidopsis thaliana*, кодирующий белок из группы Polycomb, импринтирован в эндосперме, т.е. активно транскрибируется с материнского аллеля и неактивен в яйцеклетке, однако в эмбрионе на стадии торпеды и позже в проростке, листе, стебле и корне он экспрессируется биаллельно (таблица в Приложении) [38].

ПОДДЕРЖАНИЕ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА

Исследования механизмов поддержания импринтированных аллелей в активном или неактивном состоянии показали важность как генетических, так и эпигенетических факторов. Многие ICR расположены в CpG-островках или CpG-богатых участках. CpG-островок – участок ДНК, в котором уровень пар GC больше 50% и соотношение ожидаемое/наблюдаемое количество CpG выше 0,6 [39]. Введение в геном мышиных стволовых клеток неметилированной последовательности ICR в эухроматиновый регион приводило к устойчивости данного ICR к *de novo* метилированию [40]. Такая же картина характерна для любых CpG-островков [41]. То есть поддержание ICR в неметилированном состоянии может регулироваться повышенной плотностью CpG-пар. Введение в то же самое место генома метилированного *in vitro* ICR

характеризовалось поддержанием высокого уровня метилирования ICR и появлением модификаций неактивного хроматина [40, 42, 43]. При этом CpG-островки, расположенные вовне ICR, теряли свое метилирование при введении в клетки в метилированном состоянии [40]. Таким образом, метилирование ICR в клетках способно поддерживаться вне зависимости от того, находится ли он в эндогенном локусе или введен искусственно. Были проведены исследования по определению того, какие элементы последовательности ICR необходимы для поддержания его в метилированном состоянии. Оказалось, что плотность CpG и GC-состав являются не единственными критериями, наличие которых гарантирует поддержание статуса ICR. Ключевую роль в поддержании метилирования ICR и установление модификаций, характерных для гетерохроматина, играют последовательности, к которым привлекается метил-ДНК-связывающий KRAB-белок с цинковыми пальцами ZFP57 или его аналоги [40, 44]. ZFP57 связывается с метилированной гексануклеотидной последовательностью TGCCGC, высокое обогащение которой наблюдается в большинстве ICR. Далее ZFP57 привлекает KAP1 (известный также как TRIM28 или TIF1-beta), который является скаффолдом для сборки репрессивного комплекса, содержащего такие факторы, как ДНК-метилтрансферазы (DNMT1, DNMT3a/b), а также факторы, модифицирующие хроматин: гетерохроматиновый белок HP1, гистон-метилтрансфераза SETDB1, комплекс ремоделирования хроматина и деацетилирования гистонов NuRD и ядерный рецепторный корепрессорный комплекс N-CoR1 [45].

Белки, содержащие KRAB-домен, были найдены у многих позвоночных, в том числе у рептилий и птиц, однако наибольшее количество таких белков присутствует у млекопитающих. Особенно много KRAB-белков с цинковыми пальцами у человека, где количество их достигает 724 [46]. Тем не менее ZFP57 присутствует исключительно в геноме млекопитающих, что говорит о его особенной роли в регуляции импринтинга у этих организмов. Удаление ZFP57 у мыши приводит к ранней эмбриональной летальности и потере большинства импринтов. В отличие от мыши, у человека ZFP57 начинает синтезироваться только после формирования бластоцисты, до этого времени функцией привлечения к импринтированным локусам фактора KAP1 обладают другие белки с цинковыми пальцами и KRAB-доменом: ZNF202 и ZNF445 [47]. Отметим, что, несмотря на большое количество метил-ДНК-связывающих белков (белки семейства MBD, Kaiso и Kaiso-подобные белки, UHRF, KLF4 и пр.), только белки семейства KRAB-ZNF вовлечены в поддержание метилированного состояния ICR. Удаление генов, кодирующих метил-ДНК-связывающие белки семейства MBD

и семейства Kaiso, не приводит к реактивации метилированного аллеля, хотя это может влиять на метилирование различных регуляторных элементов неимпринтированных генов как прямо, так и опосредованно [39, 48, 49]. Единственным исключением является BTV/POZ-ZNF белок Kaiso. Его удаление способствует снижению метилирования ICR импринтированного локуса *Igf2/H19* в первичных фибробластах человека, которое, однако, не приводит к изменению экспрессии импринтированных генов в данном локусе [50].

У амфибий аналогов ZFP57 не было найдено, и долгое время считалось, что импринтинга у лягушек нет. Однако в работе 2014 г. у лягушки был найден единственный импринтированный ген 45S рРНК (рис. 1) [51]. Одним из возможных кандидатов в регуляторы импринтинга 45S рРНК может выступать метил-ДНК-связывающий белок Kaiso. Нокаут гена *Kaiso* в *Xenopus laevis* приводит к аресту развития и характеризуется преждевременной активацией генов, которая наблюдается на два цикла раньше классической стадии сдвига в средней бластуле, после которой обычно начинается активная транскрипция [52]. Таким образом, Kaiso и ZFP57 необходимы для развития лягушки и мыши соответственно. Отметим общую схожесть белков ZFP57 и Kaiso в клеточной локализации, сайтах связывания с ДНК и возможности образовывать комплекс с KAP1 [53]. Однако нокаут *Kaiso* у мыши приводит лишь к определенному поведенческому фенотипу, характеризующемуся повышенной локомоторной и исследовательской активностью [54]. Все это позволяет предположить, что Kaiso у млекопитающих вовлечен в регуляцию транскрипции генов в клетках нервной системы и, возможно, участвует в динамическом импринтинге при онтогенезе и в процессе обучения, что поддерживается способностью Kaiso напрямую взаимодействовать с ключевым регулятором импринтинга KAP1 [53].

СЛУЧАЙНАЯ МОНОАЛЛЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ

В данной главе мы рассмотрим известные данные о механизмах случайной моноаллельной экспрессии или сдвига биаллельной транскрипции генов человека, которая характерна для примерно 10% генов (рис. 4) [55].

Впервые моноаллельная экспрессия была описана при инактивации X-хромосомы, которая происходит случайным образом при развитии эмбриона женского пола. Исключением являются ткани плаценты грызунов и сумчатых, у которых всегда происходит инактивация отцовской X-хромосомы. Инактивация X-хромосомы в плаценте

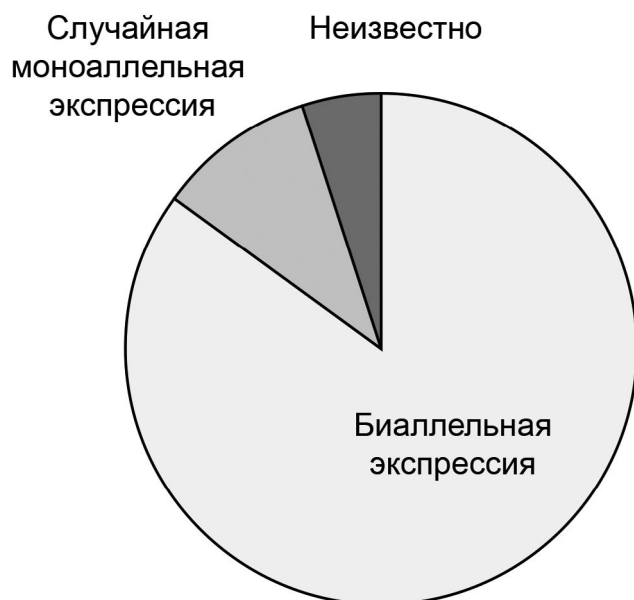


Рис. 4. Соотношение биаллельно и моноаллельно экспрессирующихся генов в геноме человека (адаптировано из [55])

человека происходит неоднородно, наблюдаются крупные кластеры клеток с отцовской или материнской экспрессией, что значительно отличается от мозаичного паттерна инактивации в тканях взрослого организма или эмбриона [56]. Позднее были найдены и аутосомные гены, которые подвергаются случайной инактивации. Часть генов со случайной моноаллельной инактивацией регулируется перестройкой ДНК. К таким генам относятся гены иммуноглобулинов Т-клеточных рецепторов. Однако случайная моноаллельная инактивация для других аутосомных генов, среди которых были найдены гены обонятельных рецепторов, рецепторов феромонов, интерлейкинов, рибосомных генов и других генов, кодирующих разнообразные факторы, не связана с геномными перестройками [57, 58]. Отметим, что спектр генов, который регулируется моноаллельной инактивацией, обогащен генами, кодирующими поверхностные клеточные маркеры [59]. Это позволяет предположить, что регуляция с помощью моноаллельной экспрессии направлена на создание клеточной идентичности для отдельных клеток. С другой стороны, моноаллельная экспрессия также затрагивает гены, связанные с возрастными заболеваниями: раком, нейродегенеративными заболеваниями [55, 60]. Также эти гены чаще всего расположены в быстро развивающихся геномных регионах, а мутации в них детектируются при различных заболеваниях [55]. Моноаллельная экспрессия, аналогично импринтингу, может динамически изменяться. Так, пластичность моноаллельной экспрессии наблюдается в нервной системе при онтогенезе (таблица в Приложении) [61].

Таким образом, моноаллельная экспрессия представляет собой важную мишень для регуляции различных патогенетических состояний.

РЕГУЛЯЦИЯ СЛУЧАЙНОЙ МОНОАЛЛЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ

О механизмах установления и регуляции моноаллельной экспрессии известно немного. Рассматривается несколько механизмов, вовлеченных в установление и поддержание моноаллельной экспрессии, однако ни один из них не является универсальным.

Одной из наиболее исследованных причин возникновения моноаллельной транскрипции является наличие однонуклеотидных полиморфизмов в *cis*-регуляторных элементах генов, которые оказывают влияние на связывание транскрипционных факторов [62] (рис. 5, а).

Недостаток регуляторных факторов также может приводить к преимущественной экспрессии гена с одного аллеля, что в дальнейшем закрепляется с помощью асинхронной репликации, различной локализации аллелей в ядре, которая характерна и для импринтированных генов (рис. 5, б).

Около половины генов со случайной моноаллельной экспрессией содержат внутри себя гены, расположенные на комплементарной цепи, в то время как биаллельные гены редко пересекаются с другими генами таким образом (рис. 5, в) [55].

Транскрипция с комплементарной цепи, идущая в противоположном направлении, более вероятно будет оказывать влияние на транскрипцию по прямой цепи, нежели транскрипция другого гена по той же цепи. Эта ситуация схожа с тем, что наблюдается при геномном импринтинге (рис. 5, в): в большинстве случаев белок-кодирующие импринтированные гены имеют в своем составе последовательности различных нкРНК, расположенных на комплементарной цепи.

Аналогично геномному импринтингу, одна из ключевых ролей при моноаллельной транскрипции принадлежит метилированию ДНК промоторных участков (рис. 5, г) [63–65]. На примере моноаллельно экспрессирующегося в В-клетках гена *Col6a5* показано, что обработка клеток деметилирующим агентом 5-азациитидином приводит к реактивации второго аллеля этого гена [64]. Многие гены с моноаллельной экспрессией имеют средний уровень метилирования, соответствующий наличию метилированного и неметилированного аллелей [63–65]. Однако остается неизвестным, является ли метилирование промоторов причиной или следствием моноаллельной экспрессии. Несмотря на корреляцию между метилированием ДНК, импринтингом и моноаллельной

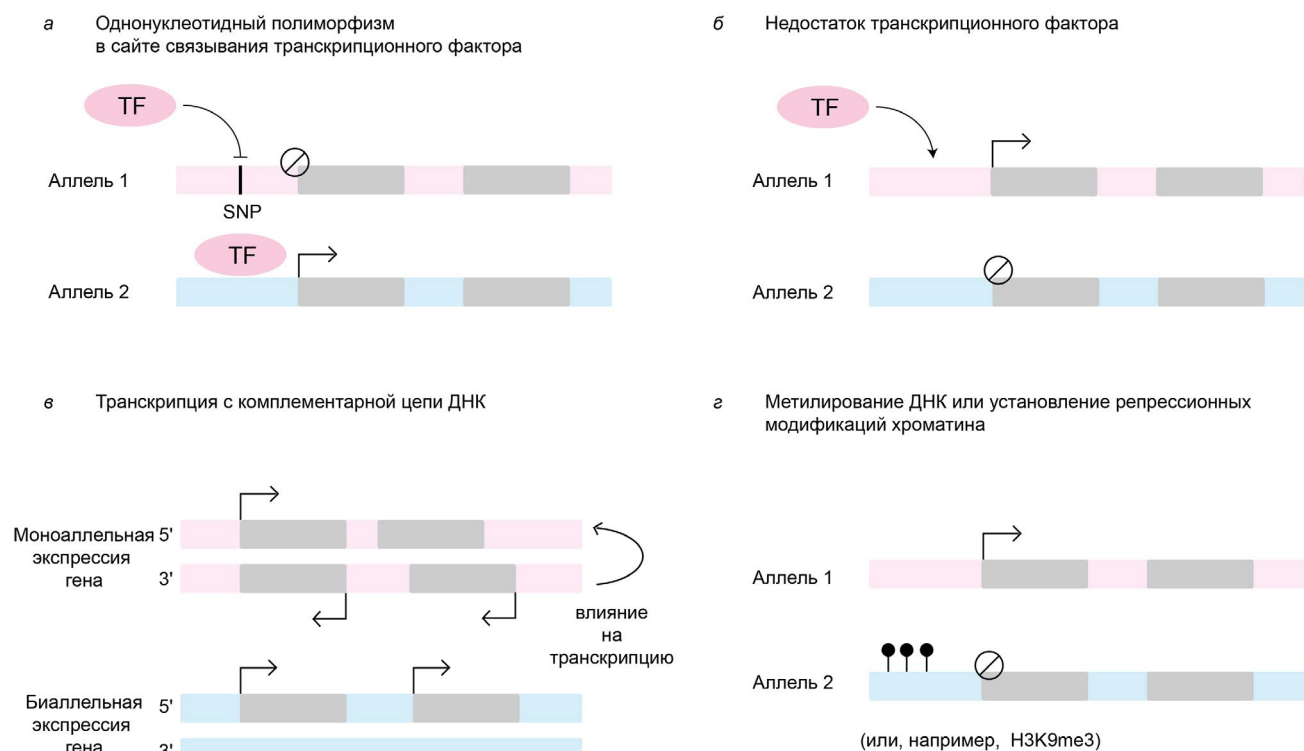


Рис. 5. Факторы, играющие роль в регуляции моноаллельной транскрипции. *а* – Наличие однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в сайтах связывания транскрипционных факторов. *б* – Недостаток транскрипционного фактора для связывания с обоими аллелями. *в* – Транскрипция с комплементарной цепи, идущая в противоположном направлении. *г* – Метилирование ДНК (черные закрашенные круги) или наличие гистоновых модификаций H3K9me3, H3K27me3 промоторного участка. TF – транскрипционный фактор; SNP – однонуклеотидный полиморфизм

экспрессией, были найдены гены с моноаллельной экспрессией, для которых метилирование могло быть как высоким в промоторной области, так и низким независимо от активности аллеля [65, 66]. Таким образом, метилирование ДНК является одним из регуляторных механизмов моноаллельной экспрессии, но не для всех генов. Иная картина наблюдается для энхансеров: для них характерно неметилированное состояние независимо от того, на каком аллеле он расположен: на активном или неактивном [67].

Еще одним из факторов, коррелирующим с моноаллельной экспрессией, являются интроны. Так, у нематод было показано, что наличие интрона в 5'-области гена препятствует возникновению моноаллельной транскрипции. В то время как полное отсутствие интронов или наличие их в 3'-области является маркером моноаллельной транскрипции [68]. Однако пока мы не можем ответить на вопрос, является ли отсутствие интронов маркером селекции генов с моноаллельной экспрессией или имеет регуляторную роль, поскольку эксперименты по удалению интронов в гене *MTL-2* у нематод не привели к их моноаллельной экспрессии [68]. Что касается роли интронов в регуляции моноаллельной экспрессии у человека, то среди

генов со сдвигом биаллельной транскрипции действительно широко представлены гены без интронов, однако это не является правилом. Поэтому этот вопрос остается открытым.

ПРОБЛЕМЫ ПРИ АНАЛИЗЕ МОНОАЛЛЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ

В основе анализа моноаллельной экспрессии лежит возможность разделять, с какого из аллелей идет транскрипция. Поэтому главным инструментом для исследования как геномного импринтинга, так и случайной моноаллельной экспрессии является наличие однонуклеотидных полиморфизмов в транскрибируемой области гена. Перспективным методом анализа является введение в разные аллели для исследуемого гена маркеров, позволяющее проводить разделение аллелей. Например, это могут быть баркоды или последовательности, кодирующие различные флуоресцентные белки. Это позволит определить вклад каждого из аллелей в транскрипцию с помощью секвенирования и флуоресцентного анализа соответственно [68]. Работа на клетках человека дает преимущество при наличии информации о генотипе родителей,

в то время как для мышиных моделей возникают дополнительные трудности. При исследовании моноаллельной экспрессии у мышей проводят скрещивание разных линий для создания пула гетерозиготных одонуклеотидных полиморфизмов в геноме. Основным недостатком данного подхода является аллельный дисбаланс, вызванный генотипической изменчивостью, возникающей из-за скрещиваний разных линий животных, который необходимо учитывать при анализе за счет дополнительных контрольных скрещиваний [16].

Другой трудностью анализа сдвига биаллельной транскрипции и моноаллельной экспрессии является выбор критерия, при котором мы можем говорить о статистической значимости дисбаланса аллелей. Эта проблема связана с многочисленными техническими артефактами, которые возникают при пробоподготовке и секвенировании, что приводит к необходимости проводить не только биологические, но и технические повторы. Этот вопрос особенно актуален при одноклеточном анализе популяции клеток [69]. Для уменьшения количества технических повторов было предложено при пробоподготовке использовать РНК других организмов, например, при анализе моноаллельной экспрессии у мыши или человека при подготовке библиотек добавлять РНК из *Caenorhabditis elegans* [70].

В последнее время стал широко применяться одноклеточный анализ транскриптома для анализа моноаллельной экспрессии, который показал, что в клетках широко представлена динамическая моноаллельная экспрессия, которая может меняться после деления клетки [57, 71]. Необходимо отметить, что в основе этого явления может лежать сам механизм транскрипции [72]. Процесс синтеза мРНК является прерывистым, поэтому при одноклеточном анализе необходимо учитывать возможность синтеза в текущий момент времени с одного аллеля, а в другой момент времени – с обоих или с другого аллелей [73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря современным методам секвенирования мы можем говорить не просто о геномном импринтинге, а, скорее, об импринтоме, наряду с транскриптомом и метилом, который устанавливается в эмбриогенезе и может изменяться по мере роста и развития организма. Это позволяет рассматривать такие процессы, как обучение, формирование памяти с точки зрения пластичности импринтома. Тем не менее наиболее исследованным остается процесс установления импринтинга при эмбриогенезе и формировании плаценты, установлена роль первичной последовательно-

сти локусов, регулирующих импринтинг, а также определены ключевые факторы, позволяющие поддерживать эпигенетические модификации на импринтированных участках. Однако механизмы пластичности импринтинга остаются нераскрытыми. Их исследование необходимо в первую очередь для понимания процессов, связанных с обучением и формированием памяти. Одним из перспективных направлений исследования является изучение метил-ДНК-связывающих белков как регуляторов импринтома в процессе формирования нервной системы и при обучении. Эти белки могут не только выступать в роли интерпретаторов метилирования ДНК, но и в качестве факторов, участвующих в его регуляции [39, 49]. Кроме того, основной фенотип при удалении многих метил-ДНК-связывающих белков ассоциирован с поведенческими отклонениями, что позволяет рассматривать их в роли регуляторов пластичности импринтома.

Пластичность импринтома необходимо учитывать при работе с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). ИПСК являются одними из перспективных инструментов в регенеративной медицине. Будучи полученными из соматических клеток, ИПСК могут быть дифференцированы в любые клетки человека. Основными проблемами применения ИПСК в терапии являются накопление генетических мутаций и возникновение эпимутаций, которые происходят преимущественно при репрограммировании соматических клеток и дальнейшем культивировании клеток [74, 75]. В процессе репрограммирования в клетках происходит переключение эпигенетического профиля с соматического на плюрипотентный, что может сопровождаться появлением эпимутаций, т.е. появлением наследуемых изменений в эпигенетическом профиле. В первую очередь это касается инактивации X-хромосомы и импринтируемых генов.

Длительное культивирование ИПСК с XX-генотипом приводит к частичной реактивации инактивированной X-хромосомы, которую называют эрозированной X-хромосомой. Такие клетки имеют сниженную способность к дифференцировке, поскольку эрозированная X-хромосома не может быть инактивирована полностью в дальнейшем [76, 77]. Поэтому возникает проблема выбора наиболее оптимальных условий при получении ИПСК: долгое культивирование ИПСК, с одной стороны, делает их более похожими на эмбриональные стволовые клетки, а с другой стороны, приводит к образованию эрозированной X-хромосомы; более короткое культивирование приводит к формированию клеток с недостаточным уровнем плюрипотентности, но с инактивированной X-хромосомой. Заметим, что эта проблема не касается ИПСК с генотипом XY [78]. Для ИПСК также характерно

нарушение импринтинга для целого ряда генов: *H19*, *IGF2*, *MEG3*, *PEG3*, *PEG10*, *MEST*, которые начинают экспрессироваться с обоих аллелей [79]. Отметим, что культивирование *in vitro* мышинных ооцитов и в дальнейшем эмбрионов ассоциировано с различными нарушениями импринтинга [80]. Поэтому применение ИПСК в исследовательских целях, для скрининга лекарственных препаратов и особенно в рамках заместительной клеточной терапии обуславливает необходимость контроля корректного состояния моноаллельной экспрессии генов в них. В дальнейшем необходимы новые исследования, направленные на оптимизацию условий культивирования ИПСК, которые позволили бы предотвратить нарушения как в импринтинге, так и в X-инактивации.

Работы последних лет об аутосомных генах с моноаллельной экспрессией показали, что моноаллельная экспрессия распространена не только среди генов, вовлеченных в иммунную или хемисенсорную систему, но характерна для целого ряда аутосомных генов и является динамичной. Среди генов, подверженных моноаллельной экспрессии, были найдены гены поверхностных маркеров, ионных каналов, факторов, вовлеченных в клеточную адгезию, развитие нейродегенеративных заболеваний, в клеточный ответ на различные стрессовые воздействия и онкологическую трансформацию клеток. Этот список факторов позволяет выделить две ключевые возможности: 1) увеличение разнообразия белков за счет экспрессии различных аллелей и проведение более тонкой регуляцию транскрипции; 2) оказание

влияния на развитие патологических состояний в случае гетерозиготных мутаций. Особое внимание уделяется второй возможности, когда моноаллельная экспрессия влияет на прогрессирование заболевания. В связи с этим моноаллельную экспрессию можно рассматривать в качестве терапевтической мишени. Интерес к терапии за счет влияния на моноаллельную экспрессию можно объяснить еще с той точки зрения, что нет необходимости вносить изменения в геном, – требуется либо реактивировать второй аллель, либо произвести переключение с мутантного аллеля на интактный.

Вклад авторов. Я.В.Л., С.В.Ж. – написание и редактирование манускрипта.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30026-Р; геномный импринтинг) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 122041100149-7; случайная моноаллельная экспрессия).

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

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. Crouse, H. V. (1960) The controlling element in sex chromosome behavior in sciara, *Genetics*, **45**, 1429-1443, doi: 10.1093/genetics/45.10.1429.
2. Bai, F., and Settles, A. M. (2014) Imprinting in plants as a mechanism to generate seed phenotypic diversity, *Front. Plant Sci.*, **5**, 780, doi: 10.3389/fpls.2014.00780.
3. Patten, M. M., Ross, L., Curley, J. P., Queller, D. C., Bonduriansky, R., and Wolf, J. B. (2014) The evolution of genomic imprinting: theories, predictions and empirical tests, *Heredity*, **113**, 119-128, doi: 10.1038/hdy.2014.29.
4. Constância, M., Angiolini, E., Sandovici, I., Smith, P., Smith, R., Kelsey, G., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Sibley, C. P., Reik, W., and Fowden, A. (2005) Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 19219-19224, doi: 10.1073/pnas.0504468103.
5. Wang, T., Yang, L. J., Wu, M., and Ma, Q. (2021) The role of long non-coding RNAs in human imprinting disorders: prospective therapeutic targets, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 730014, doi: 10.3389/fcell.2021.730014.
6. Alazami, A. M., Awad, S. M., Coskun, S., Al-Hassan, S., Hijazi, H., and Abdulwahab, F. M. (2015) TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality, *Genome Biol.*, **16**, 240, doi: 10.1186/s13059-015-0792-0.
7. Eggermann, T., Monk, D., de Nanclares, G. P., Kagami, M., Giabicani, E., and Riccio, A. (2023) Imprinting disorders, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **9**, 33, doi: 10.1038/s41572-023-00443-4.
8. Borrás, C., Monleón, D., López-Grueso, R., Gambini, J., Orlando, L., Pallardó, F. V., Santos, E., Viña, J., and Font de Mora, J. (2011) RasGrf1 deficiency delays aging in mice, *Aging*, **3**, 262-276, doi: 10.18632/aging.100279.
9. Kawahara, M., Wu, Q., Takahashi, N., Morita, S., Yamada, K., Ito, M., et al. (2007) High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1045-1050, doi: 10.1038/nbt1331.

10. Li, Z.-K., Wang, L.-Y., Wang, L.-B., Feng, G.-H., Yuan, X.-W., Liu, C., Xu, K., Li, Y.-H., Wan, H.-F., Zhang, Y., Li, Y.-F., Li, X., Li, W., Zhou, Q., and Hu, B.-Y. (2018) Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions, *Cell Stem Cell*, **23**, 665-676, doi: 10.1016/j.stem.2018.09.004.
11. Monk, D. (2015) Genomic imprinting in the human placenta, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **213**, S152-S162, doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.032.
12. Ho-Shing, O., and Dulac, C. (2019) Influences of genomic imprinting on brain function and behavior, *Curr. Opin. Behav. Sci.*, **25**, 66-76, doi: 10.1016/j.cobeha.2018.08.008.
13. Isles, A. R. (2022) The contribution of imprinted genes to neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders, *Transl. Psychiatry*, **12**, 210, doi: 10.1038/s41398-022-01972-4.
14. Bonthuis, P. J., Huang, W.-C., Stacher Hörndli, C. N., Ferris, E., Cheng, T., and Gregg, C. (2015) Noncanonical genomic imprinting effects in offspring, *Cell Rep.*, **12**, 979-991, doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.017.
15. Perez, J. D., Rubinstein, N. D., Fernandez, D. E., Santoro, S. W., Needleman, L. A., Ho-Shing, O., Choi, J. J., Zirlinger, M., Chen, S.-K., Liu, J. S., and Dulac, C. (2015) Quantitative and functional interrogation of parent-of-origin allelic expression biases in the brain, *Elife*, **4**, e07860, doi: 10.7554/eLife.07860.
16. Pinter, S. F., Colognori, D., Beliveau, B. J., Sadreyev, R. I., Payer, B., Yildirim, E., Wu, C.-T., and Lee, J. T. (2015) Allelic imbalance is a prevalent and tissue-specific feature of the mouse transcriptome, *Genetics*, **200**, 537-549, doi: 10.1534/genetics.115.176263.
17. Sazhenova, E. A., and Lebedev, I. N. (2021) Evolutionary aspects of genomic imprinting [in Russian], *Mol. Biol.*, **55**, 3-19, doi: 10.31857/S0026898420060105.
18. Goday, C., and Ruiz, M. F. (2002) Differential acetylation of histones H3 and H4 in paternal and maternal germline chromosomes during development of sciarid flies, *J. Cell. Sci.*, **115**, 4765-4775, doi: 10.1242/jcs.00172.
19. Matsuura, K. (2020) Genomic imprinting and evolution of insect societies, *Popul. Ecol.*, **62**, 38-52, doi: 10.1002/1438-390x.12026.
20. Luo, M., Taylor, J. M., Spriggs, A., Zhang, H., Wu, X., and Russell, S. (2011) A genome-wide survey of imprinted genes in rice seeds reveals imprinting primarily occurs in the endosperm, *PLoS Genet.*, **7**, e1002125, doi: 10.1371/journal.pgen.1002125.
21. Wolff, P., Weinhofer, I., Seguin, J., Roszak, P., Beisel, C., and Donoghue, M. T. (2011) High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the Arabidopsis endosperm, *PLoS Genet.*, **7**, e1002126, doi: 10.1371/journal.pgen.1002126.
22. Ogunwuyi, O., Upadhyay, A., Adesina, S. K., Puri, R., Foreman, T. M., and Hauser, B. R. (2016) Genetic imprinting: comparative analysis between plants and mammals, *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, **26**, 267-284, doi: 10.3329/ptcb.v26i2.30576.
23. Xiao, W., Gehring, M., Choi, Y., Margossian, L., Pu, H., and Harada, J. J. (2003) Imprinting of the MEA Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase, *Dev. Cell*, **5**, 891-901, doi: 10.1016/s1534-5807(03)00361-7.
24. Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y., Kinoshita, Y., Cao, X., and Jacobsen, S. E. (2004) One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation, *Science*, **303**, 521-523, doi: 10.1126/science.1089835.
25. Ferguson-Smith, A. C. (2011) Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm, *Nat Rev Genet.*, **12**, 565-575, doi: 10.1038/nrg3032.
26. Andergassen, D., Dotter, C. P., Wenzel, D., Sigl, V., Bammer, P. C., Muckenhuber, M., Mayer, D., Kulinski, T. M., Theussl, H.-C., Penninger, J. M., Bock, C., Barlow, D. P., Pauler, F. M., and Hudson, Q. J. (2017) Mapping the mouse Allelome reveals tissue-specific regulation of allelic expression, *Elife*, **6**, e25125, doi: 10.7554/eLife.25125.
27. Zhang, Y., Guan, D.-G., Yang, J.-H., Shao, P., Zhou, H., and Qu, L.-H. (2010) ncRNAimprint: a comprehensive database of mammalian imprinted noncoding RNAs, *RNA*, **16**, 1889-1901, doi: 10.1261/rna.2226910.
28. Doe, C. M., Relkovic, D., Garfield, A. S., Dalley, J. W., Theobald, D. E. H., Humby, T., Wilkinson, L. S., and Isles, A. R. (2009) Loss of the imprinted snoRNA mbii-52 leads to increased 5htr2c pre-RNA editing and altered 5HT2CR-mediated behaviour, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 2140-2148, doi: 10.1093/hmg/ddp137.
29. Edwards, C. A., Mungall, A. J., Matthews, L., Ryder, E., Gray, D. J., Pask, A. J., Shaw, G., Graves, J. A. M., and Rogers, J., SAVOIR Consortium, Dunham, I., Renfree, M. B., Ferguson-Smith, A. C. (2008) The evolution of the DLK1-DIO3 imprinted domain in mammals, *PLoS Biol.*, **6**, e135, doi: 10.1371/journal.pbio.0060135.
30. Hanna, C. W., and Kelsey, G. (2017) Genomic imprinting beyond DNA methylation: a role for maternal histones, *Genome Biol.*, **18**, 177, doi: 10.1186/s13059-017-1317-9.
31. Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y., and Feil, R. (2004) Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes, *Nat. Genet.*, **36**, 1296-1300, doi: 10.1038/ng1467.
32. Mager, J., Montgomery, N. D., de Villena, F. P.-M., and Magnuson, T. (2003) Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed, *Nat. Genet.*, **33**, 502-507, doi: 10.1038/ng1125.

33. Yang, H., Bai, D., Li, Y., Yu, Z., Wang, C., Sheng, Y., Liu, W., Gao, S., and Zhang, Y. (2022) Allele-specific H3K9me3 and DNA methylation co-marked CpG-rich regions serve as potential imprinting control regions in pre-implantation embryo, *Nat. Cell Biol.*, **24**, 783-792, doi: 10.1038/s41556-022-00900-4.
34. Hao, N., Palmer, A. C., Dodd, I. B., and Shearwin, K. E. (2017) Directing traffic on DNA-How transcription factors relieve or induce transcriptional interference, *Transcription*, **8**, 120-125, doi: 10.1080/21541264.2017.1285851.
35. Latos, P. A., Pauler, F. M., Koerner, M. V., Şenergin, H. B., Hudson, Q. J., Stocsits, R. R., Allhoff, W., Stricker, S. H., Klement, R. M., Warczok, K. E., Aumayr, K., Pasierbek, P., and Barlow, D. P. (2012) Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing, *Science*, **338**, 1469-1472, doi: 10.1126/science.1228110.
36. Schertzer, M. D., Bracer, K. C. A., Starmer, J., Cherney, R. E., Lee, D. M., Salazar, G., Justice, M., Bischoff, S. R., Cowley, D. O., Ariel, P., Zylka, M. J., Downen, J. M., Magnuson, T., and Calabrese, J. M. (2019) lncRNA-induced spread of polycomb controlled by genome architecture, RNA abundance, and CpG island DNA, *Mol. Cell*, **75**, 523-537, doi: 10.1016/j.molcel.2019.05.028.
37. Nagano, T., Mitchell, J. A., Sanz, L. A., Pauler, F. M., Ferguson-Smith, A. C., Feil, R., and Fraser, P. (2008) The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin, *Science*, **322**, 1717-1720, doi: 10.1126/science.1163802.
38. Kinoshita, T., Yadegari, R., Harada, J. J., Goldberg, R. B., and Fischer, R. L. (1999) Imprinting of the MEDEA polycomb gene in the Arabidopsis endosperm, *Plant Cell*, **11**, 1945-1952, doi: 10.1105/tpc.11.10.1945.
39. Kaplun, D. S., Kaluzhny, D. N., Prokhortchouk, E. B., and Zhenilo, S. V. (2022) DNA methylation: genomewide distribution, regulatory mechanism and therapy target, *Acta Naturae*, **14**, 4-19, doi: 10.32607/actanaturae.11822.
40. Butz, S., Schmolka, N., Karemaker, I. D., Villaseñor, R., Schwarz, I., Domcke, S., Uijttewaal, E. C. H., Jude, J., Lienert, F., Krebs, A. R., de Wagenaar, N. P., Bao, X., Zuber, J., Elling, U., Schübeler, D., and Baubec, T. (2022) DNA sequence and chromatin modifiers cooperate to confer epigenetic bistability at imprinting control regions, *Nat. Genet.*, **54**, 1702-1710, doi: 10.1038/s41588-022-01210-z.
41. Krebs, A. R., Dessus-Babus, S., Burger, L., and Schübeler, D. (2014) High-throughput engineering of a mammalian genome reveals building principles of methylation states at CG rich regions, *Elife*, **3**, e04094, doi: 10.7554/eLife.04094.
42. Matsuzaki, H., Okamura, E., Kuramochi, D., Ushiki, A., Hirakawa, K., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. (2018) Synthetic DNA fragments bearing ICR cis elements become differentially methylated and recapitulate genomic imprinting in transgenic mice, *Epigenetics Chromatin*, **11**, 36, doi: 10.1186/s13072-018-0207-z.
43. Taylor, D. H., McLean, C. M., Wu, W. L., Wang, A. B., and Soloway, P. D. (2016) Imprinted DNA methylation reconstituted at a non-imprinted locus, *Epigenetics Chromatin*, **9**, 41, doi: 10.1186/s13072-016-0094-0.
44. Anvar, Z., Cammisa, M., Riso, V., Baglivo, I., Kukreja, H., Sparago, A., Girardot, M., Lad, S., De Feis, I., Cerrato, F., et al. (2016) ZFP57 recognizes multiple and closely spaced sequence motif variants to maintain repressive epigenetic marks in mouse embryonic stem cells, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1118-1132, doi: 10.1093/nar/gkv1059.
45. Zuo, X., Sheng, J., Lau, H.-T., McDonald, C. M., Andrade, M., Cullen, D. E., Bell, F. T., Iacovino, M., Kyba, M., Xu, G., and Li, X. (2012) Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain, *J. Biol. Chem.*, **287**, 2107-2118, doi: 10.1074/jbc.M111.322644.
46. Imbeault, M., Helleboid, P.-Y., and Trono, D. (2017) KRAB zinc-finger proteins contribute to the evolution of gene regulatory networks, *Nature*, **543**, 550-554, doi: 10.1038/nature21683.
47. Monteagudo-Sánchez, A., Mora, J. R. H., Simon, C., Burton, A., Tenorio, J., Lapunzina, P., Clark, S., Esteller, M., Kelsey, G., López-Siguero, J. P., et al. (2020) The role of ZFP57 and additional KRAB-zinc finger proteins in the maintenance of human imprinted methylation and multi-locus imprinting disturbances, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 11394-11407, doi: 10.1093/nar/gkaa837.
48. Menafrá, R., and Stunnenberg, H. G. (2014) MBD2 and MBD3: elusive functions and mechanisms, *Front. Genet.*, **5**, 428, doi: 10.3389/fgene.2014.00428.
49. Kaplun, D. S., Fok, R. E., Korostina, V. S., Prokhortchouk, E. B., and Zhenilo, S. V. (2019) Kaiso gene knockout promotes somatic cell reprogramming, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 283-290, doi: 10.1134/S0006297919030106.
50. Barrett, C. W., Smith, J. J., Lu, L. C., Markham, N., Stengel, K. R., and Short, S. P. (2012) Kaiso directs the transcriptional corepressor MTG16 to the Kaiso binding site in target promoters, *PLoS One*, **7**, e51205, doi: 10.1371/journal.pone.0051205.
51. Michalak, P. (2014) Evidence for maternal imprinting of 45S ribosomal RNA genes in *Xenopus* hybrids, *Dev. Genes Evol.*, **224**, 125-128, doi: 10.1007/s00427-014-0464-1.
52. Ruzov, A., Dunican, D. S., Prokhortchouk, A., Pennings, S., Stancheva, I., Prokhortchouk, E., and Meehan, R. R. (2004) Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development, *Development*, **131**, 6185-6194, doi: 10.1242/dev.01549.

53. Lobanova, Y., Filonova, G., Kaplun, D., Zhigalova, N., Prokhortchouk, E., and Zhenilo, S. (2023) TRIM28 regulates transcriptional activity of methyl-DNA binding protein Kaiso by SUMOylation, *Biochimie*, **206**, 73-80, doi: 10.1016/j.biochi.2022.10.006.
54. Kulikov, A. V., Korostina, V. S., Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., Akulov, A. E., Moshkin, M. P., and Prokhortchouk, E. B. (2016) Knockout Zbtb33 gene results in an increased locomotion, exploration and pre-pulse inhibition in mice, *Behav. Brain Res.*, **297**, 76-83, doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.003.
55. Kravitz, S. N., Ferris, E., Love, M. I., Thomas, A., Quinlan, A. R., and Gregg, C. (2023) Random allelic expression in the adult human body, *Cell Rep.*, **42**, 111945, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111945.
56. Phung, T. N., Olney, K. C., Pinto, B. J., Silasi, M., Perley, L., and O'Bryan, J. (2022) X chromosome inactivation in the human placenta is patchy and distinct from adult tissues, *HGG Adv.*, **3**, 100-121, doi: 10.1016/j.xhgg.2022.100121.
57. Deng, Q., Ramsköld, D., Reinius, B., and Sandberg, R. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells, *Science*, **343**, 193-196, doi: 10.1126/science.1245316.
58. Chess, A. (2016) Monoallelic gene expression in mammals, *Annu. Rev. Genet.*, **50**, 317-327, doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035120.
59. Gimelbrant, A., Hutchinson, J. N., Thompson, B. R., and Chess, A. (2007) Widespread monoallelic expression on human autosomes, *Science*, **318**, 1136-1140, doi: 10.1126/science.1148910.
60. Walker, E. J., Zhang, C., Castelo-Branco, P., Hawkins, C., Wilson, W., Zhukova, N., Alon, N., Novokmet, A., Baskin, B., Ray, P., Knobbe, C., Dirks, P., Taylor, M. D., Croul, S., Malkin, D., and Tabori, U. (2012) Monoallelic expression determines oncogenic progression and outcome in benign and malignant brain tumors, *Cancer Res.*, **72**, 636-644, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2266.
61. Huang, W.-C., Ferris, E., Cheng, T., Hörndli, C. S., Gleason, K., Tamminga, C., Wagner, J. D., Boucher, K. M., Christian, J. L., and Gregg, C. (2017) Diverse non-genetic, allele-specific expression effects shape genetic architecture at the cellular level in the mammalian brain, *Neuron*, **93**, 1094-1109.e7, doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.033.
62. Zhenilo, S., Khrameeva, E., Tsygankova, S., Zhigalova, N., Mazur, A., and Prokhortchouk, E. (2015) Individual genome sequencing identified a novel enhancer element in exon 7 of the CSFR1 gene by shift of expressed allele ratios, *Gene*, **566**, 223-228, doi: 10.1016/j.gene.2015.04.053.
63. Rv, P., Sundaresh, A., Karunyaa, M., Arun, A., and Gayen, S. (2021) Autosomal clonal monoallelic expression: natural or artifactual? *Trends Genet.*, **37**, 206-211, doi: 10.1016/j.tig.2020.10.011.
64. Gupta, S., Lafontaine, D. L., Vigneau, S., Vinogradova, S., Mendelevich, A., Igarashi, K. J., Bortvin, A., Alves-Pereira, C. F., Clement, K., Pinello, L., Gnirke, A., Long, H., Gusev, A., Nag, A., and Gimelbrant, A. A. (2020) DNA methylation is a key mechanism for maintaining monoallelic expression on autosomes, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.02.20.954834.
65. Gendrel, A.-V., Attia, M., Chen, C.-J., Diabangouaya, P., Servant, N., Barillot, E., and Heard, E. (2014) Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression, *Dev. Cell*, **28**, 366-380, doi: 10.1016/j.devcel.2014.01.016.
66. Eckersley-Maslin, M. A., Thybert, D., Bergmann, J. H., Marioni, J. C., Flicek, P., and Spector, D. L. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation, *Dev. Cell*, **28**, 351-365, doi: 10.1016/j.devcel.2014.01.017.
67. Kissiov, D. U., Ethell, A., Chen, S., Wolf, N. K., Zhang, C., Dang, S. M., Jo, Y., Madsen, K. N., Paranjpe, I., Lee, A. Y., Chim, B., Muljo, S. A., and Raulet, D. H. (2022) Binary outcomes of enhancer activity underlie stable random monoallelic expression, *Elife*, **11**, e74204, doi: 10.7554/eLife.74204.
68. Sands, B., Yun, S., and Mendenhall, A. R. (2021) Introns control stochastic allele expression bias, *Nat. Commun.*, **12**, 6527, doi: 10.1038/s41467-021-26798-4.
69. Kim, J. K., Kolodziejczyk, A. A., Ilicic, T., Teichmann, S. A., and Marioni, J. C. (2015) Characterizing noise structure in single-cell RNA-seq distinguishes genuine from technical stochastic allelic expression, *Nat. Commun.*, **6**, 8687, doi: 10.1038/ncomms9687.
70. Mendelevich, A., Gupta, S., Pakharev, A., Teodosiadis, A., Mironov, A. A., and Gimelbrant, A. A. (2023) Foreign RNA spike-ins enable accurate allele-specific expression analysis at scale, *Bioinformatics*, **39**, i431-i439, doi: 10.1093/bioinformatics/btad254.
71. Reinius, B., Mold, J. E., Ramsköld, D., Deng, Q., Johnsson, P., Michaëlsson, J., Frisén, J., and Sandberg, R. (2016) Analysis of allelic expression patterns in clonal somatic cells by single-cell RNA-seq, *Nat. Genet.*, **48**, 1430-1435, doi: 10.1038/ng.3678.
72. Naik, H. C., Hari, K., Chandel, D., Mandal, S., Jolly, M. K., and Gayen, S. (2021) Semicoordinated allelic-bursting shape dynamic random monoallelic expression in pregastrulation embryos, *iScience*, **24**, 102954, doi: 10.1016/j.isci.2021.102954.
73. Tunnacliffe, E., and Chubb, J. R. (2020) What is a transcriptional burst? *Trends Genet.*, **36**, 288-297, doi: 10.1016/j.tig.2020.01.003.

74. Garber, K. (2015) RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 890-891, doi: 10.1038/nbt0915-890.
75. Perrera, V., and Martello, G. (2019) How does reprogramming to pluripotency affect genomic imprinting? *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 76, doi: 10.3389/fcell.2019.00076.
76. Anguera, M. C., Sadreyev, R., Zhang, Z., Szanto, A., Payer, B., and Sheridan, S. D. (2012) Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes, *Cell Stem Cell*, **11**, 75-90, doi: 10.1016/j.stem.2012.03.008.
77. Patel, S., Bonora, G., Sahakyan, A., Kim, R., Chronis, C., and Langerman, J. (2017) Human embryonic stem cells do not change their x inactivation status during differentiation, *Cell Rep.*, **18**, 54-67, doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.054.
78. Arez, M., Eckersley-Maslin, M., Klobučar, T., von Gilsa Lopes, J., Krueger, F., and Mupo, A. (2022) Imprinting fidelity in mouse iPSCs depends on sex of donor cell and medium formulation, *Nat. Commun.*, **13**, 5432, doi: 10.1038/s41467-022-33013-5.
79. Bar, S., Schachter, M., Eldar-Geva, T., and Benvenisty, N. (2017) Large-scale analysis of loss of imprinting in human pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, **19**, 957-968, doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.020.
80. Uyar, A., and Seli, E. (2014) The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, **26**, 210-221, doi: 10.1097/GCO.0000000000000071.

GENOMIC IMPRINTING AND RANDOM MONOALLELIC EXPRESSION

Review

Y. V. Lobanova^{1,2} and S. V. Zhenilo^{1*}

¹ Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: szhenilo@gmail.com

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

In this review we consider mechanisms of monoallelic expression: genomic imprinting, in which gene transcription depends on the parental origin of the allele, and random monoallelic transcription. We summarize evidence for the regulation of activity in imprinted regions. Particular attention is paid to areas that control imprinting. Factors that may influence the variability of the imprintome are considered. The perspectives behind monoallelic expression studies are also discussed.

Keywords: imprinting, random monoallelic expression, DNA methylation, ZNF57, epigenetics

ЭКСТРАКТ ЛИСТЬЕВ *Olea europaea* ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК РАКА ЖЕЛУДКА К ХИМИОПРЕПАРАТАМ ЗА СЧЕТ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА ИХ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

© 2024 Ч. Текин¹, М. Эрджелик¹, П. Дунаев², А. Галембикова², Г. Тезкан³, С. Ак Аксой^{4,5}, Ф. Будак⁶, О. Исык⁷, Н. Юграс⁸, С. Бойчук^{2,9,10*}, Б. Тунджа^{1*}

¹ Университет Бурса Улудаг, медицинский факультет, кафедра медицинской биологии, 16059 Бурса, Турция; электронная почта: btunca@uludag.edu.tr

² Казанский государственный медицинский университет, кафедра общей патологии, 420012 Казань, Россия; электронная почта: boichuksergei@mail.ru

³ Университет Бурса Улудаг, стоматологический факультет, кафедра фундаментальных наук, 16059 Бурса, Турция

⁴ Университет Бурса Улудаг, Профессионально-техническое училище «Инегел», 16059 Бурса, Турция

⁵ Университет Бурса Улудаг, медицинский факультет, отдел экспериментальных исследований на животных, 16059 Бурса, Турция

⁶ Университет Бурса Улудаг, медицинский факультет, кафедра иммунологии, 16059 Бурса, Турция

⁷ Университет Бурса Улудаг, медицинский факультет, кафедра общей хирургии, 16059 Бурса, Турция

⁸ Университет Бурса Улудаг, медицинский факультет, кафедра патологии, 16059 Бурса, Турция

⁹ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, кафедра лучевой терапии и радиологии, 125445 Москва, Россия

¹⁰ Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», 420012 Казань, Россия

Поступила в редакцию 10.10.2023

После доработки 21.11.2023

Принята к публикации 30.11.2023

Общая выживаемость больных с метастатическими и рецидивирующими формами рака желудка (РЖ) продолжает оставаться на низком уровне. Это обусловлено развитием эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) у опухолевых клеток, способствующего быстрому появлению метастазов, а также резистентности опухоли к химиотерапии. ЭМП у клеток РЖ подтверждается исследованием их транскриптома. Анализ баз данных TCGA и GTEx ($n = 408$) и нашей когорты пациентов с РЖ ($n = 43$) показал, что экспрессия гена *CDH2* была значительно снижена в опухолях, по сравнению с неопухолевыми тканями, и коррелировала с общей выживаемостью пациентов с РЖ. Аналогичным образом, экспрессия генов транскрипционных факторов, способствующих ЭМП, *SNAIL* и *ZEB1*, была значительно увеличена при РЖ. Таким образом, ингибирование процесса ЭМП может стать новым подходом в стратегии терапии больных с метастатическими и рецидивирующими формами РЖ. В предыдущих исследованиях была обнаружена противоопухолевая активность экстракта листьев *Olea europaea* (OLE). В настоящей работе показана способность OLE ингибировать ЭМП, а также усиливать гибель клеток РЖ по механизму апоптоза *in vitro*. В частности, при комбинированном применении OLE с химиопрепаратами 5-фторурацилом (5-FU) и цисплатином (Cis) отмечалась выраженная гибель опухолевых клеток РЖ по механизму апоптоза. При использовании комбинации OLE с химиопрепаратами (5-FU, Cis) в клетках РЖ изменялась экспрессия маркеров ЭМП (Е-кадгерина, N-кадгерина, виментина, клаудина-1), повышалась экспрессия маркеров апоптоза (расщепленная форма PARP1) и увеличивалось количество апоптотических клеток (Annexin V-позитивных). Таким образом, представленная работа свидетельствует о способности OLE вызывать гибель клеток РЖ за счет подавления процесса ЭМП

* Адресат для корреспонденции.

и повышения чувствительности к химиопрепаратам (5-FU, Cis), используемым для терапии РЖ в настоящее время.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак желудка, экстракт листьев *Olea europaea*, эпителиально-мезенхимальный переход, апоптоз, химиотерапевтические препараты, кадгерин 2, SOX2, некодирующая РНК, miR-23b-3p, противоопухолевый эффект.

DOI: 10.31857/S0320972524010067 **EDN:** YRICHX

ВВЕДЕНИЕ

Частота ранней диагностики рака желудка (РЖ) остается низкой. В случае поздней диагностики опухолевые клетки, как правило, обладают химиорезистентностью, что является серьезной проблемой для дальнейшей терапии [1, 2]. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток РЖ инициирует развитие прогрессии опухоли. При ЭМП за счет усиления мезенхимального фенотипа увеличивается подвижность опухолевых клеток, что обеспечивает их инвазивный рост и метастазирование. Кроме того, при ЭМП увеличивается количество раковых стволовых клеток и развивается химиорезистентность [3]. При ЭМП в опухолевых клетках резко снижается экспрессия кадгерина 1, повышается экспрессия кадгерина 2 и транскрипционных факторов ZEB1 (цинк-зависимый белок), SNAIL и TWIST [4, 5]. Ингибирование процесса ЭМП в клетках РЖ способствует повышению их чувствительности к химиопрепаратам [3, 6].

В настоящее время, используя некодирующие РНК, можно модулировать экспрессию различных генов клетки. Данный метод, потенциально, может быть использован в рамках персонализированного подхода к терапии злокачественных новообразований [7]. Продemonстрировано, что в процессе ЭМП в различных опухолевых клетках меняются уровни микроРНК (miRNA). В частности, снижается уровень miR-23b-3p и miR-200c [8–10]. Данный факт требует дальнего экспериментального изучения.

Препараты на основе лекарственных трав широко используются в клинической онкологии. В частности, их назначают вместе с химиопрепаратами, что позволяет уменьшить дозу цитостатиков и, следовательно, выраженность побочных эффектов [11, 12]. Показано, что экстракт листьев *Olea europaea* (OLE) обладает антигипертензивным, антиоксидантным и противоопухолевым действиями благодаря наличию в его составе биоло-

гически активных компонентов – секойридоидов, тритерпеноидов и флавоноидов [13–16]. OLE снижает выраженность воспалительного процесса в слизистой оболочке желудка, что уменьшает прогрессию РЖ [17]. Наши предыдущие исследования показали, что под влиянием OLE уменьшается популяция раковых стволовых клеток в опухолевой ткани РЖ [18]. Кроме того, OLE способен подавлять активность сигнальных путей в клетках РЖ, оказывая влияние на микроРНК [19]. ЭМП играет важную роль в прогрессии РЖ [20], но влияние OLE на механизмы ЭМП остаются неизученными.

Химиопрепараты 5-фторурацил (5-FU) и цисплатин (Cis) в настоящее время используются для лечения разнообразных злокачественных новообразований, в том числе и РЖ [1, 2]. Тем не менее у большинства больных РЖ на фоне их применения отмечаются побочные эффекты [21]. Показано, что у пациентов с РЖ при развитии ЭМП резко снижается чувствительность к 5-FU [22].

Вышеизложенное явилось основанием для настоящего исследования по изучению способности OLE ингибировать процесс ЭМП в клетках РЖ и тем самым усиливать чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам (5-FU, Cis).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование экспрессии транскрипционных факторов и генов-маркеров ЭМП в тканях РЖ по результатам, опубликованным в международных базах данных. В базе данных GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis – интерактивный анализ профиля экспрессии генов; <http://gepia.cancer-pku.cn/>, дата обращения – 15 февраля 2023 г.) проанализирована экспрессия генов-маркеров ЭМП (*CDH1*, *CDH2*) и транскрипционных факторов (*TWIST*, *SNAIL*, *ZEB1*) в тканях РЖ и неопухолевых тканях. Использовались результаты проектов TCGA (The Cancer Genome Atlas – атлас генома раковых клеток) и GTEx (Genotype-Tissue

Принятые сокращения: АО – акридиновый оранжевый; РЖ – рак желудка; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; AGS – клеточная линия аденокарциномы желудка; Cis – цисплатин; 5-FU – 5-фторурацил; GEPIA – интерактивный анализ профиля экспрессии генов; GTEx – генотипы клеток тканей; HPA – атлас белков человека; lncRNA – длинная некодирующая РНК; OLE – экстракт листьев *Olea europaea*; PI – йодид пропидия; TCGA – атлас генома раковых клеток.

Expression – генотипы клеток тканей). Было проанализировано влияние экспрессии генов-маркеров ЭМП на общую выживаемость пациентов с РЖ. Была изучена корреляция между экспрессией гена *CDH2* и уровнем длинной некодирующей РНК (lncRNA) *MALAT1*. Для изучения взаимодействий различных видов РНК (lncRNA и RNA, lncRNA и miRNA, RNA и miRNA) использовались соответственно следующие базы данных: LncRRISearch (<http://rtools.cbrc.jp/LncRRISearch/>), the lncRNASNP database version 2.0 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP>), DIANA-TarBase v7.0 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>). Дата обращения – 1 апреля 2023 г.

Исследование образцов опухолевых тканей.

Парафиновые блоки опухолевых тканей от пациентов с РЖ ($n = 43$) и неопухолевых тканей желудка ($n = 7$) были получены из архива отделения патологии больницы медицинского факультета Университета Бурса Улудуг. У всех больных РЖ была диагностирована аденокарцинома. У 34 пациентов (79,06%) опухоли находились на стадии 3 или 4. Мутация гена *TP53* у 11 пациентов (25,58%) была выше 70%; у 6 пациентов (13,95%) – находилась в пределах 40–70%; у 6 пациентов (13,95%) – была менее 40%; у 20 пациентов (46,52%) – не обнаруживалась. В 10 случаях РЖ (23,25%) в опухоли отмечалась экспрессия *CerbB2*. В 35 случаях РЖ (81,39%) отмечались метастазы в лимфатические узлы, из них 21 опухоль (48,83%) сопровождалась перинеуральной инвазией. У 17 пациентов с РЖ (39,53%) отмечалась резистентность к химиотерапии (5-FU, Cis). Все пациенты находились под наблюдением в течение не менее 5 лет на предмет рецидива РЖ. Протоколы сбора образцов опухолей и анализа клинических записей были одобрены местным комитетом по этике Университета Бурса Улудуг (2019-6/32). От пациентов было получено письменное информированное согласие на использование своих тканей и клинических данных в научно-исследовательских целях.

Анализ экспрессии генов. РНК из образцов опухолевой ткани экстрагировали с использованием набора Quick-RNA FFPE Miniprep («Zymo Research», США). Количество и качество образцов РНК подтверждали путем измерения поглощения образцов при 260/280 нм на спектрофотометре UV/Vis («Beckman Coulter», Канада). Для преобразования образцов РНК (100 нг) в кДНК использовали набор High-Capacity cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Экспрессию РНК генов-маркеров ЭМП *CDH1* (Hs01013959_m1) и *CDH2* (Hs00983056_m1), а также генов, кодирующих факторы транскрипции, *TWIST* (Hs01675818_s1), *SNAI1* (Hs_00195591_m1) и *ZEB1* (Hs01566408_m1), исследовали с использованием соответствующих праймеров (Taqman, «Thermo Fisher Scientific»,

США) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-qPCR) с помощью амплификатора StepOne™ Real-Time PCR System («Applied Biosystems», США).

Образцы были нормализованы по экспрессии гена *GAPDH* (Hs02786624_g1). Условия для RT-qPCR были следующими: 95 °C – 10 мин, 95 °C – 15 с, 60 °C – 60 мин. Количественную оценку результатов проводили с использованием метода $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ [23].

Анализ экспрессии микроРНК. 10 нг общей РНК конвертировали в кДНК с использованием набора miRCURY® LNA® RT Kit («Qiagen», США). Экспрессию РНК hsa-miR-200c-3p (YP00204482) и hsa-miR-23b-3p (YP02119314) оценивали методом RT-qPCR с помощью прибора Applied Biosystem StepOne™ RT-PCR. Использовали набор реактивов miRCURY® LNA® miRNA PCR Assays в соответствии с инструкциями производителя («Qiagen»). Образцы были нормализованы по экспрессии гена *SNORD48* (YP00203903). Условия для RT-qPCR были следующими: начальная активация нагреванием при 95 °C – 2 мин; затем 40 циклов: денатурация при 95 °C – 10 с и отжиг при 56 °C – 60 мин. Количественную оценку результатов проводили с использованием метода $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ [23].

Эксперименты *in vitro*. Клеточные культуры и реагенты. Эксперименты *in vitro* проводили на клеточной линии AGS (аденокарцинома желудка), предоставленной Американской коллекцией типовых культур («ATCC», США). Клетки AGS культивировали в питательной среде DMEM/F-12 («HyClone», США) с добавлением L-глутамина (292 мг/литр), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 1 мМ пирувата натрия и антибиотиков пенициллина (5000 Ед./мл) и стрептомицина (5000 мкг/мл) (все реагенты фирмы «Biochrome», Германия). Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C в инкубаторе MCO-19AIC (UV) («Panasonic Healthcare», Япония). Для определения молекулярного профиля клеток AGS использовали Атлас белков человека (HPA; Human Protein Atlas version 22.0 (<https://www.proteinatlas.org/>); дата обращения – 15 февраля 2023 г.). Стандартизированный OLE (05.06.2007,10-00014-00015-0) был предоставлен компанией «Kale Naturel» (Турция). Протокол экстракции и состав OLE описаны в нашем предыдущем исследовании [24]. Фенольные соединения во фракциях OLE идентифицировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью прибора Agilent 1200 HPLC system («Waldbronn», Германия) [25]. В стандартизованном OLE, применяемом в настоящем исследовании, были обнаружены (при длине волны 280 нм) 19 419 мг/мл олеуропеина, 409 мг/мл рутина и следовые количества гидрокситирозола и тирозола [26]. Для использования в эксперименте

OLE предварительно растворяли в дистиллированной воде. Химиопрепараты 5-FU и Cis («Sigma-Aldrich», Германия) для использования в эксперименте были предварительно растворены в диметилсульфоксиде (ДМСО) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ клеточной пролиферации. Влияние различных концентраций OLE (0,1–3 мг/мл), 5-FU (10–400 мкМ) и Cis (0,1–100 мкМ) на пролиферацию клеток AGS оценивали колориметрическим методом с помощью реагента WST-1 («Roche Applied Sciences», Германия), согласно протоколу производителя [15, 27–30]. Для этого клетки AGS в количестве 2×10^5 засеивали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета («Corning Inc.», США). Через 24 ч к клеткам добавляли OLE, 5-FU, Cis или их комбинации. Через определенные интервалы времени инкубации (24, 48, 72 ч) к клеткам добавляли 10 мкл реагента WST-1 и через 1 ч инкубации при комнатной температуре оценивали пролиферацию клеток при длине волны Ex/Em = 460/420 нм с использованием спектрофотометра TriStar2 S LB942 Multimode Reader («Berthold Technologies», Германия). Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Для расчета половинной ингибирующей концентрации (IC₅₀) OLE, 5-FU и Cis использовали следующую формулу: $[(1 - \text{поглощение образца} / \text{поглощение контроля}) \times 100]$ [19]. Данные были нормализованы по отношению к контрольным образцам клеток. Исследование влияния OLE, 5-FU и Cis на пролиферацию клеток AGS в режиме реального времени проводили с помощью прибора «ACEA Biosciences» (США). Индекс пролиферации клеток регистрировали каждые 15 мин в течение 72 ч с использованием биосенсорной системы анализа клеток xCELLigence («ACEA Biosciences»).

Изучение взаимодействия OLE с химиопрепаратами 5-фторурацилом и цисплатином. Клетки AGS в количестве 2×10^5 засеивали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. Через 24 ч к клеткам добавляли комбинации препаратов в различных концентрациях: OLE + 5-FU; OLE + Cis; 5-FU + Cis; OLE + 5-FU + Cis. Далее, клетки культивировали в течение 48 ч при комнатной температуре. Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Влияние комбинаций OLE + химиопрепарат на пролиферацию клеток определяли с использованием реагента WST-1 и системы клеточного анализатора xCELLigence в реальном времени, как указано выше. Потенциальный эффект взаимодействия OLE с химиопрепаратами (аддитивный, антагонистический или синергический эффект взаимодействия) рассчитывали с помощью R-пакета программного обеспечения SynergyFinder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html>) [31]. Использовались следующие значения показателя синергии SC (synergy

score): 1) SC менее –10 (антагонистический эффект взаимодействия); 2) $-10 < SC < 10$ (аддитивный эффект взаимодействия); 3) SC > 10 (синергический эффект взаимодействия) [31].

Исследование экспрессии РНК генов-маркеров ЭМТ и факторов транскрипции, а также экспрессии микроРНК в клетках AGS. РНК из клеток AGS выделяли с использованием набора Zymo RNA Isolation Kit («Zymo Research»). Для исследования экспрессии генов *CDH2*, *SNAI1* и *ZEB1* использовали набор реагентов High-Capacity cDNA Synthesis Kit. Для анализа экспрессии микроРНК использовали набор реагентов miRCURY® LNA® RT Kit. RT-qPCR проводили, как описано выше.

Вестерн-блоттинг. Клетки AGS лизировали на льду с использованием RIPA-буфера («Thermo Fisher Scientific»), к которому предварительно добавляли коктейль ингибиторов протеаз («Roche», США). Затем лизаты центрифугировали в течение 30 мин при 15 000 g при 4 °C, а супернатанты, содержащие растворимые белки, использовали для анализа. Концентрацию белка в образцах измеряли методом Брэдфорда. После этого не более 35 мкг белка загружали в лунку 10%-ного геля SDS-PAGE и разделяли электрофорезом; далее, переносили на нитроцеллюлозную мембрану с использованием системы полусухого переноса («Bio-Rad», США). Мембраны блокировали в 5%-ном обезжиренном сухом молоке (в TBS-T) в течение 1 ч и затем инкубировали со следующими первичными антителами (+4 °C, 18 ч): N-кадгерин (# MA1-2002; «Invitrogen», «Thermo Fisher Scientific», США); расщепленная форма каспазы-3 (# 9661T), расщепленная форма PARP1 (# 5625T), N-кадгерин (# 1316S), виментин (# 5741S), клаудин-1 (# 8683S) («Cell Signaling Technology Inc.», США); E-кадгерин (# sc-56527), β-актин (# sc-517582) («Santa Cruz Biotechnology», США). Далее, мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с HRP (# 1706516, «Bio-Rad»). Изображения мембран были получены с использованием системы визуализации Versadoc MP 4000 и программного обеспечения Quantity One («Bio-Rad»). Для захвата изображения был выбран канал «Chemi Hi Sensitivity»; время экспозиции мембраны – 10–15 мин. Цифровые изображения были сохранены для дальнейшего анализа. Интенсивность различных полос измеряли с помощью программного обеспечения Quantity One («Bio-Rad»). Окраску на β-актин использовали для контроля уровня белка в образцах. Эксперименты повторяли 3 раза.

Флуоресцентная микроскопия опухолевых клеток с использованием красителей акридинового оранжевого и йодида пропидия. Флуоресцентный краситель АО/PI (содержит акридиновый оранжевый – АО и йодид пропидия – PI) исполь-

зовали для оценки морфологических особенностей опухолевых клеток AGS. Клетки в количестве 1×10^5 засеивали в лунки 24-луночного плоскодонного планшета («Corning Inc.»). К клеткам добавляли 100 мкл раствора флуоресцентного красителя АО/PI (концентрация АО – 10 мкг/мл, PI – 5 мкл/мл) («Thermo Fisher», США). Инкубация – 5 мин при комнатной температуре. Морфологию клеток исследовали при возбуждении (535 нм)/эмиссии (580 нм) с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа EVOS 5000 («Thermo Fisher Scientific»). Интактное зеленое ядро считалось признаком жизнеспособных клеток. Плотная зеленая область конденсации хроматина в ядре считалась признаком ранней стадии апоптоза клетки, тогда как плотные оранжевые области конденсации хроматина считались маркером поздней стадии апоптоза клетки. Клетки, имеющие интактное оранжевое ядро, считались погибшими по механизму некроза [32, 33].

Исследование апоптоза опухолевых клеток с использованием красителя Annexin V. Гибель опухолевых клеток AGS по механизму апоптоза оценивали с помощью красителя Annexin V, используя набор реагентов Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC («Invitrogen»; «Thermo Fisher Scientific») в соответствии с инструкциями производителя. Количество апоптотических клеток определяли методом проточной цитометрии на приборе NAVIOS EX Flow Cytometer («Beckman Coulter»). Окраска красителем Annexin V считалась признаком ранней стадии апоптоза клетки. Двойное окрашивание Annexin V/PI – признаком поздней стадии апоптоза клетки или ее некроза. Жизнеспособными считались клетки, не имеющие окрашивания указанными выше красителями. Эксперименты повторяли 3 раза.

Анализ «заживления раны» в области монослоя опухолевых клеток AGS (Scratch-метод). Клетки AGS в количестве 1×10^6 засеивали в лунки 6-луночных плоскодонных планшетов («Corning Inc.»). Когда клетки достигали конfluence 90%, микропипеткой (200 мкл) наносили царапину («рана») в области монослоя клеток. Лунки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и добавляли культуральную среду (контроль), а также культуральную среду, содержащую OLE, 5-FU или Cis. Площадь закрытия «раны» оценивали через различные интервалы времени (6, 12, 24, 36 и 48 ч) с помощью световой микроскопии. Фотографии «раны» в области монослоя клеток исследовали с помощью программного обеспечения ImageJ v1.53s (National Institute of Health, США). Эксперименты повторяли 3 раза.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Клетки AGS засеивали на покровные стекла, предварительно покрытые раствором поли-L-лизина

(«Sigma-Aldrich») и культивировали в 6-луночных плоскодонных планшетах в течение 48 ч. Далее, к клеткам добавляли OLE, 5-FU или Cis (инкубация 6 ч при комнатной температуре). После инкубации покровные стекла с клетками фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. Для анализа экспрессии транскрипционного фактора SOX2 использовали мышинные моноклональные антитела анти-SOX2, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor® 488 (разведение 1 : 100; «Cell Signaling Technologies», # 5049S). Экспрессия транскрипционного фактора SOX2 визуализировалась зеленым цветом при длине волны 488 нм. Ядро клетки визуализировали с помощью красителя DAPI («Cell Signaling Technologies», # 4083S). Изображения клеток AGS были получены с помощью системы визуализации клеток EVOS 5000 cell imaging system («Thermo Fisher Scientific»). Показатель интенсивности свечения (H-score) клеток, экспрессирующих SOX2, проводили с помощью методики, описанной в нашей предыдущей работе [34].

Статистическая обработка результатов. Количественные различия уровней экспрессии РНК и микроРНК в опухолевой ткани РЖ и неопухолевых тканях оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Корреляционный анализ Пирсона использовали для выявления связи между экспрессией гена *CDH2* и уровнем длинной некодирующей РНК *MALAT1* в тканях РЖ (при анализе результатов проектов TCGA и GTEx в международных базах данных). Для анализа общей выживаемости больных РЖ использовали тест Каплана–Мейера. Различия в экспрессии генов-маркеров ЭМП в клетках AGS при их культивировании с OLE и химиопрепаратами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Количественную оценку пролиферации клеток AGS, их апоптоза, площади закрытия «раны» в области монослоя опухолевых клеток проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для статистической обработки результатов экспериментов использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 6 («GraphPad Software Inc.», США). Уровень статистической значимости (*p*) считали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия генов-маркеров эпителиально-мезенхимального перехода у пациентов с раком желудка. Анализируя результаты проектов TCGA и GTEx, было установлено, что экспрессия гена *CDH1*, кодирующего белок кадгерин 1, была значительно повышена в образцах РЖ (*n* = 408) по сравнению с неопухолевыми тканями (*n* = 211) (рис. 1, а).

Аналогичным образом, наша исследовательская группа подтвердила повышенную экспрессию РНК гена *CDH1* в образцах РЖ (рис. 1, б). Однако различия в экспрессии гена *CDH1* в образцах опухолей не влияли на общую выживаемость пациентов с РЖ, как показано на рис. 1, в. В то же время экспрессия гена *CDH2*, кодирующего белок кадгерин 2, была значительно ниже в образцах РЖ ($n = 408$) по сравнению с неопухолевыми тканями ($n = 211$) (рис. 1, г). В образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании, также наблюдалось снижение экспрессии гена *CDH2* (рис. 1, д). В то же время в некоторых образцах РЖ отмечалась повышенная экспрессия гена *CDH2* по сравнению с неопухолевыми тканями (рис. 1, г и д). Важно отметить, что у пациентов с низкой экспрессией гена *CDH2* отмечалось повышение общей выживаемости по сравнению с пациентами, имеющими высокую экспрессию гена *CDH2* (рис. 1, е).

Далее, была изучена экспрессия транскрипционных факторов, участвующих в процессе ЭМП. Было обнаружено, что экспрессия генов *SNAI1* и *ZEB1* (кодирующих одноименные белки *SNAI1* и *ZEB1*) была значительно увеличена в образцах опухолей пациентов с РЖ по сравнению с их неопухолевыми тканями (*SNAI1*: $p < 0,001$; *ZEB1*: $p = 0,03$; рис. 1, ж и з). В то же время изменения экспрессии гена *TWIST1*, кодирующего белок *TWIST*, отсутствовали ($p > 0,05$; рис. 1, и).

Таким образом, процесс ЭМП при РЖ был обусловлен повышенной экспрессией генов *SNAI1* и *ZEB1*. Кроме того, в процессе ЭМП повышалась экспрессия гена *CDH2*, что сопровождалось снижением общей выживаемости пациентов.

Посттранскрипционная регуляция ЭМП при РЖ. Экспрессия lncRNA *MALAT1* была повышена в образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании, по сравнению с их нормальными тканями. Такая же закономерность характерна для экспрессии lncRNA *MALAT1* при анализе результатов проектов TCGA и GTEx в международных базах данных (рис. 1, к и л). Экспрессия lncRNA *MALAT1* не оказывала прямого влияния на выживаемость пациентов с РЖ (рис. 1, м). Тем не менее lncRNA *MALAT1*, взаимодействуя с 3'-UTR-сайтом РНК *CDH2* (рис. 1, н), способствовала снижению ее экспрессии. Следовательно, повышенная экспрессия lncRNA *MALAT1*, вызывая снижение экспрессии гена *CDH2*, косвенно способствует прогрессированию РЖ.

Экспрессия микроРНК (miR-23b-3p и miR-200c-3p) была снижена в образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании, по сравнению с их нормальными тканями (рис. 1, о и п). Показано, что miR-23b-3p имеет сайт связывания с РНК *MALAT1* (рис. 1, р).

Кроме того, miR-200c-3p взаимодействует с 3'-UTR-сайтом РНК транскрипционного фактора *ZEB1* (рис. 1, с).

Таким образом, при РЖ в регуляции экспрессии генов ЭМП играют роль также микроРНК. Полученные результаты свидетельствуют, что miR-23b-3p может участвовать в посттранскрипционной регуляции экспрессии lncRNA *MALAT1*. Кроме того, miR-200c-3p может посттранскрипционно регулировать экспрессию транскрипционного фактора *ZEB1*, имеющего важное значение для ЭМП.

OLE усиливает цитотоксическую активность некоторых химиопрепаратов, используемых для лечения РЖ. Влияние OLE и химиопрепаратов (5-FU и Cis) на выживаемость и пролиферацию клеток РЖ исследовали с использованием клеточной линии AGS (аденокарцинома желудка). Клетки AGS характеризуются развитием ЭМП, индуцированного повышенной экспрессией генов *CDH2* и *SNAI1* (рис. 2, а). По информации базы данных HPA, в клетках AGS активизированы сигнальные пути, опосредованные киназами PI3K и JAK/STAT (рис. 2, б), которые играют важную роль в развитии ЭМП [35, 36]. Было обнаружено, что при использовании OLE в концентрации 1,5 мг/мл жизнеспособность клеток AGS снижалась до 50% через 24 ч инкубации (рис. 2, в и г). В то же время химиопрепараты 5-FU (25 мкМ) и Cis (20 мкМ) оказывали подобный эффект на клетки AGS только спустя 48 ч культивирования (рис. 2, д–з). При последующем окрашивании клеток AGS, инкубированных в присутствии OLE и химиопрепаратов (5-FU, Cis) флуоресцентным красителем AO/PI, в них отмечались признаки апоптоза: увеличение конденсации хроматина (т.е. плотные зеленые и оранжевые области) (рис. 2, и). Кроме того, признаки апоптоза в клетках AGS, индуцированных OLE и химиопрепаратами (5-FU, Cis), были обнаружены методом проточной цитометрии с использованием красителя Annexin V (рис. 2, к).

Далее, исследовалась способность OLE модулировать цитотоксическую и антипролиферативную активность 5-FU и Cis. Для этого клетки AGS культивировали с комбинацией OLE и химиопрепаратов. OLE использовали в концентрации 1,5 мг/мл, 5-FU – 25 мкМ, Cis – 20 мкМ. При использовании комбинации OLE + Cis жизнеспособность клеток AGS уменьшалась более значительно по сравнению с отдельным применением Cis ($p < 0,0001$; рис. 3, а). При использовании комбинации OLE сразу с двумя химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) жизнеспособность клеток AGS снижалась более значительно, чем при использовании комбинаций OLE с одним химиопрепаратом (OLE + 5-FU или OLE + Cis; $p = 0,0493$; рис. 3, б–г). Согласно шкале синергии Bliss, при использовании комбинации OLE + 5-FU

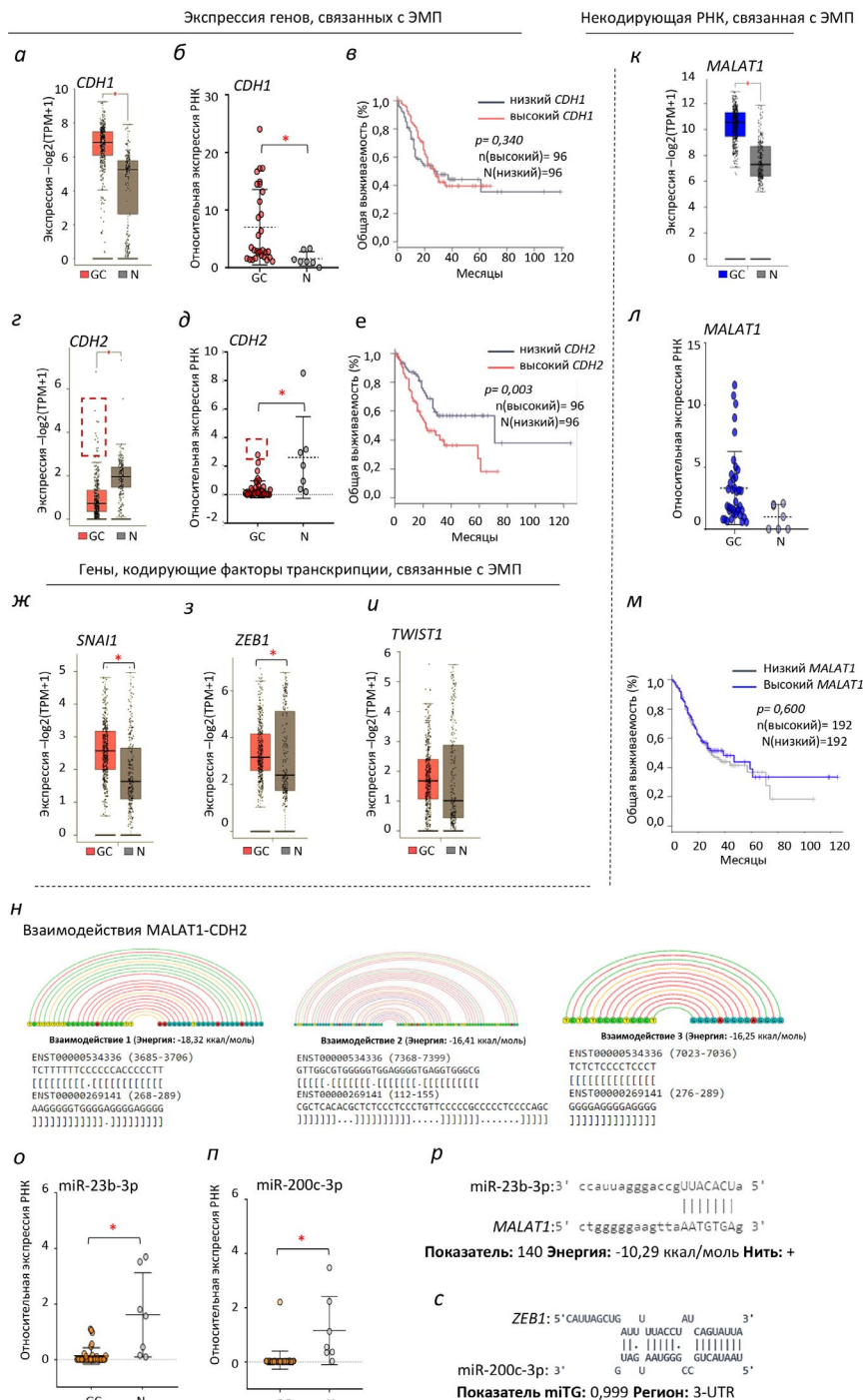


Рис. 1. Регуляция экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) при раке желудка (РЖ). *а* – Экспрессия гена *CDH1* в ткани РЖ и неопухолевых тканях (база данных GEPID); *б* – экспрессия гена *CDH1* в образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании; *в* – влияние нарушения экспрессии гена *CDH1* на общую выживаемость пациентов с РЖ (база данных GEPID); *г* – экспрессия гена *CDH2* в ткани РЖ (база данных GEPID); *д* – экспрессия гена *CDH2* в образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании; *е* – влияние нарушений экспрессии гена *CDH2* на общую выживаемость пациентов с РЖ (база данных GEPID); *ж-и* – экспрессия генов *SNAI1*, *ZEB1* и *TWIST1*, кодирующих транскрипционные факторы, связанные с ЭМП при РЖ (база данных GEPID); *к* – экспрессия некодирующей РНК *MALAT1* при РЖ (база данных GEPID); *л* – экспрессия некодирующей РНК *MALAT1* в образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании; *м* – взаимосвязь экспрессии некодирующей РНК *MALAT1* и общей выживаемости пациентов с РЖ (база данных GEPID); *н* – взаимодействие некодирующей РНК *MALAT1* и гена *CDH2* (база данных LncRsearch); *о* и *п* – экспрессия *miR-23b-3p* и *miR-200c* при РЖ; *р* – связывание *miR-23b-3p* с сайтом некодирующей РНК *MALAT1* (база данных LncRNASNP); *с* – связывание *miR-200c* с сайтом гена *ZEB1* (база данных DIANA-TarBase). Уровень статистической значимости (*p*) рассчитывался с помощью *t*-критерия Стьюдента (для *а*, *б*, *г*, *д*, *ж-л*, *о* и *п*) и теста Каплана-Мейера (для *в*, *е* и *м*); * $p < 0,05$; TPM – число транскриптов на миллион картированных прочтений

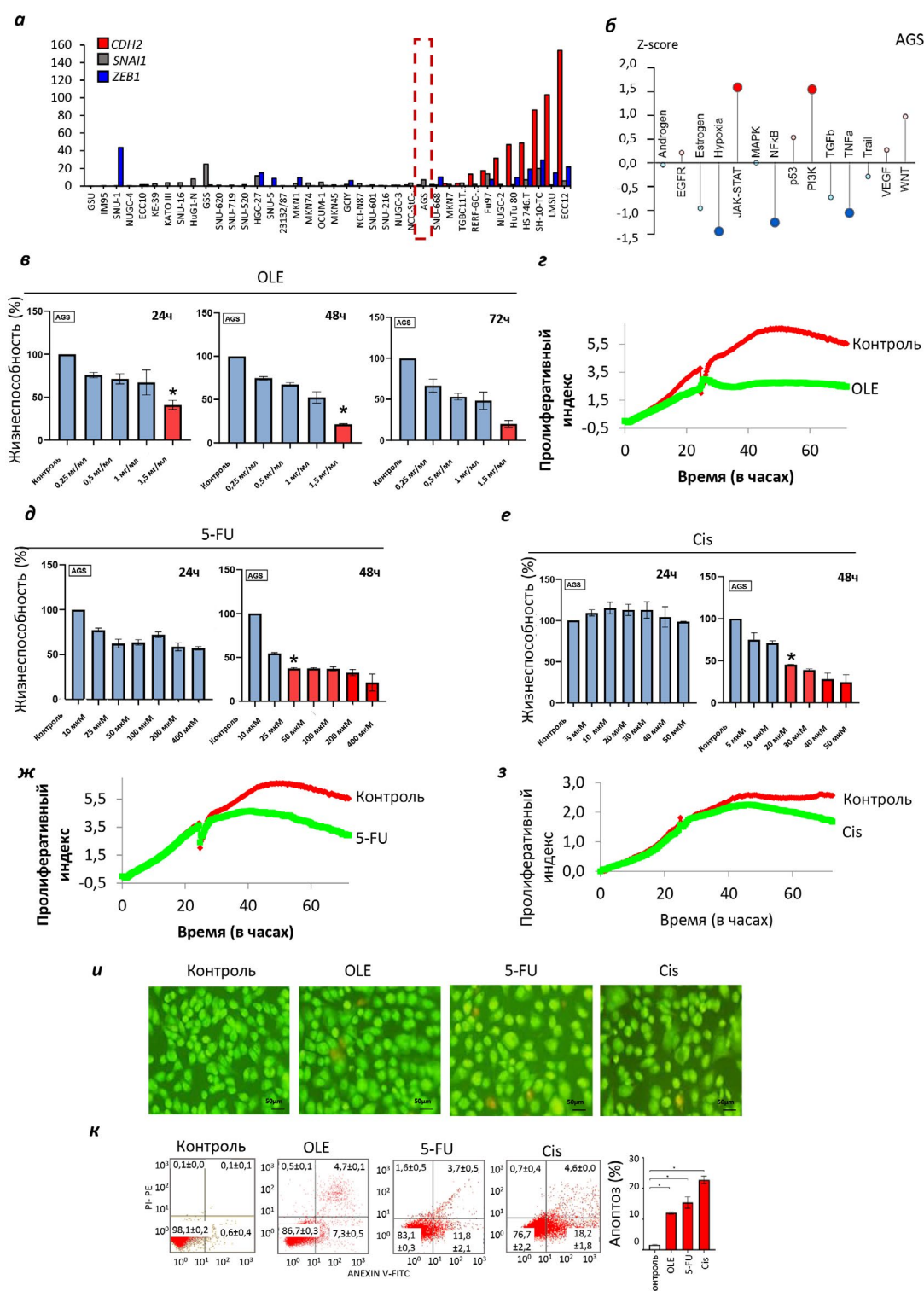


Рис. 2. Влияние OLE, 5-FU и Cis на жизнеспособность клеток AGS. *а* – Экспрессия генов *CDH2*, *SNAIL1* и *ZEB1* в различных клетках рака желудка (база данных HPA); *б* – сигнальные пути в опухолевых клетках AGS (база данных HPA); *в* – жизнеспособность клеток AGS при различных концентрациях OLE (инкубация 24, 48 и 72 ч); *г* – влияние половинной ингибирующей концентрации (IC_{50}) OLE на пролиферацию клеток AGS; *д* и *ж* – влияние половинной ингибирующей концентрации (IC_{50}) 5-FU на пролиферацию клеток AGS; *е* и *з* – влияние половинной ингибирующей концентрации (IC_{50}) Cis на пролиферацию клеток AGS; *и* – исследование способности OLE, 5-FU и Cis индуцировать апоптоз клеток AGS методом флуоресцентной микроскопии (окраска красителем AO/PI, содержащим акридиновый оранжевый – АО и йодид пропидия – PI); *к* – исследование способности OLE, 5-FU и Cis индуцировать апоптоз клеток AGS методом проточной цитометрии. Проводилась окраска опухолевых клеток красителями Annexin V и йодидом пропидия (PI). OLE – экстракт листьев *Olea europaea*; 5-FU – 5-фторурацил; Cis – цисплатин. Уровень статистической значимости (p) рассчитывался методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и с помощью апостериорного теста Тьюки; * $p < 0,05$; $n = 3$

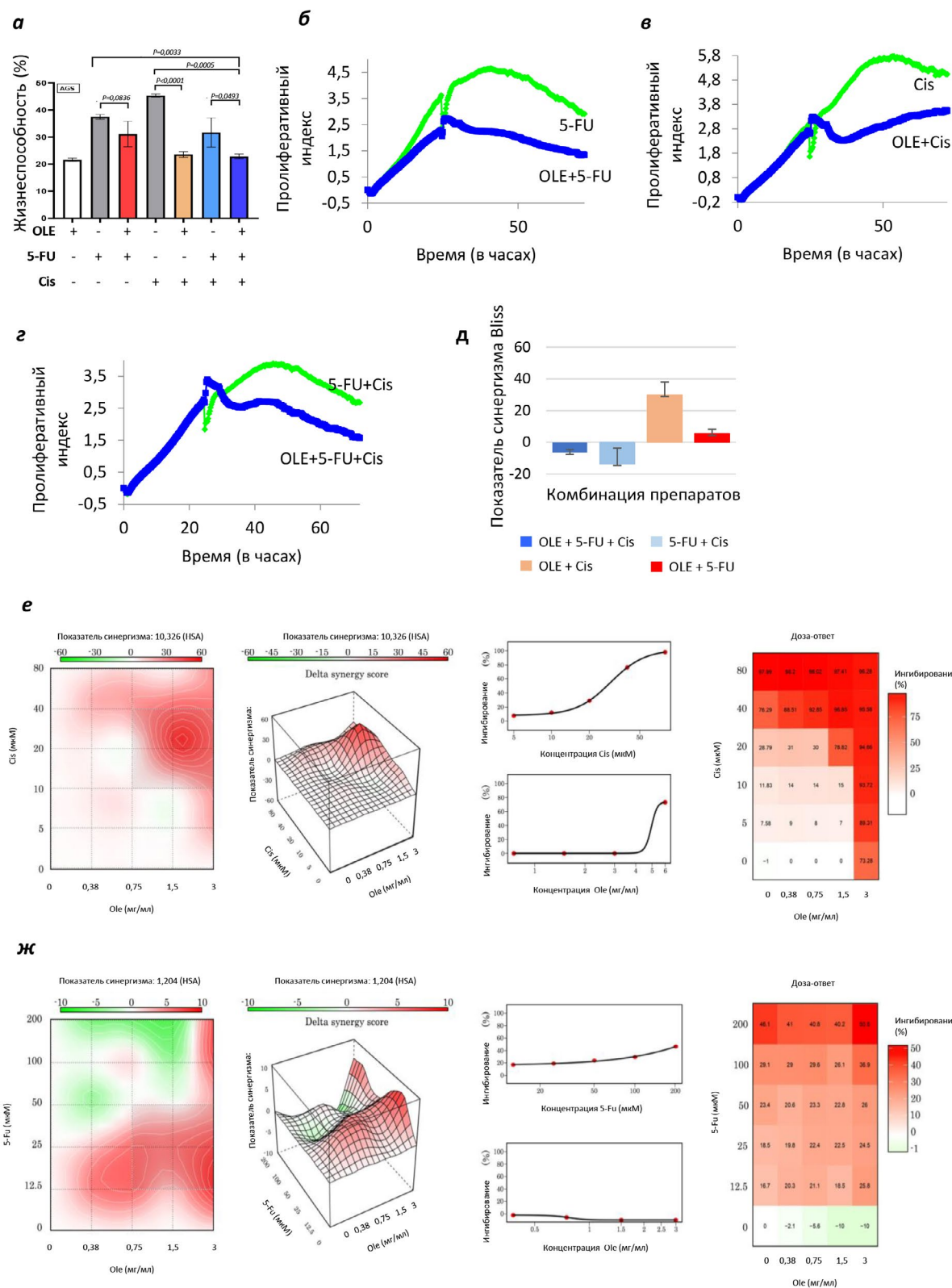


Рис. 3. Влияние комбинаций OLE (1,5 мг/мл) с 5-FU (25 мкМ) и Cis (20 мкМ) на жизнеспособность клеток AGS. **а** – Жизнеспособность клеток AGS при их культивировании с OLE в отдельности и в условиях комбинаций OLE с химиопрепаратами (OLE + 5-FU, OLE + Cis); $n = 3$. **б–г** – Исследование пролиферации клеток AGS при их культивировании с OLE, 5-FU, Cis и их комбинациями; **д** – исследование взаимодействия OLE с химиопрепаратами (5-FU, Cis) с использованием шкалы синергии Bliss; **е** – синергический эффект взаимодействия OLE и Cis в отношении клеток AGS (данные программного обеспечения Synergy Finder); **ж** – аддитивный эффект взаимодействия OLE и 5-FU (данные программного обеспечения Synergy Finder). OLE – экстракт листьев *Olea europaea*; 5-фторурацил – 5-FU; цисплатин – Cis. Уровень статистической значимости (p) рассчитывался методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и с помощью апостериорного теста Тьюки; * $p < 0,05$

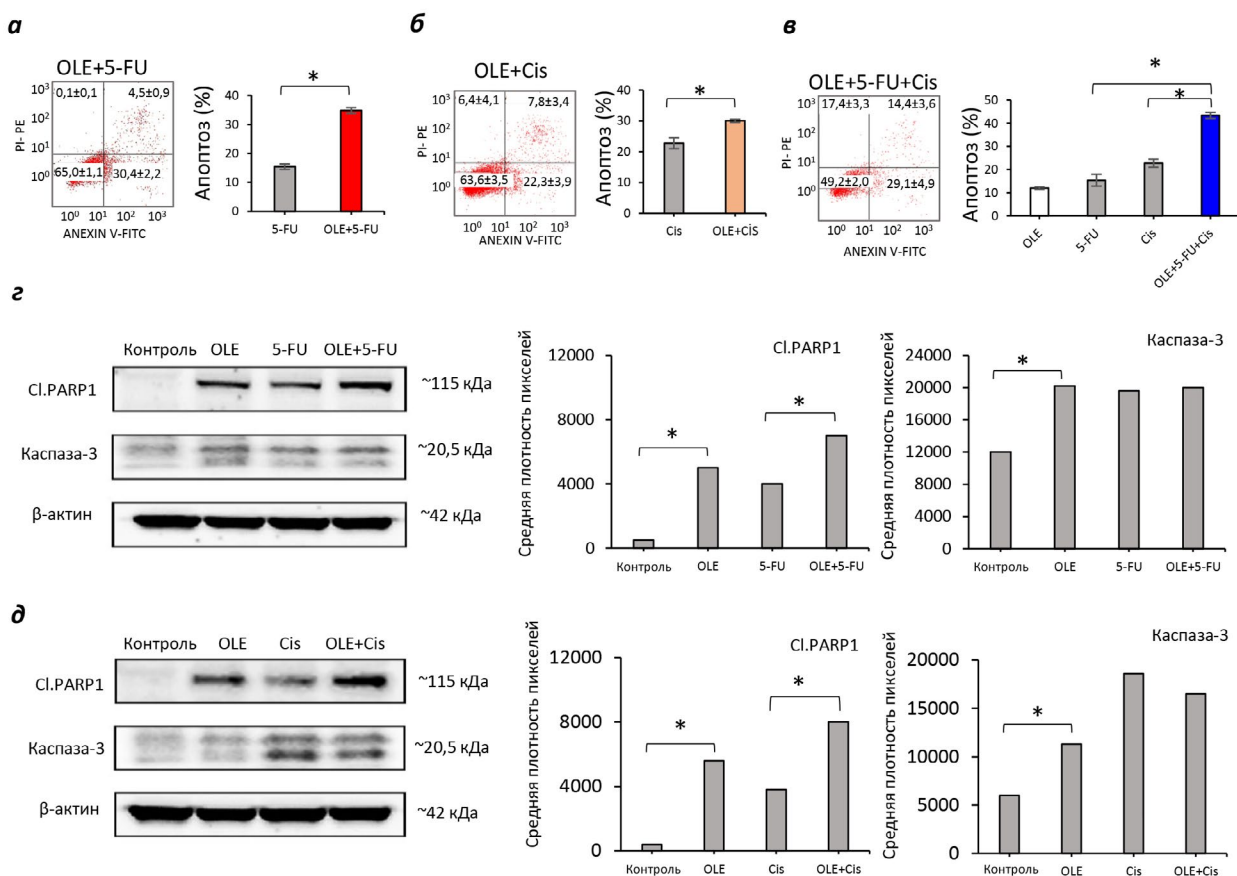


Рис. 4. Исследование способности OLE (1,5 мг/мл), 5-FU (25 мкМ), Cis (20 мкМ) и их комбинаций индуцировать гибель клеток AGS по механизму апоптоза. *а-в* – Исследование способности комбинаций препаратов OLE + 5-FU, OLE + Cis, OLE + 5-FU + Cis индуцировать апоптоз клеток AGS методом проточной цитометрии. Проводилась окраска опухолевых клеток красителями Annexin V и йодидом пропидия (PI); *г* и *д* – исследование способности препаратов OLE, 5-FU, Cis и комбинаций OLE + 5-FU, OLE + Cis индуцировать апоптоз клеток AGS методом вестерн-блоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы PARP1 и каспазы-3. β-Актин отражает уровень белка в образцах. На графиках – экспрессия расщепленных форм белков PARP1 и каспазы-3, выраженная в пикселях. OLE – экстракта листьев *Olea europaea*; 5-фторурацил – 5-FU; цисплатин – Cis. Уровень статистической значимости (*p*) рассчитывался методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и с помощью апостериорного теста Тьюки; * *p* < 0,05; *n* = 3

наблюдался аддитивный эффект взаимодействия (SC = 5,43). Аналогичный аддитивный эффект наблюдался при использовании комбинации OLE + 5-FU + Cis (SC = 6,58). В то же время при использовании комбинации OLE + Cis наблюдался синергический эффект взаимодействия (SC = 29,83; рис. 3, *д*). Синергический эффект взаимодействия OLE и Cis в отношении клеток AGS был выявлен с использованием R-пакета программного обеспечения Synergy Finder (SC = 10,33; рис. 3, *е*). В то же время между OLE и 5-FU был выявлен аддитивный эффект взаимодействия (SC = 1,20; рис. 3, *ж*).

Таким образом, при использовании комбинации OLE + 5-FU цитотоксический эффект складывался из индивидуальных эффектов каждого препарата (аддитивный эффект взаимодействия). В то же время при использовании комбинации OLE + Cis цитотоксический эффект был сильнее, чем индивидуальные эффекты каждого из препаратов (синергический эффект взаимодействия).

После изучения эффектов взаимодействия OLE, 5-FU и Cis исследовалась их способность индуцировать гибель клеток AGS по механизму апоптоза. При использовании комбинации OLE + 5-FU отмечался более выраженный апоптоз клеток AGS по сравнению с отдельным применением 5-FU (*t* = 9,64; *p* = 0,010; рис. 4, *а*). При комбинированном применении OLE и Cis количество апоптотических клеток AGS значительно увеличивалось по сравнению с отдельным применением Cis (*t* = 5,62; *p* = 0,030; рис. 4, *б*). При использовании комбинации OLE с двумя химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) выраженность апоптоза клеток AGS была более значительной по сравнению с отдельным применением 5-FU (*t* = 13,91; *p* = 0,005), Cis (*t* = 13,41; *p* = 0,005) или комбинации 5-FU + Cis (*t* = 20,3; *p* = 0,002; рис. 4, *в*). Таким образом, при комбинированном использовании OLE и химиопрепаратов (5-FU, Cis) значительно усиливается гибель опухолевых клеток AGS по механизму апоптоза,

что может способствовать уменьшению длительности курса химиотерапии у больных РЖ.

Способность OLE усиливать цитотоксическую активность химиопрепаратов (5-FU, Cis) была подтверждена методом вестерн-блоттинга. При использовании комбинации OLE + 5-FU ($p < 0,001$) или OLE + Cis ($p < 0,0023$) в клетках AGS возрастала экспрессия маркера апоптоза (расщепленная форма PARP) по сравнению с отдельным применением 5-FU или Cis (рис. 4, г и д). Проапоптотическая активность OLE при его отдельном применении была ниже по сравнению с его использованием в комбинации с химиопрепаратами.

OLE способен регулировать процесс ЭМП в клетках РЖ. Влияние OLE на процесс ЭМП в клетках AGS исследовали с использованием метода вестерн-блоттинга и PCR. Было обнаружено, что OLE ($p = 0,0060$) и 5-FU ($p = 0,0167$) значительно снижают экспрессию гена *CDH2* в клетках AGS (рис. 5, а). Кроме того, под влиянием OLE в клетках AGS снижалась экспрессия N-кадгерин ($p = 0,0001$; рис. 5, б и в). При использовании комбинации OLE + 5-FU в клетках AGS экспрессия гена *CDH2* ($p = 0,0165$) и кодируемого им белка N-кадгерин ($p = 0,008$) снижалась более значительно по сравнению с отдельным применением 5-FU (рис. 5, а и б). Под влиянием OLE в клетках AGS снижалась экспрессия виментина ($p = 0,0165$) и клаудина-1 ($p = 0,025$; рис. 5, б). При использовании комбинации OLE + 5-FU в клетках AGS экспрессия виментина и клаудина-1 снижалась более значительно по сравнению с отдельным применением OLE или 5-FU (рис. 5, б). При комбинированном применении OLE и 5-FU экспрессия E-кадгерина не изменялась по сравнению с контролем (рис. 5, б). Таким образом, OLE ингибирует ЭМП в клетках AGS, что, вероятно, и обуславливает повышение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Было показано, что под влиянием Cis экспрессия гена *CDH2* в клетках AGS не изменялась по сравнению с контролем. При использовании комбинации OLE + Cis в клетках AGS экспрессия гена *CDH2* снижалась незначительно. В то же время при комбинированном применении OLE и Cis в клетках AGS экспрессия N-кадгерина снижалась более значительно по сравнению с отдельным применением OLE или Cis ($p = 0,0061$; рис. 5, в). Наконец, при использовании комбинации OLE с двумя химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) в клетках AGS резко снижалась экспрессия гена *CDH2* по сравнению с комбинацией только химиопрепаратов 5-FU + Cis ($p = 0,0193$; рис. 5, а).

Таким образом, ингибирующий эффект комбинации OLE + 5-FU на экспрессию гена *CDH2* в клетках AGS обусловлен их аддитивным взаимодействием. В соответствии с этими результатами было обнаружено, что OLE усиливает

экспрессию miR-23b-3p в клетках AGS ($p < 0,001$; рис. 5, г). Ранее было продемонстрировано, что miR-23b-3p взаимодействует с геном *CDH2* через lncRNA *MALAT1* (рис. 1, о и с). Химиопрепараты 5-FU и Cis при отдельном использовании и в комбинации (5-FU + Cis) не оказывали влияния на экспрессию miR-23b-3p. В то же время при комбинированном применении OLE и химиопрепаратов (OLE + 5-FU, OLE + Cis и OLE + 5-FU + Cis) экспрессия miR-23b-3p значительно повышалась по сравнению с отдельным применением 5-FU ($p = 0,0293$), Cis ($p < 0,001$) и комбинации 5-FU + Cis ($p = 0,0002$; рис. 5, г).

Таким образом, в клетках AGS при использовании комбинации OLE + 5-FU резко повышается экспрессия miR-23b-3p. Данная микроРНК, взаимодействуя с геном *CDH2*, снижает его экспрессию, что проявляется уменьшением синтеза N-кадгерина в опухолевых клетках.

Далее, было обнаружено, что под влиянием OLE в клетках AGS снижалась экспрессия гена транскрипционного фактора *ZEB1*, участвующего в процессе ЭМП ($p = 0,022$; рис. 5, д). При отдельном использовании 5-FU экспрессия гена *ZEB1* не изменялась по сравнению с контролем. Тем не менее при использовании комбинации OLE + 5-FU экспрессия гена *ZEB1* в клетках AGS также не изменялась. В противоположность, при отдельном использовании Cis экспрессия гена *ZEB1* в клетках AGS увеличивалась по сравнению с контролем ($p = 0,0039$). Использование комбинации OLE + Cis обуславливало снижение экспрессии гена *ZEB1* в клетках AGS ($p = 0,0189$). При комбинированном использовании химиопрепаратов (5-FU + Cis) также отмечалось снижение экспрессии гена *ZEB1* в клетках AGS ($p = 0,0033$; рис. 5, д). В соответствии с этими результатами было обнаружено, что OLE усиливает экспрессию miR-200c в клетках AGS (рис. 5, е). Ранее было продемонстрировано, что miR-200c имеет сайт связывания с геном *ZEB1* (рис. 1, с). При использовании комбинации OLE + 5-FU не отмечалось увеличения экспрессии miR-200c по сравнению с отдельным использованием 5-FU. В то же время при комбинированном применении OLE + Cis экспрессия miR-200c значительно повышалась по сравнению с отдельным использованием Cis ($p = 0,0132$). А при использовании комбинации OLE с двумя химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) также отмечалось усиление экспрессии miR-200c по сравнению с комбинированным применением только химиопрепаратов (5-FU + Cis) ($p < 0,001$; рис. 5, е). Таким образом, в клетках AGS под влиянием Cis увеличивается экспрессия гена *ZEB1*, участвующего в процессе ЭМП. При комбинированном применении OLE + Cis в клетках повышается экспрессия miR-200c, которая имеет сайт связывания с геном *ZEB1*.

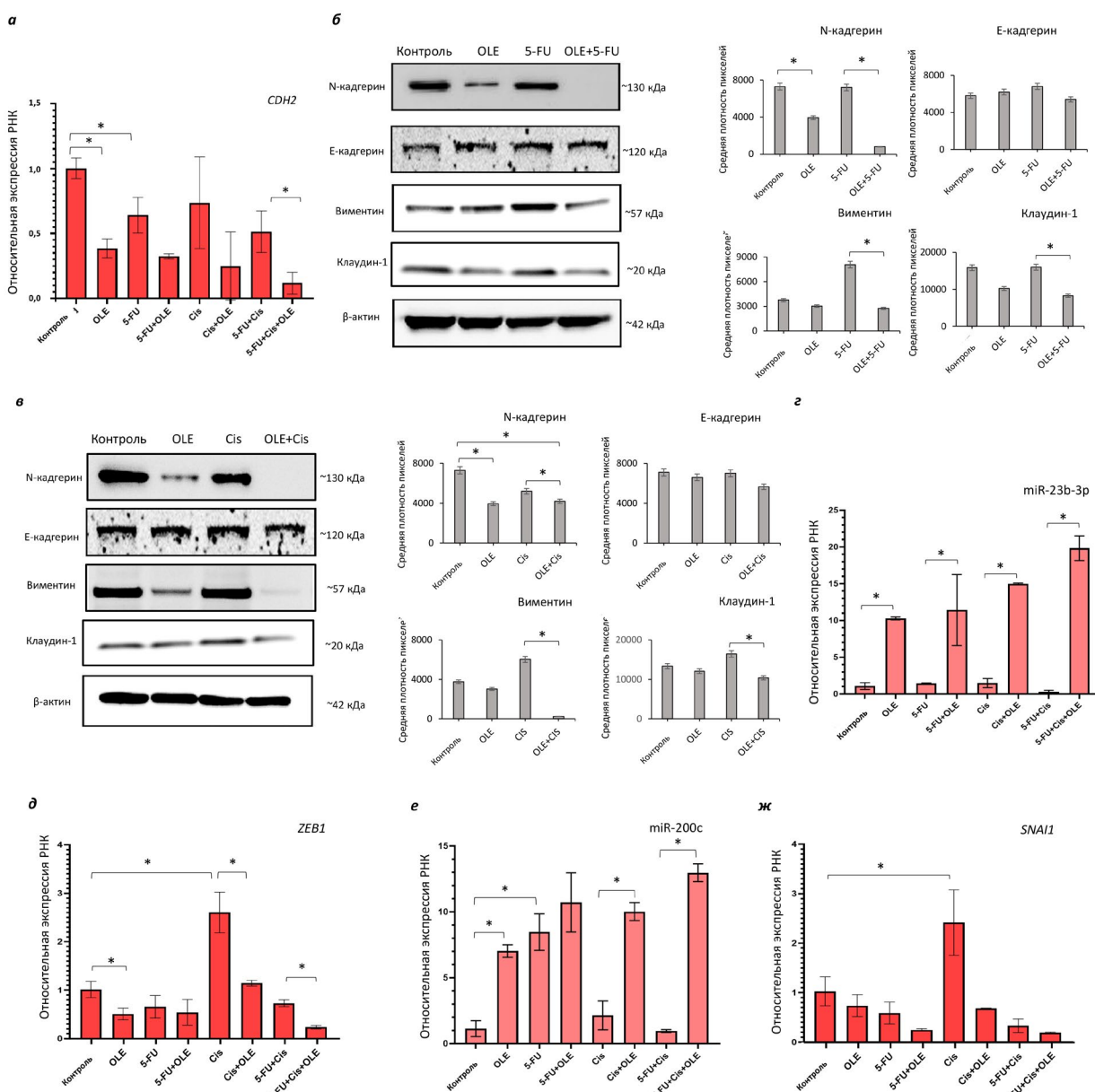


Рис. 5. Исследование способности OLE (1,5 мг/мл), 5-FU (25 мкМ), Cis (20 мкМ) и их комбинаций ингибировать процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в клетках AGS. *а* – Анализ экспрессии гена *CDH2* в клетках AGS под влиянием OLE, 5-FU, Cis и их комбинаций. *б* и *в* – Изучение способности OLE, 5-FU, Cis и их комбинаций ингибировать процесс ЭМП в клетках AGS методом вестерн-блоттинга. Представлен анализ экспрессии N-кадгерина, E-кадгерина, виментина и клаудина-1, участвующих в процессе ЭМП. β-Актин отражает уровень белка в образцах. На графиках – экспрессия изучаемых белков ЭМП, выраженная в пикселях. *г* – Анализ экспрессии *miR-23b-3p* в клетках AGS, культивированных в течение 72 ч в присутствии OLE, 5-FU, Cis и их комбинаций; *д* – анализ экспрессии гена *ZEB1* в клетках AGS, культивированных в течение 72 ч в присутствии OLE, 5-FU, Cis и их комбинаций; *е* – анализ экспрессии *miR-200c* в клетках AGS, культивированных в течение 72 ч в присутствии OLE, 5-FU, Cis и их комбинаций; *ж* – анализ экспрессии гена *SNAI1* в клетках AGS, культивированных в течение 72 ч в присутствии OLE, 5-FU, Cis и их комбинаций. OLE – экстракт листьев *Olea europaea*; 5-фторурацил – 5-FU; цисплатин – Cis. Уровень статистической значимости (p) рассчитывался с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$; $n = 3$

В результате при использовании комбинации OLE + Cis экспрессия гена *ZEB1* в клетках AGS резко снижается, т.к. *miR-200c*, связываясь с сайтом гена *ZEB1*, подавляет его экспрессию (посттранскрипционная регуляция экспрессии гена).

Экспрессия гена транскрипционного фактора *SNAI1* в клетках AGS не изменялась при отдель-

ном использовании OLE и 5-FU, а также их комбинации (рис. 5, ж). Напротив, экспрессия гена *SNAI1* в клетках AGS резко повышалась при отдельном применении Cis ($p = 0,0435$; рис. 5, ж). При использовании комбинации OLE + Cis экспрессия гена *SNAI1* снижалась по сравнению с отдельным применением Cis ($p = 0,0659$). При комбинированном

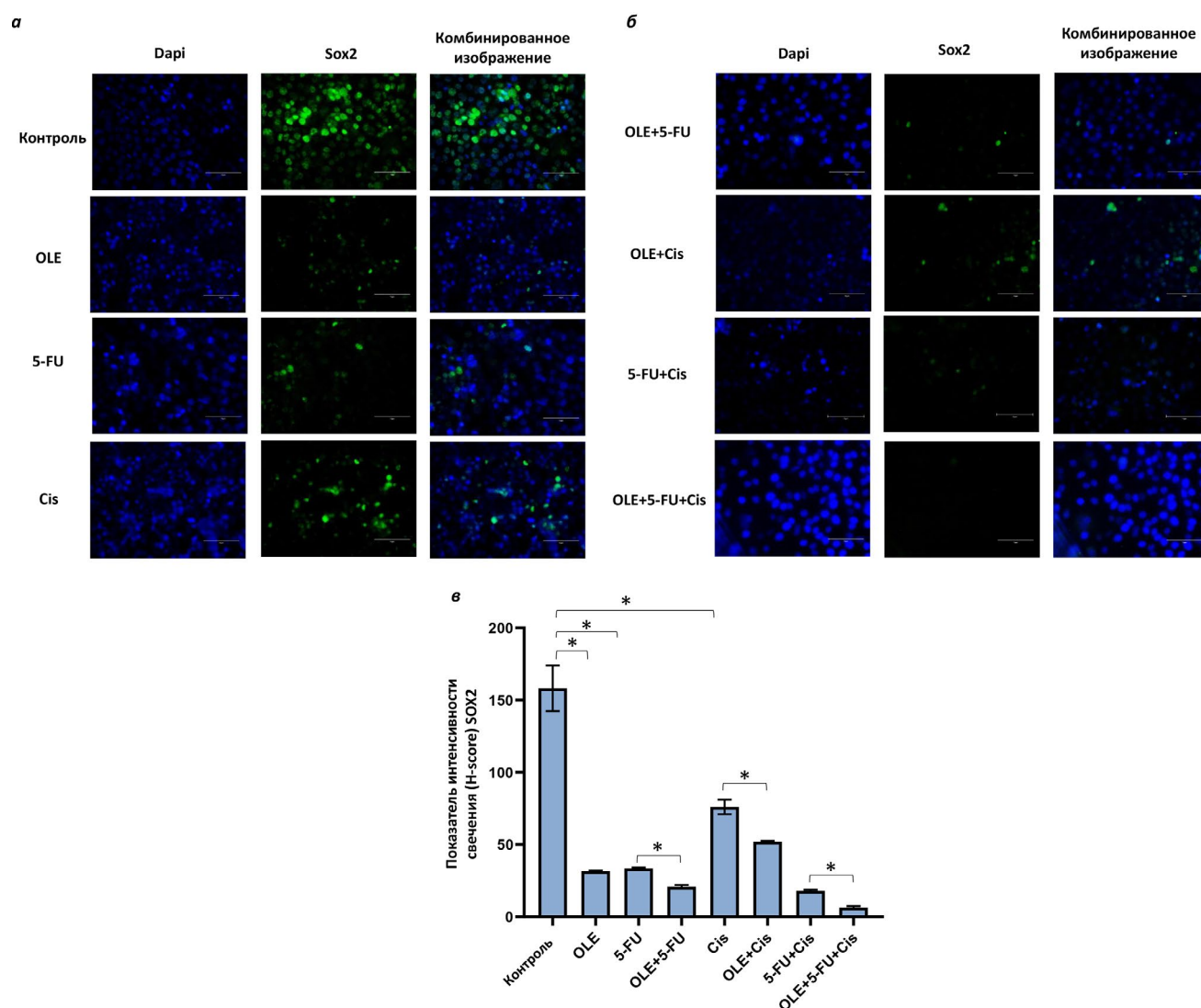


Рис. 6. Изучение влияние OLE (1,5 мг/мл), 5-FU (25 мкМ), Cis (20 мкМ) и их комбинаций на экспрессию белка SOX2 в клетках AGS методом иммунофлуоресцентной микроскопии. а и б – Клетки AGS инкубировали с OLE в течение 24 ч, с химиопрепаратами – 48 ч, с комбинацией OLE + химиопрепараты – 24 ч. Экспрессия белка SOX2 – зеленое свечение (определялось при длине волны 488 нм). Ядро клетки визуализировано с помощью красителя DAPI (синее окрашивание). в – Интенсивность свечения SOX2 в клетках AGS. Показатель интенсивности свечения (H-score) для каждого образца рассчитывали по формуле: количество окрашенных клеток (в %) × интенсивность окрашивания клеток. OLE – экстракт листьев *Olea europaea*; 5-фторурацил – 5-FU; цисплатин – Cis. Уровень статистической значимости (p) рассчитывался с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$; $n = 3$

применении OLE с двумя химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) экспрессия гена *SNAIL* лишь незначительно снижалась по сравнению с комбинированным применением только химиопрепаратов (5-FU + Cis; $p = 0,2759$; рис. 5, ж).

OLE за счет ингибирования процесса ЭМП изменяет фенотип клеток AGS. Было продемонстрировано, что в клетках AGS активизированы сигнальные пути, опосредованные киназами PI3K и JAK/STAT (рис. 2, б), которые играют важную роль в развитии ЭМП. Киназы PI3K и JAK/STAT способствуют повышению экспрессии в клетках транскрипционного фактора SOX2, играющего важную роль в формировании фенотипа стволовых

клеток [36–38]. В связи с этим было изучено влияние OLE, химиопрепаратов и их комбинаций на экспрессию белка SOX2 в клетках AGS методом иммунофлуоресцентной микроскопии. При отдельном использовании OLE, 5-FU и Cis в клетках AGS отмечалось снижение экспрессии SOX2. Наибольший эффект оказывал OLE (рис. 6, а). При комбинированном применении OLE и 5-FU экспрессия SOX2 снижалась более значительно по сравнению с отдельным применением 5-FU. Аналогично, при комбинированном применении OLE и Cis экспрессия SOX2 снижалась более значительно по сравнению с отдельным применением Cis (рис. 6, б). При использовании комбинации OLE с двумя

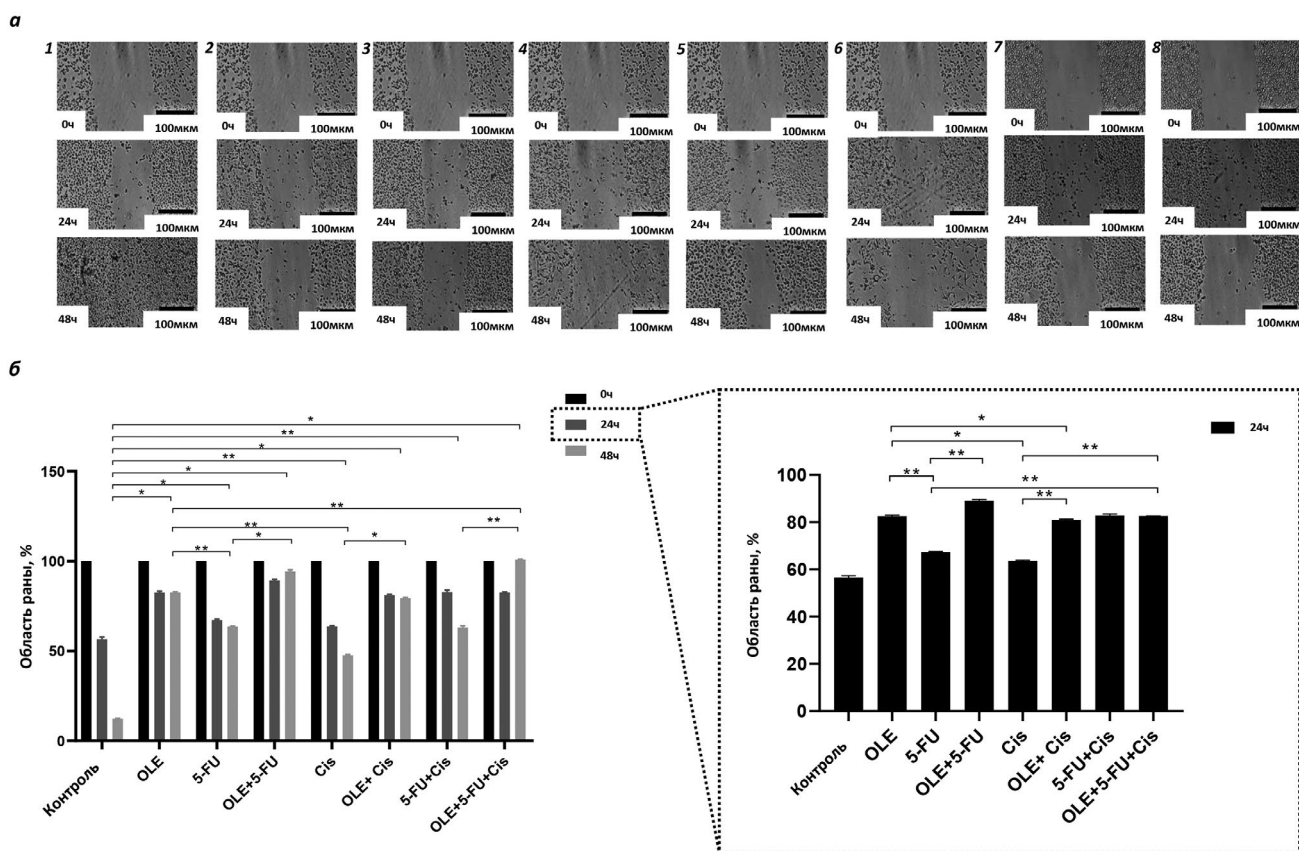


Рис. 7. Изучение влияние OLE (1,5 мг/мл), 5-FU (25 мкМ), Cis (20 мкМ) на скорость миграции клеток AGS. *а* – Световая микроскопия поврежденного участка монослоя клеток AGS через различные промежутки времени (при повреждении – 0 ч, через 24 ч, через 48 ч). 1 – Контроль; 2 – OLE; 3 – 5-FU; 4 – OLE + 5-FU; 5 – Cis; 6 – OLE + Cis; 7 – 5-FU + Cis; 8 – OLE + 5-FU + Cis. *б* – Изменение «области раны» (поврежденного участка монослоя клеток AGS) под влиянием OLE, химиопрепаратов и их комбинаций. Справа на графике – изменение «области раны» под влиянием OLE, химиопрепаратов и их комбинаций в первые 24 ч. Уровень статистической значимости (*p*) рассчитывался методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA); * $p < 0,05$; $n = 3$

химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) отмечалось наиболее выраженное снижение экспрессии SOX2 в клетках AGS (рис. 6, б). Полученные результаты коррелируют с показателем интенсивности свечения (H-score) SOX2 в клетках AGS (рис. 6, в).

OLE подавляет миграцию клеток AGS за счет ингибирования процесса их ЭМП. Влияние OLE на миграцию клеток AGS исследовали с помощью Scratch-метода (Анализ заживления «раны» в области монослоя опухолевых клеток). В контрольном образце поврежденный участок («рана») в области монослоя клеток AGS полностью закрылась через 48 ч ($p < 0,0001$). В то же время закрытие поврежденного участка при отдельном использовании OLE, 5-FU и Cis через 48 ч не наступало (рис. 7). Под влиянием OLE закрытие поврежденного участка существенно снижалось в первые 24 ч ($p < 0,0001$). Ингибирующий эффект 5-FU ($p < 0,05$) и Cis ($p < 0,0001$) на закрытие поврежденного участка отмечался только через 48 ч. При этом ингибирующий эффект Cis был менее выражен по сравнению с OLE и 5-FU ($p < 0,0001$). При использовании комбинаций OLE с химиопрепаратами (OLE + 5-FU

и OLE + Cis) ингибирующий эффект был более выраженным по сравнению с отдельным применением 5-FU ($p < 0,0001$) и Cis ($p < 0,0001$): закрытие поврежденного участка замедлялось в первые 24 ч и не завершалось через 48 ч.

При использовании комбинации OLE с двумя химиопрепаратами (OLE + 5-FU + Cis) ингибирующий эффект был более выраженным по сравнению с комбинированным применением только химиопрепаратов (5-FU + Cis; $p < 0,0001$; рис. 7). Таким образом, OLE за счет ингибирования процесса ЭМП в клетках AGS снижал их способность к миграции. Кроме того, OLE усиливал ингибирующий эффект на миграцию клеток химиопрепаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эпителиально-мезенхимальный переход является хорошо известным фактором, способствующим прогрессированию роста злокачественной опухоли [39]. Опухолевые клетки за счет ЭМП приобретают подвижность, что усиливает инвазивный

рост опухоли в соседние ткани и облегчает развитие метастазов. Кроме того, за счет ЭМП опухолевые клетки приобретают резистентность к химиопрепаратам, что повышает риск развития рецидива опухоли после проведенного лечения [36]. Таким образом, ингибирование процесса ЭМП может стать новым перспективным подходом в терапии злокачественных новообразований.

В процессе ЭМП у опухолевых клеток нарушается экспрессия молекул адгезии, в частности кальций-зависимых белков-кадгеринов. В частности, при ЭМП экспрессия кадгерина-2 (N-кадгерин), кодируемого геном *CDH2*, увеличивается. Напротив, экспрессия кадгерина-1 (Е-кадгерин), кодируемого геном *CDH1*, снижается. Такое нарушение экспрессии белков-кадгеринов, обозначаемое термином «cadherin switch», является одним из ключевых признаков ЭМП [40, 41].

В настоящей работе, соответствуя вышеприведенным данным, показано, что у большинства пациентов с раком желудка отмечается снижение экспрессии гена *CDH1* и повышение экспрессии гена *CDH2* (анализ результатов проектов TCGA и GTEX). Кроме того, у пациентов с РЖ, имеющих повышенную экспрессию гена *CDH2*, отмечалось снижение показателя общей выживаемости (рис. 1, г–е). Нами было обнаружено, что повышенная экспрессия lncRNA *MALAT1* коррелирует со снижением общей выживаемости пациентов с РЖ (рис. 1, к–м). Известно, что lncRNA *MALAT1* эпигенетически подавляет экспрессию белка Е-кадгерин, способствуя развитию ЭМП в опухолевых клетках [42]. Кроме того, показано, что lncRNA *MALAT1* имеет сайт связывания с геном *CDH2* и ее повышенная экспрессия указывает на прогрессирование РЖ [43]. Продemonстрировано, что miR-23b-3p способна снижать экспрессию lncRNA *MALAT1* [44]. Напротив, при низкой экспрессии miR-23b-3p повышается инвазивный рост опухолевых клеток и их способность к миграции, что является признаком развития ЭМП [45]. В то же время при повышении экспрессии miR-23b-3p происходит увеличение экспрессии и кадгерина-2 и снижение экспрессии транскрипционного фактора SNAIL. Известно, что транскрипционный фактор SNAIL участвует в развитии ЭМП, подавляя экспрессию кадгерина-1 и стимулируя экспрессию lncRNA *MALAT1*. В результате под влиянием транскрипционного фактора SNAIL снижаются адгезивные свойства опухолевых клеток и повышается их подвижность [45–47]. Следует отметить, что за счет повышенной экспрессии miR-23b-3p подавляются опосредованные lncRNA *MALAT1* химиорезистентные свойства опухолевых клеток РЖ [44]. Мы не смогли обнаружить прямое взаимодействие между miR-23b-3p и транскрипционным фактором SNAIL. Тем не менее при изучении базы данных SNP

в lncRNA были обнаружены возможности прямого взаимодействия между микроРНК miR-23b-3p и lncRNA *MALAT1*. Показано, что у пациентов с РЖ в опухолевой ткани отмечается низкий уровень экспрессии miR-23b-3p по сравнению с прилегающими нормальными тканями [44]. Обнаруженные нами нарушения экспрессии генов *CDH1* и *CDH2* у пациентов с РЖ соответствуют ранее опубликованным результатам проекта TCGA, приведенным в международной базе данных. Поэтому результаты настоящего исследования могут быть использованы для клинических рекомендаций больным РЖ. Согласно полученным нами результатам, в клетках РЖ при снижении экспрессии miR-23b-3p нарастает экспрессия lncRNA *MALAT1*. В результате повышается экспрессия гена *CDH2*, что способствует развитию ЭМП в опухолевых клетках и прогрессированию заболевания.

Развитие ЭМП в опухолевых клетках, помимо описанного выше нарушения экспрессии белков-кадгеринов («cadherin switch»), характеризуется активацией транскрипционных факторов ZEB1, SNAIL и TWIST [4]. Согласно результатам проектов TCGA и GTEX, при РЖ в развитии ЭМП наиболее важную роль играет повышенная экспрессия транскрипционных факторов ZEB1 и SNAIL, чем экспрессия TWIST. Изменение экспрессии транскрипционного фактора ZEB1 рассматривается в качестве маркера прогрессирования солидных опухолей, в том числе РЖ [48, 49].

Показано, что экспрессия ZEB1 контролируется miR-200c [50]. При изучении базы данных SNP в lncRNA было обнаружено взаимодействие между транскрипционным фактором ZEB1 и miR-200c. Экспрессия miR-200c была снижена в образцах РЖ, полученных от пациентов, участвующих в настоящем исследовании, по сравнению с их нормальными тканями. Вероятно, вследствие снижения экспрессии miR-200c при РЖ отмечалась высокая экспрессия транскрипционного фактора ZEB1 в опухолевых клетках. Продemonстрировано, что транскрипционный фактор SNAIL способен взаимодействовать с членами семейства miR-200, например, с miR-203 [51]. Хотя мы и не обнаружили прямого взаимодействия между транскрипционным фактором SNAIL и miR-200c, продemonстрировано его участие в передаче сигнала между ZEB1 и miR-200c [51]. Таким образом, согласно полученным результатам, признаками развития ЭМП в клетках РЖ являются: повышенная экспрессия генов *CDH2*, ZEB1 и SNAIL, повышенная экспрессия lncRNA *MALAT1*, сниженная экспрессия miR-23b-3p и miR-200c. Указанные признаки свидетельствуют о неблагоприятном течении заболевания и высоком риске развития метастазов.

Поскольку ЭМП способствует прогрессированию опухолевого роста и развитию химио-

резистентности, ингибирование этого процесса может стать новым перспективным подходом в терапии злокачественных новообразований. В частности, в предыдущем исследовании мы продемонстрировали ингибирование процесса ЭМП в клетках глиобластомы за счет использования OLE [15]. Кроме того, OLE ингибировал экспрессию lncRNA *MALAT1* в клетках РЖ [18]. Поэтому в настоящей работе мы исследовали влияние OLE на экспрессию генов *CDH1*, *CDH2*, *ZEB1*, *SNAI1*, экспрессию lncRNA *MALAT1*, а также экспрессию miR-23b-3p и miR-200c, т.е. факторов, играющих важную роль в развитии ЭМП в опухолевых клетках. Исследования проводились на клетках РЖ линии AGS (аденокарцинома), в которых отмечаются низкая экспрессия гена *CDH2* и высокая экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы, *ZEB1* и *SNAI1*. Кроме того, мы исследовали способность OLE модулировать чувствительность клеток AGS к химиопрепаратам, применяемым в терапии РЖ: 5-FU и Cis.

Мы показали, что под влиянием OLE в клетках AGS снижалась экспрессия гена *CDH2* и кодируемого им белка N-кадгерин (рис. 5, а и б). Кроме того, под влиянием OLE в клетках AGS снижалась экспрессия белков виментин и клаудин-1. Под действием OLE в клетках AGS также снижалась экспрессия транскрипционного фактора *ZEB1*. Вероятно, экспрессия указанных белков ЭМП снижалась на посттранскрипционном уровне за счет воздействия miR-23b-3p и miR-200c на соответствующие гены. Под влиянием OLE экспрессия данных микроРНК в клетках AGS повышалась. Продemonстрировано, что miR-23b-3p подавляет экспрессию lncRNA *MALAT1* [18, 44]. Полученные нами результаты указывают, что OLE не оказывал влияния на экспрессию транскрипционного фактора *SNAI1* (вероятно, miR-23b-3p и miR-200c не имеют сайта связывания с данным транскрипционным фактором).

Мы также обнаружили, что под влиянием OLE в клетках AGS значительно снижается экспрессия белка SOX2, играющего важную роль в формировании фенотипа стволовых клеток (рис. 6). Экспрессия SOX2 в зависимости от молекулярных особенностей клеток по-разному влияет на развитие опухолевого процесса. Она может рассматриваться как в качестве маркера прогрессирования опухоли, так и в качестве благоприятного прогностического признака для больного [52]. Показано, что в клетках AGS отмечается повышенная экспрессия SOX2 [53]. Экспрессию SOX2 в клетках AGS индуцирует белок клаудин-6. Показано участие клаудина-6 в развитии ЭМП за счет его взаимодействия с транскрипционным фактором *SNAI1* [53, 54]. Кроме того, повышенная экспрессия SOX2 в клетках AGS может быть обусловлена акти-

вацией сигнальных путей, опосредованных киназами JAK-STAT и PI3K [36–38]. Мы показали, что под влиянием OLE уменьшалась способность клеток AGS к миграции (рис. 7). Ослабление способности опухолевых клеток к миграции возникает вследствие усиления их адгезивных свойств [55]. Вероятно, OLE изменяет фенотип клеток AGS, что проявляется ингибированием процесса их ЭМП и соответствующим снижением способности к миграции и усилением адгезивных свойств.

Развитие ЭМП также сопровождается приобретением опухолевыми клетками резистентности к химиопрепаратам и лучевой терапии [56]. В частности, в опухолевых клетках подавляется программа апоптоза, которая должна запускаться в ответ на грубое повреждение ДНК химиопрепаратами [57]. Продemonстрирована способность OLE индуцировать апоптоз клеток различных опухолей: меланома, глиобластома, гепатоцеллюлярная карцинома, рак молочной железы, рак толстой кишки и рак шейки матки [19, 54–63]. OLE индуцировал апоптоз опухолевых клеток за счет воздействия на различные внутриклеточные процессы: нарушение деления раковых стволовых клеток, повреждение митохондрий, ослабление репарации повреждений ДНК, нарушение секреции факторов роста, нарушение ангиогенеза и инвазивного роста и др. [18, 19, 26, 58, 60, 62–66]. Способность OLE индуцировать апоптоз клеток РЖ обусловлена ингибированием процесса их ЭМП. Данный механизм согласуется с результатами нашей предыдущей работы, где OLE индуцировал апоптоз клеток глиобластомы [15]. Вероятно, ингибирование ЭМП является универсальным механизмом, способствующим развитию программированной гибели различных типов опухолевых клеток. Кроме того, под влиянием OLE усиливалась проапоптотическая активность химиопрепаратов, используемых для терапии РЖ в настоящее время: 5-FU и Cis. Под влиянием комбинаций OLE с химиопрепаратами (OLE + 5-FU, OLE + Cis) в клетках AGS значительно повышалась экспрессия маркеров апоптоза (например, появление расщепленной формы PARP1 и увеличение количества Annexin V-позитивных клеток) (рис. 4). Кроме того, под влиянием OLE снижалась половинная ингибирующая доза (IC_{50}) указанных химиопрепаратов для клеток AGS (рис. 3). Для OLE и Cis был обнаружен синергический механизм взаимодействия (рис. 3, д и е), а для OLE и 5-FU – аддитивный механизм взаимодействия. Указанные механизмы, таким образом, подтверждают способность OLE повышать чувствительность клеток РЖ к химиопрепаратам [67].

Мы также показали, что проапоптотическая активность OLE может быть связана с его способностью ингибировать ЭМП в клетках РЖ. Было обнаружено, что OLE усиливал ингибирование

химиопрепаратами экспрессии гена *CDH2* и транскрипционного фактора ZEB1. Данный механизм обусловлен способностью OLE индуцировать в клетках AGS экспрессию miR-23b-3p и miR-200c. Продemonстрировано, что miR-23b-3p подавляет экспрессию lncRNA *MALAT1* [18], в то же время miR-200c участвует в снижении экспрессии транскрипционного фактора ZEB1. При комбинированном использовании OLE и химиопрепаратов в клетках AGS ослаблялся процесс ЭМП, что приводило к снижению способности опухолевых клеток к миграции и уменьшению экспрессии в них белка SOX2. В клетках AGS под влиянием OLE и его комбинаций с химиопрепаратами отмечалось снижение экспрессии клаудина-1. Продemonстрировано, что при нокауте гена, кодирующего клаудин-1, в клетках рака печени ослабляются процессы аутофагии, что повышает чувствительность опухолевых клеток к 5-FU [68]. Кроме того, показано, что при нокауте гена, кодирующего клаудин-1, повышается чувствительность клеток рака яичников к карбоплатину и паклитакселу как *in vitro*, так и *in vivo* [69]. Следовательно, способность OLE повышать чувствительность клеток AGS к химиопрепаратам может быть также обусловлена ингибированием экспрессии клаудина-1. Кроме того, недавнее исследование показало, что транскрипционный фактор SNAIL усиливает ЭМП за счет повышения экспрессии N-кадгерина в клетках остеосаркомы, что сопровождается усилением их инвазивного роста и способности к миграции [70]. Продemonстрировано, что под влиянием транскрипционного фактора SNAIL усиливалась способность к миграции клеток AGS. Наши результаты показывают, что OLE за счет способности индуцировать экспрессию miR-23b-3p может модулировать экспрессию транскрипционного фактора SNAIL. Данный механизм обусловлен способностью miR-23b-3p оказывать влияние на взаимодействие гена *CDH2* и lncRNA *MALAT1* [71]. Для полного понимания механизмов противоопухолевой активности OLE необходимы дальнейшие эксперименты с использованием различных клеточных линий РЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительный прогресс в лечении локализованного (неметастатического) рака желудка был достигнут за счет сочетанного применения хирургической операции и курсов пред- и послеоперационной химиотерапии. В то же время показатели безрецидивной выживаемости и общей выживаемости у пациентов с метастатическими и рецидивирующими формами РЖ продолжают

оставаться на низком уровне. Это обусловлено развитием резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам. Важную роль в прогрессировании злокачественной опухоли играет процесс ЭМП. В представленной работе было изучено влияние экстракта листьев *Olea europaea* на процесс ЭМП в клетках РЖ и их чувствительности к химиопрепаратам. Показана способность OLE ингибировать ЭМП, а также усиливать гибель клеток РЖ по механизму апоптоза *in vitro*. В частности, при комбинированном применении OLE с химиопрепаратами 5-FU и Cis отмечалась выраженная гибель опухолевых клеток РЖ по механизму апоптоза. Кроме того, при использовании комбинации OLE с химиопрепаратами значительно снижалась миграция и инвазивный рост опухолевых клеток РЖ. Таким образом, представленная работа свидетельствует о способности OLE индуцировать апоптоз клеток РЖ за счет подавления процесса их ЭМП и повышения чувствительности к химиопрепаратам (5-FU и Cis).

Вклад авторов. Ч. Текин, М. Эрджелик, Г. Тезкан, Б. Тунджа, С. Бойчук – концепция и руководство работой; Ч. Текин, М. Эрджелик, Г. Тезкан, С. Ак Аксой, П. Дунаев, А. Галембикова – проведение экспериментов; Ф. Будак, О. Исык, Н. Юграс, Ч. Текин, С. Бойчук, Б. Тунджа – обсуждение результатов исследования; Ч. Текин, М. Эрджелик, Г. Тезкан, С. Ак Аксой, Б. Тунджа, С. Бойчук – написание текста; Ч. Текин, Г. Тезкан, Б. Тунджа, С. Бойчук – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Научного фонда Университета Бурса Улудаг ТКО-2020-175, Российского научного фонда (грант № 20-15-00001), программы «Стратегическое академическое лидерство России» (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского федерального университета Минздрава России.

Благодарности. Авторы благодарят Дениз Гюлькая (факультет иммунологии Университета Бурса Улудаг) за помощь в выполнении проточной цитометрии. Отдельная благодарность ассистенту Гурлеру Акпинару и профессору Мурату Касапу (Университет Коджаэли, факультет медицинской биологии) за консультативную помощь при выполнении экспериментов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты, представленные в настоящей работе, были одобрены этическим комитетом Университета Бурса Улудаг (решение № 2019-6/32). От всех пациентов, участвовавших в исследовании, было получено информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Song, Z., Wu, Y., Yang, J., Yang, D., and Fang, X. (2017) Progress in the treatment of advanced gastric cancer, *Tumour Biol.*, **39**, 1010428317714626, doi: 10.1177/1010428317714626.
2. Power, D. G., Kelsen, D. P., and Shah, M. A. (2010) Advanced gastric cancer--slow but steady progress, *Cancer Treat. Rev.*, **36**, 384-392, doi: 10.1016/j.ctrv.2010.01.005.
3. Huang, L., Wu, R. L., Xu, A. M. (2015) Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer, *Am. J. Transl. Res.*, **7**, 2141-2158.
4. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, *Cell*, **133**, 704-715, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
5. Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M., and Alahari, S. K. (2016) Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications, *Mol. Cancer*, **15**, 18, doi: 10.1186/s12943-016-0502-x.
6. Du, B., and Shim, J. S. (2016) Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer, *Molecules*, **21**, 965, doi: 10.3390/molecules21070965.
7. Chen, B., Dragomir, M. P., Yang, C., Li, Q., Horst, D., and Calin, G. A. (2022) Targeting non-coding RNAs to overcome cancer therapy resistance, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **7**, 121, doi: 10.1038/s41392-022-00975-3.
8. Park, N. R., Cha, J. H., Sung, P. S., Jang, J. W., Choi, J. Y., Yoon, S. K., and Bae, S. H. (2022) MiR-23b-3p suppresses epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting c-MET, *Heliyon*, **8**, e11135, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11135.
9. Hur, K., Toiyama, Y., Takahashi, M., Balaguer, F., Nagasaka, T., Koike, J., Hemmi, H., Koi, M., Boland, C. R., and Goel, A. (2013) MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis, *Gut*, **62**, 1315-1326, doi: 10.1136/gutjnl-2011-301846.
10. Gollavilli, P. N., Parma, B., Siddiqui, A., Yang, H., Ramesh, V., Napoli, F., Schwab, A., Natesan, R., Mielenz, D., and Asangani, I. A. (2021) The role of miR-200b/c in balancing EMT and proliferation revealed by an activity reporter, *Oncogene*, **40**, 2309-2322, doi: 10.1038/s41388-021-01708-6.
11. Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2005) Plants as a source of anti-cancer agents, *J. Ethnopharmacol.*, **100**, 72-79, doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.
12. Li, J., Liu, H., Ramachandran, S., Waypa, G. B., Yin, J. J., Li, C. Q., Han, M., Huang, H. H., Sillard, W. W., Vanden Hoek, T. L., and Shao, Z. H. (2010) Grape seed proanthocyanidins ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Am. J. Chinese Med.*, **38**, 569-584, doi: 10.1142/S0192415X10008068.
13. Hamdi, H. K., and Castellon, R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 769-778, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.161.
14. Ryan, D., and Robards, K. (1998) Phenolic compounds in olives, *Analyst*, **123**, 31-44, doi: 10.1039/A708920A.
15. Mutlu, M., Tunca, B., Ak Aksoy, S., Tekin, C., Egeli, U., and Cecener, G. (2021) Inhibitory effects of *Olea europaea* leaf extract on mesenchymal transition mechanism in glioblastoma cells, *Nutr. Cancer*, **73**, 713-720, doi: 10.1080/01635581.2020.1765260.
16. Bartolí, R., Fernández-Bañares, F., Navarro, E., Castellà, E., Mañé, J., Alvarez, M., Pastor, C., Cabré, E., and Gassull, M. A. (2000) Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis, *Gut*, **46**, 191-199, doi: 10.1136/gut.46.2.191.
17. Al-Quraishy, S., Othman, M. S., Dkhil, M. A., and Abdel Moneim, A. E. (2017) Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities, *Biomed Pharmacother.*, **91**, 338-349, doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.069.
18. Tekin, C., Ercelik, M., Tezcan, G., Ak Aksoy, S., Egeli, U., Cecener, G., and Tunca, B. (2022) *Olea europaea* leaf extract suppress stemness – characteristics of gastric cancer via long non-coding RNAs, *Eur. J. Integrat. Med.*, **49**, 102099, doi: 10.1016/j.eujim.2022.102099.
19. Tezcan, G., Tunca, B., Bekar, A., Budak, F., Sahin, S., Cecener, G., Egeli, U., Taskapilioglu, M. O., Kocaeli, H., Tolunay, S., Malyer, H., Demir, C., and Tumen, G. (2014) *Olea europaea* leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression, *Am. J. Cancer Res.*, **4**, 572-590.
20. Baj, J., Korona-Głowniak, I., Forma, A., Maani, A., Sitarz, E., Rahnama-Hezavah, M., Radzikowska, E., and Portinca, P. (2020) Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition and tumor microenvironment in *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer, *Cells*, **9**, 1055, doi: 10.3390/cells9041055.
21. Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Bucci, E. O., Finzi, G., Sessa, F., Noonan, D. M., and Albini, A. (2015) Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes, *PLoS One*, **10**, e0115686, doi: 10.1371/journal.pone.0115686.
22. Kim, A. Y., Kwak, J. H., Je, N. K., Lee, Y. H., and Jung, Y. S. (2015) Epithelial-mesenchymal transition is associated with acquired resistance to 5-fluorouracil in HT-29 colon cancer cells, *Toxicol. Res.*, **31**, 151-156, doi: 10.5487/TR.2015.31.2.151.

23. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
24. Tunca, B., Tezcan, G., Cecener, G., Egeli, U., Ak, S., Malyer, H., Tumen, G., and Bilir, A. (2012) Olea europaea leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells, *J. Cancer Res Clin Oncol.*, **138**, 1831-1844, doi: 10.1007/s00432-012-1261-8.
25. Kamiloglu, S. (2019) Effect of different freezing methods on the bioaccessibility of strawberry polyphenols, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **54**, 2652-2660, doi: 10.1111/ijfs.14249.
26. Ercelik, M., Tekin, C., Tezcan, G., Ak Aksoy, S., Bekar, A., Kocaeli, H., Taskapilioglu, M. O., Eser, P., and Tunca, B. (2023) Olea europaea leaf phenolics oleuropein, Hydroxytyrosol, Tyrosol, and Rutin induce apoptosis and additionally affect temozolomide against glioblastoma: in particular, oleuropein inhibits spheroid growth by attenuating stem-like cell phenotype, *Life (Basel)*, **13**, 470, doi: 10.3390/life13020470.
27. Xu, Z. Y., Tang, J. N., Xie, H. X., Du, Y. A., Huang, L., et al. (2015) 5-Fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells, *Int. J. Biol. Sci.*, **11**, 284-294, doi: 10.7150/ijbs.10248.
28. Yang, H., Huang, S., Wei, Y., Cao, S., Pi, C., Feng, T., Liang, J., Zhao, L., and Ren, G. (2017) Curcumin enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil against gastric cancer through down-regulation of COX-2 and NF- κ B signaling pathways, *J. Cancer*, **8**, 3697-3706, doi: 10.7150/jca.20196.
29. Tao, K., Yin, Y., Shen, Q., Chen, Y., Li, R., Chang, W., Bai, J., Liu, W., Shi, L., and Zhang, P. (2016) Akt inhibitor MK-2206 enhances the effect of Cisplatin in gastric cancer cells, *Biomed. Rep.*, **4**, 365-368, doi: 10.3892/br.2016.594.
30. Lei, Y., Tang, L., Hu, J., Wang, S., Liu, Y., Yang, M., Zhang, J., and Tang, B. (2020) Inhibition of MGMT-mediated autophagy suppression decreases cisplatin chemosensitivity in gastric cancer, *Biomed. Pharmacother.*, **125**, 109896, doi: 10.1016/j.biopha.2020.109896.
31. Ianevski, A., Giri, A. K., and Aittokallio, T. (2020) SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 488-493, doi: 10.1093/nar/gkaa216.
32. Ciapetti, G., Granchi, D., Savarino, L., Cenni, E., Magrini, E., Baldini, N., and Giunti, A. (2002) In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells, *Biomaterials*, **23**, 617-627, doi: 10.1016/s0142-9612(01)00149-1.
33. Anasamy, T., Abdul, A. B., Sukari, M. A., Abdelwahab, S. I., Mohan, S., Kamalidehghan, B., Azid, M. Z., Muhammad Nadzri, N., et al. (2013) A phenylbutenoid dimer, cis-3-(3',4'-dimethoxyphenyl)-4-[(E)-3'',4'''-dimethoxystyryl] cyclohex-1-ene, exhibits Apoptogenic properties in T-acute lymphoblastic leukemia cells via induction of p53-independent mitochondrial signalling pathway, *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, **93**, 9810, doi: 10.1155/2013/939810.
34. Yuan, T., Ni, Z., Han, C., Min, Y., Sun, N., Liu, C., Shi, M., Lu, W., Wang, N., Du, F., Wu, Q., Xie, N., and Shi, Y. (2019) SOX2 interferes with the function of CDX2 in bile acid-induced gastric intestinal metaplasia, *Cancer Cell Int.*, **19**, 24, doi: 10.1186/s12935-019-0739-8.
35. Xu, W., Yang, Z., and Lu, N. (2015) A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition, *Cell Adh. Migr.*, **9**, 317-324, doi: 10.1080/19336918.2015.1016686.
36. Jin, W. (2020) Role of JAK/STAT3 Signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial-mesenchymal transition, *Cells*, **9**, 217, doi: 10.3390/cells9010217.
37. Gao, H., Teng, C., Huang, W., Peng, J., and Wang, C. (2015) SOX2 promotes the epithelial to mesenchymal transition of esophageal squamous cells by modulating slug expression through the activation of STAT3/HIF- α signaling, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 21643-21657, doi: 10.3390/ijms160921643.
38. Schaefer, T., Steiner, R., and Lengerke, C. (2020) SOX2 and p53 expression control converges in PI3K/AKT signaling with versatile implications for stemness and cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4902, doi: 10.3390/ijms21144902.
39. Zhong, B. H., and Dong, M. (2023) The implication of ciliary signaling pathways for epithelial-mesenchymal transition, *Mol. Cell Biochem.*, doi: 10.1007/s11010-023-04817-w.
40. Pećina-Slaus, N. (2003) Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells, *Cancer Cell Int.*, **3**, 17, doi: 10.1186/1475-2867-3-17.
41. Malgulwar, P. B., Nambirajan, A., Pathak, P., Rajeshwari, M., Suri, V., Sarkar, C., Singh, M., and Sharma, M. C. (2018) Epithelial-to-mesenchymal transition-related transcription factors are up-regulated in ependymomas and correlate with a poor prognosis, *Hum. Pathol.*, **82**, 149-157, doi: 10.1016/j.humpath.2018.07.018.
42. Huang, J., Fang, J., Chen, Q., Chen, J., and Shen, J. (2022) Epigenetic silencing of E-cadherin gene induced by lncRNA MALAT-1 in acute myeloid leukaemia, *J. Clin. Lab. Anal.*, **36**, e24556, doi: 10.1002/jcla.24556.
43. Chaleshi, V., Asadzadeh Aghdaei, H., Nourian, M., Irvani, S., Jalaeikhoo, H., Rajaeinejad, M., Khoshdel, A. R., and Naghoosi, H. (2021) Association of MALAT1 expression in gastric carcinoma and the significance of its clinicopathologic features in an Iranian patient, *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.*, **14**, 108-114.
44. YiRen, H., YingCong, Y., Sunwu, Y., Keqin, L., Xiaochun, T., Senrui, C., Ende, C., XiZhou, L., and Yanfan, C. (2017) Long noncoding RNA MALAT1 regulates autophagy associated chemoresistance via miR-23b-3p sequestration in gastric cancer, *Mol. Cancer*, **16**, 174, doi: 10.1186/s12943-017-0743-3.

45. Hu, J., Sun, Z., Hu, K., Tang, M., Sun, S., Fang, Y., Yu, H., and Zhang, Y. (2020) Over-expression of Hsa-miR-23b-3p suppresses proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of human cervical cancer CasKi cells [in Chinese], *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.*, **36**, 983-989.
46. Iwatsuki, M., Mimori, K., Yokobori, T., Ishi, H., Beppu, T., Nakamori, S., Baba, H., and Mori, M. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance, *Cancer Sci.*, **101**, 293-299, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01419.x.
47. Aban, C. E., Lombardi, A., Neiman, G., Biani, M. C., La Greca, A., Waisman, A., Moro, L. N., Sevlever, G., Miriuka, S., and Luzzani, C. (2021) Downregulation of E-cadherin in pluripotent stem cells triggers partial EMT, *Sci. Rep.*, **11**, 2048, doi: 10.1038/s41598-021-81735-1.
48. Chen, B., Chen, B., Zhu, Z., Ye, W., Zeng, J., Liu, G., Wang, S., Gao, J., Xu, G., and Huang, Z. (2019) Prognostic value of ZEB-1 in solid tumors: a meta-analysis, *BMC. Cancer*, **19**, 635, doi: 10.1186/s12885-019-5830-y.
49. Romero, S., Musleh, M., Bustamante, M., Stambuk, J., Pisano, R., Lanzarini, E., Chiong, H., Rojas, J., Castro, V. G., Jara, L., Berger, Z., and Gonzalez-Hormazabal, P. (2018) Polymorphisms in TWIST1 and ZEB1 are associated with prognosis of gastric cancer patients, *Anticancer Res.*, **38**, 3871-3877, doi: 10.21873/anticancer.12671.
50. Sundararajan, V., Gengenbacher, N., Stemmler, M. P., Kleemann, J. A., Brabletz, T., and Brabletz, S. (2015) The ZEB1/miR-200c feedback loop regulates invasion via actin interacting proteins MYLK and TKS5, *Oncotarget*, **6**, 27083-27096, doi: 10.18632/oncotarget.4807.
51. Moes, M., Le Béche, A., Crespo, I., Laurini, C., Halavatyi, A., Vetter, G., Del Sol, A., and Friederich, E. (2012) A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition, *PLoS One*, **7**, e35440, doi: 10.1371/journal.pone.0035440.
52. Otsubo, T., Akiyama, Y., Yanagihara, K., and Yuasa, Y. (2008) SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis, *Br. J. Cancer*, **98**, 824-831, doi: 10.1038/sj.bjc.6604193.
53. Medrano-González, P. A., Cruz-Villegas, F., Alarcón Del Carmen, A., Montaña, L. F., and Rendón-Huerta, E. P. (2022) Claudin-6 increases SNAI1, NANOG and SOX2 gene expression in human gastric adenocarcinoma AGS cells, *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 11663-11674, doi: 10.1007/s11033-022-07976-z.
54. Yu, S., Zhang, Y., Li, Q., Zhang, Z., Zhao, G., and Xu, J. (2019) CLDN6 promotes tumor progression through the YAP1-snail1 axis in gastric cancer, *Cell Death Dis.*, **10**, 949, doi: 10.1038/s41419-019-2168-y.
55. Chen, A., Beetham, H., Black, M. A., Priya, R., Telford, B. J., Guest, J., Wiggins, G. A., Godwin, T. D., Yap, A. S., and Guilford, P. J. (2014) E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition, *BMC Cancer*, **14**, 552, doi: 10.1186/1471-2407-14-552.
56. Dart, A. (2023) EMT in chemoresistance, *Nat. Rev. Cancer*, **23**, 349, doi: 10.1038/s41568-023-00581-7.
57. Singh, A., and Settleman, J. (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer, *Oncogene*, **29**, 4741-4751, doi: 10.1038/onc.2010.215.
58. Essafi Rhouma, H., Trabelsi, N., Chimento, A., Benincasa, C., Tamaalli, A., Perri, E., Zarrouk, M., and Pezzi, V. (2021) *Olea europaea* L. flowers as a new promising anticancer natural product: phenolic composition, antiproliferative activity and apoptosis induction, *Nat. Prod. Res.*, **8**, 1-4, doi: 10.1080/14786419.2019.1637867.
59. Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Alaiz, M., Vioque, J., Girón-Calle, J., and Fernández-Bolaños, J. (2019) Pectin-rich extracts from olives inhibit proliferation of Caco-2 and THP-1 cells, *Food Funct.*, **10**, 4844-4853, doi: 10.1039/c9fo00917e.
60. Benot-Dominguez, R., Tupone, M. G., Castelli, V., d'Angelo, M., Benedetti, E., Quintiliani, M., Cinque, B., Forte, I. M., Cifone, M. G., Ippoliti, R., Barboni, B., Giordano, A., and Cimini, A. (2021) Olive leaf extract impairs mitochondria by pro-oxidant activity in MDA-MB-231 and OVCAR-3 cancer cells, *Biomed Pharmacother.*, **134**, 11113, doi: 10.1016/j.biopha.2020.111139.
61. Ruzzolini, J., Peppicelli, S., Andreucci, E., Bianchini, F., Scardigli, A., Romani, A., la Marca, G., Nediani, C., and Calorini, L. (2018) Oleuropein, the main polyphenol of *Olea europaea* leaf extract, has an anti-cancer effect on human BRAF melanoma cells and potentiates the cytotoxicity of current chemotherapies, *Nutrients*, **10**, 1950, doi: 10.3390/nu10121950.
62. Zeriuoh, W., Nani, A., Belarbi, M., Dumont, A., de Rosny, C., Aboura, I., Ghanemi, F. Z., Murtaza, B., Patoli, D., Thomas, C., Apetoh, L., Rébé, C., Delmas, D., Khan, N. A., Ghiringhelli, F., Rialland, M., and Hichami, A. (2017) Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, *PLoS One*, **12**, e0170823, doi: 10.1371/journal.pone.0170823.
63. Samet, I., Han, J., Jlaiei, L., Sayadi, S., and Isoda, H. (2014) Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **9**, 27619, doi: 10.1155/2014/927619.

64. Ercelik, M., Tunca, B., Ak Aksoy, S., Tekin, C., and Tezcan, G. (2023) *Olea europaea* L. leaf extract attenuates temozolomide-induced senescence-associated secretion phenotype in glioblastoma, *Turk. J. Pharm. Sci.*, **9**, 68-77, doi: 10.4274/tjps.galenos.2022.57639.
65. Tezcan, G., Taskapilioglu, M. O., Tunca, B., Bekar, A., Demirci, H., Kocaeli, H., Aksoy, S. A., Egeli, U., Cecener, G., and Tolunay, S. (2017) *Olea europaea* leaf extract and bevacizumab synergistically exhibit beneficial efficacy upon human glioblastoma cancer stem cells through reducing angiogenesis and invasion *in vitro*, *Biomed Pharmacother.*, **90**, 713-723, doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.022.
66. Tezcan, G., Tunca, B., Demirci, H., Bekar, A., Taskapilioglu, M. O., Kocaeli, H., Egeli, U., Cecener, G., Tolunay, S., and Vatan, O. (2017) *Olea europaea* leaf extract improves the efficacy of temozolomide therapy by inducing MGMT methylation and reducing P53 expression in glioblastoma, *Nutr. Cancer*, **69**, 873-880, doi: 10.1080/01635581.2017.1339810.
67. Ohtsu, A. (2008) Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future, *J. Gastroenterol.*, **43**, 256-264, doi: 10.1007/s00535-008-2177-6.
68. Tong, H., Li, T., Qiu, W., and Zhu, Z. (2019) Claudin-1 silencing increases sensitivity of liver cancer HepG2 cells to 5-fluorouracil by inhibiting autophagy, *Oncol. Lett.*, **18**, 5709-5716, doi: 10.3892/ol.2019.10967.
69. Visco, Z. R., Sfakianos, G., Grenier, C., Boudreau, M. H., Simpson, S., Rodriguez, I., Whitaker, R., Yao, D. Y., Berchuck, A., Murphy, S. K., and Huang, Z. (2021) Epigenetic regulation of claudin-1 in the development of ovarian cancer recurrence and drug resistance, *Front. Oncol.*, **11**, 620873, doi: 10.3389/fonc.2021.620873.
70. Fang, S., Yu, L., Mei, H., Yang, J., Gao, T., Cheng, A., Guo, W., Xia, K., and Liu, G. (2016) Cisplatin promotes mesenchymal-like characteristics in osteosarcoma through Snail, *Oncol. Lett.*, **12**, 5007-5014, doi: 10.3892/ol.2016.5342.
71. Chen, S., Wang, G., Tao, K., Cai, K., Wu, K., Ye, L., Bai, J., Yin, Y., Wang, J., Shuai, X., Gao, J., Pu, J., and Li, H. (2020) Long noncoding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 cooperates with enhancer of zeste homolog 2 to promote hepatocellular carcinoma development by modulating the microRNA-22/Snail family transcriptional repressor 1 axis, *Cancer Sci.*, **111**, 1582-1595, doi: 10.1111/cas.14372.

LEAF EXTRACT FROM EUROPEAN OLIVE (*Olea europaea* L.) POST-TRANSCRIPTIONALLY SUPPRESSES THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND SENSITIZES GASTRIC CANCER CELLS TO CHEMOTHERAPY

**Cagla Tekin¹, Melis Ercelik¹, Pavel Dunaev², Aigul Galembikova², Gulcin Tezcan³,
Secil Ak Aksoy^{4,5}, Ferah Budak⁶, Ozgen Isik⁷, Nesrin Ugras⁸,
Sergei Boichuk^{2,9,10*}, and Berrin Tunca^{1*}**

¹ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Bursa Uludag University,
16059 Bursa, Turkey; e-mail: btunca@uludag.edu.tr

² Department of Pathology, Kazan State Medical University,
420012 Kazan, Russia; e-mail: boichuksergei@mail.ru

³ Department of Fundamental Sciences, Faculty of Dentistry, Bursa Uludag University,
16059 Bursa, Turkey

⁴ Inegol Vocation School, Bursa Uludag University, 16059 Bursa, Turkey

⁵ Experimental Animal Breeding and Research Unit, Faculty of Medicine,
16059 Bursa Uludag University, Bursa, Turkey

⁶ Department of Immunology, Medical Faculty, Bursa Uludag University, 16059 Bursa, Turkey

⁷ Department of General Surgery, Medical Faculty, Bursa Uludag University, 16059 Bursa, Turkey

⁸ Department of Pathology, Medical Faculty, Bursa Uludag University, 16059 Bursa, Turkey

⁹ Department of Radiotherapy and Radiology,
Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, 125445 Moscow, Russia

¹⁰ "Biomarker" Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan Federal University, 420012 Kazan, Russia

The overall survival of patients with the advanced and recurrent gastric cancer (GC) remains unfavorable. In particular, this is due to cancer spreading and resistance to chemotherapy associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of tumor cells. EMT can be identified by the transcriptome profiling of GC for EMT markers. Indeed, analysis of the TCGA and GTEx databases ($n = 408$) and

a cohort of GC patients ($n = 43$) revealed that expression of the *CDH2* gene was significantly decreased in the tumors vs. non-tumor tissues and correlated with the overall survival of GC patients. Expression of the EMT-promoting transcription factors SNAIL and ZEB1 was significantly increased in GC. These data suggest that targeting the EMT might be an attractive therapeutic approach for patients with GC. Previously, we demonstrated a potent anti-cancer activity of the olive leaf extract (OLE). However, its effect on the EMT regulation in GC remained unknown. Here, we showed that OLE efficiently potentiated the inhibitory effect of the chemotherapeutic agents 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin (Cis) on the EMT and their pro-apoptotic activity, as was demonstrated by changes in the expression of the EMT markers (E- and N-cadherins, vimentin, claudin-1) in GC cells treated with the aforementioned chemotherapeutic agents in the presence of OLE. Thus, culturing GC cells with 5-FU + OLE or Cis + OLE attenuated the invasive properties of cancer cells. Importantly, upregulation of expression of the apoptotic markers (PARP cleaved form) and increase in the number of cells undergoing apoptosis (Annexin V-positive) were observed for GC cells treated with a combination of OLE and 5-FU or Cis. Collectively, our data illustrate that OLE efficiently interferes with the EMT in GC cells and potentiates the pro-apoptotic activity of certain chemotherapeutic agents used for GC therapy.

Keywords: gastric cancer, *Olea europaea* leaf extract, epithelial-mesenchymal transition, apoptosis, chemotherapeutic agents, cadherin 2, SOX2, non-coding RNA, miR-23b-3p, anti-cancer effect

УДК 577.112.7

Н-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С МОДУЛИРУЕТ КООПЕРАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТОНКОЙ НИТИ ПРЕДСЕРДИЙ И ЖЕЛУДОЧКОВ

© 2024 А.М. Кочурова¹, Е.А. Бельдия^{1,2}, В.В. Нефёдова³, Н.С. Рябкова^{4,5},
Д.С. Ямпольская³, А.М. Матюшенко³, С.Ю. Бершицкий¹,
Г.В. Копылова¹, Д.В. Щепкин^{1*}

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
620049 Екатеринбург, Россия; электронная почта: dvshcherkin@gmail.com

² УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002 Екатеринбург, Россия

³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии, 119234 Москва, Россия

⁵ ООО «Хайтест», 20520 Турку, Финляндия

Поступила в редакцию 16.11.2023

После доработки 09.12.2023

Принята к публикации 11.12.2023

Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) – один из важных элементов контроля цикла миозинового мостика. С-Терминальная часть сМуВР-С располагается на поверхности толстой нити, а N-концевая часть сМуВР-С взаимодействует с актином, миозином и тропомиозином, влияя как на кинетику цикла гидролиза АТФ и время жизни поперечного мостика, так и на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия, модулируя тем самым сократительную функцию миокарда. Роль сМуВР-С в сокращении предсердий практически не изучена. Мы исследовали влияние N-терминального C0-C1-m-C2 (C0-C2) фрагмента сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие, используя предсердный и желудочковый миозин в *in vitro* подвижной системе. Фрагмент C0-C2 сМуВР-С существенно снижал максимальную скорость скольжения тонких нитей по обоим изоформам миозина и увеличивал кальциевую чувствительность актин-миозинового взаимодействия. Фрагмент C0-C2 по-разному влиял на кинетику обмена нуклеотидов, АТФ и АДФ, увеличивая аффинность желудочкового миозина к АДФ и уменьшая аффинность предсердного миозина. Влияние фрагмента C0-C2 на активацию тонкой нити зависело от изоформ миозина. Предсердный миозин слабее активирует тонкую нить, чем желудочковый, а фрагмент C0-C2 делает эти различия изоформ миозина более выраженными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сердечный миозин-связывающий белок С, миокард, предсердный и желудочковый миозин, сердечная мышца, регуляторные белки, актин-миозиновое взаимодействие, кальциевая регуляция, активация тонкой нити, *in vitro* подвижная система.

DOI: 10.31857/S0320972524010076 EDN: YRFXXI

ВВЕДЕНИЕ

Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) – белок саркомера кардиомиоцита, который модулирует актин-миозиновое взаимо-

действие, влияя на характеристики сокращения сердца. сМуВР-С определяет скорости сокращения и расслабления миокарда [1–4]. Молекула сМуВР-С имеет массу ~140 кДа и состоит из восьми иммуноглобулиновых и трех фибронектиновых доменов,

Принятые сокращения: ИПС – *in vitro* подвижная система; ТЦМ – тяжёлые цепи миозина; сМуВР-С – сердечный миозин-связывающий белок С; RLC – регуляторные лёгкие цепи миозина; S1 и S2 – субфрагменты 1 и 2 миозина; Тп – тропониновый комплекс; Трпм – тропомиозин.

* Адресат для корреспонденции.

обозначаемых от C0 до C10, начиная с *N*-конца. Между доменами C1 и C2 находится *m*-мотив, содержащий сайты фосфорилирования [5–7]. *N*-Терминальная часть сМуВР-С взаимодействует как с субфрагментами 1 и 2 (S1 и S2) миозина, так и с актином и тропомиозином, а также с белками, обеспечивающими стабильность и функционирование саркомера [8–16]. Домены C5–C10 сМуВР-С продольно располагаются на стволе толстой нити, взаимодействуя с лёгким меромиозином сердечного миозина [8, 10]. Согласно данным криоэлектронной микроскопии и термофореза, центральные домены сМуВР-С могут взаимодействовать с фрагментами S1 и S2 сердечного миозина [17, 18]. Благодаря линкерному участку между доменами C4 и C5 белок способен изгибаться под прямым углом, и его *N*-терминальная часть направляется к тонкой нити саркомера [8, 19].

Фрагмент C1-*m*-C2 связывает S2 миозина, а фосфорилирование в *m*-мотиве приводит к диссоциации фрагмента C1-*m*-C2, что влияет на количество головок миозина, которые могут взаимодействовать с поверхностью F-актина [6, 20–23]. Связываясь с актином, фрагмент C0-C1-*m*-C2 сМуВР-С способен активировать тонкую нить, смещая тропомиозин из блокирующей, или закрытой, позиции в открытую, способствуя взаимодействию миозина с актином [24–27]. *N*-Терминальная часть сМуВР-С увеличивает скорость циклирования поперечного мостика миозина при субмаксимальных концентрациях кальция и кальциевую чувствительность силы, развиваемой изолированными препаратами миокарда [28–30]. Показано также увеличение кальциевой чувствительности актин-миозинового взаимодействия в присутствии сМуВР-С при использовании изолированных белков в *in vitro* подвижной системе (ИПС) [26, 27, 31–34].

Несмотря на интенсивные исследования, механизм, регулирующий взаимодействие *N*-терминальной части сМуВР-С с миозином и тонкой нитью, до конца не ясен. Показано, что во время диастолы в кардиомиоцитах одна популяция молекул сМуВР-С своей *N*-терминальной частью взаимодействует с тонкой нитью, другая популяция – с толстой нитью, а фосфорилирование *m*-мотива ведёт к диссоциации сМуВР-С от тонкой нити [35]. Кроме того, сМуВР-С влияет на количество поперечных мостиков, а также на кинетику прикрепления/открепления головки миозина от актина [36–39]. На нокаутных по гену *MYBPC3* мышах, а также мышах с экспрессией укороченной формы сМуВР-С показано, что отсутствие сМуВР-С ускоряет высвобождение фосфата и ADP, тем самым ускоряя кинетику открепления поперечного мостика [40–42]. Кинетика открепления поперечных мостиков определяет их количество в прикрепленном состоянии, что влияет на активацию

тонких нитей через механизмы кооперативности кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия [43, 44].

Обнаружено, что эффект сМуВР-С на кинетику поперечного мостика зависит от изоформ миозина. Tanner et al. [41] показали, что сМуВР-С не оказывает влияния на выход ADP из АТРазного кармана миозина и кинетику открепления поперечного мостика у мышей, экспрессирующих α -изоформу тяжёлых цепей миозина (ТЦМ) в миокарде. У мышей с экспрессией β -ТЦМ сМуВР-С замедлял выход ADP, кинетику открепления и время жизни поперечного мостика в миокарде левого желудочка.

сМуВР-С экспрессируется не только в желудочках, но и в предсердиях, одной из важных функций которых является наполнение желудочков кровью. Сокращения предсердий обеспечивают в среднем 18–20% ударного объёма крови [45]. В предсердиях и желудочках млекопитающих и человека соотношение α - и β -ТЦМ различно. Предсердный миозин отличается от желудочкового изоформами существенных (ELC) и регуляторных лёгких цепей (RLC) [46]. Из-за различий изоформного состава предсердный миозин отличается от желудочкового функциональными свойствами, в том числе способностью активировать тонкую нить [47–50].

Роль сМуВР-С в сокращении предсердий практически не исследована. На мышах, нокаутных по гену *MYBPC3*, обнаружено, что отсутствие сМуВР-С уменьшает кальциевую чувствительность зависимости *p*Ca-сила предсердных кардиомиоцитов [51]. В ряде работ было показано, что при патологиях миокарда может наблюдаться как снижение, так и увеличение степени фосфорилирования сМуВР-С в предсердиях [52–54].

Целью работы было исследование влияния *N*-терминального фрагмента C0-C1-*m*-C2 (C0-C2) сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие в *in vitro* подвижной системе. Мы сравнили эффект фрагмента C0-C2 на активацию тонких нитей с предсердным и желудочковым миозином, а также на кинетику обмена нуклеотидов – АТФ и ADP – обеих изоформ миозина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Синтез полной кодирующей последовательности сМуВР-С человека (UniProt Q14896; MYPC3_HUMAN) был выполнен компанией «Евроген» (Россия). На базе этой последовательности был получен молекулярно-генетический конструктор C0-C2 (1–455 а.о.), для получения которого были использованы праймеры, представленные в табл. 1.

Молекулярно-генетический конструктор C0-C2 был получен с помощью метода ПЦР с использо-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для получения молекулярно-генетической конструкции фрагмента C0-C2 сMyBP-C

Название праймера	Последовательность праймера (5'→3')
сMyBPC (C0) fw	GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCT
сMyBPC (C2) rev	TCAGTGATGGTGATGGTGATGCGGGCCCTGAAACAGCACTTCCAGGGGCTCTTTCACAAAGAGCTCCGT

ванием соответствующих пар праймеров (табл. 1) в амплификаторе Mastercycler («Eppendorf», Германия). Полученный ДНК-фрагмент был клонирован в плазмиду pET23a+ между сайтами распознавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и EcoRI. Кодированная последовательность С-конца сMyBP-C была фланкирована His-tag из шести гистидинов и сайтом распознавания вирусной протеазы 3С. Корректность последовательности молекулярно-генетической конструкции была подтверждена секвенированием в компании «Евроген».

Рекомбинантный C0-C2-фрагмент сMyBP-C был экспрессирован в клетках *Escherichia coli* штамма C41(DE3). Для этого одиночные колонии, полученные после химической трансформации целевого конструкта, инокулировали в 15–20 мл стерильной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и оставляли на ночь на шейкере при 37 °С и 250 об./мин. Затем 15–20 мл ночной культуры добавляли в 1 литр среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и оставляли клетки расти на шейкере до поглощения 0,6–0,7 при 600 нм (~2 ч). Индукцию экспрессии производили добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ, и инкубировали клетки в течение ночи при 30 °С. После экспрессии клетки собирали центрифугированием при 4000 g на центрифуге Eppendorf 5810R («Eppendorf», Германия) в течение 40 мин при 4 °С. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для хроматографии (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 15 мМ имидазола, 300 мМ NaCl, 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонил фторид), 5 мМ 2-меркаптоэтанола). Клеточные лизаты замораживали при –80 °С до последующей очистки.

При очистке белков осадки клеток размораживали в буфере для хроматографии, после чего суспензию клеток обрабатывали ультразвуком («Sonic & Materials, Inc.», США) в течение 10 мин. Полученный лизат центрифугировали при 25 000 g в течение 40 мин. Супернатант наносили на колонку HisTrap HP («GE HealthCare», Швеция) объемом 5 мл, предварительно уравновешенную 10 объемами (50 мл) буфера для хроматографии. Колонку подключали к хроматографической системе ProStar 3250 («Varian Inc.», Австралия) и промывали при скорости 3 мл/мин в течение 10–20 мин. Элюцию проводили градиентом имидазола (15–500 мМ)

на базе буфера для хроматографии. Фракции, содержащие наибольшее количества белка, объединяли и диализовали против 2 литров 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), 100 мМ NaCl в течение ночи. Концентрацию полученного белка измеряли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции $Abs_{0,1\%} = 0,867$, добавляли ДТТ до 1 мМ и замораживали при –80 °С. Электрофореграмма препарата C0-C2-фрагмента сMyBP-C приведена на рис. 1, а.

Сердечный миозин получали из левого желудочка и левого предсердия свиньи с помощью стандартного метода [55]. Содержание α- и β-ТЦМ определяли с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза по методу Reiser et al. [56]. Гели сканировали на ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»), и процентное содержание α- и β-изоформ ТЦМ определяли по интенсивности белковых полос программой Image Lab 5.2.1 («Bio-Rad»). Предсердный миозин содержал ~100% α-ТЦМ, а желудочковый – ~100% β-ТЦМ (рис. 1, б).

Сердечный тропомиозин (Trpm, Trpm1.1) человека получен, как описано ранее [50]. Рекомбинантный сердечный тропониновый комплекс (Tn) человека, состоящий из TnI, TnT и TnC, был предоставлен компанией «HyTest» (Финляндия; кат. № 8ITCR). Мономерный актин получали стандартным методом из скелетных мышц кролика [57] и полимеризовали в актиновые филаменты (F-актин) добавлением 4 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl. Для экспериментов в ИПС F-актин окрашивали TRITC-фаллоидином («Sigma Chemical Co.», США).

Эксперименты в *in vitro* подвижной системе. Основным методом, использованным в этой работе, было измерение скорости скольжения F-актина и тонких нитей с помощью ИПС. Скорость движения филаментов по миозину представляет собой интегральную характеристику всех процессов, обеспечивающих актин-миозиновое взаимодействие: механику головки миозина, кооперативные механизмы, в том числе цикл гидролиза АТФ. Поэтому измерение параметров движения филаментов позволяет получать разнообразную информацию об этих процессах, варьируя экспериментальные условия.

Эксперименты проводили при 30 °С, как описано ранее [34, 48–50]. Вкратце, сердечный миозин в концентрации 300 мкг/мл (0,65 мкМ) загружали

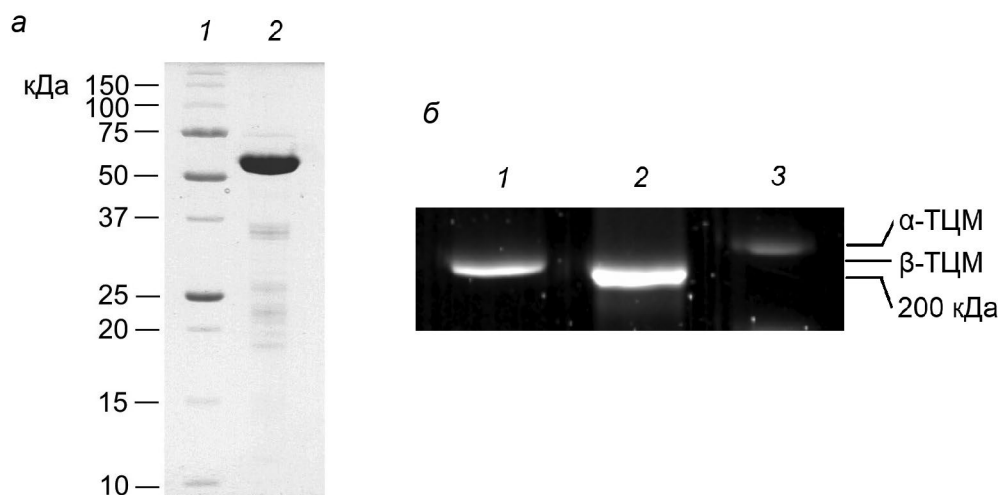


Рис. 1. Электрофореграммы препарата C0-C2-фрагмента сMyBP-C и тяжёлых цепей миозина. *а* – Электрофореграмма препарата C0-C2-фрагмента сMyBP-C: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – препарат фрагмента C0-C2. *б* – Электрофореграмма для определения состава изоформ тяжёлых цепей миозина. ПААГ окрашен SYPRO Ruby («Thermo Fisher Scientific», США). Изображение получено с помощью денситометра GS-800 («Bio-Rad», США). TiM – тяжёлые цепи миозина; 1 – миозин из левого желудочка; 2 – маркер молекулярной массы («Mark12™ Unstained Standard, Invitrogen™», США); 3 – миозин из левого предсердия

в экспериментальную проточную ячейку в АВ-буфере (25 мМ KCl, 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА и 20 мМ ДТТ; pH 7,5), содержащем 0,5 М KCl. Регулируемые тонкие нити реконструировали в АВ-буфере, добавляя Trm и Tn до конечных концентраций 100 нМ к раствору, содержащему 10 нМ F-актина, меченного TRITC-фаллоидином, и заливали их в проточную ячейку с миозином. Для инициации скольжения тонких нитей в проточную ячейку добавляли финальный АВ-буфер, который содержал 2 мМ АТР, 0,5 мг/мл БСА, 3,5 мг/мл глюкозы, 0,02 мг/мл каталазы, 0,15 мг/мл глюкозо-оксидазы, 0,5% метилцеллюлозы, 100 нМ Trm/Tn и необходимую концентрацию кальция.

Для исследования влияния фрагментов сMyBP-C на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия измеряли скорость скольжения тонких филаментов по миозину в ИПС в присутствии 2 мМ АТР при различных концентрациях ионов Ca²⁺ с помощью программы GMimPro [58]. В данном виде эксперимента использовали 500 нМ C0-C2-фрагмента сMyBP-C, который загружали в проточную ячейку в финальном растворе, содержащем АТР и ионы Ca²⁺. Кальциевую зависимость скорости тонких филаментов аппроксимировали уравнением Хилла:

$$V = V_{max} \times (1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})})^{-1}, \quad (1)$$

где V и V_{max} – скорость и максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция соответственно; pCa_{50} (кальциевая чувствительность) – концентрация кальция, при которой достигается полумаксимальная

скорость скольжения тонких нитей; h – коэффициент кооперативности Хилла. Скорость скольжения F-актина измеряли в тех же условиях, но при отсутствии Trm, Tn и ионов Ca²⁺.

Влияние фрагмента C0-C2 на мостик-мостиковую кооперативность исследовали по зависимости скорости скольжения тонких нитей от концентрации миозина, загружаемого в проточную ячейку. Эксперименты проводились при насыщающей (pCa 4) и ненасыщающей концентрациях кальция. Так как предсердный миозин имеет более низкую кальциевую чувствительность, чем желудочковый, то значения ненасыщающей концентрации кальция составили pCa 5,5 для предсердного миозина и pCa 6 – для желудочкового. Фрагмент C0-C2 добавлялся в концентрации 500 нМ в буфер, содержащий АТР и соответствующую концентрацию кальция. Определяли концентрация миозина, при которой скорость скольжения тонких нитей достигала половины от своего максимального значения ($S_{миозин}$).

Влияние фрагмента C0-C2 на скорость скольжения F-актина и тонких нитей при насыщающей концентрации кальция (pCa 4) исследовали, добавляя в финальный буфер, содержащий АТР, C0-C2-фрагмент в концентрации 100–2000 нМ. Для каждой концентрации фрагмента загружали отдельную ячейку.

Зависимость скорости скольжения F-актина и тонких нитей при насыщающей концентрации кальция (pCa 4) от концентрации АТР исследовали, измеряя их скорость скольжения при концентрациях АТР в финальном буфере – 0–2 мМ. Эксперименты выполняли без добавления фрагмента C0-C2 и при добавлении 500 нМ

фрагмента C0-C2 в финальный буфер, содержащий АТР. Для каждой концентрации АТР загружали отдельную ячейку.

Влияние ADP на скорость скольжения F-актина и тонких нитей при насыщающей концентрации кальция (pCa 4) исследовали, добавляя в финальный буфер, содержащий 2 мМ АТР, ADP в концентрации 0,05–6 мМ. Для каждой концентрации ADP загружали отдельную ячейку.

Зависимость скорости скольжения F-актина и тонких нитей от концентрации C0-C2-фрагмента сМуВР-С и ADP аппроксимировали логистической функцией:

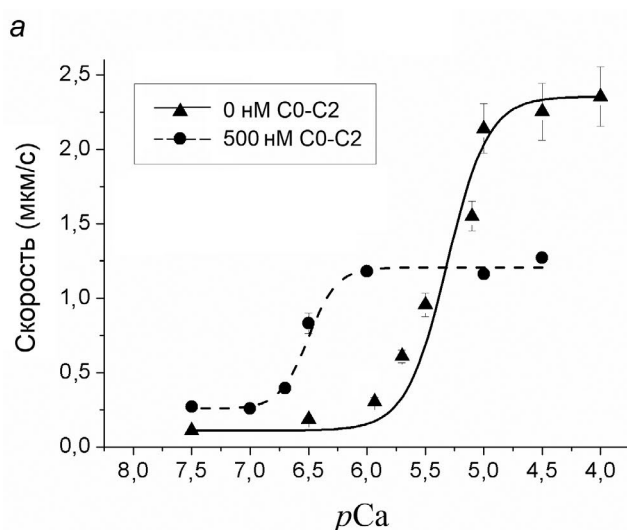
$$V = (V_1 - V_2) \times (1 + (x/x_0)^3)^{-1} + V_2, \quad (2)$$

где V_1 – минимальное значение скорости, V_2 – максимальное значение скорости, x_0 – значение концентрации фрагмента или ADP, при котором скорость полумаксимальная.

Каждый эксперимент повторяли трижды (каждый раз – с заново приготовленным миозином), и полученные значения скоростей скольжения тонких нитей и F-актина выражали как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Анализ данных и статистический анализ проводили с использованием Excel 16 («Microsoft Corp.», США) и Origin 8.0 («Origin Lab», США). Статистический анализ проводили с использованием t -критерия Стьюдента или Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние C0-C2 N-терминального фрагмента сМуВР-С на скорость скольжения F-актина



и тонких нитей по миозину в ИПС. Фрагмент C0-C2 дозозависимым образом снижал скорость скольжения F-актина и регулируемых тонких нитей по обоим изоформам миозина. Двукратное снижение скорости (полученное как среднее значение между максимальным и минимальным) как F-актина, так и тонких нитей достигалось при фактически одинаковых концентрациях фрагмента C0-C2. Концентрации фрагмента, в 2 раза снижающие скорость F-актина, были 358 ± 7 нМ и 354 ± 9 нМ с предсердным и желудочковым миозином соответственно; эти значения для тонких нитей составили 328 ± 31 нМ и 430 ± 73 нМ.

Влияние N-терминального C0-C2-фрагмента сМуВР-С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия. Мы сравнили кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей – pCa -скорость – по предсердному и желудочковому миозину в ИПС. С желудочковым миозином фрагмент C0-C2 на 30% снижал максимальную скорость тонких нитей, увеличивал её Ca^{2+} -чувствительность и уменьшал коэффициент Хилла зависимости pCa -скорость, что согласуется с ранее полученными данными [26, 33, 34] (рис. 2; табл. 2). С предсердным миозином фрагмент C0-C2 уменьшал максимальную скорость скольжения нитей на 50%, существенно увеличивал её Ca^{2+} -чувствительность и не влиял на коэффициент Хилла (рис. 2; табл. 2).

В кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия участвуют механизмы кооперативности, одним из которых является мостик-мостиковая кооперативность. Суть её заключается в том, что присоединение поперечного мостика в одной регуляторной группе, состоящей из семи мономеров актина, Тpm и Тn-комплекса, делает

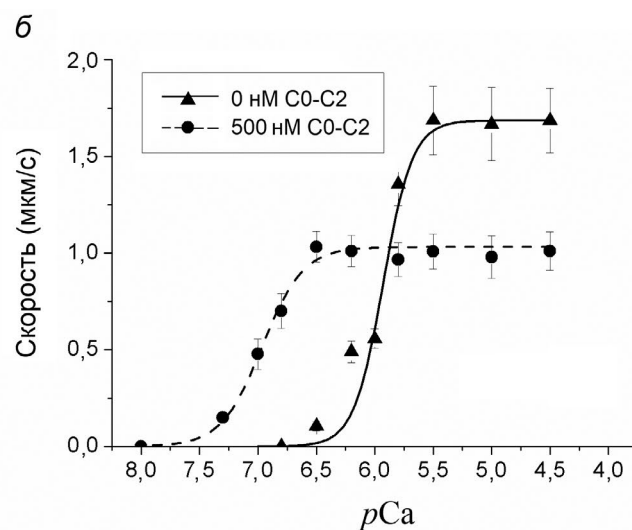


Рис. 2. Влияние 500 нМ C0-C2-фрагмента сМуВР-С на Ca^{2+} -зависимость скорости скольжения тонких нитей по предсердному (а) и желудочковому (б) миозину в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1), параметры уравнения приведены в табл. 2

Таблица 2. Параметры Ca^{2+} -зависимости скорости скольжения тонких нитей по предсердному и желудочковому миозину в *in vitro* подвижной системе

Миозин	Концентрация фрагмента C0-C2, нМ	$V_{\max}$, мкм/с	h	$p\text{Ca}_{50}$
Предсердный миозин	0	$2,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$5,31 \pm 0,01$
	500	$1,2 \pm 0,1^*$	$1,7 \pm 0,2$	$6,50 \pm 0,02^*$
Желудочковый миозин	0	$1,7 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$	$5,93 \pm 0,01$
	500	$1,0 \pm 0,1^*$	$1,4 \pm 0,2^*$	$6,96 \pm 0,01^*$

Примечание. $V_{\max}$ – максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция; h – коэффициент кооперативности Хилла; $p\text{Ca}_{50}$ (кальциевая чувствительность) – значение концентрации кальция, при которой скорость нитей достигает полумаксимального значения. Символ * указывает на значимое отличие параметров уравнения Хилла (1) в присутствии фрагмента C0-C2 от таковых без его добавления ($p < 0,05$).

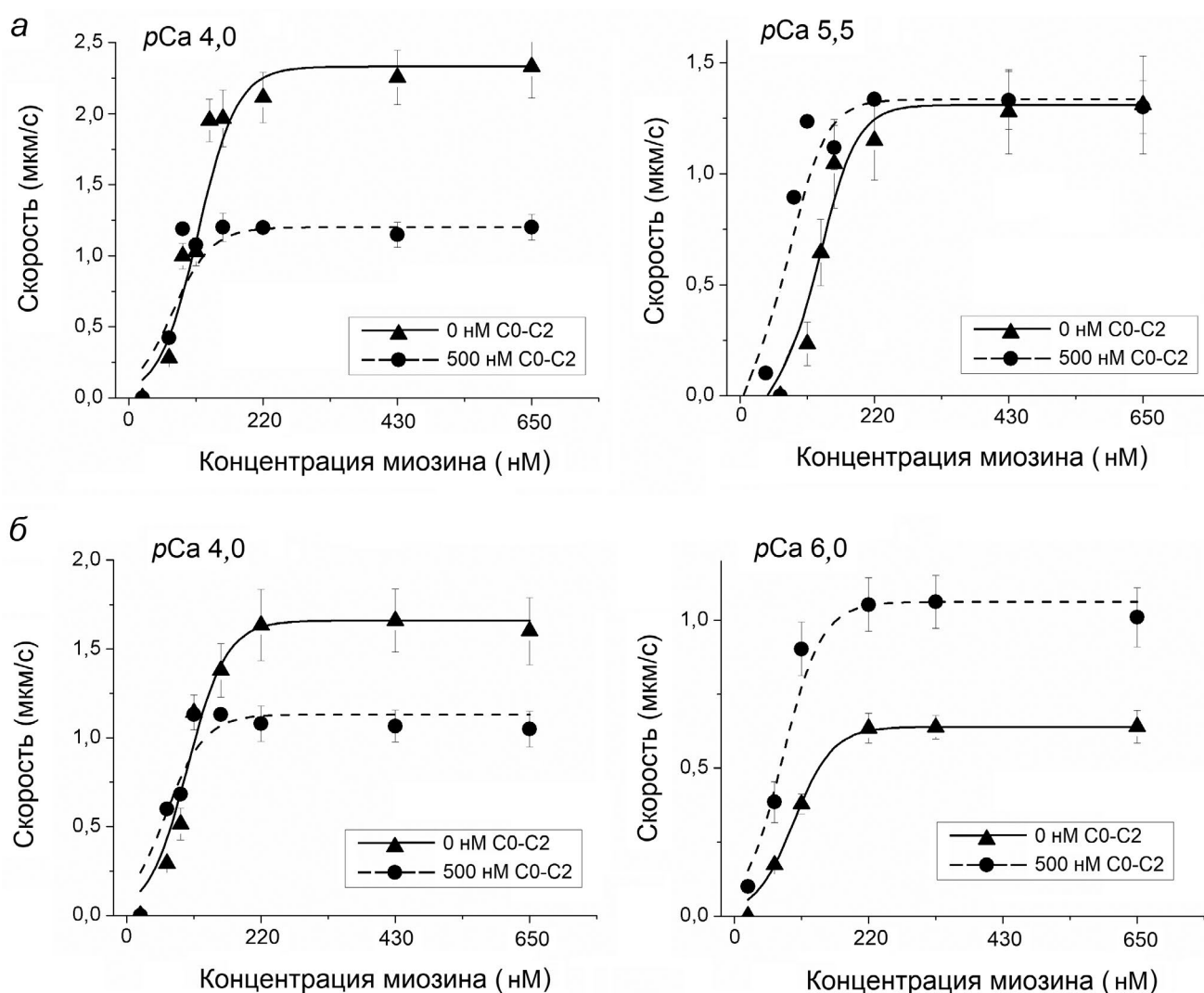


Рис. 3. Влияние C0-C2-фрагмента сМуВР-С на зависимость скорости скольжения тонких нитей от концентрации предсердного (а) и желудочкового (б) миозина в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные значения скоростей (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1). Концентрации миозина, при которых скорость нитей уменьшалась вдвое ($S_{\text{миозин}}$), для желудочкового миозина при $p\text{Ca} 4$ были равны $97,0 \pm 1,5$ нМ и $62,4 \pm 1,2^*$ нМ без фрагмента C0-C2 и при его добавлении соответственно; при $p\text{Ca} 6$ эти значения были $95,4 \pm 0,6$ нМ и $76,7 \pm 1,4^*$ нМ. Для предсердного миозина значения $S_{\text{миозин}}$ при $p\text{Ca} 4$ были равны $111,2 \pm 1,2$ нМ и $67,6 \pm 1,3^*$ нМ; при $p\text{Ca} 5,5$ – $121,6 \pm 1,3$ нМ и $37,5 \pm 0,5^*$ нМ. Символом * обозначено значимое отличие величины $S_{\text{миозин}}$ в присутствии фрагмента C0-C2 от такового при его отсутствии ($p < 0,05$)

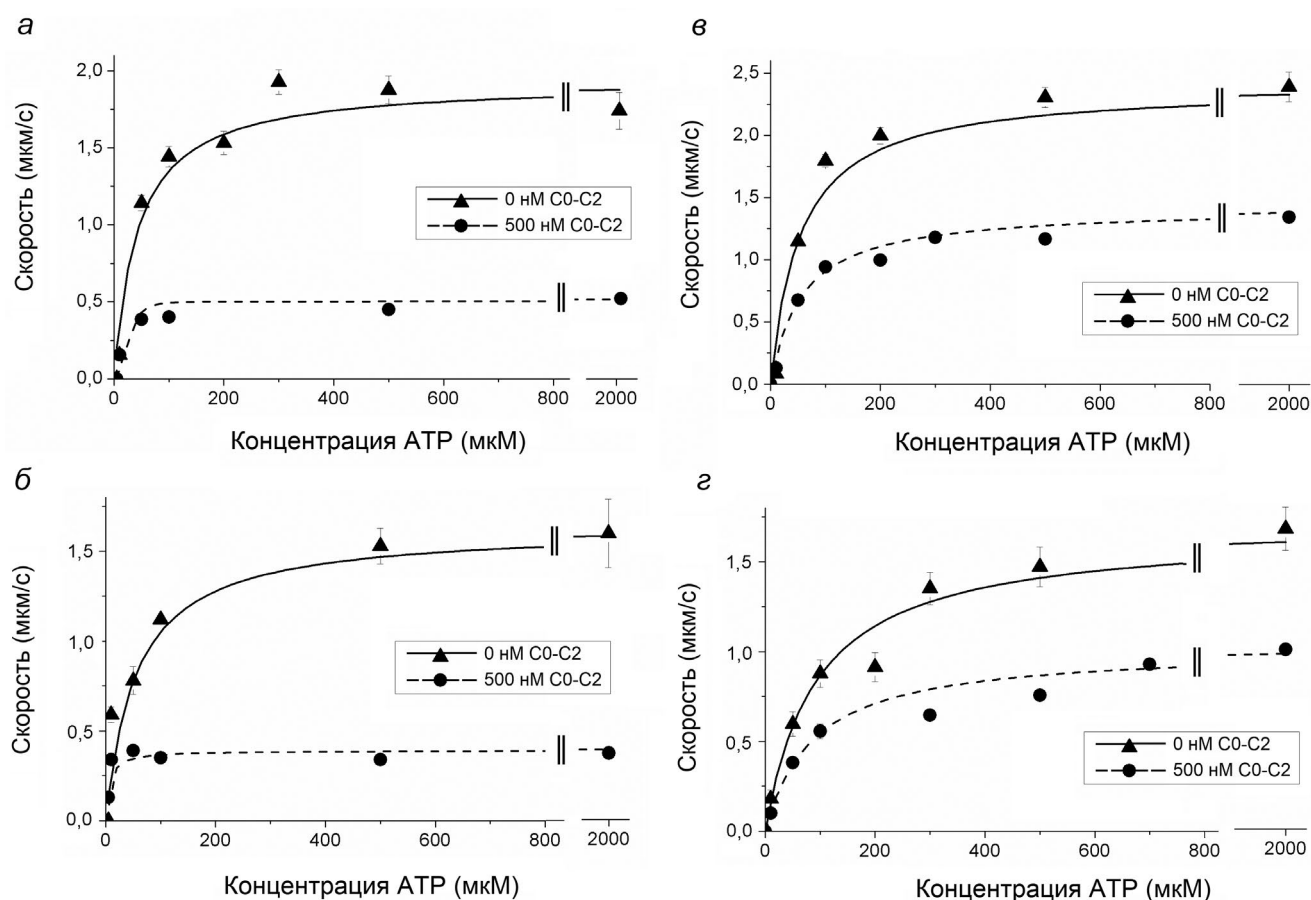


Рис. 4. Влияние C0-C2-фрагмента сМуВР-С на зависимость скорости скольжения F-актина (а и б) и регулируемых тонких нитей при pCa 4 (в и г) по предсердному (а, в) и желудочковому (б, г) миозину от концентрации АТР в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1). Значения S_{ATP} для зависимости скорости скольжения F-актина от концентрации АТР в ИПС по желудочковому миозину были равны $55,2 \pm 0,1$ мкМ и $6,5 \pm 0,1^*$ мкМ, а по предсердному – $42,8 \pm 0,1$ мкМ и $26,6 \pm 0,1^*$ мкМ без фрагмента C0-C2 и в его присутствии соответственно. Значения S_{ATP} для зависимости скорости скольжения тонких нитей от концентрации АТР по желудочковому миозину были равны $92,5 \pm 2,5$ мкМ и $86,4 \pm 4,5$ мкМ, а по предсердному миозину – $53,9 \pm 0,5$ мкМ и $56,2 \pm 2,5$ мкМ. Символом * обозначено отличие значения S_{ATP} в присутствии фрагмента C0-C2 от такового при его отсутствии ($p < 0,05$)

сайты связывания на актине в соседних регуляторных группах доступными для миозина. Мы исследовали эффект C0-C2-фрагмента сМуВР-С на мостик-мостиковую кооперативность кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия, определяя концентрацию миозина, при которой скорость тонких нитей достигает полумаксимального значения ($S_{миозин}$). Эксперименты были выполнены при насыщающей (pCa 4) и ненасыщающей (pCa 5,5 – для предсердного миозина и pCa 6 – для желудочкового миозина) концентрациях кальция. Обнаружено, что фрагмент C0-C2 существенно усиливал мостик-мостиковую кооперативность, уменьшая $S_{миозин}$ для обеих изоформ миозина (рис. 3).

Влияние АТР и АДФ на актин-миозиновое взаимодействие. Ранее было показано, что сМуВР-С влияет на кинетику прикрепления/открепления поперечного мостика [37]. Для исследова-

ния влияния C0-C2-фрагмента сМуВР-С на кинетику прикрепления/открепления поперечного мостика мы проанализировали зависимость скорости скольжения тонких нитей при pCa 4 и F-актина по миозину от концентрации АТР и АДФ в ИПС, так как эти нуклеотиды определяют время жизни головки миозина на актине [59, 60].

Мы определили концентрацию АТР, при которой скорости тонких нитей и F-актина достигали полумаксимальных значений (S_{ATP}). При отсутствии фрагмента C0-C2 значение S_{ATP} для предсердного миозина при взаимодействии с F-актином было меньше, чем для желудочкового. Добавление фрагмента C0-C2 в 8,5 раза уменьшало S_{ATP} для желудочкового миозина и в 1,6 раза – для предсердного миозина (рис. 4, а и б).

Фрагмент C0-C2 не влиял на S_{ATP} обеих изоформ миозина при взаимодействии с тонкими нитями (рис. 4, в и г). При этом предсердному миозину

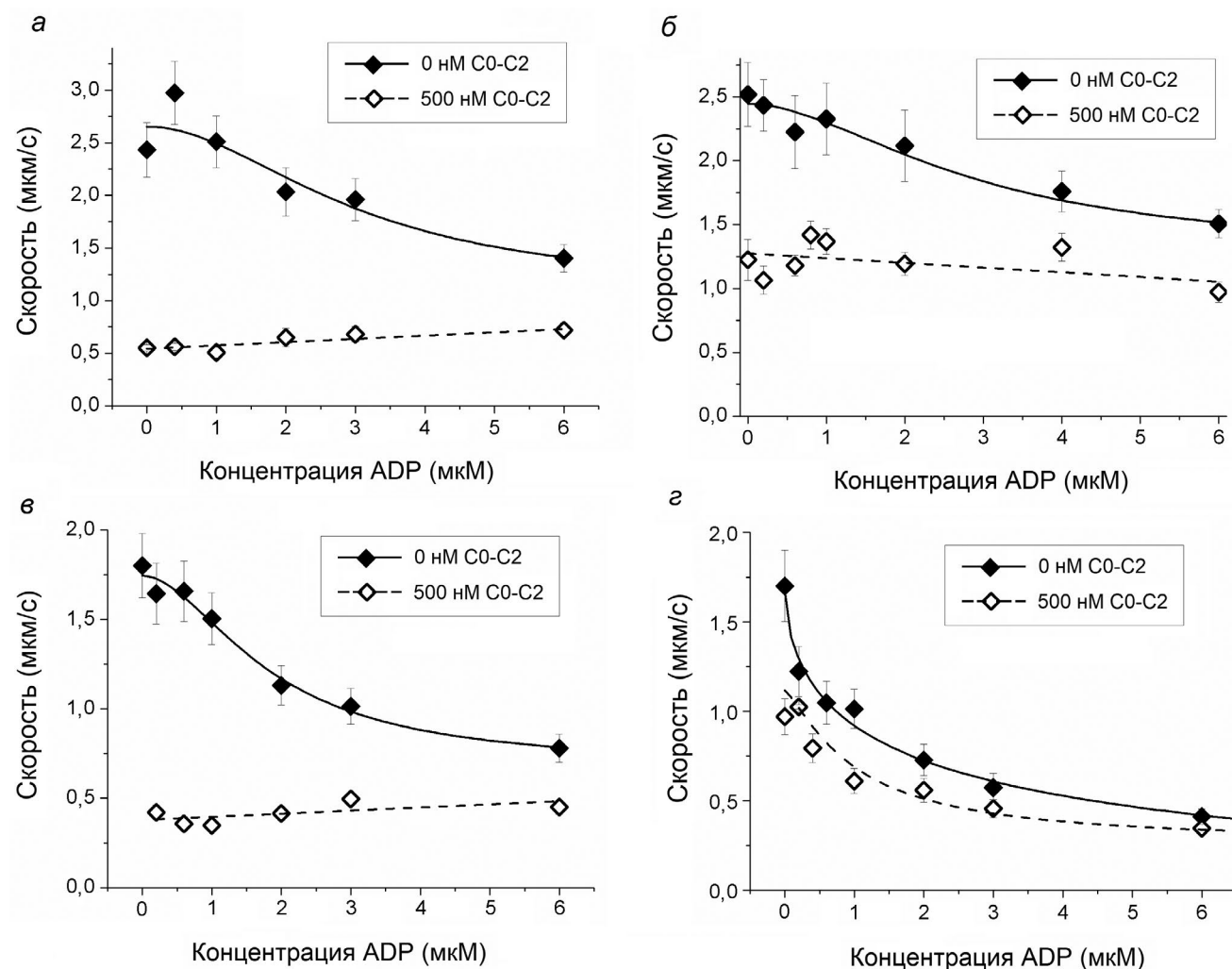


Рис. 5. Влияние C0-C2-фрагмента сMyBP-C на зависимость скорости скольжения F-актина (а и в) и регулируемых тонких нитей при pCa 4 (б и г) по предсердному (а, б) и желудочковому (в, г) миозину от концентрации ADP в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) для F-актина (а, б) и тонких нитей (г) с фрагментом C0-C2 аппроксимированы линейной функцией; экспериментальные данные для F-актина и тонких нитей без фрагмента C0-C2 с обеими изоформами миозина (а, в) и для тонких нитей с желудочковым миозином аппроксимированы логистической функцией (2). Значения C_{ADP} без фрагмента C0-C2 для зависимости скорости скольжения F-актина по предсердному миозину от концентрации ADP были равны $3,03 \pm 0,35$ мМ, для зависимости скорости скольжения тонких нитей – $3,46 \pm 0,23$ мМ. Значения C_{ADP} без фрагмента C0-C2 для зависимости скорости скольжения F-актина по желудочковому миозину от концентрации ADP были равны $1,84 \pm 0,2$ мМ; для тонких нитей значение C_{ADP} без фрагмента C0-C2 было равно $2,12 \pm 0,15$ мМ, а при его присутствии – $1,00 \pm 0,25$ мМ

требовалось меньше АТР, чтобы достичь полумаксимального значения скорости, чем желудочковому миозину, как с фрагментом C0-C2, так и без него.

ADP ингибирует АТРазную активность миозина и увеличивает время жизни актомиозинового комплекса, снижая скорость скольжения F-актина и тонких нитей в ИПС [61]. Мы определили концентрацию ADP, при которой скорость уменьшается в 2 раза (C_{ADP}). При отсутствии фрагмента C0-C2 добавление ADP дозозависимым образом снижало скорость скольжения F-актина и тонких нитей по предсердному и желудочковому миозину (рис. 5). В присутствии фрагмента C0-C2 добавление ADP снижало скорость скольжения тонких

нитей по желудочковому миозину (рис. 5, г), но не влияло на скорость скольжения F-актина по обеим изоформам миозина (рис. 5, а и в) и на скорость скольжения тонких нитей по предсердному миозину (рис. 5, б).

Известно, что увеличение концентрации ADP в миокарде ведёт к диастолической дисфункции желудочков [62, 63]. Мы исследовали влияние ADP на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия при отсутствии и в присутствии фрагмента C0-C2. Добавление 0,5 мМ ADP увеличивало кальциевую чувствительность зависимости pCa -скорость обеих изоформ миозина и вело к неполному ингибированию скольжения

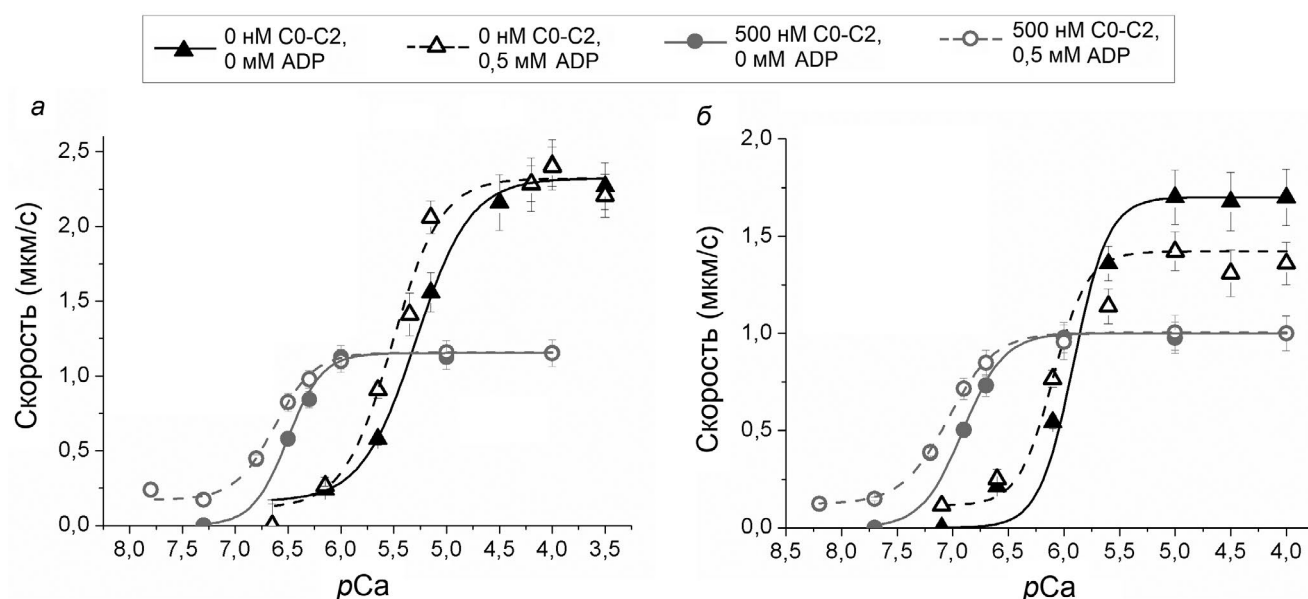


Рис. 6. Влияние ADP на кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей по желудочковому (а) и предсердному (б) миозину в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные значения скоростей (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1). Параметры уравнения Хилла представлены в табл. 3

Таблица 3. Параметры кальциевой зависимости скорости скольжения тонких нитей по миозину в *in vitro* подвижной системе в присутствии ADP

Миозин	Концентрация фрагмента C0-C2, нМ	Концентрация ADP, мМ	$V_{\max}$, мкм/с	V_0 , мкм/с	h	pCa_{50}
Желудочковый миозин	0	0	$1,7 \pm 0,1$	0	$1,7 \pm 0,2$	$5,91 \pm 0,01$
	0	0,5	$1,4 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01^*$	$1,5 \pm 0,2$	$6,10 \pm 0,01^*$
	500	0	$1,0 \pm 0,1$	0	$1,4 \pm 0,2$	$6,91 \pm 0,01$
	500	0,5	$1,0 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01^*$	$1,1 \pm 0,2$	$7,04 \pm 0,01$
Предсердный миозин	0	0	$2,3 \pm 0,04$	0	$1,2 \pm 0,2$	$5,29 \pm 0,02$
	0	0,5	$2,3 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,3$	$5,51 \pm 0,03^*$
	500	0	$1,2 \pm 0,1^*$	0	$1,5 \pm 0,2$	$6,51 \pm 0,01$
	500	0,5	$1,2 \pm 0,1^*$	$0,17 \pm 0,01^*$	$1,1 \pm 0,2$	$6,63 \pm 0,01$

Примечание. $V_{\max}$ – максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция; V_0 – скорость скольжения филаментов при ненасыщающих концентрациях кальция; h – коэффициент кооперативности Хилла; pCa_{50} – концентрация кальция, при которой скорость полумаксимальная (кальциевая чувствительность). Символ * указывает на значимое отличие параметров уравнения Хилла (1) в присутствии фрагмента C0-C2 от таковых в его отсутствии ($p < 0,05$).

тонких нитей при низких концентрациях кальция (рис. 6; табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты многочисленных исследований указывают на важную роль сМуВР-С в контроле

сократительной функции сердца. Его N-терминальные домены принимают участие в активации тонкого филамента и регулируют количество головок миозина, взаимодействующих с тонкой нитью при сокращении миокарда, а также кинетику поперечного мостика [24–27], оказывая влияние на связывание АТФ и выход ADP из АТРазного кармана миозина [40, 42]. При этом большинство

исследований направлены на изучение роли сМуВР-С в сокращении левого желудочка сердца, тогда как работ, посвящённых его влиянию на сократительную функцию предсердий, практически нет. Мы сравнили влияние *N*-терминального С0-С2-фрагмента сМуВР-С на характеристики взаимодействия предсердного и желудочкового миозина с актином. Используя изолированные мышечные белки и *in vitro* подвижную систему, мы напрямую оценили эффекты сМуВР-С на взаимодействие сократительных и регуляторных белков миокарда, активацию тонкого филамента и аффинность миозина к АТР и АДФ.

Влияние С0-С2-фрагмента сМуВР-С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия. Ранее на изолированных препаратах миокарда, а также в ИПС было показано, что как полноразмерный сМуВР-С, так и его *N*-терминальные домены, определяют кальциевую чувствительность актин-миозинового взаимодействия [26, 27, 31–33]. Так, *N*-терминальные домены сМуВР-С увеличивали кальциевую чувствительность зависимости *pCa*-скорость и снижали максимальную скорость скольжения тонких нитей по желудочковому миозину в ИПС [26, 27, 30, 34]. В нашей работе максимальная скорость скольжения тонких нитей по предсердному миозину снизилась в большей степени (~ на 50%), чем по желудочковому миозину (~ на 30%).

В кальциевой регуляции участвуют механизмы кооперативности, в связи с тем, что сМуВР-С замедляет цикл поперечного мостика, он должен оказывать эффект на мостик-мостиковую кооперативность. Мы проверили это предположение и обнаружили, что фрагмент С0-С2 усиливает мостик-мостиковую кооперативность обеих изоформ миозина в одинаковой степени даже при насыщающей концентрации кальция (рис. 3). Фрагмент С0-С2 может активировать тонкую нить либо непосредственно, либо через кинетику образования поперечных мостиков. Механизм прямой активации состоит в смещении тропомиозинового тяжа из заблокированного или закрытого состояния тонкой нити в открытое состояние, что делает сайты на поверхности актина доступными для взаимодействия с головками миозина [24, 25].

Влияние фрагмента С0-С2 на кинетику поперечного мостика. Кинетика присоединения АТР, гидролиза и выхода продуктов гидролиза (АДФ и Р_i) определяет время жизни миозина на поверхности актина и силогенерацию головки миозина. Миозины, содержащие α - и β -ТЦМ, различаются кинетическими характеристиками и временем жизни актомиозинового комплекса [47–49, 64, 65]. Согласно работе Homsher et al. [61], зависимость скорости движения F-актина и тонких нитей от концентрации АТР и АДФ позволяет косвенно охарактери-

зовать аффинность изоформ миозина к этим нуклеотидам.

Мы обнаружили, что фрагмент С0-С2 уменьшает $S_{\text{АТР}}$, т.е. увеличивает аффинность предсердного и желудочкового миозина к АТР при взаимодействии с F-актином, но не влияет на неё в случае с тонкими нитями (рис. 4). Присутствие фрагмента сМуВР-С увеличивало разницу в аффинности обеих изоформ миозина к АТР с F-актином и тонкой нитью.

При увеличении концентрации АДФ скорость скольжения F-актина по обеим изоформам миозина снижалась дозозависимым образом. Предсердный миозин при взаимодействии как с F-актином, так и с тонкой нитью показал меньшую аффинность к АДФ, чем желудочковый. Этот результат согласуется с данными, полученными методом быстрой кинетики (*stopped flow*) для S1 человека с α - и β -ТЦМ [59, 60]. Авторы обнаружили, что S1 с β -ТЦМ обладает большей аффинностью к АДФ и меньшей скоростью высвобождения АДФ из АТР-азного кармана, а с α -ТЦМ – меньшей аффинностью к АДФ и большей скоростью его высвобождения.

Homsher et al. [61] в экспериментах со скелетным миозином в ИПС показали, что сердечные тропомиозин и тропонин снижают аффинность миозина к АТР и АДФ. Согласно нашим данным с миозином из сердечной мышцы, сердечные регуляторные белки не оказывают существенного влияния на аффинность к АДФ, что, вероятно, объясняется изоформами миозина.

Мы обнаружили, что *N*-терминальные домены сМуВР-С по-разному влияют на кинетику поперечного мостика предсердного и желудочкового миозина в зависимости от присутствия или отсутствия регуляторных белков на F-актине. Как известно, сМуВР-С увеличивает время жизни актомиозинового комплекса и замедляет выход АДФ из АТР-азного кармана [40–42], ведя к значительному снижению скорости скольжения F-актина по миозину в ИПС. В наших экспериментах добавление АДФ в присутствии фрагмента С0-С2 не влияло на скорость F-актина по обеим изоформам миозина (рис. 5, а и в), а также на скорость скольжения тонкой нити по предсердному миозину. Фрагмент С0-С2 в большей степени подавлял скольжение тонких нитей по предсердному миозину, чем по желудочковому, к тому же оказалось, что предсердный миозин менее чувствителен к АДФ, чем желудочковый.

В присутствии фрагмента С0-С2 АДФ дозозависимо снижал скорость скольжения тонких нитей по миозину желудочков, а аффинность желудочкового миозина к АДФ увеличилась в 2 раза (рис. 5). Увеличение аффинности, в свою очередь, ведёт к увеличению времени жизни головки миозина на актине и, соответственно, к снижению скорости

скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция. Эти данные согласуются с результатами, полученными на изолированных препаратах миокарда левого желудочка с экспрессией укороченной формы сМуВР-С, которая приводила к отсутствию сМуВР-С на толстой нити, что снижало аффинность к АDP и увеличивало скорость его выхода из АТРазного кармана β -ТЦМ миозина [40, 41].

Взаимодействие сМуВР-С с изоформами миозина. Отличия влияния АDP на скорость скольжения тонких нитей в присутствии фрагмента C0-C2 по предсердному и желудочковому миозину могут объясняться различием длительности стадий цикла поперечного мостика α - и β -изоформ миозина. Ещё одной причиной этого отличия может быть взаимодействие RLC предсердного и желудочкового миозина с сМуВР-С. Цикл поперечного мостика является общим для всех изученных миозинов, но изоформы отличаются скоростью гидролиза АТР и константами стадий цикла, в частности, константами высвобождения АDP [60]. Кроме того, было показано, что C0-домен сМуВР-С способен связывать RLC сердечного миозина [66], а фрагмент C1-C2 – взаимодействовать с S2 миозина [11, 16]. Предсердный и желудочковый миозин имеют соответственно предсердную и желудочковую изоформы RLC и ELC. Эти различия могут влиять на взаимодействие изоформ сердечного миозина с актином в присутствии фрагмента C1-C2. Ранее на медленном скелетном миозине, содержащем β -изоформу ТЦМ, используя полноразмерный сМуВР-С, мы показали, что изоформы лёгких цепей миозина модулируют эффект сМуВР-С на характеристики актин-миозинового взаимодействия [67]. В частности, сМуВР-С увеличивал максимальную скорость скольжения тонких нитей по медленному миозину в ИПС, в отличие от изоформ сердечного миозина. Таким образом, мы видим, что взаимодействие сМуВР-С с миозином зависит от изоформного состава миозина.

Влияние фрагмента C0-C2 на активацию тонкой нити. Активация тонкой нити – это обеспечение доступа головок миозина к сайтам связывания его на F-актине и образование поперечных мостиков. В поперечнополосатых мышцах этот процесс инициируется связыванием Ca^{2+} тропонином С, а последующая полная активация тонкой нити требует присоединения к ней молекул миозина [68]. Медленный миозин дольше находится в связанном с актином состоянии и тем самым лучше активирует тонкую нить через механизм мостик-мостиковой кооперативности, чем быстро циклирующий миозин [50, 69]. Увеличение аффинности миозина к АDP, т.е. замедление его высвобождения, увеличивает время жизни головки миозина на актине и мостик-мостиковую кооперативность, что способствует активации тонкой

нити и повышению кальциевой чувствительности актин-миозинового взаимодействия.

При сердечных патологиях (ишемия, диабет, хроническая сердечная недостаточность) в миокарде желудочков растёт концентрация АDP [62, 63, 70]. Нарушение сократимости предсердий также связано с увеличением концентрации АDP [71, 72]. Ранее было показано, что избыток АDP увеличивает кальциевую чувствительность зависимости $p\text{Ca}$ -сила изолированных препаратов миокарда, вызывая нарушение расслабления миокарда. Это ведёт к чрезмерному росту силы при ненасыщающих концентрациях кальция и конечно-диастолического давления, и в конечном итоге – к развитию сердечной недостаточности [63]. Мы исследовали влияние АDP на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в предсердиях и желудочках. Добавление АDP увеличивало кальциевую чувствительность скорости скольжения тонких нитей по предсердному и желудочковому миозину в ИПС независимо от присутствия фрагмента C0-C2 (рис. 6; табл. 3), вероятнее всего, через механизм мостик-мостиковой кооперативности. Рост концентрации АDP в миокарде предсердий при хронической сердечной недостаточности вследствие нарушения кальциевой регуляции может вести к развитию фибрилляции предсердий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для полной активации тонкой нити необходимо образование поперечных мостиков [68]. Механизмы кооперативной активации тонкой нити предсердного и желудочкового миозина различаются, и это ведёт к различию сократительных свойств миокарда предсердий и желудочков. Предсердный и желудочковый миозин различаются аффинностью к нуклеотидам и временем жизни актомиозинового комплекса, которое является одним из факторов, определяющих активацию тонкой нити. сМуВР-С увеличивает аффинность желудочкового миозина к АDP и уменьшает аффинность предсердного миозина, таким образом, по-разному влияя на активацию тонкой нити этими изоформами миозина.

Вклад авторов. С.Ю. Бершицкий, Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – концепция и руководство работой; А.М. Кочурова, Е.А. Бельдия, Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – проведение экспериментов в *in vitro* подвижной системе; А.М. Кочурова, Е.А. Бельдия, Г.В. Копылова – обработка экспериментальных данных; Н.С. Рябкова, Д.С. Ямпольская, А.М. Матюшенко и В.В. Нефёдова – экспрессия белков; Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – написание первоначального текста статьи; А.М. Матюшенко, С.Ю. Бершицкий,

Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – редактирование окончательной версии статьи. Все авторы одобрили окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00174).

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. Nagayama, T., Takimoto, E., Sadayappan, S., Mudd, J. O., Seidman, J. G., Robbins, J., and Kass, D. A. (2007) Control of *in vivo* left ventricular [correction] contraction/relaxation kinetics by myosin binding protein C: protein kinase A phosphorylation dependent and independent regulation, *Circulation*, **20**, 2399-2408, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706523.
2. Palmer, B. M., Georgakopoulos, D., Janssen, P. M., Wang, Y., Alpert, N. R., Belardi, D. F., Harris, S. P., Moss, R. L., Burgon, P. G., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Maughan, D. W., and Kass, D. A. (2004) Role of cardiac myosin binding protein C in sustaining left ventricular systolic stiffening, *Circ. Res.*, **94**, 1249-1255, doi: 10.1161/01.RES.0000126898.95550.31.
3. Janssen, P. M. (2010) Kinetics of cardiac muscle contraction and relaxation are linked and determined by properties of the cardiac sarcomere, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**, 1092-1099, doi: 10.1152/ajpheart.00417.2010.
4. Fazlollahi, F., Santini Gonzalez, J. J., Repas, S. J., Canan, B. D., Billman, G. E., and Janssen, P. M. L. (2021) Contraction-relaxation coupling is unaltered by exercise training and infarction in isolated canine myocardium, *J. Gen. Physiol.*, **153**, e202012829, doi: 10.1085/jgp.202012829.
5. Barefield, D., and Sadayappan, S. (2010) Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **48**, 866-875, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.014.
6. Previs, M. J., Mun, J. Y., Michalek, A. J., Previs, S. B., Gulick, J., Robbins, J., Saber, D. M., and Craig, R. (2016) Phosphorylation and calcium antagonistically tune myosin-binding protein C's structure and function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3239-3244, doi: 10.1073/pnas.1522236113.
7. Kumar, M., Haghigh, I. K., Kranias, E. G., and Sadayappan, S. (2020) Phosphorylation of cardiac myosin-binding protein-C contributes to calcium homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **295**, 11275-11291, doi: 10.1074/jbc.RA120.013296.
8. Huang, X., Torre, I., Chiappi, M., Yin, Z., Vydyanath, A., Cao, S., Raschdorf, O., Beeby, M., Quigley, B., de Tombe, P. P., Liu, J., Morris, E. P., and Luther, P. K. (2023) Cryo-electron tomography of intact cardiac muscle reveals myosin binding protein-C linking myosin and actin filaments, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **44**, 165-178, doi: 10.1007/s10974-023-09647-3.
9. Suay-Corredera, C., and Alegre-Cebollada, J. (2022) The mechanics of the heart: zooming in on hypertrophic cardiomyopathy and cMyBP-C, *FEBS Lett.*, **596**, 703-746, doi: 10.1002/1873-3468.14301.
10. Dutta, D., Nguyen, V., Campbell, K. S., Padrón, R., and Craig, R. (2023) Cryo-EM structure of the human cardiac myosin filament, *Nature*, **623**, 853-862, doi: 10.1038/s41586-023-06691-4.
11. Gruen, M., and Gautel, M. (1999) Mutations in β -myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin binding protein-C, *J. Mol. Biol.*, **286**, 933-949, doi: 10.1006/jmbi.1998.2522.
12. Kulikovskaya, I., McClellan, G., Flavigny, J., Carrier, L., and Winegrad, S. (2003) Effect of MyBP-C binding to actin on contractility in heart muscle, *J. Gen. Physiol.*, **122**, 761-774, doi: 10.1085/jgp.200308941.
13. Whitten, A. E., Jeffries, C. M., Harris, S. P., and Trewthella, J. (2008) Cardiac myosin-binding protein C decorates F-actin: implications for cardiac function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18360-18365, doi: 10.1073/pnas.0808903105.
14. Shaffer, J. F., Kensler, R. W., and Harris, S. P. (2009) The myosin-binding protein C motif binds to F-actin in a phosphorylation-sensitive manner, *J. Biol. Chem.*, **284**, 12318-12327, doi: 10.1074/jbc.M808850200.
15. Orlova, A., Galkin, V. E., Jeffries, C. M., Egelman, E. H., and Trewthella, J. (2011) The N-terminal domains of myosin binding protein C can bind polymorphically to F-actin, *J. Mol. Biol.*, **412**, 379-386, doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.056.
16. Bhuiyan, M. S., McLendon, P., James, J., Osinska, H., Gulick, J., Bhandary, B., Lorenz, J. N., and Robbins, J. (2016) *In vivo* definition of cardiac myosin-binding protein C's critical interactions with myosin, *Pflugers Arch.*, **468**, 1685-1695, doi: 10.1007/s00424-016-1873-y.
17. Tamborini, D., Wang, Z., Wagner, T., Tacke, S., Stabrin, M., Grange, M., Kho, A. L., Rees, M., Bennett, P., Gautel, M., and Raunser, S. (2023) Structure of the native myosin filament in the relaxed cardiac sarcomere, *Nature*, **623**, 863-871, doi: 10.1038/s41586-023-06690-5.
18. Ponnamm, S., and Kampourakis, T. (2022) Microscale thermophoresis suggests a new model of regulation of cardiac myosin function via interaction with cardiac myosin-binding protein C, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101485, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101485.

19. Doh, C. Y., Bharambe, N., Holmes, J. B., Dominic, K. L., Swanberg, C. E., Mamidi, R., Chen, Y., Bandyopadhyay, S., Ramachandran, R., and Stelzer, J. E. (2022) Molecular characterization of linker and loop-mediated structural modulation and hinge motion in the C4-C5 domains of cMyBPC, *J. Struct. Biol.*, **214**, 107856, doi: 10.1016/j.jsb.2022.107856.
20. Sadayappan, S., and de Tombe, P. P. (2012) Cardiac myosin binding protein-C: redefining its structure and function, *Biophys. Rev.*, **4**, 93-106, doi: 10.1007/s12551-012-0067-x.
21. Walcott, S., Docken, S., and Harris, S. P. (2015) Effects of cardiac Myosin binding protein-C on actin motility are explained with a drag-activation-competition model, *Biophys. J.*, **108**, 10-13, doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.1852.
22. Colson, B. A., Thompson, A. R., Espinoza-Fonseca, L. M., and Thomas, D. D. (2016) Site-directed spectroscopy of cardiac myosin-binding protein C reveals effects of phosphorylation on protein structural dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3233-3238, doi: 10.1073/pnas.1521281113.
23. Moss, R. L. (2016) Cardiac myosin-binding protein C: a protein once at loose ends finds its regulatory groove, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3133-3135, doi: 10.1073/pnas.1602568113.
24. Risi, C., Belknap, B., Forgacs-Lonart, E., Harris, S. P., Schröder, G. F., White, H. D., and Galkin, V. E. (2018) N-Terminal domains of cardiac myosin binding protein C cooperatively activate the thin filament, *Structure*, **26**, 1604-1611.e4, doi: 10.1016/j.str.2018.08.007.
25. Harris, S. P., Belknap, B., Van Sciver, R. E., White, H. D., and Galkin, V. E. (2016) C0 and C1 N-terminal Ig domains of myosin binding protein C exert different effects on thin filament activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1558-1563, doi: 10.1073/pnas.1518891113.
26. Mun, J. Y., Previs, M. J., Yu, H. Y., Gulick, J., Tobacman, L. S., Beck Previs, S., Robbins, J., Warshaw, D. M., and Craig, R. (2014) Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2170-2175, doi: 10.1073/pnas.1316001111.
27. Inchingolo, A. V., Previs, S. B., Previs, M. J., Warshaw, D. M., and Kad, N. M. (2019) Revealing the mechanism of how cardiac myosin-binding protein C N-terminal fragments sensitize thin filaments for myosin binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6828-6835, doi: 10.1073/pnas.1816480116.
28. Stelzer, J. E., Fitzsimons, D. P., and Moss, R. L. (2006) Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium, *Biophys. J.*, **90**, 4119-4127, doi: 10.1529/biophysj.105.078147.
29. Stelzer, J. E., Patel, J. R., and Moss, R. L. (2006) Protein kinase A-mediated acceleration of the stretch activation response in murine skinned myocardium is eliminated by ablation of cMyBP-C, *Circ. Res.*, **99**, 884-890, doi: 10.1161/01.RES.0000245191.34690.66.
30. Napierski, N. C., Granger, K., Langlais, P. R., Moran, H. R., Strom, J., Touma, K., and Harris, S. P. (2020) A novel "Cut and Paste" method for *in situ* replacement of cMyBP-C reveals a new role for cMyBP-C in the regulation of contractile oscillations, *Circ. Res.*, **126**, 737-749, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315760.
31. Razumova, M. V., Bezold, K. L., Tu, A. Y., Regnier, M., and Harris, S. P. (2008) Contribution of the myosin binding protein C motif to functional effects in permeabilized rat trabeculae, *J. Gen. Physiol.*, **132**, 575-585, doi: 10.1085/jgp.200810013.
32. Razumova, M. V., Shaffer, J. F., Tu, A. Y., Flint, G. V., Regnier, M., and Harris, S. P. (2006) Effects of the N-terminal domains of myosin binding protein-C in an *in vitro* motility assay: evidence for long-lived cross-bridges, *J. Biol. Chem.*, **281**, 35846-35854, doi: 10.1074/jbc.M606949200.
33. Saber, W., Begin, K. J., Warshaw, D. M., and VanBuren, P. (2008) Cardiac myosin binding protein-C modulates actomyosin binding and kinetics in the *in vitro* motility assay, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **44**, 1053-1061, doi: 10.1016/j.jmcc.2008.03.012.
34. Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Nikitina, L. V., Katsnelson, L. B., and Bershitsky, S. Y. (2010) Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an *in vitro* motility assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**, 159-163, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.040.
35. Chandler, J., Treacy, C., Ameer-Beg, S., Ehler, E., Irving, M., and Kampourakis, T. (2012) *In situ* FRET-based localization of the N terminus of myosin binding protein-C in heart muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2222005120, doi: 10.1073/pnas.2222005120.
36. Nelson, S., Beck-Previs, S., Sadayappan, S., Tong, C., and Warshaw, D. M. (2023) Myosin-binding protein C stabilizes, but is not the sole determinant of SRX myosin in cardiac muscle, *J. Gen. Physiol.*, **155**, e202213276, doi: 10.1085/jgp.202213276.
37. Moss, R. L., Fitzsimons, D. P., and Ralphe, J. C. (2015) Cardiac MyBP-C regulates the rate and force of contraction in mammalian myocardium, *Circ. Res.*, **116**, 183-192, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.300561.
38. De Lange, W. J., Grimes, A. C., Hegge, L. F., and Ralphe, J. C. (2013) Ablation of cardiac myosin-binding protein-C accelerates contractile kinetics in engineered cardiac tissue, *J. Gen. Physiol.*, **141**, 73-84, doi: 10.1085/jgp.201210837.
39. McNamara, J. W., Singh, R. R., and Sadayappan, S. (2019) Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation regulates the super-relaxed state of myosin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 11731-11736, doi: 10.1073/pnas.1821660116.

40. Tanner, B. C., Wang, Y., Robbins, J., and Palmer, B. M. (2014) Kinetics of cardiac myosin isoforms in mouse myocardium are affected differently by presence of myosin binding protein-C, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **35**, 267-278, doi: 10.1007/s10974-014-9390-0.
41. Tanner, B. C. W., Previs, M. J., Wang, Y., Robbins, J., and Palmer, B. M. (2021) Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation accelerates β -cardiac myosin detachment rate in mouse myocardium, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **320**, H1822-H1835, doi: 10.1152/ajpheart.00673.2020.
42. Wang, L., Sadayappan, S., and Kawai, M. (2014) Cardiac myosin binding protein C phosphorylation affects cross-bridge cycle's elementary steps in a site-specific manner, *PLoS One*, **9**, e113417, doi: 10.1371/journal.pone.0113417.
43. Gordon, A. M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle, *Physiol. Rev.*, **80**, 853-924, doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.853.
44. Gorga, J. A., Fishbaugher, D. E., and VanBuren, P. (2003) Activation of the calcium-regulated thin filament by myosin strong binding, *Biophys. J.*, **85**, 2484-2491, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74671-2.
45. Narolska, N. A., Eiras, S., van Loon, R. B., Boontje, N. M., Zaremba, R., Spiegelberg, S. R., Stooker, W., Huybrechts, M. A., Visser, F. C., van der Velden, J., and Stienen, G. J. (2005) Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 39-48, doi: 10.1007/s10974-005-9005-x.
46. Morano, I. (1999) Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains, *J. Mol. Med.*, **77**, 544-555, doi: 10.1007/s001099900031.
47. Yamashita, H., Sugiura, S., Fujita, H., Yasuda, S., Nagai, R., Saeki, Y., Sunagawa, K., and Sugi, H. (2003) Myosin light chain isoforms modify force-generating ability of cardiac myosin by changing the kinetics of actin-myosin interaction, *Cardiovasc. Res.*, **60**, 580-588, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.011.
48. Shchepkin, D. V., Nikitina, L. V., Bershitsky, S. Y., and Kopylova, G. V. (2017) The isoforms of α -actin and myosin affect the Ca^{2+} regulation of the actin-myosin interaction in the heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **490**, 324-329, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.043.
49. Kopylova, G., Nabiev, S., Nikitina, L., Shchepkin, D., and Bershitsky, S. (2016) The properties of the actin-myosin interaction in the heart muscle depend on the isoforms of myosin but not of α -actin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **476**, 648-653, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.013.
50. Kopylova, G. V., Berg, V. Y., Kochurova, A. M., Matyushenko, A. M., Bershitsky, S. Y., and Shchepkin, D. V. (2022) The effects of the tropomyosin cardiomyopathy mutations on the calcium regulation of actin-myosin interaction in the atrium and ventricle differ, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 29-33, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.051.
51. Pohlmann, L., Kröger, I., Vignier, N., Schlossarek, S., Krämer, E., Coirault, C., Sultan, K. R., El-Armouche, A., Winegrad, S., Eschenhagen, T., and Carrier, L. (2007) Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes, *Circ. Res.*, **101**, 928-938, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.158774.
52. El-Armouche, A., Boknik, P., Eschenhagen, T., Carrier, L., Knaut, M., Ravens, U., and Dobrev, D. (2006) Molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in human chronic atrial fibrillation, *Circulation*, **114**, 670-680, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.636845.
53. Wakili, R., Yeh, Y. H., Yan Qi, X., Greiser, M., Chartier, D., Nishida, K., Maguy, A., Villeneuve, L.-R., Boknik, P., Voigt, N., Krysiak, J., Kääh, S., Ravens, U., Linke, W. A., Stienen, G. J. M., Shi, Y., Tardif, J.-C., Schotten, U., Dobrev, D., and Nattel, S. (2010) Multiple potential molecular contributors to atrial hypocontractility caused by atrial tachycardia remodeling in dogs, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, **3**, 530-541, doi: 10.1161/CIRCEP.109.933036.
54. Butova, X., Myachina, T., Simonova, R., Kochurova, A., Mukhlynina, E., Kopylova, G., Shchepkin, D., and Khokhlova, A. (2023) The inter-chamber differences in the contractile function between left and right atrial cardiomyocytes in atrial fibrillation in rats, *Front. Cardiovasc. Med.*, **10**, 1203093, doi: 10.3389/fcvm.2023.1203093.
55. Margossian, S. S., and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, **85**, 55-71, doi: 10.1016/0076-6879(82)85009-x.
56. Reiser, P. J., and Kline, W. O. (1998) Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species, *Am. J. Physiol.*, **274**, 1048-1053, doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.3.H1048.
57. Pardee, J. D., and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin, *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181, doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9.
58. Mashanov, G. I., and Molloy, J. E. (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells, *Biophys. J.*, **92**, 2199-2211, doi: 10.1529/biophysj.106.081117.
59. Deacon, J. C., Bloemink, M. J., Rezavandi, H., Geeves, M. A., and Leinwand, L. A. (2012) Identification of functional differences between recombinant human α and β cardiac myosin motors, *Cell. Mol. Life Sci.*, **69**, 2261-2277, doi: 10.1007/s00018-012-0927-3.
60. Walklate, J., Ferrantini, C., Johnson, C. A., Tesi, C., Poggesi, C., and Geeves, M. A. (2021) Alpha and beta myosin isoforms and human atrial and ventricular contraction, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7309-7337, doi: 10.1007/s00018-021-03971-y.

61. Homsher, E., Nili, M., Chen, I. Y., and Tobacman, L. S. (2003) Regulatory proteins alter nucleotide binding to actomyosin of sliding filaments in motility assays, *Biophys. J.*, **85**, 1046-1052, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74543-3.
62. Tian, R., Christe, M. E., Spindler, M., Hopkins, J. C., Halow, J. M., Camacho, S. A., and Ingwall, J. S. (1997) Role of MgADP in the development of diastolic dysfunction in the intact beating rat heart, *J. Clin. Invest.*, **99**, 745-751, doi: 10.1172/JCI119220.
63. Sequeira, V., Najafi, A., McConnell, M., Fowler, E. D., Bollen, I. A., Wüst, R. C., dos Remedios, C., Helmes, M., White, E., Stienen, G. J., Tardiff, J., Kuster, D. W., and van der Velden, J. (2015) Synergistic role of ADP and Ca²⁺ in diastolic myocardial stiffness, *J. Physiol.*, **593**, 3899-3916, doi: 10.1113/JP270354.
64. Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Momomura, S., Chaen, S., Omata, M., and Sugi, H. (1998) Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation, *Circ. Res.*, **82**, 1029-1034, doi: 10.1161/01.res.82.10.1029.
65. Palmiter, K. A., Tyska, M. J., Dupuis, D. E., Alpert, N. R., and Warshaw, D. M. (1999) Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms, *J. Physiol.*, **519**, 669-678, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0669n.x.
66. Ratti, J., Rostkova, E., Gautel, M., and Pfuhl, M. (2011) Structure and interactions of myosin-binding protein C domain C0: cardiac-specific regulation of myosin at its neck? *J. Biol. Chem.*, **286**, 12650-12658, doi: 10.1074/jbc.M110.156646.
67. Nabiev, S. R., Kopylova, G. V., and Shchepkin, D. V. (2019) The effect of cardiac myosin-binding protein c on calcium regulation of the actin-myosin interaction depends on myosin light chain isoforms, *Mol. Biophys.*, **64**, 690-693, doi: 10.1134/S000635091905018X.
68. McKillop, D. F., and Geeves, M. A. (1993) Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament, *Biophys. J.*, **65**, 693-701, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81110-X.
69. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershtsky, S. Y., and Levitsky, D. I. (2020) Unique functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin, *Biochimie*, **174**, 1-8, doi: 10.1016/j.biochi.2020.03.013.
70. Papp, Z., Szabó, A., Barends, J. P., and Stienen, G. J. (2002) The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes, *J. Physiol.*, **543**, 177-189, doi: 10.1113/jphysiol.2002.022145.
71. Cha, Y. M., Dzeja, P. P., Shen, W. K., Jahangir, A., Hart, C. Y., Terzic, A., and Redfield, M. M. (2003) Failing atrial myocardium: energetic deficits accompany structural remodeling and electrical instability, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1313-H1320, doi: 10.1152/ajpheart.00337.2002.
72. Shimura, D., Nakai, G., Jiao, Q., Osanai, K., Kashikura, K., Endo, K., Soga, T., Goda, N., and Minamisawa, S. (2012) Metabolomic profiling analysis reveals chamber-dependent metabolite patterns in the mouse heart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **305**, H494-H505, doi: 10.1152/ajpheart.00867.2012.

N-TERMINAL FRAGMENT OF CARDIAC MYOSIN BINDING PROTEIN C MODULATES COOPERATIVE MECHANISMS OF THE THIN FILAMENT ACTIVATION IN THE ATRIA AND VENTRICLES

**A. M. Kochurova¹, E. A. Beldiia^{1,2}, V. V. Nefedova³, N. S. Ryabkova^{4,5},
D. S. Yampolskaya³, A. M. Matyushenko³, S. Y. Bershtsky¹,
G. V. Kopylova¹, and D. V. Shchepkin^{1*}**

¹ *Institute of Immunology and Physiology of the Russian Academy of Sciences,
620049 Yekaterinburg, Russia; e-mail: dvshchepkin@gmail.com*

² *Ural Federal University, 620002 Ekaterinburg, Russia*

³ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

⁴ *Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁵ *HyTest Ltd., 20520 Turku, Finland*

Cardiac myosin binding protein C (сМЫВР-С) is one of the essential control components of the myosin cross-bridge cycle. The C-terminal part of сМЫВР-С lies on the surface of the thick filament, and its

N-terminal part interacts with actin, myosin, and tropomyosin, affecting both the kinetics of the ATP hydrolysis cycle and the lifetime of the cross bridge, as well as the calcium regulation of actin-myosin interaction, thereby modulating the contractile function of the myocardium. The role of cMyBP-C in atrial contraction is poorly studied. We examined the effect of the N-terminal C0-m-C2 (C0-C2) fragment of cMyBP-C on actin-myosin interaction using ventricular and atrial myosin in an *in vitro* motility assay. The C0-C2 fragment of cMyBP-C significantly reduced the maximum sliding velocity of thin filaments on both myosin isoforms and increased the calcium sensitivity of actin-myosin interaction. The C0-C2 fragment had different effects on the kinetics of nucleotide, ATP, and ADP exchange, increasing the affinity of ventricular myosin for ADP and decreasing the affinity of atrial myosin. The effect of the C0-C2 fragment on the activation of the thin filament depended on the myosin isoforms. Atrial myosin activates the thin filament less strongly than ventricular myosin, and the C0-C2 fragment makes these differences in myosin isoforms more pronounced.

Keywords: cardiac myosin binding protein C, myocardium, atrial and ventricular myosin, cardiac muscle, regulatory proteins, actin-myosin interaction, calcium regulation, thin filament activation, *in vitro* motility assay

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ АНЕВРИЗМЫ ТОРАКАЛЬНОЙ И АБДОМИНАЛЬНОЙ АОРТЫ

Обзор

© 2024 А.Н. Кучер, Ю.А. Королёва, М.С. Назаренко*

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634050 Томск, Россия; электронная почта: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023

После доработки 30.11.2023

Принята к публикации 01.12.2023

Аневризма аорты (АА) – жизнеугрожающее состояние с высокой распространённостью и риском развития тяжёлых осложнений. Цель настоящего обзора заключалась в обобщении накопленных к настоящему времени данных о роли длинных некодирующих РНК (lncRNA) в развитии АА различной локализации. За менее чем 10-летний период исследований lncRNA при АА с использованием экспериментальных и биоинформатических подходов получены сведения, подтверждающие вовлечённость молекул данного класса в критические для развития аневризмы метаболические пути и патогенетические звенья. Вне зависимости от локализации патологического процесса (грудная, брюшная аорта), установлены изменения уровней экспрессии различных lncRNA в ткани поражённых сосудов. Зарегистрирована согласованность изменений уровня экспрессии lncRNA, мРНК и микроРНК в тканях аорты при развитии АА и выявлен ряд патогенетически значимых для биохимических путей и клеточных процессов регуляторных сетей, в которых lncRNA выступает в качестве конкурирующей эндогенной РНК (ceRNA-сети). При этом, с одной стороны, одна и та же lncRNA может вовлекаться в различные ceRNA-сети и регулировать разные биохимические и клеточные события, с другой – один и тот же патологический процесс контролируется разными lncRNA. Несмотря на некоторую общность патогенеза и на перекрывание спектра lncRNA, для абдоминальной и торакальной АА не описаны идентичные ceRNA-сети. Установлены также потенциально значимые для патогенеза АА взаимодействия между lncRNA и белковыми молекулами, в том числе вовлечёнными в эпигенетические процессы на других уровнях. Для некоторых lncRNA наблюдали корреляции уровня экспрессии с клинически значимыми при АА параметрами аорты и биохимическими показателями. Выявление функционально значимых для развития аневризмы регуляторных РНК имеет значение для уточнения патогенеза заболевания, а также создаёт основу для ранней диагностики и разработки новых профилактических и терапевтических препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, аневризма аорты.

DOI: 10.31857/S0320972524010089 **EDN:** YRDDMV

ВВЕДЕНИЕ

Аневризма аорты (АА) – жизнеугрожающий патологический фенотип, который является важной проблемой общественного здравоохранения в связи с высокой распространённостью, вероят-

ностью инвалидизации, а также летального исхода при таком осложнении патологии, как разрыв аорты [1, 2]. Аневризма может развиваться в любом сегменте аорты – в корне, восходящем, нисходящем и других отделах грудной аорты (при торакальной аневризме аорты, ТАА), в брюшной аорте

Принятые сокращения: АА – аневризма аорты; ААА – абдоминальная аневризма аорты; ВКМ – внеклеточный матрикс; ГМКС – гладкомышечные клетки сосудов; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; ТАА – торакальная аневризма аорты; circRNA – кольцевые РНК; lncRNA – длинные некодирующие РНК.

* Адресат для корреспонденции.

(абдоминальная аневризма аорты, AAA), также известны AA смешанного типа, в том числе торако-абдоминальная аневризма аорты (ТААА) [3].

Основным методом лечения AAA является хирургическое вмешательство, что показано не всем пациентам, при этом до 70% малых аневризм даже при консервативном лечении продолжают расти, увеличивая риск разрыва [4]. Поэтому, к сожалению, можно констатировать, что всё ещё не существует надёжного фармакологического подхода, который мог бы замедлить прогрессирование аневризмы и защитить от риска острого разрыва аорты [3–5].

AAA и ТАА рассматриваются как самостоятельные заболевания, различающиеся по этиологии и механизмам образования [6–8]. Разные участки аорты отличаются по эмбриональному происхождению гладкомышечных клеток сосудов (ГМКС) – важных участников патологического процесса при развитии AA [9], а AAA и ТАА (как и AA в пределах конкретных сегментов грудной аорты) характеризуются специфической значимостью этиологических факторов, которые, в свою очередь, определяют клиническую картину заболеваний и влияют на тактику ведения пациентов [3, 10–12].

К категории факторов риска ТАА относят наследственные факторы (наличие некоторых синдромов (Марфана, Лойса–Дитца, Элерса–Данлоса и другие) и несиндромальные заболевания, связанные с патологическими вариантами в генах *ACTA2*, *MYH11*, *PRKG1*, *MYLK* и других), врождённые патологии (пороки сердца и аорты: двустворчатый аортальный клапан, коарктация аорты, тетрада Фалло и другие), гипертония, атеросклероз (чаще при аневризме нисходящей аорты), дегенеративные изменения, курение, предшествующее расслоение/травматическое повреждение аорты, воспалительный и инфекционный аортит [3]. Менделевские (моногенные) нарушения в качестве первопричины ТАА регистрируют у 20–30% пациентов, ещё у 13–25% пациентов выявляют семейное отягощение [1, 3, 12–18]. В качестве основных факторов риска AAA рассматривают курение, пожилой возраст, мужской пол, в качестве дополнительных – гипертонию и гиперлипидемию, принадлежность к европеоидной расе [3].

Факторы риска развития AA различной локализации не являются высокоспецифичными, а их спектр и значимость постоянно уточняются и дополняются. Так, несмотря на то что моногенные нарушения рассматривают в качестве причины ТАА, при аналогичных патогенных вариантах может регистрироваться и AAA [19, 20]; выявляются также общие предрасполагающие для данных патологий генетические варианты и эпигенетические маркеры [21]. Например, 15,2% мужчин и 30,7% женщин с AAA (в среднем – 19,2%) имеют синхронную или метакронную ТАА [22].

В целом, вне зависимости от этиологических факторов и локализации образование аневризмы является результатом сложных и разнообразных патофизиологических процессов, приводящих к разрушению/ремоделированию внеклеточного матрикса (ВКМ), эластиновых структур меди (средней оболочки сосуда) [6, 23–25]. Эндотелиальные клетки и соединительная ткань являются основными структурными компонентами интимы (внутренняя стенка сосуда); гладкомышечные клетки, эластические волокна, белки коллагена и полисахариды образуют медию (центральную часть сосуда), а соединительная ткань, фибробласты (а также нервы и *vasa vasorum*) – адвентицию (наружный слой сосуда) [3]. Нарушение структуры и функции данных компонент стенки аорты имеет важное значение в патогенезе AA вне зависимости от этиологии патологического процесса.

Большинство аневризм брюшной и грудной аорты протекает бессимптомно до разрыва, но может выявляться при диагностических исследованиях [8, 26, 27]. Возраст манифестации AA варьирует, при этом отмечается увеличение среднего возраста проявления болезни в ряду: генетически обусловленные – семейные – спорадические случаи AA [3, 15, 28]. Но даже для генетически обусловленных AA средний возраст манифестации составляет около 40 лет (возрастной диапазон – 17–89 лет) [28], что указывает на потенциальную значимость внешнесредовых воздействий для инициации патологических событий. Поэтому важным представляется поиск маркеров ранних этапов развития патологии, которые могут представлять интерес для разработки новых специфичных для лечения AA лекарственных препаратов. К данной категории относится широкий спектр регуляторных РНК, таких как микроРНК, длинные некодирующие РНК (lncRNA), кольцевые РНК (circRNA) и другие. Молекулы указанных типов показали высокую информативность в отношении диагностической значимости, вовлечённости в патогенез, а также оказались перспективными для разработки на их основе новых лекарственных препаратов, в том числе для заболеваний сердечно-сосудистой системы и, в частности, аневризмы аорты [5, 29–36].

Среди регуляторных РНК особое внимание привлекают lncRNA – относительно недавно открытый, но активно исследуемый класс регуляторных молекул. К lncRNA относят РНК размером свыше 200 нуклеотидов [35, 37]. Известно большое число транскриптов lncRNA и кодирующих их генов. На 11 октября 2023 г. в базе NONCODE (NONCODE v5: <http://www.noncode.org/index.php>) [38] для человека зарегистрированы 173 112 транскриптов, кодируемых 96 411 генами, в базе GENCODE (https://www.encodegenes.org/human/stats_43.html) [39] – 19 922 и 58 246 транскриптов и генов соответственно.

Кольцевые регуляторные РНК (circRNA) – разновидность длинных некодирующих РНК, которые замкнуты в кольцо и образуются в результате обратного сплайсинга кодирующих и некодирующих транскриптов [40, 41].

lncRNA обладают различными функциями: участвуют в регуляции транскрипции, контролируют стабильность мРНК и других РНК, регулируют эффективность функционирования РНК, взаимодействуют с белковыми молекулами (транскрипционными факторами, эпигенетическими модуляторами) и т.д. [37, 41, 42]. lncRNA и circRNA могут выполнять роль конкурирующей эндогенной РНК (ceRNA) и выступать в качестве «молекулярной губки» для разных классов РНК (в том числе и микроРНК). В результате формируются регуляторные сети lncRNA(circRNA)/микроРНК/мРНК (ceRNA-сети, в некоторых публикациях обозначаются как ceRNA-оси), влияющие на функциональное состояние клетки (соответственно органа и организма в целом), которые при определённых условиях либо способствуют развитию патологии, либо противодействуют этому неблагоприятному процессу [34, 43, 44]. Так, показано, что некодирующие регуляторные РНК (микроРНК, circRNA, lncRNA) являются важными регуляторами развития и функционирования сердечно-сосудистой системы и факторов риска широкого спектра заболеваний данной системы [34, 45].

Выявление регуляторных сетей с участием длинных некодирующих РНК, оценка их функциональной и патогенетической значимости представляют интерес для понимания патогенеза болезней, а также создают основу для разработки новых препаратов, способствующих предотвращению развития патологического процесса и/или лечению уже развившихся заболеваний [34, 36, 45–48].

Цель настоящего обзора заключалась в обобщении накопленных к настоящему времени данных о роли lncRNA и circRNA в развитии АА различной локализации.

Поиск научных публикаций проведён в зарубежных (PubMed) и отечественных (eLibrary) электронных библиотеках. В качестве ключевых слов для поиска выступали отдельные термины/обозначения/заболевания/гены и их сочетания: аневризма аорты, аневризма грудной аорты (торакальная АА), аневризма брюшной аорты (абдоминальная АА), длинные некодирующие РНК, конкурирующая эндогенная РНК.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ lncRNA ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ

Одним из первых этапов изучения роли lncRNA при АА является поиск дифференциально

экспрессирующихся генов (ДЭГ), кодирующих данный класс РНК. До середины 2010-х гг. подобного рода исследований на уровне транскриптома при АА практически не проводилось [49]. Поэтому к настоящему времени в связи с непродолжительным периодом исследований (менее 10 лет) опубликовано небольшое число работ, посвящённых анализу экспрессионных профилей lncRNA при АА (табл. 1).

При проведении транскриптомных исследований чаще исследовались образцы тканей аорты от пациентов с ААА, чем с ТАА, и реже анализировались lncRNA в образцах крови [50]. В целом, наблюдается большой разброс в оценках числа ДЭГ lncRNA и circRNA и в соотношении генов с повышенным и пониженным уровнем экспрессии в образцах от пациентов с данными патологиями (табл. 1).

Наибольшее число ДЭГ lncRNA (1105) зарегистрировано между тканями при спорадической форме ТАА и нормальной тканью аорты, причём наиболее часто регистрировали снижение экспрессии (954 lncRNA с порогом кратности различий < 0,5), по сравнению с увеличением (151 lncRNA с кратностью различий > 2,0) экспрессии генов lncRNA [52]. При расслоении грудной аорты и при аневризме восходящего отдела грудной аорты число зарегистрированных ДЭГ было меньше, и не столь выражены были различия по числу генов lncRNA с повышенным и пониженным уровнем экспрессии [46, 51]. В частности, 269 генов lncRNA были aberrантно экспрессированы (159 с повышенной и 110 с пониженной экспрессией) при расслоении грудной аорты человека [46], 147 – при ТАА (в том числе 104 были гипер- и 43 гипоекспрессированы) [51].

При ААА в ткани аорты число ДЭГ lncRNA превышало несколько тысяч, но меньшее их количество регистрировали для circRNA (табл. 1). Кроме того, изменённые профили экспрессии lncRNA при развитии ААА были установлены не только в ткани аорты [53–55], но и в крови пациентов, причём различия в образцах крови наблюдали между тремя группами сравнения: между пациентами с ААА до и после эндоваскулярного восстановления АА, а также между данными группами пациентов и индивидами с непоражёнными артериями [50]. В крови пациентов с АА регистрировали изменения и для других lncRNA: выявлено снижение в плазме крови пациентов с ТАА уровней lncRNA *LUCAT1* (уровень данной lncRNA снижался и в ткани аорты) и *SMILR* [63], увеличение в периферической крови пациентов с ААА уровней lncRNA *NEAT1* [64]. Более чем в 6 раз был повышен уровень *HIF1A-AS1* в крови пациентов с ТААА [65]. Эти данные указывают на то, что при развитии АА возможны системные изменения в профилях

Таблица 1. Дифференциальная экспрессия lncRNA и circRNA при аневризме аорты

Патология#	Объект исследования	lncRNA/circRNA*		
		всего ДЭГ	уровень экспрессии	
			повышен	снижен
РТА [46]	человек, ткань аорты	269	159	110
ТАА [51]	человек, ткань восходящей аорты	147	104	43
СТАА [52]	человек, ткань восходящей аорты	1105	151	954
ААА [53]	человек, ткань аорты	3688	1582	2106
ААА [54]	человек, ткань аорты, реанализ данных [53]	2093	896	1197
ААА [55]	человек, ткань аорты	2976	1352	1624
ААА [56]	человек, ткань аорты	2046	425	1621
ААА, 3 группы сравнения: N – норма; SQ – до эндоваскулярного восстановления АА; SH – после эндоваскулярного восстановления АА [50]	человек, кровь, 3 группы сравнения: SH – SQ – N	179		
	человек, кровь, SH – SQ	353	167	186
	человек, кровь, SH – N	341	214	127
	человек, кровь, SQ – N	327	216	111
	человек, кровь, 3 группы сравнения: SH – SQ – N	440*		
	человек, кровь, SH – SQ	138*	57*	81*
	человек, кровь, SH – N	162*	47*	115*
	человек, кровь, SQ – N	167*	71*	96*
ААА [57]	человек, ткань аорты	65*	30	35
Экспериментальная ААА [58]	мыши, ткань аорты	413*	271*	142*
ААА [59]/[60]/[61]/[62]	ткань аорты: GSE144431	27*/382*/517*/142*	17*/-/225*/-	10*/-/292*/-

Примечание. # Для всех случаев, за исключением специально отмеченных, сравнение проводилось между образцами с АА и без АА; РТА – расслоение грудной аорты; ТАА – аневризма торакальной аорты, СТАА – спорадические случаи аневризмы торакальной аорты, ААА – аневризма абдоминальной аорты. * Отмечены данные, полученные для circRNA; через «/» приведены оценки разных авторов исследований, полученные на основании анализа идентичных источников данных. GSE – номер первичных данных из Базы данных Национального центра биотехнологической информации по экспрессии генов (NCBI_GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

экспрессии регуляторных РНК (в том числе и lncRNA), выходящих за границы поражённых тканей.

Из приведённых материалов (табл. 1) следует, что число ДЭГ lncRNA и circRNA может существенно различаться по данным разных авторов. Оценки числа ДЭГ могут различаться в разных публикациях в связи со специфичностью использованных подходов и критериев для выделения таких генов (как это наблюдается для circRNA при

реанализе данных GSE – см. табл. 1), а также могут зависеть от клинических особенностей включённых в выборки пациентов. Wang J. et al. [58] в экспериментальной модели ААА у мыши при использовании в качестве критерия отнесения к ДЭГ кратности различий между сравниваемыми группами в пределах 2–5 раз регистрировали 186 circRNA с повышенным уровнем экспрессии и 109 circRNA – с пониженным, при кратности различий в 5–10 раз – 65 и 28 circRNA соответственно,

а при кратности различий более чем в 10 раз таких *circRNA* было выявлено 20 и 5 соответственно. При анализе подгрупп пациентов с ТАА с учётом сопутствующей патологии установлен более высокий уровень экспрессии *lncRNA lnc-HLTF-5* в подгруппе с гипертонией, чем в подгруппе без данной патологии [51].

В ряде транскриптомных исследований, наряду с анализом *lncRNA/circRNA*, оценивались изменения уровня экспрессии мРНК и микроРНК, что позволило выявить скоррелированные изменения уровней для различных типов РНК и установить потенциальные регуляторные сети. Так, на основании ДЭГ ткани аорты при спорадической ТАА была сформирована сеть, включающая 277 *lncRNA* и 50 мРНК (корреляция по уровню экспрессии составила $> 0,97$), которая состояла из 327 узлов и 514 связей (рёбер) [52]. Сеть, состоящая из 416 узлов и включающая 573 пары совместно экспрессирующихся *lncRNA* и мРНК, была сформирована для ДЭГ в ткани аорты при ААА, причём для 371 пары *lncRNA* и мРНК была характерна положительная, а для 202 пары – отрицательная корреляция по уровню экспрессии [53], что предполагает возможное участие данных *lncRNA* в формировании сетей *ceRNA*. В другом исследовании [50] для ДЭГ в ткани при ААА установлена сеть из 15 *lncRNA*, 63 микроРНК и 57 мРНК.

Tian L. et al. [54] создали две сети, отличающиеся по направленности изменений уровня экспрессии *lncRNA*, микроРНК и мРНК: одну сеть с «активирующей» регуляцией уровня мРНК при помощи *lncRNA* (повышен уровень мРНК и *lncRNA*, понижен уровень микроРНК) и вторую – с «ослабляющей» регуляцией (понижен уровень мРНК и *lncRNA*, повышен уровень микроРНК). «Активирующая» сеть *lncRNA*/микроРНК/мРНК содержала 38 *lncRNA*, 374 мРНК, 27 микроРНК и 2021 связь (ребро), тогда как сеть с «ослабляющей» регуляцией включала 28 *lncRNA*, 238 мРНК, 12 микроРНК и 729 рёбер.

На основании анализа профилей экспрессии наборов данных GSE57691 (образцы аорты от пациентов с ААА и здоровых доноров), представленных в базе Gene Expression Omnibus, были выявлены 9 дифференциально экспрессирующихся *lncRNA* [66]. Из числа этих *lncRNA* 5 (*TTTY7B*, *HCG27*, *MIAT*, *TTTY4C*, *SNHG3*) являлись узловыми в сети взаимодействия *lncRNA*/микроРНК/мРНК (сеть также включала 34 микроРНК, 112 мРНК и 275 рёбер (связей)). Несколько сетей были сформированы с участием *circRNA* для ДЭГ при ААА, их структура различалась по данным разных исследователей и была представлена следующими компонентами: 19 *circRNA*, 68 микроРНК и 36 мРНК [61]; 3 *circRNA*, 4 микроРНК и 17 мРНК [60]; 79 *circRNA*, 21 микроРНК и 49 мРНК [50].

Таким образом, при развитии АА вне зависимости от локализации патологического процесса регистрируют изменения по уровню экспрессии некодирующих регуляторных РНК. При этом наблюдается скоррелированность изменчивости уровня различных классов РНК, и с учётом структурных особенностей данных молекул были сформированы сети, в которых *lncRNA* и *circRNA* выступают в качестве *ceRNA*.

Формирование различных функциональных сетей между молекулами РНК разных классов (*lncRNA*, *circRNA*, микроРНК и мРНК) может отражать различные аспекты функционирования клеток и тканей, в том числе и универсальных, не связанных с развитием патологии. Поэтому важным этапом является выявление тех звеньев сети, которые значимы для развития или прогрессирования патологии. В дальнейшем среди ДЭГ *lncRNA/circRNA* и выявленных сетей взаимодействия был проведён поиск высокоспецифичных и/или функционально значимых для патогенеза АА различной локализации регуляторных РНК и патогенетически значимых метаболических путей, в которые они вовлечены [46, 52, 54, 55, 62].

СВЯЗЬ *lncRNA* И *circRNA* С ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМИ ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ ПОКАЗАТЕЛЯМИ

Развитие АА наблюдается вследствие изменения структурно-функциональных особенностей гладкомышечных и эндотелиальных клеток сосудов, ремоделирования внеклеточного матрикса и, в определённой степени, активации воспалительных процессов. Поэтому при аневризме на молекулярном уровне регистрируют патогенетически значимые изменения структуры генов и функционирования кодируемых ими белковых продуктов, связанных именно с данными компонентами аорты (табл. 2). Соответственно, можно ожидать, что именно на уровне данных клеток и молекул будут наблюдаться значимые регуляторные события с участием *lncRNA* и *circRNA*. Действительно, согласно как биоинформатическим, так и экспериментальным исследованиям, *lncRNA*, уровень которых меняется при развитии АА, потенциально (через формирование *ceRNA*-сетей) могут вовлекаться в регуляцию экспрессии генов, продукты которых участвуют в патогенезе данной ортопатии. Так, Tian L. et al. [54] установили, что при ААА пять ключевых *lncRNA* (взаимодействуют более чем с 5 различными микроРНК) с повышенным уровнем в ткани аорты (*NEAT1*, *CDKN2B-AS1*, *SCARNA10*, *AC005224.4*, *SEN3-EIF4A1*) участвуют в регуляции передачи сигнала, фосфорилировании аминокислот белков, в иммунном ответе,

Таблица 2. Патогенетически значимые для развития АА структурные компоненты, метаболические пути и биохимические маркеры (по литературным источникам [3, 6, 23, 49, 67])

Класс маркеров	Показатели
Основные структурные компоненты	– гладкомышечные клетки сосудов (ГМКС); – эндотелиальные клетки; – эластические волокна; – внеклеточный матрикс; – Т-, В-лимфоциты, макрофаги
Патологические процессы и проявления на молекулярном, клеточном и гистологическом уровнях	– апоптоз ГМКС и уменьшение количества ГМКС; – изменение функции ГМКС (переход с сократительного на синтетический фенотип); – накопление в ГМКС фибриллина, фибронектина и тенасцина, снижение уровня данных белков во ВКМ; – нарушение связи ГМКС с эластическими волокнами; – разрушение эластических, коллагеновых волокон и других белков ВКМ; – образование кистообразных пространств, заполненных базофильным мукоидным веществом, накопление коллагена и гликозаминогликанов, гиалина; – фиброз, кальцификация, внеклеточное отложение жирных кислот; – экспрессия эндотелиальными клетками межклеточной адгезивной молекулы-1 (ICAM-1) и адгезивной молекулы клеток сосудов-1 (VCAM-1); – усиление пролиферации эндотелиальных клеток; – инфильтрация стенки аорты Т- и В-лимфоцитами, макрофагами; – дилатация и образование аневризм грудного отдела
Сигнальные пути	TGF- β 1/Smad2/3, TGFBR1/2, TGFB2/3, NOTCH1, ANGII, PI3K/AKT, MAPK, NF- κ B, BMP, WNT/ β -катенина, Ras, Ca ²⁺ , кальмодулина, RapI, рецептора Т-клеток
Белки, кодируемые генами, патогенные варианты которых приводят к развитию АА	– ГМКС-специфичный альфа-актин, ACTA2; – коллаген 3-го типа {↓}, COL3A1; – фибриллин-1 {ГМКС ↑, ВКМ ↓}, FBN1; – тяжёлая цепь миозина 11, MYH11; – киназа лёгкой цепи миозина, MYLK; – cGMP-зависимая протеинкиназа типа I, PRKG1; – трансформирующий фактор роста β 2-го и 3-го типов, TGFB2 и TGFB3; – внутриклеточный TGF-бета-фактор, SMAD3; – рецепторы 1-го и 2-го типов к TGF-β, TGFBR1 и TGFBR2; – белок цитоскелета филамин А, FLNA; – член 10 облегчённых переносчиков глюкозы, семейства растворённых переносчиков 2, SLC2A10; – протоонкоген, SKI; – бигликан, BGN; – лизин-оксидаза, LOX
Белки с доказанной патогенетической значимостью на биохимическом уровне	– молекулы клеточной адгезии – селектин L {↑}, SELP (CD62L); селектин P {↑}, SELP (CD62); межклеточная адгезивная молекула-1 {↑}, ICAM-1; адгезивная молекула клеток сосудов-1 {↑}, VCAM-1; – протеазы и их ингибиторы – матриксные металлопротеиназы {↑} MMP2, MMP9, MMP1; катепсины {↑} B/D/K/S, CTSB/CTSD/CTSK/CTSS; тканевые ингибиторы металлопротеиназ {↓} 1 и 2, TIMP1 и TIMP2; активатор плазминогена, урокиназа {↑}, PLAU; активатор плазминогена тканевого типа {↑}, PLAT; цистатин С {↓}, CST3; – цитокины, хемокины, маркеры воспаления – представитель β-хемокинов, MCP-1 (CCL2) {↑}; интерлейкины {↑}: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23; фактор некроза опухоли-α, TNF-α {↑}; TNFα-конвертирующий фермент, TACE {↑}; – компоненты и функциональные молекулы внеклеточного матрикса – фибронектин, FN1 {в ГМКС ↑, во ВКМ ↓}; интегрин α5β1 {↓}, ITGA5; коллагеназа 1-го типа, MMP8 {↑}; коллаген 1-го типа, COL1A1 {↓}; трансформирующий фактор роста β, TGFB1 {↑}; инсулиноподобный фактор роста, IGF1 {↓}; белки 1-го {↑} и 3-го {↑} типов, связывающие IGF1, IGFBP-1 и IGFBP-3; – эндотелиальные клетки – тенасцин Х, TNXB {в ГМКС ↑, во ВКМ ↓}; фактор роста эндотелия сосудов В, VEGFB {↑}; – регуляторы неоангиогенеза – ангиопоэтины 1 и 2, ANGPT1 и ANGPT2; рецептор ангиопоэтинов 2, TEK

Примечание. {↑} и {↓} отмечены соответственно увеличение и снижение уровня указанных белков при развитии АА.

апоптозе/анти-апоптозе и других процессах, а lncRNA с пониженной экспрессией (*ZNRD1-AS1*) – в регуляции транскрипции, клеточной пролиферации, развитии мышц и сердца, дифференцировке клеток, адгезии между клеткой и матриксом.

При анализе обогащения дифференциально экспрессирующихся при AAA генов, включённых в ceRNA-сети, установлено, что повышенный уровень экспрессии (4 пары circRNA – мРНК) был характерен для генов, задействованных по генной онтологии (GO) в таких путях, как «иммунный ответ», «воспалительная реакция» и «активность хемокинов», по KEGG – «взаимодействие цитокин-цитокиновых рецепторов» и «сигнальный путь хемокинов», а пониженный уровень (5 пар circRNA – мРНК) наблюдали для генов, значимых для процессов «сокращение мышц», «Z-диск», «связывание актина», «сокращение гладких мышц сосудов» и «метаболизм тирозина» [62]. Среди генов с повышенной экспрессией были *CD8A*, кодирующие субъединицу α рецептора IL-10 (*IL10RA*), семафорин 4A (*SEMA4A*) и белок, индуцирующий миграцию клеток и связывающий гиалуронан (*CEMIP*), среди генов с пониженной экспрессией – *ATON8*, *PRUNE2*, кальпонин 1 (*CNN1*), транскрипционный фактор *ZBTB16*, склеростин (*SOST*), *TMEM47*, *FBXO32* и ядерный фактор 1A (*NF1A*) [62]. Продукты, кодируемые данными генами, вовлечены в разнообразные метаболические пути, в том числе и значимые для патогенеза АА.

Транскрипционный фактор АТОН8 участвует в регуляции дифференцировки эндотелиальных клеток, *SEMA4A* является активатором Т-клеточного иммунитета и подавляет опосредованные фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток (*in vitro*) и ангиогенез (*in vivo*), *PRUNE2* вовлечён в процессы апоптоза, трансформацию клеток и синаптические функции, *CNN1* регулирует пролиферацию ГМКС, *TMEM47* – организацию клеточных соединений в эпителиальных клетках, *CEMIP* – эпителиально-мезенхимальный переход (источники: База данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [68]).

По данным Wang S. et al. [57], дифференциально экспрессирующиеся circRNA в ткани аорты при AAA потенциально значимы для регуляции генов, задействованных в биологических процессах «клеточная адгезия», «воспалительная реакция», «организация ВКМ», «разборка ВКМ», «регуляция разборки ВКМ» и «регуляция сборки ВКМ», основными клеточными компонентами были «ВКМ», «клеточное соединение», «белки ВКМ» и «внеклеточная область», по KEGG обогащены пути, связанные с ВКМ, включая сигнальный путь TNF, сигнальный путь NF- κ B, взаимодействие ЕСМ-рецептора и сигнальный путь PI3K-Akt.

По данным Nie H. et al. [66], при AAA пять дифференциально экспрессирующихся lncRNA (*TTTY7B*, *HCG27*, *MIAT*, *TTTY4C*, *SNHG3*), включённых в ceRNA-сети, участвуют в трансляции генов, кодирующих продукты, вовлечённые в связывание белков, передачу сигнала, транскрипцию ДНК и РНК, развитие и дифференцировку клеток. В ткани аорты пациентов с AAA зарегистрирован повышенный уровень экспрессии lncRNA *NUDT6*, для которой *in vitro* показано, что сверхэкспрессия нарушает миграцию ГМКС, ограничивает их пролиферацию и усиливает апоптоз [69].

Наряду с результатами биоинформатического анализа на основании данных транскриптомных исследований, о потенциальной значимости отдельных lncRNA и circRNA в патогенезе АА могут свидетельствовать данные об их вовлечённости в функционирование ключевых клеточных участников патогенеза при развитии данной патологии. Например, установлено, что lncRNA *ANRIL* (известна также как *CDKN2B-AS1*) регулирует экспрессию генов, функционально связанных с ГМКС, *SENCR* ингибирует их миграцию, *LncAng362* (в настоящее время известна как *MIR222HG*) регулирует пролиферацию, *HIF1A-AS1* оказывает проапоптотический и антипролиферативный эффект на данные клетки (цит. по Duggirala et al. [49]). В дальнейшем значимость данных lncRNA в развитии АА получила подтверждение в других исследованиях. Так, установлено повышение уровня *HIF1A-AS1* в сыворотке пациентов с ТАА [70], в тканях аорты при ТАА [71] и при ТААА [65]. Подтверждено участие данной lncRNA в регуляции пролиферации, апоптоза и активности белков внеклеточного матрикса в ГМКС [65, 71, 72]. В частности, *in vitro* показано, что подавление *HIF1a-AS1* влияет на уровень апоптотических белков (приводит к снижению уровня экспрессии каспазы 3 и каспазы 8 и к повышению экспрессии *Bcl2*), защищает от апоптоза и стимулирует пролиферацию ГМКС, что указывает на участие данной lncRNA в патогенез ТААА [65].

В ряде исследований установлена вовлечённость lncRNA в детерминацию уровня матричных металлопротеиназ. Металлопротеиназы, в том числе и MMP2, являются важными участниками патогенеза АА [73, 74]. Повышение уровня MMP2 рассматривается в качестве ключевого события, происходящего во время развития ААА [74]. Среди дифференциально экспрессирующихся при АА – lncRNA *ENSG00000260135* (*MMP2-AS1*), являющаяся антисмысловым транскриптом для *MMP2* [46]. Уровень данной lncRNA повышен в ткани аорты при ТАА и расслоении аорты [75]. Ещё одна lncRNA, *RP11-465L10.10* (известна как *SLC12A5-AS1* и *MMP9 antisense RNA 1*), влияет на экспрессию *MMP9* через сигнальный путь NF- κ B и индуцирует

переключение фенотипа ГМКС с сократительного на синтетический [76].

Антисмысловые РНК часто вовлекаются в регуляцию экспрессии как своих генов-хозяев, так и других генов с помощью различных молекулярных механизмов [77]. В экспериментах *in vivo* (на мышинной модели ААА) и *in vitro* (на ГМКС аорты мыши) установлено, что при ААА уровень lncRNA *SENCR* снижен, тогда как сверхэкспрессия данной lncRNA не только подавляла апоптоз ГМКС, но и способствовала снижению экспрессии генов матриксных металлопротеиназ *MMP2* и *MMP9*, в то время как экспрессия тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (*TIMP-1*) увеличивалась (вследствие чего подавлялась деградация ВКМ), что приводило к ингибированию образования ААА [78].

Известны и другие lncRNA, участвующие в регуляции уровня матричных металлопротеиназ, в том числе *PVT1*. У человека и на модельных объектах при ААА в ткани аорты регистрировали увеличение уровня lncRNA *PVT1*, что сопровождалось усилением апоптоза ГМКС, разрушением ВКМ и переключением фенотипа ГМКС [79]. На мышинной модели показано, что подавление lncRNA *PVT1* отменяло вызванное ангиотензином II (AngII) развитие ААА, что сопровождалось ослаблением деградации ВКМ и воспаления, а также улучшением биохимических показателей (снижались уровни белков *MMP-1*, *MMP-9*, а также *TNF-α*, *IL-1β* и *IL-6*, увеличивался уровень *TIMP-1*) [79].

Под контролем lncRNA находятся и другие звенья патогенеза АА. lncRNA *CRNDE* подавляется в тканях ААА и AngII-стимулированных ГМКС (модель развития АА *in vitro*), а сверхэкспрессия данной lncRNA способствует пролиферации ГМКС и ингибирует клеточный апоптоз в ААА путём регуляции *Smad3* при участии *Bcl-3* (lncRNA *CRNDE*, связанная с *Bcl-3*, регулирует убиквитинирование *Smad3*) [80].

Для lncRNA *H19* характерен повышенный уровень экспрессии в образцах ткани аорты (у человека и у мышей) [81]. Сверхэкспрессия *H19 in vivo* усиливала сосудистое воспаление и индуцировала образование ААА, что подтверждалось ухудшением морфологии аорты, максимальными значениями диаметра аорты, деградацией эластина, экспрессией интерлейкина-6 (*IL-6*) и макрофагального хемоаттрактантного белка-1 (*MCP-1*) и макрофагальной инфильтрацией, тогда как подавление *H19* приводило к противоположным эффектам [81]. При нокдауне *HOTAIR* регистрировали снижение экспрессии коллагена I и III типов на уровне как мРНК, так и белка (что указывает на вовлечённость данной lncRNA в ремоделирование ВКМ), а также наблюдали апоптоз и снижение пролиферации клеток [52].

Сверхэкспрессия lncRNA *GAS5* индуцировала апоптоз ГМКС и подавляла их пролиферацию, тем

самым благоприятствуя образованию ААА в мышинных моделях [82], а *circCdy1* способствовала развитию CaCl_2 - и AngII-индуцированных ААА через поляризацию M1 и развитие воспаления M1-типа путём связывания *IRF4* и ингибирования его проникновения в ядро клетки [83].

В некоторых исследованиях показано изменение уровня lncRNA в ответ на воздействие эндогенных факторов, значимых при развитии АА, а также взаимодействия между lncRNA и генами, патогенные варианты которых способствуют развитию АА [84–86]. Так, в крови пациентов с синдромом Лоеса–Дитца (при котором часто развивается ТАА) сверхэкспрессируется lncRNA *AK056155*, причём экспрессия данной lncRNA усиливалась при воздействии $\text{TGF-}\beta 1$ (показано *in vitro*) [87] – одного из ключевых участников патогенеза ТАА на молекулярном уровне [88].

Установлена положительная корреляция по уровню экспрессии между lncRNA *ENSG00000269936* и *MAP2K6* (повышен уровень), а также между lncRNA *1421* и *FBLN5*, *ACTA2*, *TIMP3* (понижен уровень) у пациентов с расслоением грудной аорты [46]. Гены *FBLN5* и *ACTA2* (кодируют белки, участвующие в сокращении гладкомышечных клеток) с пониженной экспрессией отнесены к категории генетически и/или эпигенетически значимых для риска развития АА [21], а для гена *ACTA2* описаны патогенные варианты с доказанной значимостью для развития ТАА [89].

Приведённые в настоящем разделе данные свидетельствуют о том, что ДЭГ lncRNA и circRNA задействованы в широком спектре патогенетически значимых для развития АА процессов. Отмечается также связь уровня lncRNA и circRNA с клиническими и диагностически значимыми для АА показателями. Li Y. et al. [51] установлена положительная корреляция уровня lncRNA *HLTF-5* с расширенным диаметром восходящей аорты и уровнем *MMP9* у пациентов с ТАА. У пациентов со спорадической ТАА в поражённой ткани восходящего отдела аорты регистрировали снижение уровня lncRNA *HOTAIR*, и её уровень отрицательно коррелировал с диаметром аорты [52]. Морфологические особенности аорты зависели от уровня lncRNA *H19* [81].

Клиническая значимость lncRNA показана и на модельных объектах (на мышах). Нокдаун lncRNA *PVT1* (уровень которой повышен в ткани аорты при ААА) обращал вспять вызванные AngII изменения, связанные с ААА (такие как расширение диаметра аорты, утолщение адвентиции, потеря эластина в аорте, усиленный апоптоз клеток аорты, повышение уровня *MMP2*, *MMP9*, снижение уровня *TIMP-1*, увеличение уровня провоспалительных цитокинов) [79]. Усиление экспрессии *circChordc1* (уровень которой снижен в ткани аорты при ААА) вызывало существенное уменьшение

максимального диаметра брюшной аорты, и в группе со сверхэкспрессией данной кольцевой РНК практически не регистрировались случаи развития ААА и разрыва аорты [90].

Таким образом, получены убедительные данные о вовлечённости lncRNA и circRNA в регуляцию патогенетически значимых для развития АА метаболических путей и функционирование ключевых структурных компонент аорты. Поэтому важной представляется детализация молекулярных механизмов, через которые реализуется участие данных регуляторных молекул в патогенезе ААА и ТАА.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПАТОФИЗИОЛОГИЯ АНЕВРИЗМЫ АОРТЫ С УЧАСТИЕМ lncRNA И circRNA

Молекулярные процессы с участием lncRNA и circRNA описаны для различных патогенетически значимых звеньев и процессов развития АА, в том числе следующих: дисфункция ГМКС; переключение фенотипа ГМКС с сократительного на синтетический; нарушение миграции и дифференцировки ГМКС; дисфункция эндотелиальных клеток; жизнеспособность, пролиферация, апоптоз ГМКС; деградация ВКМ; воспалительная реакция;

Таблица 3. Функциональные взаимодействия между lncRNA и другими молекулами при АА

Исследуемые группы, ткани, клетки*	Сети ceRNA (lncRNA/микроРНК/мРНК) и другие молекулярные взаимодействия lncRNA	Чувствительные к изменению уровня lncRNA патогенетически значимые звенья и процессы
ТАА с мутациями в генах сигнального пути TGF-β и цитоскелета, ГМКС [88]	HDAC9 + MALAT1 [NEAT1] ↑ + BRG1 [SMARCA4]	дисфункция ГМКС ↑, экспрессия генов сократительных белков ↓
ТАА, ГМКС аорты, первичные ГМКС аорты [91]	NEAT1 ↑/miR-324-5p/RAN	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ТАА, кровь, ГМКС, ткань аорты [92]	XIST ↑/miR-193a-5p/KLF7	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ГМКС (крысы, мыши, человек) [93]	Xist ↑/miR-29b-3p/Eln	апоптоз ↑
ТАА, ГМКС [46]	XIST ↑/hsa-miR-17-5p/p21	пролиферация
Синдром Лоеса–Дитца, эндотелиальные клетки периферической крови [87]	TGF-β1 [TGFB1] → AK056155	риск формирования АА через сигнальный путь АКТ/PI3K
ТАА, ГМКС аорты [94]	LOXL1-AS ↑ → Giver ↑	пролиферация ↑, апоптоз ↓ (экспрессия Bcl-2 ↑)
ТАА, ткани аорты [95]	MIAT ↑/miR-145/p-Akt (сигнальный путь PI3K/Akt)	жизнеспособность клеток ↑, апоптоз ↓ (экспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 ↑ и Bcl-xl ↑)
ТАА, ткань аорты, сыворотка, ГМКС [96]	H19 ↑/miR-1-3p/ADAM10	пролиферация ↓, апоптоз ↑, деградация ВКМ ↑
ТАА, ГМКС [71]	HIF1A-AS1 ↑/let-7g/APAF1	пролиферация ↓, апоптоз ↑, деградация ВКМ ↑ (экспрессия белков ВКМ)
ТАА, медиа аорты [72]	BRG1 [SMARCA4] ↑ → HIF1A-AS1 ↑; BRG1 [SMARCA4] + HIF1A-AS1	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ТАА, сыворотка, ГМКС [70]	HIF1A-AS1 ↑/.../CASP3 ↑, CASP8 ↑, Bcl2 ↓	пролиферация ↓, апоптоз ↑

Таблица 3 (продолжение)

Исследуемые группы, ткани, клетки*	Сети ceRNA (lncRNA/микроРНК/мРНК) и другие молекулярные взаимодействия lncRNA	Чувствительные к изменению уровня lncRNA патогенетически значимые звенья и процессы
ТАА/РА, ткань сосудов, ГМКС [76]	RP11-465L10.10 [SLC12A5 и MMP9 antisense RNA 1] ↑/.../MMP9 (через сигнальный путь NF-κB)	переключение фенотипа ГМКС с сократительного на синтетический
ТАА, ткань аорты [55]	RP11-465L10.10 [SLC12A5 и MMP9 antisense RNA 1] ↑ + NF-κappaBp50 + MZF1/.../MMP9	–
Модель ТАА <i>in vivo</i> (мышь Fbn1C1039G/+), ГМКС аорты [97]	Sox2ot ↑/ <i>mmu</i> -miR-330-5p/ <i>Myh11</i>	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ТАА, ГМКС [98]	HOXA-AS2 ↑/miR-520d-3p/ KIAA1522 [NHSL3] ; HOXA-AS2 + IGF2BP3 → стабилизация мРНК KIAA1522 [NHSL3]	дифференцировка клеток, пролиферация ↑, апоптоз ↓
ААА, ГМКС [99]	LUCAT1 ↑/miR-199a-5p/MYRF	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ААА, ГМКС, кровь [64]	NEAT1 ↑/miR-30d-5p/ADAM10	пролиферация ↓, апоптоз ↑, воспалительная реакция ↑ (TNF-α ↑, IL-6 ↑, IL-1β ↑); окислительный стресс ↑
ААА, ГМКС [100]	STAT3 ↑ → NEAT1 ↑/miR-4688/TULP3	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ААА, эндотелиальные клетки [85]	(IL-6 + ERK [MAPK1]) → MALAT1 [NEAT1] ↑/ ... /NOX2 [CYBB]	дисфункция эндотелиальных клеток ↑
ААА, ГМКС [66]	SNHG5 ↓/miR-205-5p/SMAD4	пролиферация ↓, миграция ↓, апоптоз ↑
Модель ААА, ГМКС (мышь) [101]	XIST ↑/miR-762/MAP2K4	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ААА, сыворотка [102]	XIST ↑/miR-1264/WNT5A (регуляция сигнального пути WNT/β-катенин)	пролиферация ↓, апоптоз ↑
Модель ААА, ГМКС (мышь) [79]	PVT1 ↑/ ... /MMP2 ↑, MMP9 ↑, TIMP1 ↓	апоптоз ↑, разрушение ВКМ ↑, переключение с сократительного на синтетический фенотип ГМКС, усиление воспаления (TNF-α ↑, IL-1β ↑ и IL-6 ↑)
ААА, ткань аорты, ГМКС [103]	PVT1 ↑/miR-3127-5p/NCKAP1L	пролиферация ↓, апоптоз ↑, воспаление ↑
РА/ГМКС аорты человека [104]	PTENP1 ↑/miR-21/PTEN → Akt ↓ (сигнальный путь PI3K/Akt)	пролиферация ↓, апоптоз ↑
Модель ААА, ткань аорты, ГМКС (мышь) [78]	SENCR ↓/.../MMP2 ↑, MMP9 ↑, TIMP1 ↓	апоптоз ↑, разрушение ВКМ ↑
ААА, ткань аорты, ГМКС (человек, мышь) [81]	H19 ↑/let-7a/IL-6	воспаление сосудов ↑, MCP-1 ↑, IL-6 ↑, ухудшение морфологии аорты, диаметр аорты ↑, деградация эластина ↑, макрофагальная инфильтрация ↑
Модель ААА, ГМКС (мышь, мини-свиньи) [105]	(H19 ↑ + Sp1) → (HIF1α ↑ + Mdm2) → p53↑	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ААА, ГМКС (человек, мышь) [69]	NUDT6 ↑ + CSRП1 ↓ ... FGF2 ↓, αSMA [ACTA2] ↓	нарушение миграции и дифференцировки ГМК, пролиферация ↓, апоптоз ↑

Таблица 3 (окончание)

Исследуемые группы, ткани, клетки*	Сети ceRNA (lncRNA/микроРНК/мРНК) и другие молекулярные взаимодействия lncRNA	Чувствительные к изменению уровня lncRNA патогенетически значимые звенья и процессы
Модель AAA, ГМКС (мышь) [106].	Sox2ot ↑/miR-145/Egr1	окислительный стресс ↑, воспаление ↑, апоптоз ↑
AAA, ткань аорты (человек, мышь) [82]	GAS5 ↑/miR-21 ↑/PTEN ↑/Akt ↓; YBX1 ↑ → (GAS5 ↑ + YBX1 ↑) → p21 ↑ (более значимый путь); HIF-1α [HIF1A] ↑ → GAS5 ↑	пролиферация ↓, апоптоз ↑
ГМКС [107]	LBX2 → LBX2-AS1 ↑/miR-4685-5p/LBX2 ↑	пролиферация ↓, апоптоз ↑
AAA, макрофаги THP-1 [108]	circ0087352 ↑/hsa-miR-149-5p/IL-6, CCL2, TNF-α, IL-1β, NF-κB (сигнальный путь ERK/NF-κB, фосфорилирование IκB и NF-κB p65)	воспалительная реакция макрофагов ↑, апоптоз ↑
AAA, ткани аорты, ГМКС после воздействия Ang-II [109]	circFNDC3B ↑/miR-143-3p/ADAM10	воспаление ↑, IL-6 ↑, TNF-α ↑, апоптоз ↑, окислительный стресс ↑, пролиферация ↓
AAA, ткань аорты, ГМКС [110]	circ0002168 ↓/miR-545-3p/CKAP4	пролиферация ↓, апоптоз ↑
AAA (человек, мышь) [90]	circChordc1 ↓ + (ANXA2 ↓) → ослабление связывания ANXA2 + GSK3β [GSK3B]; ↑ взаимодействие GSK3β/β-катенин (↑ сигнальный путь GSK3β/β-катенин); circChordc1 ↓ + (виментин ↑)	пролиферация ↓, апоптоз ↑, α-SMA [ACTA2] ↓, каспаза 3 ↑, PH3 ↓; переключение фенотипа ГМКС (↓ сократительные маркеры, в т.ч. SM22 и кальпонин; ↑ экспрессия синтетических маркеров, в т.ч. виментина и остеопонтина)
AAA, ткани аорты, макрофаги, ГМКС, эндотелиальные клетки [83]	circCdy1 ↑/let-7c/C/EBP-δ [CEBPD]; circCdy1 ↑ + IRF4 → ингибирование входа IRF4 в ядро → поляризация M1	воспаление сосудов ↑, поляризация M1 ↑
AAA, ГМКС [111]	circCCDC66 ↑/miR-342-3p/CCDC66	пролиферация ↓, апоптоз ↑
AAA, ткани аорты [57]	circRBM33 ↑/miR-4268/EPHB2	усиление деградации ВКМ; MMP2 ↑; TIMP1 ↓
AAA, ткань аорты, модель AAA <i>in vitro</i> [112]	LINC00473 ↑/miR-212-5p/BASP1	пролиферация ↓, апоптоз ↑

Примечание. * Во всех случаях, кроме специально отмеченных, исследования проводились на биологических образцах от пациентов с аневризмой аорты (АА); ТАА – торакальная аневризма аорты; РА – расслоение аорты, ААА – абдоминальная аневризма аорты; ГМКС – гладкомышечные клетки сосудов; ВКМ – внеклеточный матрикс. Жирным шрифтом выделены lncRNA; lncRNA/микро-РНК/мРНК – ceRNA-сеть; «→» отмечено влияние одного маркера (взаимодействия маркеров) на другой; «↑» и «↓» указано направление изменения уровня lncRNA при АА, наблюдаемых *in vivo* или *in vitro*, а также направление изменения патогенетически значимых процессов при соответствующем изменении уровня lncRNA. В таблице приведены авторские обозначения lncRNA и белков, в квадратных скобках указаны принятые в настоящее время обозначения генов. «/.../» обозначены случаи наличия неизвестных промежуточных звеньев. Знаком «+» отмечены взаимодействия или совместные эффекты для указанных молекул.

макрофагальная инфильтрация; окислительный стресс; ухудшение морфологии стенки аорты (табл. 3, рисунок). В целом, клеточные компоненты, процессы (и участвующие в них молекулы), в которые вовлечены lncRNA и circRNA (табл. 3), согласуются с патогенетическими маркерами развития АА (табл. 2).

На молекулярном уровне установлены различные взаимодействия lncRNA (формирование сетей ceRNA; взаимодействие с другими lncRNA, белками, в том числе задействованными в эпигенетических модификациях) и механизмы (регуляция транскрипции, трансляции, стабилизация мРНК и других процессов, значимых для различных

H19/let-7a/IL-6 [81], *Sox2ot/miR-145/Egr1* [106] и др.), с активацией дегградации ВКМ (*H19/miR-1-3p/ADAM10*, *H19/let-7a/IL-6* [81] и др. (табл. 3, рисунок).

Следует отметить несколько принципиальных моментов реализации эффектов lncRNA, в том числе и через ceRNA-сети (табл. 3, рисунок).

Во-первых, одна и та же lncRNA может приводить к аналогичным патологическим процессам посредством вовлечённости в разные ceRNA-сети, не только при АА разной, но и одной и той же локализации, как это было показано, в частности, для lncRNA *NEAT1*. Так, на апоптоз и пролиферацию ГМКС при ААА оказывали влияние ceRNA-сети *NEAT1/miR-4688/TULP3* [100] и *NEAT1/miR-30d-5p/ADAM10* [64], при ТАА – *NEAT1/miR-324-5p/RAN* [91].

Во-вторых, одна и та же lncRNA может вовлекаться в разные патологические процессы. Например, сети *H19/miR-1-3p/ADAM10* [96] и *HIF1A-AS1/let-7g/APAF1* [71] значимы не только для регуляции пролиферации и апоптоза, но и для дегградации ВКМ при ТАА, а сеть *PVT1/miR-3127-5p/NCKAP1L* в ткани аорты при ААА – для регуляции пролиферации, апоптоза, воспаления [103].

Уровень матричных металлопротеиназ (включая MMP2, MMP9 и др.) оказался зависим от разных lncRNA, в том числе: *ADAM10* – от *H19*, *NEAT1* и *circFNDC3B*, а MMP2 и/или MMP9 – от *RP11-465L10.10* (*MMP9 antisense RNA 1*), *PVT1*, *SENCR* (детали – см. табл. 3). С другой стороны, *circ0005073* может связываться с рядом микроРНК (*miR-635*, *miR-527*, *miR-520h*, *miR-938* и *miR-518a-5p*) и тем самым влиять на уровень транскрипции разных белков – CCL2, SPP1 и UBA52 [59].

В-третьих, lncRNA чувствительны к воздействию различных молекулярных стимулов. Например, на уровень экспрессии lncRNA *NEAT1* (формирует ceRNA-сеть *NEAT1/miR-4688/TULP3* в ГМКС) влияет STAT3, действующий в качестве фактора транскрипции [100]. В некоторых случаях установлены петли положительной обратной связи, способствующие развитию АА. Так, показано, что lncRNA *LBX2-AS1* секвестрирует *miR-4685-5p*, способствуя тем самым экспрессии *LBX2* через механизм ceRNA, при этом *LBX2* может действовать как активатор транскрипции *LBX2-AS1* [107]. В то же время даже при взаимодействии одной lncRNA с одной микроРНК может наблюдаться каскад биохимических изменений [82, 108].

Помимо реализации своей функции через ceRNA-сети, lncRNA вовлечены в патогенетические звенья посредством взаимодействия с белками или вовлекаясь в регуляцию уровня других lncRNA. Например, повышенный апоптоз ГМКС связан с цитоплазматическим взаимодействием между lncRNA *H19* и гипоксически индуцируемым фактором 1α (HIF1α) и последующей стабилизацией

p53, при этом в ядре клетки *H19* усиливает транскрипцию HIF1α посредством рекрутирования Sp1 в его промоторную область (установлены два сайта связывания Sp1: -66 и -79) [105]. Иными словами, значимые эффекты lncRNA *H19* в отношении АА реализуются через взаимодействие с молекулами различных функциональных классов как в цитоплазме, так и в ядре клетки [105].

Для ДЭГ *RP11-465L10.10* (*MMP9 antisense RNA 1*) установлено взаимодействие с MZF1, который является фактором транскрипции *MMP9* [55]. *circCdy1* не только формирует ceRNA-сеть *circCdy1/let-7c/C/EBP-δ* (*CEBPD*) в макрофагах, вызывая поляризацию M1, но и, взаимодействуя с регуляторным фактором интерферона 4 (IRF4), ингибирует его вход в ядро, что способствует развитию ААА [83]. *circChordc1*, уровень которой существенно снижен в ткани АА по сравнению с интактными артериями, за счёт связывания с виментином (VIM) и ANXA2 способна оптимизировать фенотип ГМКС, стимулировать рост данных клеток путём индукции дегградации виментина и повышая активность пути GSK3β/β-катенина, что, в свою очередь, приводит к ослаблению ремоделирования стенки сосудов и препятствует прогрессированию АА [90].

В ГМКС lncRNA *HOXA-AS2* посредством рекрутирования IGF2BP3 способствует стабильности мРНК ещё одной lncRNA – *KIAA1522* [98]. Сверхэкспрессия lncRNA *LOXL1-AS* приводит к увеличению уровня другой lncRNA – *Giver* в ГМКС аорты человека (но избыточная экспрессия *Giver* не влияет существенно на уровень *LOXL1-AS*), при этом сверхэкспрессия данных lncRNA (*LOXL1-AS* и *Giver*) приводит к усилению пролиферации и ингибированию апоптоза ГМКС аорты человека [94].

Кроме того, являясь участниками эпигенетических процессов, lncRNA вовлекаются в эпигенетические события на других уровнях. *In vitro* показано, что lncRNA *HIF1A-AS* во взаимодействии со сверхэкспрессирующимся в меди аорты с ТАА ферментом ремоделирования хроматина BRG1 играет ключевую роль в регуляции пролиферации и апоптоза ГМКС, что, по мнению авторов, указывает на потенциальную значимость данного комплекса и входящей в его состав lncRNA *HIF1A-AS* в патогенезе аневризмы грудной аорты [72].

BRG1 вовлечён и в другие молекулярные сети с участием lncRNA. Так, установлено, что патогенные для АА варианты, приводящие к нарушению передачи сигналов TGF-β и/или цитоскелета ГМКС, приводят к образованию тройного комплекса, включающего гистоновую деацетилазу HDAC9, фермент ремоделирования хроматина BRG1 и lncRNA *MALAT1* [88]. При наличии патогенетически значимых вариантов в генах АА p.G357W *TGFR2* и p.R179H *ACTA2* наблюдали селективное

связывание данного тройного комплекса (HDAC9, BRG1 и *MALAT1*) с промоторами смубелина-1 (*SMTN1*), кальпонины (*CNN1*), винкулина (*VCL1*) и трансгелина (*SM22a*) [88].

Следует отметить, что для АА разной локализации – ТАА и ААА – наблюдалось перекрывание как между lncRNA (*LUCAT1*, *NEAT1*, *XIST*, *H19*, *Sox2ot*), так и регулируемыми ими не только процессами (пролиферация, апоптоз), но и молекулярными маркерами (белками – MMP2, MMP9, ADAM10, TIMP1, микроРНК – *miR-145*), но на настоящий момент не зарегистрировано полностью идентичных молекулярных путей, в частности, ceRNA-сетей (табл. 3, рисунок). Это согласуется с данными о различиях по значимости этиологических факторов в развитии ТАА и ААА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, посвящённые изучению длинных некодирующих/кольцевых РНК в патогенезе АА, имеют недавнюю историю – менее 10 лет. В то же время уже опубликован ряд обзорных работ, посвящённых анализу lncRNA при АА различной локализации [5, 30, 36, 49, 113, 114]. В данных обзорах рассматриваются либо отдельные lncRNA, либо длинные некодирующие РНК наряду с другими эпигенетическими маркерами. Так, в обзоре Gareev et al. [113] приводится сводка по 12 lncRNA, значимых для развития АА (5 lncRNA – для ТАА, 6 – для ТАА, 1 – для ТААА), но анализируются они с точки зрения их включённости в патогенез внутричерепных аневризм (в том числе и через возможную вовлечённость в регуляцию факторов риска данной патологии). Сравнение спектра lncRNA, значимых для АА различной локализации, в другой обзорной работе [114] также ограничивалось единичными молекулами данного класса: для ТАА – 6 lncRNA, для ААА – 8 lncRNA. В недавней публикации [36] рассматривалась роль lncRNA в развитии ААА наряду с другими эпигенетическими факторами. Во всех этих обзорах отмечается важная роль lncRNA в развитии данных аортопатий и актуальность продолжения подобного рода исследований.

Информация, приведённая в настоящем обзоре, свидетельствует о том, что происходит быстрое накопление данных как по спектру lncRNA и circRNA, уровень которых изменяется в поражённой ткани и в крови у пациентов с АА различной локализации, так и по перечню метаболических путей и клеточных процессов, в которые они вовлечены (что показано с использованием биоинформатических и экспериментальных подходов).

Несмотря на определённое сходство в клинической картине развития ТАА и ААА, а также общ-

ность для данных аортопатий некоторых ключевых патогенетических изменений на клеточном и молекулярном уровне (даже идентичность lncRNA и биохимических показателей, уровень которых изменяется при развитии патологии), до настоящего времени не выявлено полностью идентичных ключевых звеньев патогенеза (в частности, ceRNA-сетей). Это может быть связано как со специфичностью эмбрионального происхождения клеток различных регионов аорты, особенностями вклада различных этиологических факторов в риск развития ТАА и ААА, так и в целом с непродолжительностью исследований lncRNA при АА разной локализации.

В то же время уже сейчас полученные данные позволили авторам предложить ряд lncRNA и circRNA в качестве диагностических маркеров АА и перспективных мишеней для разработки новых лекарственных препаратов. В качестве диагностических маркеров при ААА предлагают использовать *ENST00000566954*, *ENST00000580897*, *T181556* [97]. Сниженный уровень lncRNA *LUCAT1* в плазме крови рассматривается в качестве перспективного диагностического маркера для выявления пациентов с ТАА [63]. Диагностической значимостью при ТАА и расслоении грудной аорты может обладать lncRNA *XIST* (особенно у мужчин, так как в норме данная lncRNA не выявляется) [46, 92].

Обсуждаются возможности разработки на основе некоторых lncRNA новых лекарственных препаратов для лечения АА [55, 78, 91]. Например, для лечения ТАА предлагают использовать lncRNA *Malat1* [88], *LINC00473* [97], *NEAT1* [91], *H19* [81, 96]. lncRNA *SNHG5* [66] рассматривают в качестве многообещающей мишени для терапии ААА, *RP11-465L10.10* – для лечения ТАА и её расслоения [76]. Маркеры, входящие в ceRNA-сеть с участием *hsa_circ_0081968*, *hsa_circ_0005073*, *hsa_circ_0011449* [60], а также ceRNA-сеть *PVT1/miR-3127-5p/NCKAP1L* [103], вызвали интерес исследователей с точки зрения разработки на их основе препаратов для лечения аневризм брюшной аорты.

Список кандидатных lncRNA и circRNA для диагностики АА различной локализации и разработки на их основе новых лекарственных препаратов не ограничен приведёнными выше. Более того, можно ожидать, что в ближайшие годы будет продолжен как поиск новых регуляторных РНК, информативных для данных целей, так и разработка на их основе лекарственных препаратов.

Вклад авторов. А.Н. Кучер – работа с источниками, дизайн статьи, написание текста статьи; Ю.А. Королёва – работа с текстом статьи и оформление; М.С. Назаренко – идея обзора, общая концепция, работа с текстом.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 122020300041-7.

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.Н. Осипенко за помощь в оформлении иллюстрации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clouse, W. D., Hallett, J. W. J., Jr, Schaff, H. V., Gayari, M. M., Ilstrup, D. M., and Melton, L. J., 3rd (1998) Improved prognosis of thoracic aortic aneurysms: a population-based study, *JAMA*, **280**, 1926-1929, doi: 10.1001/jama.280.22.1926.
2. Gillum, R. F. (1995) Epidemiology of aortic aneurysm in the United States, *J. Clin. Epidemiol.*, **48**, 1289-1298, doi: 10.1016/0895-4356(95)00045-3.
3. Isselbacher, E. M., Preventza, O., Hamilton Black, J., 3rd, Augoustides, J. G., Beck, A. W., et al. (2022) 2022 ACC/AHA guideline for the diagnosis and management of aortic disease: a report of the american heart association/american college of cardiology joint committee on clinical practice guidelines, *Circulation*, **146**, e334-e482, doi: 10.1161/CIR.0000000000001106.
4. Golledge, J., Krishna, S. M., and Wang, Y. (2022) Mouse models for abdominal aortic aneurysm, *Br J. Pharmacol.*, **179**, 792-810, doi: 10.1111/bph.15260.
5. Li, Y., and Maegdefessel, L. (2017) Non-coding RNA contribution to thoracic and abdominal aortic aneurysm disease development and progression, *Front. Physiol.*, **8**, 429, doi: 10.3389/fphys.2017.00429.
6. Пальцева, Е. М. (2015) Аневризмы аорты: этиология и патоморфология, *Молекулярная медицина*, **4**, 3-10.
7. Quintana, R. A., and Taylor, W. R. (2019) Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation, *Circ. Res.*, **124**, 607-618, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313187.
8. Bararu Bojan Bararu, I., Pleșoianu, C. E., Badulescu, O. V., Vlădeanu, M. C., Badescu, M. C., et al. (2023) Molecular and cellular mechanisms involved in aortic wall aneurysm development, *Diagnostics (Basel)*, **13**, 253, doi: 10.3390/diagnostics13020253.
9. Zhang, L., Issa Bhaloo, S., Chen, T., Zhou, B., and Xu, Q. (2018) Role of resident stem cells in vessel formation and arteriosclerosis, *Circ. Res.*, **122**, 1608-1624, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313058.
10. D'Amico, F., Doldo, E., Pisano, C., Scioli, M. G., Centofanti, F., et al. (2020) Specific miRNA and gene deregulation characterize the increased angiogenic remodeling of thoracic aneurysmatic aortopathy in marfan syndrome, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6886, doi: 10.3390/ijms21186886.
11. Lionakis, N., Briasoulis, A., Zouganeli, V., Koutoulakis, E., Kalpakos, D., et al. (2023) Coronary artery aneurysms: comprehensive review and a case report of a left main coronary artery aneurysm, *Curr. Probl. Cardiol.*, **48**, 101700, doi: 10.1016/j.cpcardiol.2023.101700.
12. Monda, E., Lioncino, M., Verrillo, F., Rubino, M., Caiazza, M., et al. (2023) The Role of Genetic testing in patients with heritable thoracic aortic diseases, *Diagnostics (Basel)*, **13**, 772, doi: 10.3390/diagnostics13040772.
13. Biddinger, A., Rocklin, M., Coselli, J., and Milewicz, D. M. (1997) Familial thoracic aortic dilatations and dissections: a case control study, *J. Vasc. Surg.*, **25**, 506-511, doi: 10.1016/s0741-5214(97)70261-1.
14. Coady, M. A., Davies, R. R., Roberts, M., Goldstein, L. J., Rogalski, M. J., et al. (1999) Familial patterns of thoracic aortic aneurysms, *Arch. Surg.*, **134**, 361-367, doi: 10.1001/archsurg.134.4.361.
15. Albornoz, G., Coady, M. A., Roberts, M., Davies, R. R., Tranquilli, M., et al. (2006) Familial thoracic aortic aneurysms and dissections-incidence, modes of inheritance, and phenotypic patterns, *Ann. Thorac. Surg.*, **82**, 1400-1405, doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.04.098.
16. Pyeritz, R. E. (2014) Heritable thoracic aortic disorders, *Curr. Opin. Cardiol.*, **29**, 97-102, doi: 10.1097/HCO.0000000000000023.
17. Duarte, V. E., Yousefzai, R., and Singh, M. N. (2023) Genetically triggered thoracic aortic disease: who should be tested?, *Methodist DeBakey Cardiovasc J.*, **19**, 24-28, doi: 10.14797/mdcvj.1218.
18. Krywaczyk, A., Rodriguez, E. R., Tan, C. D., and Gilson, T. (2023) Thoracic aortic aneurysm and dissection: review and recommendations for evaluation, *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, **44**, 69-76, doi: 10.1097/PAF.0000000000000819.
19. Mangum, K. D., and Farber, M. A. (2020) Genetic and epigenetic regulation of abdominal aortic aneurysms, *Clin. Genet.*, **97**, 815-826, doi: 10.1111/cge.13705.
20. Gouveia E Melo, R., Silva Duarte, G., Lopes, A., Alves, M., Caldeira, D., et al. (2022) Incidence and prevalence of thoracic aortic aneurysms: a systematic review and meta-analysis of population-based studies, *Semin. Thorac. Cardiovasc Surg.*, **34**, 1-16, doi: 10.1053/j.semtevs.2021.02.029.

21. Kim, H. W., and Stansfield, B. K. (2017) Genetic and epigenetic regulation of aortic aneurysms, *Biomed. Res. Int.*, **2017**, 7268521, doi: 10.1155/2017/7268521.
22. Gouveia E Melo, R., Silva Duarte, G., Lopes, A., Alves, M., Caldeira, D., et al. (2020) Synchronous and metachronous thoracic aortic aneurysms in patients with abdominal aortic aneurysms: a systematic review and meta-analysis, *J. Am. Heart Assoc.*, **9**, e017468, doi: 10.1161/JAHA.120.017468.
23. Van de Pol, V., Kurakula, K., DeRuiter, M. C., and Goumans, M. J. (2017) Thoracic aortic aneurysm development in patients with bicuspid aortic valve: what is the role of endothelial cells?, *Front. Physiol.*, **8**, 938, doi: 10.3389/fphys.2017.00938.
24. Rombouts, K. B., van Merriënboer, T. A. R., Ket, J. C. F., Bogunovic, N., van der Velden, J., and Yeung, K. K. (2022) The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections, *Eur. J. Clin. Invest.*, **52**, e13697, doi: 10.1111/eci.13697.
25. Qian, G., Adeyanju, O., Olajuyin, A., and Guo, X. (2022) Abdominal aortic aneurysm formation with a focus on vascular smooth muscle cells, *Life (Basel)*, **12**, 191, doi: 10.3390/life12020191.
26. Senser, E. M., Misra, S., and Henkin, S. (2021) Thoracic aortic aneurysm: a clinical review, *Cardiol. Clin.*, **39**, 505-515, doi: 10.1016/j.ccl.2021.06.003.
27. Haque, K., and Bhargava, P. (2022) Abdominal aortic aneurysm, *Am. Fam. Physician*, **106**, 165-172.
28. Wolford, B. N., Hornsby, W. E., Guo, D., Zhou, W., Lin, M., et al. (2019) Clinical implications of identifying pathogenic variants in individuals with thoracic aortic dissection, *Circ. Genom. Precis. Med.*, **12**, e002476, doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002476.
29. Iyer, V., Rowbotham, S., Biros, E., Bingley, J., and Golledge, J. (2017) A systematic review investigating the association of microRNAs with human abdominal aortic aneurysms, *Atherosclerosis*, **261**, 78-89, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.010.
30. Spin, J. M., Li, D. Y., Maegdefessel, L., and Tsao, P. S. (2019) Non-coding RNAs in aneurysmal aortopathy, *Vascul. Pharmacol.*, **114**, 110-121, doi: 10.1016/j.vph.2018.06.008.
31. Xiao, J. (2020) *Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases*, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Springer Singapore, doi: 10.1007/978-981-15-1671-9.
32. Han, Y., Zhang, H., Bian, C., Chen, C., Tu, S., et al. (2021) Circular RNA expression: its potential regulation and function in abdominal aortic aneurysms, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2021**, 9934951, doi: 10.1155/2021/9934951.
33. Schellinger, I. N., Dannert, A. R., Mattern, K., Raaz, U., and Tsao, P. S. (2021) Unresolved issues in RNA therapeutics in vascular diseases with a focus on aneurysm disease, *Front. Cardiovasc. Med.*, **8**, 571076, doi: 10.3389/fcvm.2021.571076.
34. Кучер, А. Н., Назаренко, М. С. (2023) Регуляторный потенциал ко-локализованных с генами кардиомиопатий некодирующих РНК, *Генетика*, **59**, 381-402, doi: 10.31857/S0016675823040057.
35. Kawaguchi, S., Moukette, B., Hayasaka, T., Haskell, A. K., Mah, J., et al. (2023) Noncoding RNAs as key regulators for cardiac development and cardiovascular diseases, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, **10**, 166, doi: 10.3390/jcdd10040166.
36. Xu, Y., Yang, S., and Xue, G. (2023) The role of long non-coding RNA in abdominal aortic aneurysm, *Front. Genet.*, **14**, 1153899, doi: 10.3389/fgene.2023.1153899.
37. Hombach, S., and Kretz, M. (2016) Non-coding RNAs: classification, biology and functioning, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **937**, 3-17, doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1.
38. Fang, S., Zhang, L., Guo, J., Niu, Y., Wu, Y., et al. (2018) NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D308-D314, doi: 10.1093/nar/gkx1107.
39. Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A. M., Johnson, R., Jungreis, I., et al. (2019) GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D766-D773, doi: 10.1093/nar/gky955.
40. Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., et al. (2013) Circular intronic long noncoding RNAs, *Mol. Cell*, **51**, 792-806, doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.017.
41. Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., et al. (2023) Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **24**, 430-447, doi: 10.1038/s41580-022-00566-8.
42. Jarroux, J., Morillon, A., and Pinskaya, M. (2017) History, discovery, and classification of lncRNAs, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1008**, 1-46, doi: 10.1007/978-981-10-5203-3_1.
43. Guo, Q., Wang, J., Sun, R., Gu, W., He, Z., et al. (2020) Identification of circulating hub long noncoding RNAs associated with hypertrophic cardiomyopathy using weighted correlation network analysis, *Mol. Med. Rep.*, **22**, 4637-4644, doi: 10.3892/mmr.2020.11566.
44. Guo, Q., Wang, J., Sun, R., He, Z., Chen, Q., et al. (2020) Comprehensive construction of a circular RNA-associated competing endogenous RNA network identified novel circular RNAs in hypertrophic cardiomyopathy by integrated analysis, *Front. Genet.*, **11**, 764, doi: 10.3389/fgene.2020.00764.
45. Singh, D. D., Kim, Y., Choi, S. A., Han, I., and Yadav, D. K. (2023) Clinical significance of microRNAs, long non-coding RNAs, and CircRNAs in cardiovascular diseases, *Cells*, **12**, 1629, doi: 10.3390/cells12121629.

46. Sun, J., Chen, G., Jing, Y., He, X., Dong, J., et al. (2018) LncRNA expression profile of human thoracic aortic dissection by high-throughput sequencing, *Cell. Physiol. Biochem.*, **46**, 1027-1041, doi: 10.1159/000488834.
47. Ao, X., Ding, W., Li, X., Xu, Q., Chen, X., et al. (2023) Non-coding RNAs regulating mitochondrial function in cardiovascular diseases, *J. Mol. Med. (Berl)*, **101**, 501-526, doi: 10.1007/s00109-023-02305-8.
48. Wołowicz, Ł., Mędlewska, M., Osiak, J., Wołowicz, A., Grzešek, E., et al. (2023) MicroRNA and lncRNA as the future of pulmonary arterial hypertension treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 9735, doi: 10.3390/ijms24119735.
49. Duggirala, A., Delogu, F., Angelini, T. G., Smith, T., Caputo, M., et al. (2015) Non coding RNAs in aortic aneurysmal disease, *Front. Genet.*, **6**, 125, doi: 10.3389/fgene.2015.00125.
50. Li, G. J., Yang, Q. H., Yang, G. K., Yang, G., Hou, Y., et al. (2023) MiR-125b and SATB1-AS1 might be shear stress-mediated therapeutic targets, *Gene*, **857**, 147181, doi: 10.1016/j.gene.2023.147181.
51. Li, Y., Liu, Y., Liu, S., Wu, F., Li, S., et al. (2018) Differential expression profile of long non-coding RNAs in human thoracic aortic aneurysm, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 7991-7997, doi: 10.1002/jcb.26670.
52. Guo, X., Chang, Q., Pei, H., Sun, X., Qian, X., et al. (2017) Long non-coding RNA-mRNA correlation analysis reveals the potential role of HOTAIR in pathogenesis of sporadic thoracic aortic aneurysm, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **54**, 303-314, doi: 10.1016/j.ejvs.2017.06.010.
53. Yang, Y. G., Li, M. X., Kou, L., Zhou, Y., Qin, Y. W., Liu, X. J., and Chen, Z. (2016) Long noncoding RNA expression signatures of abdominal aortic aneurysm revealed by microarray, *Biomed. Environ. Sci.*, **29**, 713-723, doi: 10.3967/bes2016.096.
54. Tian, L., Hu, X., He, Y., Wu, Z., Li, D., and Zhang, H. (2018) Construction of lncRNA-miRNA-mRNA networks reveals functional lncRNAs in abdominal aortic aneurysm, *Exp. Ther. Med.*, **16**, 3978-3986, doi: 10.3892/etm.2018.6690.
55. Li, Y., and Yang, N. (2018) Microarray expression profile analysis of long non-coding RNAs in thoracic aortic aneurysm, *Kaohsiung J. Med. Sci.*, **34**, 34-42, doi: 10.1016/j.kjms.2017.09.005.
56. Maitseyiti, A., Ci, H., Fang, Q., Guan, S., Shawuti, A., et al. (2020) Identification of novel long noncoding RNAs and their role in abdominal aortic aneurysm, *BioMed Res. Int.*, **2020**, 3502518, doi: 10.1155/2020/3502518.
57. Wang, S., Yuan, Q., Zhao, W., and Zhou, W. (2021) Circular RNA RBM33 contributes to extracellular matrix degradation via miR-4268/EPHB2 axis in abdominal aortic aneurysm, *PeerJ*, **16**, e12232, doi: 10.7717/peerj.12232.
58. Wang, J., Sun, H., Zhou, Y., Huang, K., Que, J., et al. (2019) Circular RNA microarray expression profile in 3,4-benzopyrene/angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice, *J. Cell. Biochem.*, **120**, 10484-10494, doi: 10.1002/jcb.28333.
59. Si, K., Lu, D., and Tian, J. (2021) Integrated analysis and the identification of a circRNA-miRNA-mRNA network in the progression of abdominal aortic aneurysm, *PeerJ*, **9**, e12682, doi: 10.7717/peerj.12682.
60. Zhang, H., Bian, C., Tu, S., Yin, F., Guo, P., et al. (2021) Construction of the circRNA-miRNA-mRNA regulatory network of an abdominal aortic aneurysm to explore its potential pathogenesis, *Dis. Markers*, **2021**, 9916881, doi: 10.1155/2021/9916881.
61. Chen, L., Wang, S., Wang, Z., Liu, Y., Xu, Y., et al. (2022) Construction and analysis of competing endogenous RNA network and patterns of immune infiltration in abdominal aortic aneurysm, *Front. Cardiovasc. Med.*, **9**, 955838, doi: 10.3389/fcvm.2022.955838.
62. Li, T., Wang, T., Yan, L., and Ma, C. (2021) Identification of potential novel biomarkers for abdominal aortic aneurysm based on comprehensive analysis of circRNA-miRNA-mRNA networks, *Exp. Ther. Med.*, **22**, 1468, doi: 10.3892/etm.2021.10903.
63. Patamsytė, V., Žukovas, G., Gečys, D., Žaliaduonytė, D., Jakuška, P., et al. (2020) Long noncoding RNAs CARMN, LUCAT1, SMILR, and MALAT1 in thoracic aortic aneurysm: validation of biomarkers in clinical samples, *Dis. Markers*, **2020**, 8521899, doi: 10.1155/2020/8521899.
64. Zhou, F., Zheng, Z., Zha, Z., Xiong, T., and Pan, Y. (2022) Nuclear paraspeckle assembly transcript 1 enhances hydrogen peroxide-induced human vascular smooth muscle cell injury by regulating miR-30d-5p/A disintegrin and metalloprotease 10, *Circ. J.*, **86**, 1007-1018, doi: 10.1253/circj.CJ-21-0042.
65. He, Q., Tan, J., Yu, B., Shi, W., and Liang, K. (2015) Long noncoding RNA HIF1A-AS1A reduces apoptosis of vascular smooth muscle cells: implications for the pathogenesis of thoracoabdominal aorta aneurysm, *Pharmazie*, **70**, 310-315.
66. Nie, H., Zhao, W., Wang, S., and Zhou, W. (2021) Based on bioinformatics analysis lncRNA SNHG5 modulates the function of vascular smooth muscle cells through miR-205-5p/SMAD4 in abdominal aortic aneurysm, *Immun. Inflamm. Dis.*, **9**, 1306-1320, doi: 10.1002/iid3.478.
67. Абугов С. А., Аверина Т. Б., Аксельрот Б. А., Акчурун Р. С., Алесян Б. Г. и др. (2018) Клинические рекомендации. Рекомендации по диагностике и лечению заболеваний аорты, *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*, **11**, 7-67.
68. UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D523-D531, doi: 10.1093/nar/gkac1052.

69. Winter, H., Winski, G., Busch, A., Chernogubova, E., Fasolo, F., et al. (2023) Targeting long non-coding RNA NUDT6 enhances smooth muscle cell survival and limits vascular disease progression, *Mol. Ther.*, **31**, 1775-1790, doi: 10.1016/j.ymthe.2023.04.020.
70. Zhao, Y., Feng, G., Wang, Y., Yue, Y., and Zhao, W. (2014) Regulation of apoptosis by long non-coding RNA HIF1A-AS1 in VSMCs: implications for TAA pathogenesis, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **7**, 7643-7652.
71. Zhang, X., Li, H., Guo, X., Hu, J., and Li, B. (2020) Long noncoding RNA hypoxia-inducible Factor-1 alpha-antisense RNA 1 regulates vascular smooth muscle cells to promote the development of thoracic aortic aneurysm by modulating apoptotic protease-activating factor 1 and targeting let-7g, *J. Surg. Res.*, **255**, 602-611, doi: 10.1016/j.jss.2020.05.063.
72. Wang, S., Zhang, X., Yuan, Y., Tan, M., Zhang, L., et al. (2015) BRG1 expression is increased in thoracic aortic aneurysms and regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the long non-coding RNA HIF1A-AS1 *in vitro*, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, **47**, 439-446, doi: 10.1093/ejcts/ezu215.
73. Rabkin, S. W. (2017) The role matrix metalloproteinases in the production of aortic aneurysm, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **147**, 239-265, doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.002.
74. Maguire, E. M., Pearce, S. W. A., Xiao, R., Oo, A. Y., and Xiao, Q. (2019) Matrix metalloproteinase in abdominal aortic aneurysm and aortic dissection, *Pharmaceuticals (Basel)*, **12**, 118, doi: 10.3390/ph12030118.
75. Li, Y. H., Li, X. M., Lu, M. S., Lv, M. F., and Jin, X. (2017) The expression of the BRM and MMP2 genes in thoracic aortic aneurysm and aortic dissection, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **21**, 2743-2748.
76. Lin, Y., Huang, H., Yu, Y., Zhu, F., Xiao, W., et al. (2021) Long non-coding RNA RP11-465L10.10 promotes vascular smooth muscle cells phenotype switching and MMP9 expression via the NF- κ B pathway, *Ann. Transl. Med.*, **9**, 1776, doi: 10.21037/atm-21-6402.
77. Pagani, G., Pandini, C., and Gandellini, P. (2022) Navigating the multiverse of antisense RNAs: the transcription- and RNA-dependent dimension, *Noncoding RNA*, **8**, 74, doi: 10.3390/ncrna8060074.
78. Cai, Z., Huang, J., Yang, J., Pan, B., Wang, W., et al. (2021) LncRNA SENCN suppresses abdominal aortic aneurysm formation by inhibiting smooth muscle cells apoptosis and extracellular matrix degradation, *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, **21**, 323-330, doi: 10.17305/bjbms.2020.4994.
79. Zhang, Z., Zou, G., Chen, X., Lu, W., Liu, J., et al. (2019) Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis and extracellular matrix disruption in a murine abdominal aortic aneurysm model, *Mol. Cells*, **42**, 218-227, doi: 10.14348/molcells.2018.0162.
80. Li, K., Cui, M., Zhang, K., Wang, G., and Zhai, S. (2020) LncRNA CRNDE affects the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells in abdominal aortic aneurysms by regulating the expression of Smad3 by Bcl-3, *Cell Cycle*, **19**, 1036-1047, doi: 10.1080/15384101.2020.1743915.
81. Sun, Y., Zhong, L., He, X., Wang, S., Lai, Y., et al. (2019) LncRNA H19 promotes vascular inflammation and abdominal aortic aneurysm formation by functioning as a competing endogenous RNA, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **131**, 66-81, doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.04.004.
82. He, X., Wang, S., Li, M., Zhong, L., Zheng, H., et al. (2019) Long noncoding RNA GAS5 induces abdominal aortic aneurysm formation by promoting smooth muscle apoptosis, *Theranostics*, **9**, 5558-5576, doi: 10.7150/thno.34463.
83. Song, H., Yang, Y., Sun, Y., Wei, G., Zheng, H., et al. (2022) Circular RNA Cdy1 promotes abdominal aortic aneurysm formation by inducing M1 macrophage polarization and M1-type inflammation, *Mol. Ther.*, **30**, 915-931, doi: 10.1016/j.ymthe.2021.09.017.
84. Huang, S., Lu, W., Ge, D., Meng, N., Li, Y., et al. (2015) A new microRNA signal pathway regulated by long non-coding RNA TGFB2-OT1 in autophagy and inflammation of vascular endothelial cells, *Autophagy*, **11**, 2172-2183, doi: 10.1080/15548627.2015.1106663.
85. Wang, Y., Nie, W., Yao, K., Wang, Z., and He, H. (2016) Interleukin 6 induces expression of NADPH oxidase 2 in human aortic endothelial cells via long noncoding RNA MALAT1, *Pharmazie*, **71**, 592-597, doi: 10.1691/ph.2016.6598.
86. Navarro-Corcuera, A., Sehrawat, T. S., Jalan-Sakrikar, N., Gibbons, H. R., Pirius, N. E., et al. (2022) Long non-coding RNA ACTA2-AS1 promotes ductular reaction by interacting with the p300/ELK1 complex, *J. Hepatol.*, **76**, 921-933, doi: 10.1016/j.jhep.2021.12.014.
87. Yu, B., Liu, L., Sun, H., and Chen, Y. (2015) Long noncoding RNA AK056155 involved in the development of Loeys-Dietz syndrome through AKT/PI3K signaling pathway, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 10768-10775.
88. Lino Cardenas, C. L., Kessinger, C. W., Cheng, Y., MacDonald, C., MacGillivray, T., et al. (2018) An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm, *Nat. Commun.*, **9**, 1009, doi: 10.1038/s41467-018-03394-7.
89. Pinard, A., Jones, G. T., and Milewicz, D. M. (2019) Genetics of thoracic and abdominal aortic diseases, *Circ. Res.*, **124**, 588-606, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312436.
90. He, X., Li, X., Han, Y., Chen, G., Xu, T., et al. (2021) CircRNA Chordc1 protects mice from abdominal aortic aneurysm by contributing to the phenotype and growth of vascular smooth muscle cells, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **27**, 81-98, doi: 10.1016/j.omtn.2021.11.005.

91. Gao, C., Sun, J., Zhang, Z., and Xu, Z. (2022) NEAT1 boosts the development of thoracic aortic aneurysm through targeting miR-324-5p/RAN, *Arch. Med. Res.*, **53**, 93-99, doi: 10.1016/j.arcmed.2021.06.009.
92. Zhu, M., Tan, M., Xu, F., Huang, Y., and Yang, J. (2022) Long non-coding RNA XIST negatively regulates thoracic aortic aneurysm cell proliferation by targeting the miR-193a-5p/KLF7 axis, *Cell Mol. Biol.*, **68**, 188-193, doi: 10.14715/cmb/2022.68.7.31.
93. Liang, K., Cui, M., Fu, X., Ma, J., Zhang, K., et al. (2021) LncRNA Xist induces arterial smooth muscle cell apoptosis in thoracic aortic aneurysm through miR-29b-3p/Eln pathway, *Biomed. Pharmacother.*, **137**, 111163, doi: 10.1016/j.biopha.2020.111163.
94. Huang, B., Lu, S., Lai, H., Li, J., Sun, Y., and Wang, C. (2019) LncRNA LOXL1-AS is up-regulated in thoracic aortic aneurysm and regulated proliferation and apoptosis of aortic smooth muscle cells, *Biosci. Rep.*, **39**, BSR20191649, doi: 10.1042/BSR20191649.
95. Chen, S., Chen, H., Yu, C., Lu, R., Song, T., et al. (2019) Long noncoding RNA myocardial infarction associated transcript promotes the development of thoracic aortic by targeting microRNA-145 via the PI3K/Akt signaling pathway, *J. Cell. Biochem.*, **120**, 14405-14413, doi: 10.1002/jcb.28695.
96. Fan, Z., Liu, S., and Zhou, H. (2022) LncRNA H19 regulates proliferation, apoptosis and ECM degradation of aortic smooth muscle cells via miR-1-3p/ADAM10 axis in thoracic aortic aneurysm, *Biochem. Genet.*, **60**, 790-806, doi: 10.1007/s10528-021-10118-y.
97. Xiao, W., Li, X., Ji, C., Shi, J., and Pan, Y. (2020) LncRNA Sox2ot modulates the progression of thoracic aortic aneurysm by regulating miR-330-5p/Myh11, *Biosci. Rep.*, **40**, BSR20194040, doi: 10.1042/BSR20194040.
98. Ou, M., Chu, Y., Zhang, Q., Zhao, H., and Song, Q. (2022) HOXA cluster antisense RNA 2 elevates KIAA1522 expression through microRNA-520d-3p and insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3 to promote the growth of vascular smooth muscle cells in thoracic aortic aneurysm, *ESC Heart Fail.*, **9**, 2955-2966, doi: 10.1002/ehf2.13968.
99. Xia, Q., Zhang, L., Yan, H., Yu, L., Shan, W., and Jiang, H. (2020) LUCAT1 contributes to MYRF-dependent smooth muscle cell apoptosis and may facilitate aneurysm formation via the sequestration of miR-199a-5p, *Cell. Biol. Int.*, **44**, 755-763, doi: 10.1002/cbin.11270.
100. Cai, B., Yang, B., Huang, D., Wang, D., Tian, J., et al. (2020) STAT3-induced up-regulation of lncRNA NEAT1 as a ceRNA facilitates abdominal aortic aneurysm formation by elevating TULP3, *Biosci. Rep.*, **40**, BSR20193299, doi: 10.1042/BSR20193299.
101. Zhang, D., Lu, D., Xu, R., Zhai, S., and Zhang, K. (2022) Inhibition of XIST attenuates abdominal aortic aneurysm in mice by regulating apoptosis of vascular smooth muscle cells through miR-762/MAP2K4 axis, *Microvasc. Res.*, **140**, 104299, doi: 10.1016/j.mvr.2021.104299.
102. Zou, L., Xia, P. F., Chen, L., and Hou, Y. Y. (2021) XIST knockdown suppresses vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis by regulating miR-1264/WNT5A/ β -catenin signaling in aneurysm, *Biosci. Rep.*, **41**, BSR20201810, doi: 10.1042/BSR20201810.
103. Huang, Y., Ren, L., Li, J., and Zou, H. (2021) Long non-coding RNA PVT1/microRNA miR-3127-5p/NCK-associated protein 1-like axis participates in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm by regulating vascular smooth muscle cells, *Bioengineered*, **12**, 12583-12596, doi: 10.1080/21655979.2021.2010384.
104. Lai, Y., Li, J., Zhong, L., He, X., Si, X., et al. (2019) The pseudogene PTENP1 regulates smooth muscle cells as a competing endogenous RNA, *Clin. Sci. (Lond)*, **133**, 1439-1455, doi: 10.1042/CS20190156.
105. Li, D. Y., Busch, A., Jin, H., Chernogubova, E., Pelisek, J., et al. (2018) H19 induces abdominal aortic aneurysm development and progression, *Circulation*, **138**, 1551-1568, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032184.
106. Lin, H., You, B., Lin, X., Wang, X., Zhou, D., et al. (2020) Silencing of long non-coding RNA Sox2ot inhibits oxidative stress and inflammation of vascular smooth muscle cells in abdominal aortic aneurysm via microRNA-145-mediated Egr1 inhibition, *Aging (Albany NY)*, **12**, 12684-12702, doi: 10.18632/aging.103077.
107. Li, H., Zhang, H., Wang, G., Chen, Z., and Pan, Y. (2020) LncRNA LBX2-AS1 facilitates abdominal aortic aneurysm through miR-4685-5p/LBX2 feedback loop, *Biomed. Pharmacother.*, **129**, 109904, doi: 10.1016/j.biopha.2020.109904.
108. Ma, X., Xu, J., Lu, Q., Feng, X., Liu, J., et al. (2022) Hsa_circ_0087352 promotes the inflammatory response of macrophages in abdominal aortic aneurysm by adsorbing hsa-miR-149-5p, *Int. Immunopharmacol.*, **107**, 108691, doi: 10.1016/j.intimp.2022.108691.
109. Liu, Y., Zhong, Z., Xiao, L., Li, W., Wang, Z., et al. (2021) Identification of Circ-FNDC3B, an overexpressed circRNA in abdominal aortic aneurysm, as a regulator of vascular smooth Muscle cells, *Int. Heart. J.*, **62**, 1387-1398, doi: 10.1536/ihj.21-186.
110. Wei, J., Wang, H., and Zhao, Q. (2023) Circular RNA suppression of vascular smooth muscle apoptosis through the miR-545-3p/CKAP4 axis during abdominal aortic aneurysm formation, *Vasc. Med.*, **28**, 104-112, doi: 10.1177/1358863X221132591.
111. Yang, R., Wang, Z., Meng, G., and Hua, L. (2020) Circular RNA CCDC66 facilitates abdominal aortic aneurysm through the overexpression of CCDC66, *Cell. Biochem. Funct.*, **38**, 830-838, doi: 10.1002/cbf.3494.

112. Tian, Z., Sun, Y., Sun, X., Wang, J., and Jiang, T. (2020) LINC00473 inhibits vascular smooth muscle cell viability to promote aneurysm formation via miR-212-5p/BASP1 axis, *Eur. J. Pharmacol.*, **873**, 172935, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172935.
113. Gareev, I., Beylerli, O., Aliev, G., Pavlov, V., Izmailov, A., Zhang, Y., Liang, Y., and Yang, G. (2020) The role of long non-coding RNAs in intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage, *Life (Basel)*, **10**, 155, doi: 10.3390/life10090155.
114. Wu, Z. Y., Trenner, M., Boon, R. A., Spin, J. M., and Maegdefessel, L. (2020) Long noncoding RNAs in key cellular processes involved in aortic aneurysms, *Atherosclerosis*, **292**, 112-118, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.013.

PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF LONG NON-CODING RNAs IN THE DEVELOPMENT OF THORACIC AND ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS

Review

A. N. Kucher, Iu. A. Koroleva, and M. S. Nazarenko*

*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, 634050 Tomsk, Russia; e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru*

Aortic aneurysm (AA) is a life-threatening condition with high prevalence and risk of severe complications. The aim of this review was to summarize the data on the role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the development of aortic aneurysms of various locations. Over a less than decade of lncRNA studies in AA, using experimental and bioinformatic approaches, scientists have obtained the data confirming the involvement of these molecules in metabolic pathways and pathogenetic mechanisms critical for the development of aneurysms. Regardless of the location of the pathological process (thoracic or abdominal aorta), changes in the expression levels of various lncRNAs in the tissue of the affected vessels have been established. The consistency of changes in the expression level of lncRNA, mRNA and microRNA in aortic tissues during AA development has been recorded. Also, a number of regulatory networks those are pathogenetically significant for biochemical pathways and cellular processes have been identified, in which lncRNAs act as the competing endogenous RNAs (ceRNA networks). Moreover, on the one hand, the same lncRNA can be involved in different ceRNA networks and regulate different biochemical and cellular events; on the other hand, the same pathological process is controlled by different lncRNAs. Despite some similarities in pathogenesis and the overlap of the lncRNA spectrum, identical ceRNA networks have not been described for abdominal and thoracic aortic aneurysms. Interactions between lncRNA and protein molecules, including those involved in epigenetic processes at other levels, have also been identified as potentially relevant to the pathogenesis of aortic aneurysm. For some lncRNAs, correlations of the expression level with clinically significant aortic features and biochemical findings AA were observed. The identification of regulatory RNAs that are functionally significant for aneurysm development is important for clarification of the disease pathogenesis and will also provide a basis for early diagnosis and development of new preventive and therapeutic drugs.

Keywords: long non-coding RNAs, circular RNAs, aortic aneurysm

ФУНКЦИИ N6-МЕТИЛАДЕНОЗИНА РНК В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ

Обзор

© 2024 Н.А. Жигалова¹, К.Ю. Олейникова¹, А.С. Рузов¹, А.С. Ермаков^{1,2*}

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,
119071 Москва, Россия; электронная почта: ermakov99@mail.ru

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

Поступила в редакцию 23.07.2023

После доработки 24.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

N6-Метиладенозин (m^6A) является одной из наиболее распространённых модификаций матричных РНК (мРНК) в эукариотических и прокариотических организмах. В течение последних лет был накоплен большой объём экспериментальных данных по участию m^6A -метилирования в регуляции стабильности и трансляции различных мРНК, причём до недавнего времени большинство таких исследований было сфокусировано на цитоплазматических функциях этой модификации. Данный обзор посвящён рассмотрению ряда новых работ, раскрывающих роль N6-метиладенозина в процессах, происходящих в клеточном ядре, таких как транскрипция, организация хроматина, сплайсинг, ядерно-цитоплазматический транспорт и метаболизм РНК:ДНК гибридов. Основываясь на этом анализе, мы предлагаем рассматривать модификации ядерных РНК как дополнительную детерминанту регуляции экспрессии генов, которая наряду с метилированием ДНК и модификациями гистонов определяет структуру и функции хроматина в различных биологических контекстах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: модификации РНК, N6-метиладенозин (m^6A), метилтрансферазы METTL3 и METTL14, деметилазы FTO и ALKBH5, m^6A -связывающие белки семейства YTHDF и YTHDC, хроматин, R-петли.

DOI: 10.31857/S0320972524010099 EDN: YRBLDZ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно около 170 различных неканонических нуклеотидов, встречающихся в составе РНК эукариотических и прокариотических организмов [1]. Подобно модификациям ДНК, большинство модификаций РНК являются обратимыми и могут быть вовлечены в быструю регуляцию различных биологических процессов [2]. Аденозин может быть метилирован по трём атомам азота в положениях N1, N2 или N6. Присутствие в биологических системах РНК с аденозином, метилированным по атому азота в позиции N6 (N6-ме-

тиладенозин, m^6A), было открыто в 1970-х гг. [3, 4]. m^6A является наиболее распространённой модификацией эукариотических мРНК. Примерно 25% мРНК млекопитающих содержат от одной до трёх таких модификаций на транскрипт [3, 5, 6]. Присутствие m^6A в составе мРНК эволюционно консервативно, этот нуклеозид был обнаружен в РНК прокариот [7], а также различных групп эукариот, включая дрожжи, насекомых и растения [8–10]. В большинстве случаев m^6A встречается в контексте последовательности (G/A)(m^6A)C [11, 12]. Сайты m^6A -метилирования, как правило, обогащены консенсусным мотивом RRACH (R = G или A и H = A, C или U) и чаще обнаруживаются в 3'-нетранслируемых областях, а также присутствуют вокруг стоп-кодонов, в 3'-участках экзонов и в 5'-нетранслируемых областях (UTR) в транскриптах человека и мыши [13, 14]. Помимо мРНК, m^6A присутствует в длинных некодирующих РНК (днкРНК, lncРНК), таких как *Xist*, а также малых ядерных

Принятые сокращения: днкРНК – длинные некодирующие РНК; сарРНК – chromosome associated regulatory RNAs, ассоциированные с хромосомами регуляторные РНК; m^6A – N6-метиладенозин; m^6A -мРНК – m^6A -модифицированная мРНК.

* Адресат для корреспонденции.

и рибосомных РНК [15–18]. Поскольку её введение является динамически обратимым процессом, m^6A -метка может быть добавлена с помощью метилтрансфераз (известных как «писатели») и удалена с помощью деметилаз (известных как «стиратели») [19–24]. Кроме того, существуют специфические белки, распознающие m^6A (известные как «считыватели»), которые могут напрямую или косвенно через белки-партнёры связывать последовательности, содержащие эту модификацию, влияя на метаболизм различных мРНК [25–27]. Такая обратимость m^6A -метилирования вносит дополнительную гибкость в регуляцию экспрессии генов. Многочисленные исследования показали, что m^6A -метилирование, вероятно, является ключевым регулятором целого ряда важных биологических процессов, таких как эмбриональное развитие, обновление и дифференцировка стволовых клеток, иммунный ответ, а также участвует в опухолеобразовании и патогенезе метаболических заболеваний [19, 28–32]. Примечательно, что большинство работ, посвящённых исследованию m^6A -метилирования, до недавнего времени было преимущественно сосредоточено на исследовании цитоплазматических функций этой модификации, таких как регуляция стабильности и трансляция мРНК в различных модельных системах. Это положение вещей изменилось в последние годы с появлением исследований роли m^6A -метилирования в метаболизме различных ядерных РНК. Так как количество таких исследований постоянно увеличивается, мы считаем своевременным обзор и осмысление этих результатов. Основываясь на этом, в данном обзоре мы приводим анализ современных представлений об участии m^6A в регуляции биологических процессов, происходящих в ядре эукариотических клеток, уделяя внимание механизмам хранения и реализации генетической информации, в первую очередь – организации хроматина. Также мы рассматриваем участие m^6A в организации R-петель – структур, образуемых в клеточном ядре в результате формирования РНК:ДНК гибридных гетеродимеров.

m^6A -«ПИСАТЕЛИ», «СТИРАТЕЛИ» И «СЧИТЫВАТЕЛИ»

На данный момент охарактеризованы метилтрансферазы и деметилазы, которые обеспечивают установку и удаление m^6A из разных типов РНК [20]. Для мРНК и других транскриптов, которые синтезируются РНК-полимеразой II (таких как большинство малых РНК, микроРНК, миРНК), описан комплекс метилтрансфераз METTL3–METTL14–WTAP, ответственный за внесение m^6A во вновь синтезированные РНК в ядре

клетки [18]. METTL3, основной компонент с метилтрансферазной активностью, в присутствии S-аденозилметионина (SAM) может катализировать метилирование РНК в ядре во время транскрипции. METTL14 является аллостерическим активатором и действует как РНК-связывающая платформа, образуя стабильный гетеродимер с METTL3 и усиливая таким образом его каталитический эффект [21, 22]. WTAP-Белок, ассоциированный с опухолью Вильмса 1, взаимодействует с METTL3 и METTL14 и важен как для локализации данного метилтрансферазного комплекса в ядерных регионах, обогащённых факторами процессинга пре-мРНК, так и для каталитической активности METTL3 [23]. WTAP может также связываться с другими белками, обладающими метилтрансферазной активностью [24]. Например, белок RBM15/15B, связываясь с WTAP, привлекает метилтрансферазный комплекс к сайтам модификации аденина на мРНК. Этот процесс важен для контроля инактивации X-хромосомы [16, 33]. Недавно открытая метилтрансфераза 5 (METTL5) была идентифицирована как новая метилтрансфераза, ответственная за m^6A -метилирование 28S рРНК и 18S рРНК [31]. Уменьшение уровня METTL5 приводит к нарушению сборки 80S рибосомы и снижению трансляции мРНК, участвующих в метаболизме жирных кислот [34]. Другой фермент – METTL16 (метилтрансфераза 16) – катализирует образование метилированного аденина в малой ядерной РНК U6 (мяРНК), участвующей в сплайсинге и входящей в группу ядерных мРНК [35]. В отличие от комплекса METTL3–METTL14, METTL16 может метилировать только ограниченное количество мРНК, содержащих специфический структурный элемент вместе с последовательностью 5'-UACAGAGAA-3' [35–37]. В последние годы были обнаружены и другие «писатели» m^6A , в том числе ZC3H13, VIRMA, ZCCHC4 и NAKAI [38]. Многие из них связаны с процессами опухолеобразования, например, экспрессия ZC3H13 коррелирует с уровнем клинико-патологических факторов, наблюдающихся при некоторых видах рака почки [39], а метилтрансфераза VIRMA (KIAA1429) выступает как онкоген в злокачественных опухолях молочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме (НСС), немелкоклеточном раке лёгкого и остеосаркоме [40]. Несмотря на многообразие вновь открывающихся потенциальных m^6A -метилтрансфераз, комплекс METTL3–METTL14–WTAP остаётся главным и основным ответственным за внесение m^6A во вновь синтезированные РНК в ядре клетки.

Удаление m^6A из РНК может осуществляться двумя различными деметилазами: FTO (белок жировой массы и ожирения) и ALKBH5 (гомолог 5 альфа-кетоглутарат-зависимой диоксигеназы AlkB *E. coli*) [41, 42]. Между двумя m^6A -деметилазами

существует функциональная разница. Так, ГТО деметилюет m^6A , находящийся во внутренних районах мРНК, наряду со «стиранием» целого ряда других РНК-модификаций (U6 РНК, N6, 2-О-диметиладенозин (m^6Am) на мРНК, N1-метиладенозин (m^1A) на тРНК, 3-метилтимин (m^3T) на одноцепочечных ДНК (оцДНК) и 3-метилурацил (m^3U) на оцРНК), а ALKBH5 отвечает только за катализ удаления m^6A на оцРНК [41–44]. Примечательно, что ALKBH5 локализован в ядерных регионах, обогащённых факторами процессинга мРНК. Этот факт подтверждает то, что именно ядерные РНК являются основными субстратами ALKBH5 [42].

m^6A -Метилазы и -деметилазы играют важные роли в процессах, происходящих в ядрах эукариотических клеток. METTL14 и ALKBH5 могут способствовать развитию рака, регулируя уровни m^6A в ключевых транскриптах генов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), а также в транскриптах, связанных с ангиогенезом, включая TGF- β [45]. Panneerdoss et al. показали, что METTL14 и ALKBH5 определяют статус метилирования аденозина генов-мишеней, контролируя экспрессию друг друга. Наличие гипоксии в опухолях изменяет уровень модификации m^6A , что приводит к повышению экспрессии транскриптов-мишеней METTL14 и ALKBH5 в раковых клетках [45]. Например, в клетках рака молочной железы гипоксия стимулирует HIF-1 α - и HIF-2 α -зависимую экспрессию ALKBH5 (HIF – гипоксически индуцируемый фактор), которая деметилюет мРНК транскрипционного фактора NANOG. Это приводит к увеличению экспрессии мРНК и белка NANOG, онкологической трансформации стволовых клеток и развитию рака молочной железы (BCSC) [46].

В качестве так называемых «считывателей» m^6A выступают члены семейства m^6A -связывающих белков, содержащие домен YTH (семейства YTHDF и YTHDC), гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (HNRNP) и белки, связывающие мРНК инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP) [47–49]. Семейство YTHDF включает три паралога (YTHDF1, YTHDF2 и YTHDF3), каждый из которых имеет разные функции. Основная роль YTHDF1 заключается в увеличении скорости трансляции m^6A -модифицированных мРНК (m^6A -мРНК) путём стимулирования сборки рибосомы на m^6A -содержащих мРНК и взаимодействия с фактором инициации трансляции ELF3C, YTHDF1 избирательно распознаёт m^6A -РНК в последовательности GRm⁶AC (где R представляет собой G или A) [26]. Сайты связывания YTHDF1 чаще всего располагаются вблизи стоп-кодонов и в 3'-нетранслируемых регионах (3'-UTR) [50]. Основная функция YTHDF2 – регулирование стабильности m^6A -РНК. Карбоксиконцевой домен YTHDF2 отвечает за связывание с m^6A -РНК, а аминоконцевой домен – за расположение YTHDF2 на мРНК в

местах её дальнейшей деградации [25, 51]. YTHDF3 усиливает и трансляцию, и деградацию транскриптов мРНК в различных биологических системах [25, 47]. Согласно преобладающей модели, наибольшая часть (~44%) m^6A -мРНК связывает только один из YTHDF-белков. Только около ~32% m^6A -мРНК связывают два паралога YTHDF одновременно. m^6A -мРНК, которые связывают все три паралога YTHDF, относительно редки (24%) [52]. Каждый из паралогов YTHDF опосредует эффекты m^6A , воздействуя на определённые когорты m^6A -мРНК, это приводит к тому, что разные паралоги YTHDF контролируют различные физиологические процессы [26, 51, 53–55].

К YTH-«считывателям» также относятся белки YTHDC1 и YTHDC2 [56, 57]. YTHDC1 – участник сигнального пути, который влияет на выбор сайта сплайсинга. Этот белок изменяет паттерны альтернативного сплайсинга в зависимости от своей концентрации и играет важную роль в процессинге транскриптов пре-мРНК в ядре [56, 57]. YTHDC1 может распознавать ассоциированные с хромосомами регуляторные РНК (chromosome associated regulatory RNAs, carRNAs, carРНК), модифицированные m^6A -РНК, и способствовать распаду и интерпретации этих РНК, регулируя степень компактизации хроматина, так же как и уровни транскрипции соответствующих генов [58]. YTHDC2 представляет собой белок со множеством разных доменов, который регулирует трансляцию, стабилизирует транскрипты и даже может выступать в качестве хеликазы [59].

В настоящее время выделяют ещё два семейства m^6A -связывающих белков: HNRNP-семейство (HNRNPC, HNRNPG и HNRNPA2B1) и белки, связывающие мРНК инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP1-3) [48, 49]. HNRNPC, HNRNPG и HNRNPA2B1 участвуют в сплайсинге пре-мРНК и регуляции стабильности мРНК, подобно YTH-белкам [48, 60]. HNRNPC и HNRNPG связывают m^6A -модифицированную РНК посредством механизма « m^6A -переключения», при котором m^6A -опосредованная дестабилизация шпильки РНК обнажает одноцепочечный мотив связывания белков HNRNPC и HNRNPG [60]. С другой стороны, белок HNRNPA2B1 распознаёт m^6A -модифицированный нуклеотид через прямое связывание метилированного консенсусного сайта Rgm⁶AC [60]. Взаимодействие HNRNPA2B1 с m^6A -РНК влияет на сплайсинг РНК и процессинг первичных микроРНК [60]. Повышенный уровень HNRNPA2B1 часто ассоциирован со злокачественными новообразованиями, большинство исследователей относят данный белок «считыватель» к онкогенам, и он представляет большой научный интерес в области изучения опухолеобразования [61]. До сих пор спорным остаётся вопрос о прямом или непрямым связыва-

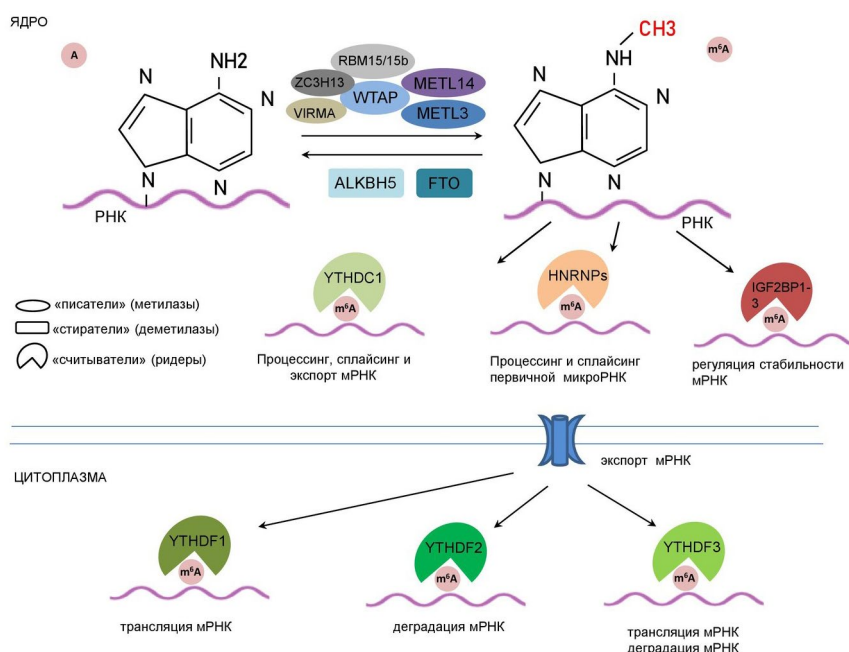


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая роль белков, участвующих в регуляции уровня m⁶A и интерпретирующих данную модификацию в клетках эукариот. Метилирование аденозина осуществляется метилтрансферазным комплексом, состоящим из METTL3, METTL14 и белка WTAP. WTAP может взаимодействовать и с другими метилтрансферазами («писателями»): RBM15/15b, ZC3Y13, VIRMA. Деметилазы или «стиратели» ALKBH5 и FTO удаляют m⁶A с мРНК. В ядре и цитоплазме m⁶A-РНК может распознаваться и регулироваться различными «считывателями»: белками семейства YTH (YTHDC1, YTHDF1-3), семейства HNRNP (HNRNPC, HNRNPG и HNRNPA2B1) и IGF2BP1-3-факторами.

нии белков-«считывателей» и белков семейства IGF2BP1-3 с m⁶A-содержащими РНК. Показано, что IGF2BP-белки выполняют важную функцию в стабилизации мРНК, сохранении её целостности. Так, например, при стрессовых состояниях в клетке IGF2BP1 формирует агрегаты с m⁶A-мРНК, сохраняя тем самым мРНК в трансляционно неактивном состоянии [49].

Таким образом, для m⁶A известны белки, которые регулируют уровень распределения этой модификации в клетке, а именно метилазы и деметилазы, а также m⁶A-связывающие белки («считыватели»), интерпретирующие данную модификацию в различных биологических системах (рис. 1).

ЯДЕРНЫЕ ФУНКЦИИ N6-МЕТИЛАДЕНОЗИНА

Сплайсинг и созревание пре-мРНК. РНК-Полимераза II синтезирует пре-мРНК, которая, проходя через события посттранскрипционного процессинга во время созревания, такие как 5'-кэпирование, сплайсинг и 3'-полиаденилирование, трансформируется в зрелую мРНК [62]. При сплайсинге из длинной молекулы РНК удаляются участки, соответствующие интронам, и в новой молекуле РНК остаются участки, соответствующие экзонам. Ещё в 1976 г. было показано, что m⁶A более распростра-

нена в пре-мРНК, чем в зрелой мРНК, что предполагает возможную значимость этой модификации для процесса сплайсинга [63]. В этом контексте также интересен факт того, что m⁶A обычно появляется в экзонных областях до или вскоре после определения экзона в формирующейся пре-мРНК, а метилирование и деметилирование, происходящие в цитоплазматической мРНК, количественно незначительны. При этом добавление m⁶A в формирующийся транскрипт является детерминантой стабильности цитоплазматической мРНК. Carrol et al. показали, что интрон-специфическая последовательность молекулы РНК пролактина содержит m⁶A, при этом преобладающий сайт метилирования находится в пределах консенсусной последовательности AGm⁶ACU [64]. m⁶A-Связывающий белок YTHDC1 является участником сигнального пути, который влияет на выбор сайта сплайсинга, изменяя паттерны альтернативного сплайсинга в зависимости от концентрации, и взаимодействует с факторами процессинга 3'-конца пре-мРНК, CPSF6, SRSF3 и SRSF7 [57]. Исследования на *Drosophila melanogaster* [9, 65] и клеточных линиях человека [66] показали, что YTHDC1 связывается непосредственно напрямую с m⁶A-модифицированной мРНК и регулирует альтернативный сплайсинг путём привлечения фактора сплайсинга SRSF3, который способствует включению экзона, ингибируя связывание фактора сплайсинга

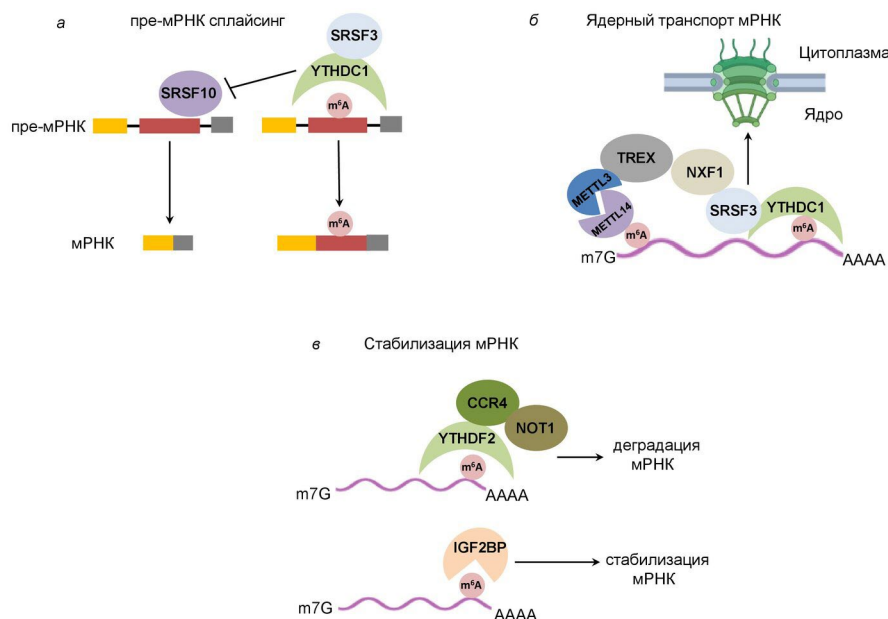


Рис. 2. Функциональные роли m^6A в клеточном ядре. *а* – m^6A регулирует сплайсинг пре-мРНК. Связывание YTHDC1 с m^6A приводит к вырезанию экзона за счёт блокирования связывания фактора сплайсинга SRSF10 с пре-мРНК. В отсутствии N6-метилирования аденозина белок SRSF10 связывается с пре-мРНК, что приводит к пропуску экзона. *б* – N6-Метилирование аденозина способствует ядерному экспорту мРНК за счёт взаимодействия YTHDC1 с комплексом белков SRSF3/NXF1; в свою очередь, комплекс TREX может привлекать метилтрансферазы к сайтам метилирования аденина мРНК. *в* – m^6A может как усиливать деградацию различных мРНК, так и стабилизировать их. YTHDF2 способствует деградации m^6A -модифицированных транскриптов, привлекая к таргетной мРНК CCR4–NOT1-комплекс деаденилаз. В свою очередь, IGF2BP (белок, связывающий мРНК инсулиноподобного фактора роста 2) связывается с m^6A -содержащими мРНК и, напротив, защищает их от деградации

SRSF10, что приводит к пропуску экзонов в мРНК (рис. 2, *а*). Kasowitz et al. показали, что YTHDC1 играет критическую роль в процессинге транскриптов пре-мРНК в ядре ооцитов. Недостаток YTHDC1 приводит к дефектам альтернативного сплайсинга в ооцитах, и развитие YTHDC1-дефицитных ооцитов останавливается на стадии первичного фолликула. При этом большинство наблюдаемых дефектов сплайсинга было возможно устранить путём введения в ооциты YTHDC1 дикого типа [57].

Метилтрансфераза METTL3 и белок WTAP также регулируют экспрессию и альтернативный сплайсинг генов, участвующих в транскрипции и процессинге РНК. Удаление METTL3 в половых клетках приводит к торможению дифференцировки сперматогоний и блокирует инициацию мейоза [67]. Эти события сопряжены с нарушением сплайсинга и нестабильностью мРНК генов, функционирующих в сперматогенезе. Экспрессия генов и сплайсинг мРНК также могут регулироваться m^6A -деметиلاзой FTO, которая контролирует экзонный сплайсинг адипогенного регуляторного фактора RUNX1T1, специфически понижая уровни m^6A вокруг сплайс-сайтов [68].

Ядерно-цитоплазматический транспорт и стабилизация мРНК. Одним из наиболее важных механизмов регуляции экспрессии генов является

экспорт зрелой мРНК из ядра через ядерную пору в цитоплазму. Процесс экспорта мРНК из ядра в цитоплазму связывает транскрипцию и процессинг мРНК в ядре с экспрессией генов в цитоплазме. В начале 1980-х гг. было показано, что обработка клеток, заражённых вирусом SV40, циклолейцином (ингибитором метилирования) практически не изменяет общего количества вирусной мРНК в ядре, но приводит к значительному снижению её уровней в цитоплазме, что указывает на возможную роль m^6A в модуляции связанного с процессингом транспорта мРНК из ядра в цитоплазму [69]. В ряде работ показано, что m^6A способствует ядерному экспорту мРНК [70]. m^6A присутствует в пре-мРНК, и некоторые из факторов, вовлечённых в процесс модификации РНК, были обнаружены в ядерных спеклах [23]. Модифицированная мРНК экспортируется из ядра независимым от Ran способом посредством комплекса TREX. TREX представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс (мРНК), содержащий белковые факторы, необходимые для связывания мРНК с экспортным рецептором NXF1 [70–72] (рис. 2, *б*). Было показано, что комплекс TREX привлекается к m^6A -модифицированным мРНК, и этот процесс необходим для эффективного экспорта мРНК. TREX стимулирует привлечение m^6A -связывающего белка YTHDC1

к мРНК [70]. Roundtree et al. обнаружили, что m^6A -связывающий белок YTHDC1 опосредует экспорт метилированной мРНК из ядра и взаимодействует с фактором сплайсинга и адаптерным белком ядерного экспорта SRSF3, облегчая связывание РНК как с SRSF3, так и с NXF1. Недостаток YTHDC1 приводит к задержке экспорта ядерной m^6A -мРНК [73]. Известно, что SRSF3 связывает NXF1, поэтому было предположено, что YTHDC1 может привлекать NXF1 и способен запускать селективный экспорт m^6A -модифицированных мРНК [74] (рис. 2, б). Lesbirel et al. обнаружили, что комплекс TREX взаимодействует с комплексом белков, устанавливающих модификацию m^6A (WTAP, KIAA1429, METTL3, METTL14), и этот процесс важен для эффективного экспорта мРНК. TREX стимулирует привлечение m^6A -связывающего белка YTHDC1 к мРНК [70]. С другой стороны, показана роль деметилаз m^6A в экспорте мРНК и сборке факторов процессинга мРНК в ядерных спеклах. Например, уменьшение количества ALKBH5 ускоряет транслокацию мРНК из ядра в цитоплазму и приводит к избыточному накоплению мРНК в этом клеточном компартменте [42]. Важная роль ALKBH5 в ядерном транспорте была показана при изучении механизма ингибирования продукции интерферонов типа I. При вирусной инфекции клеток хеликаза DDX46 привлекала деметилазу ALKBH5 к молекуле РНК, что, в свою очередь, стимулировало деметилирование m^6A -модифицированных противовирусных транскриптов, приводило к их удержанию в ядре, соответственно, предотвращая их трансляцию и, как следствие, ингибируя продукцию интерферона [75]. Важно отметить, что нарушение процессинга и экспорта мРНК связано с метастазированием [76], и, согласно ряду исследований, удаление METTL3 приводило к снижению m^6A , тем самым ухудшая миграцию, инвазию и ЭМП раковых клеток [77].

Процессинг мРНК и ядерный экспорт играют важную роль в циркадном ритме. Примечательно, что ингибирование метилирования аденозина удлиняет циркадный период. Fustin et al. идентифицировали сайты m^6A на многих транскриптах генов, связанных с регуляцией суточных ритмов. Специфическое ингибирование метилирования аденозина путём подавления m^6A -метилтрансферазы METTL3 было достаточным для задержки процессинга РНК. В таком случае происходило нарушение динамики установленных ритмов изменения уровней пре-мРНК и мРНК белков-регуляторов суточных ритмов, Per2 и Arntl, что подразумевало понижение скорости экспорта зрелой мРНК этих белков из ядра в цитоплазму [78].

Помимо ядерно-цитоплазматического транспорта, m^6A -метилирование может ускорять деградацию или стабилизацию ядерных мРНК. Так, метил-РНК-связывающий белок-«считыватель»

YTHDF2 распознаёт m^6A -РНК в сайтах связывания с консенсусной последовательностью «GAAC», привлекая деаденилазный комплекс CCR4–NOT1, что приводит к деградации мРНК [79]. В то же время белки-«считыватели» m^6A семейства IGF2BP распознают АТ-обогащённые участки m^6A -РНК, стабилизируя и сохраняя её в нетранслируемом состоянии (рис. 2, в) [49]. Интересно, что высокий уровень экспрессии этих белков характерен для различных видов рака [77].

m^6A -РНК и организация структуры хроматина. С хроматином могут физически связываться различные типы РНК, включая ассоциированные с промотором РНК (пРНК), энхансерные РНК (эРНК) и повторяющиеся РНК, транскрибируемые с транспозонов [80]. сагРНК принимают участие в регуляции организации хроматина, влияя таким образом на уровень транскрипции соответствующих генов и пространственную структуру ядерных субдоменов. Согласно недавнему исследованию, РНК-модификации, присутствующие на сагРНК, регулируют локальную доступность хроматина и транскрипцию [58]. Удаление METTL3 в эмбриональных стволовых клетках мыши повышает стабильность сагРНК, приводя к более открытому состоянию хроматина и активации транскрипции целого ряда генов. Снижение уровня метилирования m^6A , вызванное удалением метилтрансферазы METTL3, а также сайт-специфическое деметилирование m^6A -обогащённых областей увеличивают уровень сагРНК и способствуют формированию открытой конформации хроматина. Таким образом, уровень m^6A в РНК, ассоциированных с хроматином, влияет на организацию хроматина и транскрипцию [58]. Авторы другого исследования обнаружили, что m^6A селективно обогащены зарождающиеся РНК (nascent RNA), продуцируемые регуляторными элементами транскрипции, включая антисмысловые РНК, связывающиеся с областью выше промотора, и эРНК. Примечательно, что m^6A -эРНК характерны для высокоактивных энхансеров [81].

ДнкРНК являются критическими регуляторами эпигенетических механизмов [82]. Например, днкРНК XIST имеет решающее значение для поддержания компенсации дозы экспрессии генов между полами, полностью «покрывая» одну из X-хромосом у женщин и подавляя экспрессию генов в одной из копий X-хромосомы [83]. Недавняя работа показала, что для функциональной активности XIST необходимы химические модификации IncРНК [16]. Используя метод, позволяющий картировать m^6A с разрешением до отдельных нуклеотидов (miCLIP), Patil et al. выявили 78 предполагаемых сайтов m^6A на XIST рядом с областью повтора аденина (A) и показали, что в процесс метилирования аденозина в XIST-РНК, а также в клеточных мРНК вовлечены РНК-связывающий

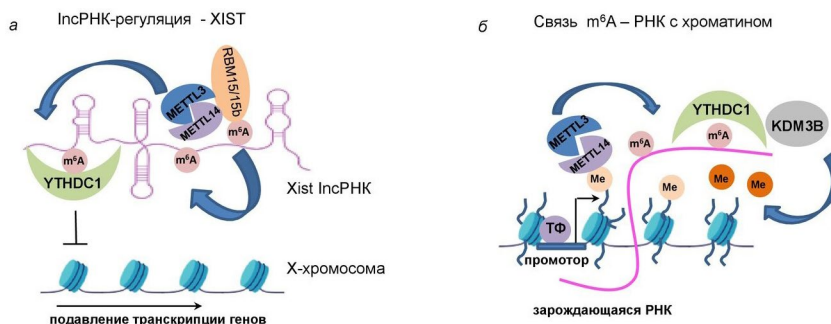


Рис. 3. Роль m⁶A в организации структуры хроматина. а – m⁶A регулирует активность и конформацию длинных некодирующих РНК (днкРНК). ДнкРНК *Xist* содержит N6-аденозин, который через RBM15/15b-YTHDC1-зависимый механизм способствует опосредованной *Xist* репрессии генов и инактивации X-хромосомы. б – YTHDC1 может связываться как с m⁶A-модифицированными транскриптами, так и с деметилазой лизина 9 гистона H3 (H3K9), KDM3B, что приводит к деметилированию гистонов и повышению доступности хроматина в активно транскрибируемых регионах

белок 15 (RBM15) и его паралог RBM15B [16]. Эксперименты по ко-иммунопреципитации показали взаимодействие между RBM15/RBM15B и METTL3, зависимое от присутствия WTAP. Используя доксициклин-индуцируемую систему экспрессии *XIST*, авторы продемонстрировали, что нокадауны RBM15 и RBM15B не влияли на подавление экспрессии мишеней *XIST*, *Gpc4* и *Atrx*, тогда как двойной нокадаун RBM15/RBM15B приводил к существенному увеличению транскрипции *Gpc4* и *Atrx* [16]. Эти результаты предполагают, что функции RBM15 и RBM15B существенно пересекаются. Кроме того, нокадаун RBM15/RBM15B значительно понижал количество m⁶A на *XIST*-РНК. Взаимодействие RBM15/RBM15B с *XIST*-РНК привлекает остальных членов метилтрансферазного комплекса, что, в свою очередь, приводит к метилированию аденозиновых нуклеотидов в соседних консенсусных мотивах. С такими участками может связываться белок YTHDC1 и, как результат, подавлять транскрипцию *XIST*-РНК [16] (рис. 3, а).

Метилтрансферазы METTL3/METTL14 также участвуют в регуляции метилирования гистонов специфической модификации H3K9me2 [84]. Так, модификация H3K9me2 может быть специфически удалена путём индукции m⁶A-модифицированных транскриптов. Недавняя работа показала полногеномную корреляцию между распределением m⁶A в зарождающихся, связанных с хроматином, транскриптах и деметилазой H3K9me2, KDM3B. Авторы этого исследования обнаружили, что белок-считыватель m⁶A, YTHDC1, взаимодействует с KDM3B и привлекает этот белок к m⁶A-обогащённым районам хроматина, способствуя деметилированию H3K9me2 и активации экспрессии генов [85] (рис. 3, б). YTHDC1 участвует в деградации m⁶A-модифицированной РНК, в частности LINE1 (long-interspersed element-1)-повторов, посредством механизма, опосредованного белком NEXT в клеточном ядре [58].

В подтверждение роли m⁶A-метилирования в регуляции структуры хроматина недавние исследования показали, что METTL3 вовлечён в регуляцию структуры хроматина в ходе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши в кардиомиоциты [85]. Удаление METTL3 в мышечных эмбриональных стволовых клетках изменяет степень компактности хроматина как в промоторных областях, так и в кодирующих районах генов, что увеличивает восприимчивость стволовых клеток к сигналам дифференцировки в направлении кардиомиоцитов [85]. Ещё один механизм регуляции состояния хроматина связан с FTO-зависимым деметилированием РНК LINE1-повторов [86] в эмбриональных стволовых клетках мыши. Присутствие LINE1-РНК способствует формированию открытого состояния LINE1-содержащих областей хроматина, а дефицит деметилазы FTO приводит к увеличению содержания m⁶A в LINE1-РНК и, как следствие, к её дестабилизации, что в итоге приводит к компактизации хроматина и снижению уровня транскрипции [86].

Более того, в другой работе было показано, что m⁶A-метилирование вовлечено в регуляцию стабильности некодирующих РНК (non-coding RNAs) в хроматине [87]. При дефиците гистона H1 наблюдается усиление транскрипции некодирующих РНК и, параллельно с этим, снижение уровня m⁶A в этих РНК, что приводит к более высокой степени ассоциации некодирующих РНК с хроматином. Высокий уровень m⁶A в некодирующих РНК коррелировал с их низким уровнем экспрессии и высоким содержанием гистона H1 в клетках дикого типа. В клетках, нокаутных по METTL3, где ожидаемо снижалось содержание m⁶A, наблюдалось повышение уровней экспрессии некодирующих РНК. Совокупность этих данных позволяет говорить о том, что m⁶A-метилирование играет ключевую роль в процессе регуляции круговорота некодирующих РНК в хроматине [87].

Помимо влияния на структурную укладку и степень компактизации хроматина, m^6A -метилирование также, вероятно, вовлечено в регуляцию метилирования ДНК (5-метилцитозин, 5mC). В одной из недавних работ было показано, что в эмбриональных стволовых клетках человека m^6A -считыватель YTHDC2 связывается с ассоциированными с хроматином m^6A -содержащими РНК LTR7/HERV-H-транспозонов [88]. При этом YTHDC2 привлекает ДНК-деметилазу TET1 в соответствующие локусы, что ведёт к их деметилированию и активации транскрипционной активности в этих областях [88].

Роль m^6A в регуляции метаболизма R-петель.

R-Петли – это трёхцепочечные структуры, которые формируются из свободной одноцепочечной цепи ДНК и РНК:ДНК гибрида. Эти структуры присутствуют во всех живых организмах, от бактерий до эукариот, и составляют порядка 5, 8 и 10% от полного генома человека, дрожжей и *Arabidopsis thaliana* соответственно [89–91].

R-Петли могут быть образованы в ряде случаев: (1) в ходе процесса репликации, когда праймаза DnaG синтезирует РНК-праймеры фрагментов Оказаки [92], или (2) из транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой [93]. R-Петли встречаются преимущественно в районах транскрибируемых генов [94], могут накапливаться в повторяющихся последовательностях генома, таких как центромеры, теломеры и ретротранспозоны [95–97], а также участвуют в целом ряде ключевых биологических процессов, таких как инициация и терминация транскрипции, репликация, поддержание стабильности теломер и рекомбинация иммуноглобулинов [98, 99]. Тем не менее эти структуры также являются мощными индукторами повреждения ДНК и препятствуют репарации, тем самым действуя как источник нестабильности генома [100]. Поэтому регуляция уровня R-петель в клетке имеет решающее значение для её жизнедеятельности и достигается либо предотвращением их образования, либо через удаление этих структур специфическими нуклеазами (например, рибонуклеазой H – РНКазой H) и хеликазами (например, сенатаксином и белком Fanconi Anemia (FA) Complementation Group M, FANCM) [101]. R-Петли являются источником геномной нестабильности и репликативного стресса. Оба эти явления, в свою очередь, являются факторами канцерогенеза и клеточной трансформации. Таким образом, R-петли могут вносить свой вклад в образование опухолей в клетках млекопитающих [89, 102–104]. В свете вышеизложенного очевидно, что существует большое число факторов метаболизма как ДНК, так и РНК, которые препятствуют образованию R-петель в эукариотических клетках. Дисфункция таких факторов вызывает накопление R-петель, которые, в свою очередь, могут

не только увеличивать геномную нестабильность и репликативный стресс, но также подавлять экспрессию генов и вести к перестройкам хроматина, которые часто ассоциированы с различными генетическими заболеваниями [102].

Исторически роль R-петель в физиологии бактерий (в частности, в организме кишечной палочки *Escherichia coli*) была впервые продемонстрирована группой во главе с Томицава в 1980-х гг. Исследования учёных показали, что в процессе репликации плазмиды ColE1 РНК-полимераза II формирует R-петли, которые впоследствии расщепляются РНКазой H (фермент, который специфически расщепляет РНК-компонент РНК:ДНК гибридов), образуя 3'-ОН-концы, необходимые для инициации синтеза ДНК [93].

Другая группа показала, что клетки *E. coli* с дефицитом RecG (хеликаза, которая способна «разрешить», т.е. распутать структуру R-петель) или РНКазы H характеризуются явлением, названным авторами «конститутивной стабильной репликацией ДНК», когда образованные в процессе транскрипции R-петли опосредуют постоянное формирование репликационных вилков, приводя к активной безостановочной репликации хромосомной ДНК [105].

Та же группа исследователей также показала, что мутанты, дефектные как по RecG, так и по РНКазе H, являются нежизнеспособными. Таким образом, R-петли, постоянно образующиеся в геноме *E. coli*, летальны до тех пор, пока они не будут «разрешены», т.е. устранены [105].

Кроме того, другая исследовательская группа (во главе с Drolet) продемонстрировала убедительные результаты, подтверждающие, что образование R-петель представляет собой основную причину физиологических аномалий, наблюдаемых в мутантах *E. coli* с дефицитом топоизомеразы I [106, 107].

Роль m^6A в метаболизме R-петель была задокументирована на уровне различных клеточных процессов во множестве организмов, в том числе в эукариотических геномах [108]. Abakir et al., используя метод иммунопреципитации со специфическими антителами к РНК:ДНК гибридам (метод DRIP) и к модификации m^6A (метод m^6A -ДНК-иммунопреципитации, или m^6A -DIP), показали, что m^6A детектируется в большинстве РНК:ДНК гибридов в плюрипотентных стволовых клетках человека [108]. Более того, белок-считыватель m^6A YTHDF2, который способствует деградации мРНК [25], также взаимодействует с участками генома, обогащёнными R-петлями, а нокаут YTHDF2 вызывает повышение уровня содержания R-петель в геноме, замедление скорости клеточного роста и накопление фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX), который является

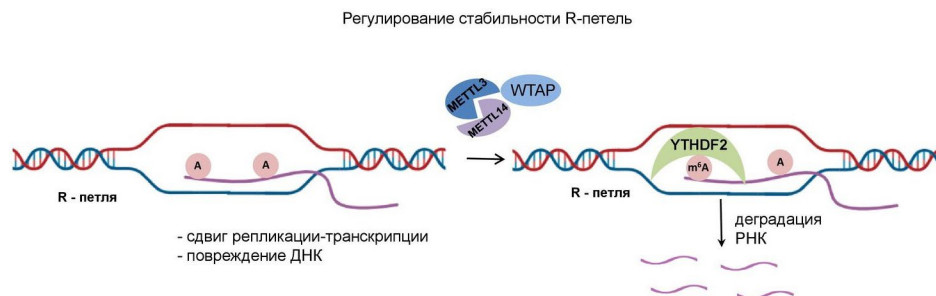


Рис. 4. Регуляция стабильности R-петель в клетке: формирование РНК:ДНК гибридов может приводить к конфликтам репликации и транскрипции, повреждению ДНК и двухцепочечным разрывам. N6-Метилирование аденозина в РНК-компонентах R-петель приводит к YTHDF2-зависимой деградации РНК:ДНК гибридов, снижая таким образом уровень геномной нестабильности

маркером двухцепочечных разрывов ДНК в эукариотических клетках [108]. Результаты этого и других исследований позволили заключить, что YTHDF2 предотвращает накопление m^6A -содержащих РНК:ДНК гибридов и, таким образом, ингибирует вызванное R-петлями повреждение ДНК, играя важную роль обеспечения стабильности генома в клетках млекопитающих [101, 108, 109] (рис. 4). Эти результаты указывают на то, что m^6A является важным составным компонентом R-петель и принимает участие во многих процессах, в которые вовлечены эти структуры [97]. Примечательно и то, что выводы, полученные в данном исследовании, также подтверждаются рядом работ, показывающих роль m^6A , локализованного на РНК:ДНК гибридах, в репарации ДНК [110], а также присутствие этой модификации на хромосом-ассоциированных регуляторных РНК [95]. Несмотря на это, данные о функциональной роли этой модификации в биологии R-петель в данный момент противоречивы. Так, например, Yang et al. показали, что в случае уменьшения количества метилтрансферазы METTL3 в клетках HELa наблюдается значительное снижение общего уровня R-петель в этой системе [111]. Интересно, что авторы этой работы показали существенное снижение уровня R-петель в регионах терминации транскрипции (TESs) генов, кодирующих m^6A -содержащие транскрипты (m^6A^+ генов). Кроме того, авторы показали, что чем ближе R-петли к сайтам m^6A , тем сильнее влияние дефицита METTL3 на снижение уровня R-петель [111]. Чтобы изучить влияние m^6A на R-петли и терминацию транскрипции, авторы создали репортёрную систему, в которой два гена – люциферазы Firefly (*Fluc*) и люциферазы Ренилла (*Rluc*) – разделены одним промотором с областью, образующей R-петлю и содержащей два сайта модификации m^6A дикого типа из терминатора MYC. В этой системе в случае формирования R-петли будут получены только транскрипты *Fluc*, в то время как уменьшение образования R-петли и дефектов терминации приведёт к получению

сквозных транскриптов. Авторы показали, что замена нуклеотида A на U приводила к уменьшению накопления R-петель. Эти результаты доказывают прямое влияние m^6A на динамику образования R-петель и на терминацию транскрипции [111].

Таким образом, результаты, полученные в работах Abakir et al. [107], противоречат результатам Yang et al. [111]: в первом случае накопление m^6A в РНК-компонентах РНК:ДНК гибридов ведёт к понижению уровня R-петель в геноме, а во втором, наоборот, стимулирует образование этих структур. Несколько других исследований также показали присутствие m^6A на РНК-компонентах R-петель. Эта модификация была найдена на сателлитных РНК (major satellite repeats, MSR), ассоциированных с гетерохроматином в эмбриональных стволовых клетках мыши [112]. Искусственное снижение уровня m^6A в MSR-транскриптах приводило к изменению состояния хроматина и снижению потенциала образования РНК:ДНК гибридов в этих геномных регионах [112]. Более того, в работе Chen et al. [113] было показано, что m^6A детектируется в субтеломерных областях на содержащей теломерные повторы РНК TERRA (Telomeric repeat-containing RNA; РНК, содержащая теломерные повторы). Авторы этого исследования показали, что m^6A -модифицированная TERRA образует R-петли и способствует гомологичной рекомбинации. Дефицит METL3 приводил к уменьшению образования R-петель, укорочению и нестабильности теломер. Кроме того, нокдаун YTHDC1, считывающего m^6A , усиливал деградацию TERRA [113]. В другой недавно вышедшей работе было показано, что белки IGF2BPs (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins) могут стабилизировать R-петли, связываясь с их m^6A -модифицированными РНК-компонентами [114].

Таким образом, несмотря на возможные противоречия между отдельными исследованиями, на данный момент очевидно, что m^6A присутствует в составе R-петель в целом ряде биологических контекстов и играет важную роль в регуляции этих

структур через взаимодействие с различными белками-считывателями этой модификации (YTHDF2, YTHDC1, IGF2BPs).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

m⁶A является наиболее широко распространённой химической модификацией мРНК и участвует в регуляции целого ряда ключевых клеточных процессов и индивидуального развития живых организмов. До недавнего времени при изучении роли m⁶A в клеточных процессах основное внимание уделялось цитоплазматическим функциям этой модификации. Совокупность экспериментальных данных последних лет свидетельствует об участии m⁶A как в регуляции организации хроматина (R-петли и эпигенетическая модуляция), так и в процессах, определяющих первые этапы реализации генетической информации (транскрипция, процессинг и сплайсинг), а также ядерного экспорта, благодаря которому зрелые транскрипты перемещаются в цитоплазму, где затем могут также регулироваться с помощью цитоплазматических m⁶A-зависимых механизмов. Довольно противоречивой и интригующей на настоящий момент представляется роль m⁶A в метаболизме R-петель, поскольку наличие такой модификации в РНК, входящей в состав этих структур, по-видимому, может приводить в зависимости от биологического контекста как к стабилизации, так и к элиминированию РНК:ДНК гибридов, потенциально уменьшая или увеличивая степень геномной стабильности в той или иной системе. Несмотря на это, присутствие m⁶A в целом ряде РНК, ассоциированных с хроматином (сarРНК, днкРНК, РНК:ДНК гибриды, пре-мРНК), и участие этой модификации в таких ключевых процессах, как транскрипция, компактизация хроматина и регуляция R-петель, застав-

ляет нас рассматривать m⁶A и, потенциально, другие РНК-модификации в составе таких РНК как дополнительную детерминанту «эпигенетической» регуляции экспрессии генов, которая, наряду с метилированием ДНК и модификациями гистонов, определяет структуру и функции хроматина в различных типах клеток. Такая модель предполагает взаимное влияние других эпигенетических факторов (ДНК-метилирование, модификации гистонов) на модификацию различных ядерных РНК и интерпретацию РНК-модификаций различными белками-считывателями, присутствующими в ядре.

Дальнейшие исследования должны определить функциональные роли, которые играет m⁶A-метилирование ядерных РНК в различных биологических процессах, происходящих в специфических типах клеток на разных стадиях индивидуального развития организма и при патогенезе различных заболеваний.

Вклад авторов. Ермаков А.С. – формирование исходной концепции обзора; Жигалова Н.А., Олейникова К.Ю., Рузов А.С., Ермаков А.С. – сбор и обсуждение литературных данных, написание текста; Жигалова Н.А. и Ермаков А.С. – подготовка иллюстраций; Олейникова К.Ю., Рузов А.С., Ермаков А.С. – редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-65-00022, и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственного задания 122041100149-7), ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (часть «Введение»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boccaletto, P., Machnicka, M. A., Purta, E., Piatkowski, P., Baginski, B., et al. (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 303-307, doi: 10.1093/nar/gkx1030.
2. Frye, M., Harada, B. T., Behm, M., and He, C. (2018) RNA modifications modulate gene expression during development, *Science*, **361**, 1346-1349, doi: 10.1126/science.aau1646.
3. Desrosiers, R., Friderici, K., and Rottman, F. (1974) Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **10**, 3971-3975, doi: 10.1073/pnas.71.10.3971.
4. Perry, R. P., and Kelley, D. E. (1974) Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells, *Cell*, **1**, 37-42, doi: 10.1016/0092-8674(74)90153-6.
5. Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., et al. (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons, *Cell*, **149**, 1635-1646, doi: 10.1016/j.cell.2012.05.003.
6. Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., et al. (2012) Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq, *Nature*, **485**, 201-206, doi: 10.1038/nature11112.
7. Deng, X., Chen, K., Luo, G. Z., Weng, X., Ji, Q., et al. (2015) Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 6557-6567, doi: 10.1093/nar/gkv596.

8. Clancy, M. J., Shambaugh, M. E., Timppte, C. S., and Bokar, J. A. (2002) Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4509-4518, doi: 10.1093/nar/gkf573.
9. Lence, T., Akhtar, J., Bayer, M., Schmid, K., Spindler, L., et al. (2016) m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in drosophila, *Nature*, **540**, 242-247, doi: 10.1038/nature20568.
10. Luo, G. Z., MacQueen, A., Zheng, G., Duan, H., Dore, L. C., et al. (2014) Unique features of the m⁶A methylome in arabidopsis thaliana, *Nat. Commun.*, **5**, 5630, doi: 10.1038/ncomms6630.
11. Schibler, U., and Perry, R. P. (1977) The 50-termini of heterogeneous nuclear RNA: a comparison among molecules of different sizes and ages, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4133-4149, doi: 10.1093/nar/4.12.4133.
12. Wei, C.-M., and Moss, B. (1977) Nucleotide sequences at the N⁶-methyladenosine sites of HeLa cell messenger ribonucleic acid, *Biochemistry*, **16**, 1672-1676, doi: 10.1021/bi00627a023.
13. Liu, N., and Pan, T. (2016) N⁶-methyladenosine-encoded epitranscriptomics, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 98-102, doi: 10.1038/nsmb.3162.
14. Ke, S., Alemu, E. A., Mertens, C., Gantman, E. C., Fak, J. J., et al. (2015) A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation, *Genes Dev.*, **29**, 2037-2053, doi: 10.1101/gad.269415.115.
15. Shimba, S., Bokar, J. A., Rottman, F., and Reddy, R. (1995) Accurate and efficient N⁶-adenosine methylation in spliceosomal U6 small nuclear RNA by HeLa cell extract *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2421-2426, doi: 10.1093/nar/23.13.2421.
16. Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., et al. (2016) m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression, *Nature*, **537**, 369-373, doi: 10.1038/nature19342.
17. Piekna-Przybylska, D., Decatur, W. A., and Fournier, M. J. (2008) The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 178-183, doi: 10.1093/nar/gkm855.
18. Konstantinos, B., and Lieberman, E. (2023) Biological roles of adenine methylation in RNA, *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 143-160, doi: 10.1038/s41576-022-00534-0.
19. Ma, Z., and Ji, J. (2020) N6-methyladenosine (m⁶A) RNA modification in cancer stem cells, *Stem Cells*, **38**, 1511-1519, doi: 10.1002/stem.3279.
20. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., and He, C. (2017) Dynamic RNA modifications in gene expression regulation, *Cell*, **169**, 1187-1200, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.045.
21. Sledz, P., and Jinek, M. (2016) Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A writer complex, *Elife*, **5**, e18434, doi: 10.7554/eLife.18434.
22. Wang, P., Doxtader, K. A., and Nam, Y. (2016) Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases, *Mol. Cell*, **63**, 306-317, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.041.
23. Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., et al. (2014) Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase, *Cell Res.*, **24**, 177-189, doi: 10.1038/cr.2014.3.
24. Huang, Q., Mo, J., Liao, Z., Chen, X., and Zhang, B. (2022) The RNA m⁶A writer WTAP in diseases: structure, roles, and mechanisms, *Cell Death Disease*, **13**, 852, doi: 10.1038/s41419-022-05268-9.
25. Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., et al. (2014) N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability, *Nature*, **505**, 117-120, doi: 10.1038/nature12730.
26. Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., et al. (2015) N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency, *Cell*, **161**, 1388-1399, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.014.
27. Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., et al. (2015) 5' UTR m(6)A promotes cap-independent translation, *Cell*, **163**, 999-1010, doi: 10.1016/j.cell.2015.10.012.
28. Sun, W., Ming, S. T., Wu, R., and Ming, L. (2019) The role of m⁶A RNA methylation in cancer, *Biomed. Pharmacother.*, **112**, 108613, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108613.
29. Zhang, Y., Zhang, S., Shi, M., Li, M., Zeng, J., et al. (2022) Roles of m⁶A modification in neurological diseases, *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, **47**, 109-115.
30. Ivanova, I., Much, C., Di Giacomo, M., Azzi, C., Morgan, M., et al. (2017) The RNA m⁶A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence, *Mol. Cell*, **67**, 1059-1067. e4, doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.003.
31. Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A. F., Kol, N., et al. (2015) m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation, *Science*, **347**, 1002-1006, doi: 10.1126/science.1261417.
32. Li, H. B., Tong, J., Zhu, S., Batista, P. J., Duffy, E. E., Zhao, J., et al. (2017) m(6)A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways, *Nature*, **548**, 338-342, doi: 10.1038/nature23450.
33. Wang, X., Tian, L., Li, Y., Wang, J., Yan, B., et al. (2021) RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMIM6 stability through IGF2BP3 dependent, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **40**, 80, doi: 10.1186/s13046-021-01871-4.

34. Zhang, W., Chen, Y., Zeng, Z., Peng, Y., Li, L., et al. (2022) The novel m⁶A writer METTL5 as prognostic biomarker probably associating with the regulation of immune microenvironment in kidney cancer, *Heliyon*, **8**, e12078, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12078.
35. Pendleton, K. E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O. V., Xie, Y., et al. (2017) The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention, *Cell*, **169**, 824-835.e14, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.003.
36. Mendel, M., Chen, K. M., Homolka, D., Gos, P., Pandey, R. R., et al. (2018) Methylation of structured RNA by the m⁶A Writer METTL16 is essential for mouse embryonic development, *Mol. Cell*, **71**, 986-1000.e11, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.004.
37. Duxtader, K. A., Wang, P., Scarborough, A. M., Seo, D., Conrad, N. K., et al. (2018) Structural basis for regulation of METTL16, an S-adenosylmethionine homeostasis factor, *Mol. Cell*, **71**, 1001-1011.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.025.
38. Yang, D., Zhao, G., and Zhang, H. M. (2023) m⁶A reader proteins: the executive factors in modulating viral replication and host immune response, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **13**, 1-20, doi: 10.3389/fcimb.2023.1151069.
39. Guo, T., Duan, H., Chen, J., Liu, J., Othmane, B., et al. (2021) N⁶-methyladenosine writer gene ZC3H13 predicts immune phenotype and therapeutic opportunities in kidney renal clear cell carcinoma, *Front. Oncol.*, **11**, 718644, doi: 10.3389/fonc.2021.718644.
40. Zhang, X., Li, M. J., Xia, L., and Zhang, H. (2022) The biological function of m⁶A methyltransferase KIAA1429 and its role in human disease, *PeerJ*, **10**, e14334, doi: 10.7717/peerj.14334.
41. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., et al. (2011) N⁶-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 885-887, doi: 10.1038/nchembio.687.
42. Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.-M., et al. (2013) ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility, *Mol. Cell*, **49**, 18-29, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015.
43. Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., et al. (2018) Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm, *Mol. Cell*, **71**, 973-985.e975, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.011.
44. Kaur, S., Tam, N. Y., McDonough, M. A., Schofield, C. J., and Aik, W. S. (2022) Mechanisms of substrate recognition and N⁶-methyladenosine demethylation revealed by crystal structures of ALKBH5-RNA complexes, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 4148-4160, doi: 10.1093/nar/gkac195.
45. Panneerdoss, S., Eedunuri, V. K., Yadav, P., Timilsina, S., Rajamanickam, S., et al. (2018) Cross-talk among writers, readers, and erasers of m(6)A regulates cancer growth and progression, *Sci. Adv.*, **4**, 1-15, doi: 10.1126/sciadv.aar8263.
46. Zhang, C., Samanta, D., Lu, H., Bullen, J. W., Zhang, H., et al. (2016) Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m(6)A-demethylation of NANOG mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2047-E2056, doi: 10.1073/pnas.1602883113.
47. Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., et al. (2017) YTHDF3 facilitates translation and decay of N(6)-methyladenosine-modified RNA, *Cell Res.*, **27**, 315-328, doi: 10.1038/cr.2017.15.
48. Alarcón, C. R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., et al. (2015) HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events, *Cell*, **162**, 1299-1308, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.011.
49. Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., et al. (2018) Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 285-295, doi: 10.1038/s41556-018-0045-z.
50. Han, D., Liu, J., Chen, C., Dong, L., Liu, Y., et al. (2019) Anti-tumour immunity controlled through mRNA m⁶A methylation and YTHDF1 in dendritic cells, *Nature*, **566**, 270-274, doi: 10.1038/s41586-019-0916-x.
51. Liu, N., Zhou, K. I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L., et al. (2017) N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6051-6063, doi: 10.1093/nar/gkx141.
52. Zaccara, S., and Jaffrey, S. R. (2020) A unified model for the function of YTHDF proteins in regulating m⁶A-modified mRNA, *Cell*, **181**, 1582-1595, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.012.
53. Shi, H., Zhang, X., Weng, Y. L., Lu, Z., Liu, Y., et al. (2018) m(6)A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1, *Nature*, **563**, 249-253, doi: 10.1038/s41586-018-0666-1.
54. Anders, M., Chelysheva, I., Goebel, I., Trenkner, T., Zhou, J., et al. (2018) Dynamic m⁶A methylation facilitates mRNA triaging to stress granules, *Life Sci. Alliance*, **1**, e201800113, doi: 10.26508/lsa.201800113.
55. Li, X., Xiong, X., and Yi, C. (2016) Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications, *Nat. Methods*, **14**, 23-31, doi: 10.1038/nmeth.4110.
56. Hartmann, A. M., Nayler, O., Schwaiger, F. W., Obermeier, A., and Stamm, S. (1999) The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn), *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3909-3926, doi: 10.1091/mbc.10.11.3909.
57. Kasowitz, S. D., Ma, J., Anderson, S. J., Leu, N. A., Xu, Y., et al. (2018) Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development, *PLoS Genet.*, **14**, 1-28, doi: 10.1371/journal.pgen.1007412.

58. Liu, J., Dou, X., Chen, C., Chen, C., Liu, C., et al. (2020) N⁶-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription, *Science*, **367**, 580-586, doi: 10.1126/science.aay6018.
59. Wojtas, M. N., Pandey, R. R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., et al. (2017) Regulation of m⁶A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline, *Mol. Cell*, **68**, 374-387.e12, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.021.
60. Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., et al. (2015) N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions, *Nature*, **518**, 560-564, doi: 10.1038/nature14234.
61. Sun, M., Shen, Y., Jia, G., Deng, Z., Shi, F., et al. (2023) Activation of the HNRNPA2B1/miR-93-5p/FRMD6 axis facilitates prostate cancer progression in an m⁶A-dependent manner, *J. Cancer*, **14**, 1242-1256, doi: 10.7150/jca.83863.
62. Shatkin, A., and Manley, J. (2000) The ends of the affair: capping and polyadenylation, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1-5, doi: 10.1038/79583.
63. Salditt-Georgieff, M., Jelinek, W., Darnell, J. E., Furuichi, Y., Morgan, M., et al. (1976) Methyl labeling of HeLa cell hnRNA: a comparison with mRNA, *Cell*, **2**, 227-237, doi: 10.1016/0092-8674(76)90022-2.
64. Carroll, S. M., Narayan, P., and Rottman, F. M. (1990) N⁶-methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4456-4465, doi: 10.1128/mcb.10.9.4456-4465.1990.
65. Haussmann, I. U., Bodi, Z., Sanchez-Moran, E., Mongan, N. P., Archer, N., Fray, R. G. and Solter, M. (2016) m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust Drosophila sex determination, *Nature*, **540**, 301-304, doi: 10.1038/nature20577.
66. Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., et al. (2016) Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing, *Mol. Cell*, **61**, 507-519, doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.012.
67. Xu, K., Yang, Y., Feng, G. H., Sun, B. F., Chen, J. Q., et al. (2017) Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation, *Cell Res.*, **9**, 1100-1114, doi: 10.1038/cr.2017.100.
68. Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., et al. (2014) FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis, *Cell Res.*, **24**, 1403-1419, doi: 10.1038/cr.2014.151.
69. Finkel, D., and Groner, Y. (1983) Methylations of adenosine residues (m⁶A) in pre-mRNA are important for formation of late simian virus 40 mRNAs, *Virology*, **131**, 409-425, doi: 10.1016/0042-6822(83)90508-1.
70. Lesbirel, S., and Wilson, S. A. (2019) The m⁶Amethylase complex and mRNA export, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **3**, 319-328, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.09.008.
71. Viphakone, N., Hautbergue, G. M., Walsh, M., Chang, C.-T., Holland, A., et al. (2012) TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export, *Nat. Commun.*, **3**, 1006, doi: 10.1038/ncomms2005.
72. Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing, *Genes Dev.*, **19**, 1512-1517, doi: 10.1101/gad.1302205.
73. Roundtree, I. A., Luo, G.-Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., et al. (2017) YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs, *eLife*, **6**, e31311, doi: 10.7554/eLife.31311.
74. Muller-McNicoll, M., Botti, V., de Jesus Domingues, A. M., Brandl, H., Schwich, O. D., et al. (2016) SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export, *Genes Dev.*, **30**, 553-566, doi: 10.1101/gad.276477.115.
75. Zheng, Q., Hou, J., Zhou, Y., Li, Z., and Cao, X. (2017) The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m⁶A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus, *Nat. Immunol.*, **18**, 1094-1103, doi: 10.1038/ni.3830.
76. Thierry, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell*, **139**, 871-890, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
77. Lin, X., Chai, G., Wu, Y., Li, J., Chen, F., et al. (2019) RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail, *Nat. Commun.*, **10**, 2065, doi: 10.1038/s41467-019-09865-9.
78. Fustin, J. M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., et al. (2013) RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock, *Cell*, **155**, 793-806, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.026.
79. Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., et al. (2016) YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex, *Nat. Commun.*, **7**, 12626, doi: 10.1038/ncomms12626.
80. Li, X., and Fu, X. D. (2019) Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 503-519, doi: 10.1038/s41556-018-0045-z.
81. Lee, J. H., Wang, R., Xiong, F., Krakowiak, J., Liao, Z., et al. (2021) Enhancer RNA m⁶A methylation facilitates transcriptional condensate formation and gene activation, *Mol. Cell*, **81**, 3368-3385, doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.024.
82. Wang, K. C., and Chang, H. Y. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs, *Mol. Cell*, **43**, 904-914, doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.
83. Sahakyan, A., Yang, Y., and Plath, K. (2018) The role of Xist in X-chromosome dosage compensation, *Trends Cell Biol.*, **28**, 999-1013, doi: 10.1016/j.tcb.2018.05.005.
84. Li, Y., Xia, L., Tan, K., Ye, X., Zuo, Z., et al. (2020) N⁶-methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone H₃K₉me₂, *Nat. Genet.*, **52**, 870-877, doi: 10.1038/s41588-020-0677-3.

85. Liu, X. M., Mao, Y., Wang, S., Zhou, J., and Qian, S. B. (2022) METTL3 modulates chromatin and transcription dynamics during cell fate transition, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 559, doi: 10.1007/s00018-022-04590-x.
86. Wei, J., Yu, X., Yang, L., Liu, X., Gao, B., et al. (2022) FTO mediates LINE1 m⁶A demethylation and chromatin regulation in mESCs and mouse development, *Science*, **376**, 968-973, doi: 10.1126/science.abe9582.
87. Fernández-Justel, J. M., Santa-María, C., Martín-Vírgala, S., Ramesh, S., Ferrera-Lagoa, A., et al. (2022) Histone H1 regulates non-coding RNA turnover on chromatin in a m⁶A-dependent manner, *Cell Rep.*, **40**, 111329, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111329.
88. Sun, T., Xu, Y., Xiang, Y., Ou, J., Soderblom, E. J., et al. (2023) Crosstalk between RNA m⁶A and DNA methylation regulates transposable element chromatin activation and cell fate in human pluripotent stem cells, *Nat. Genet.*, **55**, 1324-1335, doi: 10.1038/s41588-023-01452-5.
89. Sanz, L. A., Hartono, S. R., Lim, Y. W., Steyaert, S., Rajpurkar, A., et al. (2016) Prevalent, dynamic, and conserved R-loop structures associate with specific epigenomic signatures in mammals, *Mol. Cell*, **1**, 167-178, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.032.
90. Wahba, L., Costantino, L., Tan, F. J., Zimmer, A., and Koshland, D. (2016) S1-DRIP-seq identifies high expression and polyA tracts as major contributors to R-loop formation, *Genes Dev.*, **11**, 1327-1338, doi: 10.1101/gad.280834.116.
91. Xu, W., Xu, H., Li, K., Fan, Y., Liu, Y., et al. (2017) The R-loop is a common chromatin feature of the Arabidopsis genome, *Nat. Plants*, **9**, 704-714, doi: 10.1038/s41477-017-0004-x.
92. Kornberg, A., and Baker, T. A. (1992) DNA Replication, Vol. 3, W. H. Freeman and Co., NY.
93. Gowrishankar, J., Leela, J. K., and Anupama, K. (2013) R-loops in bacterial transcription: their causes and consequences, *Transcription*, **4**, 153-157, doi: 10.4161/trns.25101.
94. Ginno, P. A., Lott, P. L., Christensen, H. C., Korf, I., and Chédin, F. (2012) R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters, *Mol. Cell*, **45**, 814-825, doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.017.
95. Nadel, J., Athanasiadou, R., Lemetre, C., Wijetunga, N. A., Broin, Ó. P., et al. (2015) RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships, *Epigenetics Chromatin*, **8**, 46, doi: 10.1186/s13072-015-0040-6.
96. Pfeiffer, V., Crittin, J., Grolimund, L., and Lingner, J. (2013) The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening, *EMBO J.*, **21**, 2861-2871, doi: 10.1038/emboj.2013.217.
97. El Hage, A., Webb, S., Kerr, A., and Tollervey, D. (2014) Genome-wide distribution of RNA-DNA hybrids identifies RNase H targets in tRNA genes, retrotransposons and mitochondria, *PLoS Genet.*, **10**, e1004716, doi: 10.1371/journal.pgen.1004716.
98. Aguilera, A., and García-Muse, T. (2012) R-loops: from transcription byproducts to threats to genome stability, *Mol. Cell*, **46**, 115-124, doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.009.
99. Skourti-Stathaki, K., and Proudfoot, N. J. (2014) A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression, *Genes Dev.*, **28**, 1384-1396, doi: 10.1101/gad.242990.114.
100. Sollier, J., and Cimprich, K. A. (2015) Breaking bad: R-loops and genome integrity, *Trends Cell Biol.*, **9**, 514-522, doi: 10.1016/j.tcb.2015.05.003.
101. Chen, L., Chen, J. Y., Zhang, X., Gu, Y., Xiao, R., et al. (2017) R-ChIP using inactive RNase H reveals dynamic coupling of R-loops with transcriptional pausing at gene promoters, *Mol. Cell*, **68**, 745-757, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.008.
102. Santos-Pereira, J. M., and Aguilera, A. (2015) R loops: new modulators of genome dynamics and function, *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 583-597, doi: 10.1038/nrg3961.
103. Chédin, F. (2016) Nascent connections: R-loops and chromatin patterning, *Trends Genet.*, **12**, 828-838, doi: 10.1016/j.tig.2016.10.002.
104. Lu, W. T., Hawley, B. R., Skalka, G. L., Baldock, R. A., Smith, E. M., Bader, A. S., Malewicz, M., et al. (2018) Droscha drives the formation of DNA:RNA hybrids around DNA break sites to facilitate DNA repair, *Nat. Commun.*, **1**, 532, doi: 10.1038/s41467-018-02893-x.
105. Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**, 212-223, doi: 10.1128/mmbr.61.2.212-238.1997.
106. Massé, E., and Drolet, M. (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16659-16664, doi: 10.1074/jbc.274.23.16659.
107. Massé, E., and Drolet, M. (1999) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition, *J. Mol. Biol.*, **2**, 321-332, doi: 10.1006/jmbi.1999.3264.
108. Abakir, A., Giles, T. C., Cristini, A., Foster, J. M., Dai, N., et al. (2020) N⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells, *Nat. Genet.*, **1**, 48-55, doi: 10.1038/s41588-019-0549-x.
109. Salas-Armenteros, I., Pérez-Calero, C., Bayona-Feliu, A., Tumini, E., Luna, R., et al. (2017) Human THO-Sin3A interaction reveals new mechanisms to prevent R-loops that cause genome instability, *EMBO J.*, **23**, 3532-3547, doi: 10.15252/embj.201797208.

110. Wei, J., and He, C. (2021) Chromatin and transcriptional regulation by reversible RNA methylation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **70**, 109-115, doi: 10.1016/j.ceb.2020.11.005.
111. Yang, X., Liu, Q. L., Xu, W., Zhang, Y. C., Yang, Y., et al. (2019) m⁶A promotes R-loop formation to facilitate transcription termination, *Cell Res.*, **12**, 1035-1038, doi: 10.1038/s41422-019-0235-7.
112. Duda, K. J., Ching, R. W., Jerabek, L., Shukeir, N., Erikson, G., et al. (2021) m⁶A RNA methylation of major satellite repeat transcripts facilitates chromatin association and RNA:DNA hybrid formation in mouse heterochromatin, *Nucleic Acids Res.*, **249**, 5568-5587, doi: 10.1093/nar/gkab364.
113. Chen, L., Zhang, C., Ma, W., Huang, J., Zhao, Y., et al. (2022) METTL3-mediated m⁶A modification stabilizes TERRA and maintains telomere stability, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 11619-11634, doi: 10.1093/nar/gkac1027.
114. Ying, Y., Tang, Y., Wu, Y., Yi, J., Liu, Z., et al. (2023) Epigenetic regulation of co-transcriptional R-loops via IGF2BPs drives SEMA3F-mediated prostate cancer growth retardation and docetaxel chemosensitivity enhancement, *Research Square*, doi: 10.21203/rs.3.rs-3111467/v1.

THE FUNCTIONS OF RNA N6-METHYLADENOSINE IN THE NUCLEUS

Review

N. A. Zhigalova¹, K. Yu. Oleynikova¹, A. S. Ruzov¹, and A. S. Ermakov^{1,2*}

¹ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: ermakov99@mail.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

N6-methyladenosine (m⁶A) is one of the most abundant modifications of both eukaryotic and prokaryotic mRNAs. Recent years witnessed an accumulation of a large volume of experimental data on the involvement of m⁶A methylation in the regulation of stability and translation of different mRNAs. Remarkably, up until recently, the majority of such m⁶A-related studies have been focused on cytoplasmic functions of this modification. In this review, we overview a number of novel studies revealing the role of m⁶A in several key biological processes occurring in cellular nucleus, such as transcription, organization of chromatin, splicing, nuclear-cytoplasmic transport, and R-loop metabolism. Based on this analysis, we propose a model where modifications present on nuclear RNAs represent an additional layer of regulation of gene expression, that, together with DNA methylation and histone modifications, determines chromatin structure and function in various biological contexts.

Keywords: modifications of RNA, N6-methyladenosine (m⁶A), methyltransferases METTL3 and METTL14, demethylases FTO and ALKBH5, m⁶A-binding proteins of the YTHDF and YTHDC families, chromatin, R-loops

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИФЕНОЛ-СОДЕРЖАЩИХ КАТИОННЫХ ЛИНЕЙНЫХ И ДЕНДРИМЕРНЫХ ПЕПТИДОВ

© 2024 А.А. Шатилов¹, С.М. Андреев^{1*}, А.В. Шатилова¹, Е.А. Турецкий^{1,2},
Р.А. Курмашева^{1,2}, М.О. Бабикина^{1,3}, Л.В. Сапрыгина^{1,3}, Н.Н. Шершакова¹,
Д.К. Болякина¹, В.В. Смирнов^{1,2}, И.П. Шиловский¹, М.Р. Хаитов^{1,4}

¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: sm.andreev@nrcii.ru

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

³ РТУ МИРЭА, 119454 Москва, Россия

⁴ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.08.2023

После доработки 04.12.2023

Принята к публикации 08.12.2023

Природные полифенолы представляют большой интерес с точки зрения их использования для фармакологического контроля окислительного стресса и многих заболеваний. Однако низкая биодоступность и быстрый метаболизм полифенолов в форме гликозидов или агликонов стимулирует поиски эффективных средств их доставки в системный оборот. Конъюгирование полифенолов с катионными амфифильными пептидами может создавать соединения с сильной антиоксидантной активностью и способностью проходить через биологические барьеры. Такие соединения могут быть востребованы как препараты для антиоксидантной терапии, в том числе для терапии вирусных, онкологических и нейродегенеративных заболеваний ввиду разнообразного спектра биологических активностей, присущих полифенолам и пептидам. В данной работе синтетическим путём были получены катионные линейные и дендримерные амфифильные катионные пептиды, и ряд пептидов был конъюгирован с галловой кислотой (ГК). ГК является нетоксичной природной фенольной кислотой и важным функциональным элементом многих флавоноидов с высокой антиоксидантной активностью. Показано, что полученные ГК-пептидные конъюгаты проявляли антиоксидантную (антирадикальную) активность, в 2–3 раза выше по сравнению с аскорбиновой кислотой. Другие тесты указывали, что присоединение ГК не влияет на токсичность и гемолитическую активность конъюгатов. ГК-модифицированные пептиды стимулировали трансмембранный перенос плазмиды pGL3, кодирующей репортерный ген люциферазы, однако присоединение ГК по N-концу пептида снижало его трансфекционную активность. Несколько из полученных соединений обладали антибактериальной активностью в модели ингибирования роста штамма *E. coli* Dh5α.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: катионные пептиды, дендримеры, галловая кислота, антирадикальная активность, гемолиз, цитотоксичность, АФК, НуРег, трансфекция.

DOI: 10.31857/S0320972524010105 EDN: YQNKCW

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс, сопровождающий развитие многих патологий, включая вирусные, онкологические и нейродегенеративные заболевания, диабет, а также депрессии, является причиной острых и хронических воспалительных реакций,

иногда с фатальными последствиями (COVID-19, гепатит С, сепсис) [1, 2]. Тяжесть заболевания часто обусловлена мощной каскадной иммунной реакцией организма. Так, цитокиновый шторм, связанный с окислительным стрессом, вызывает неконтролируемое воспаление, нарушения на клеточном и органном уровнях, включая появление

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ГК – галловая кислота; ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; КП – катионные пептиды; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

* Адресат для корреспонденции.

мутаций [3, 4]. Механизм нарушений часто связан с окислительной атакой активными формами кислорода (АФК) и азота на ключевые компоненты клетки, липиды, белки, ДНК. Весьма опасным фактором является воздействие продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Повышение их уровня в клетке приводит к изменению внутри- и межклеточных взаимоотношений, изменению активности цитоплазматических ферментов, осмотического давления, нарушению структуры мембран и функции клеток, что в конечном итоге приводит к гибели клеток. При этом опасность представляют как первичные окислители, АФК, так и вторичные – биомолекулы, трансформированные под действием АФК в свободные радикалы, хотя они участвуют также и в нормальной регуляции клеточных процессов. При сильном окислительном стрессе содержание эндогенных антиоксидантов будет явно недостаточным для устранения окислительного повреждения. В то же время системного повышения концентрации антиоксиданта, например, за счёт употребления аскорбиновой кислоты, достичь очень трудно, поскольку избыточное её количество (> 200 мг) превращается в неактивные метаболиты, выводимые в форме уратов и оксалатов [5].

Очень привлекательными кандидатами фармакологического контроля окислительного стресса являются природные полифенолы: флавоноиды, кумарины и фенольные кислоты, обладающие мощной антиоксидантной активностью и низкой токсичностью [6, 7]. Полифенолы в реакциях с участием свободных радикалов обычно выступают в качестве донора либо электрона, либо водорода. Нейтрализация молекул АФК происходит за счёт отрыва электрона, при этом полифенол переходит в окисленную форму – фенольный радикал. Электронная плотность повышается в первую очередь вблизи гидроксильных групп, и чем больше гидроксильных и ненасыщенных связей в структуре флавоноида, тем выше его склонность к захвату электрона [8]. Блокада ПОЛ чаще всего связана с нейтрализацией радикалов $\text{HO}\cdot$ и $\text{O}\cdot^{2-}$ и пероксидных радикалов [9]. Во многих работах также показано, что полифенолы обладают выраженными антиканцерогенными свойствами, являясь ингибиторами пролиферации опухолевых клеток различного происхождения, и ряд данных указывает на то, что имеется связь между ингибированием канцерогенеза и подавлением АФК [10, 11]. Считается, что есть и другие косвенные механизмы воздействия полифенолов на окислительно-восстановительные процессы в организме, например, путём ингибирования оксидаз и хелатирования ионов железа [12], воздействия на арилуглеводородный рецептор (AhR) и связанное с ним высвобождение фактора Nrf2 из комплекса с Keap1,

последующей транскрипции антиоксидантных ферментов после его транслокации в ядро [13].

Однако фармакологическое применение полифенолов наталкивается на проблемы с биодоступностью. Например, исследования с употреблением высоких доз теафлавинов чая (700 мг) показали, что их концентрация в плазме достигала лишь уровня 0,5–1,0 мкг/мл, в то время как их концентрация в моче была 0,6–4,2 мкг/мл. Таким образом, в кровь попадало менее 0,001% принятой дозы [14]. В целом, биодоступность подавляющего числа флавоноидов (гликозилированные агликоны) является низкой из-за высокой их гидрофильности, затрудняющей транспорт в энтероциты [11]. Напротив, агликонная форма может быстрее абсорбироваться, но при этом она подвергается быстрой модификации под действием глюкуронозил-/сульфо-трансфераз и катехолметилтрансфераз. Таким образом, полифенолы интенсивно метаболизируются и выводятся из организма, микрофлора кишечника также принимает в этом участие [15].

Решению проблемы повышения биодоступности полифенолов может помочь применение специальных средств их доставки. В качестве таковых рассматривались липосомы, наночастицы, эмульсии, полимеры, циклодекстрины, инкапсулирование [16, 17]. По нашему мнению, перспективным направлением может стать применение комбинированных соединений в форме конъюгатов полифенолов с синтетическими катионными пептидами, обладающими высокой проникающей активностью. Относительно короткие амфипатические катионные пептиды (8–25 аминокислотных остатков) часто используются для доставки в клетки молекулы ДНК и РНК [18]. Значительную эффективность в этом отношении демонстрировали катионные дендримерные пептиды, в этом случае наличие в структуре неприродных ϵ -амидных связей заметно повышает их устойчивость к протеолизу, и они менее токсичны по сравнению с линейными пептидами. Такие пептиды были ранее использованы нами для доставки ДНК-плазмид, а также для РНК-интерференции и блокады вирусной инфекции [19–21]. Поиск информации по конъюгатам полифенолов показал, что имеется очень ограниченное число работ, связанных с пептидными производными. Описаны несколько соединений на основе коротких пептидов, предназначенных для омоложения кожи и ингибирования опухолевого роста [22–24]. Следует отметить, что направленное конъюгирование флавоноидов с пептидами в химическом плане – довольно сложная задача, оба компонента содержат много реактивных групп (амино, тиольные, карбоксильные, гидроксильные, фенольные), что затрудняет получение однозначного продукта. Использование селективных защитных групп и клик-реакций

сильно усложняет синтез таких гибридов, имеются лишь единичные примеры (конъюгирование флавоноидов с халконами [25]). Очевидно, что наиболее удобными и привлекательными соединениями для конъюгирования с пептидами являются фенольные кислоты, отличающиеся высокой антиоксидантной активностью и терапевтическим потенциалом: галловая, феруловая, кофейная, кумаровая [26, 27]. Например, галловая кислота (ГК, Ga), помимо антиоксидантных и противомикробных свойств, проявляет противоопухолевую активность и применяется также как пищевая добавка [28–31].

Целью настоящего исследования являлся синтез линейных и дендримерных катионных пептидов (КП), их модификация ГК, анализ полученных соединений на антиоксидантную (антирадикальную) активность *in vitro* и их оценка в отношении цитотоксичности, гемолитической и клеточно-проникающей активности, анализируемой в тесте стимуляции трансфекции клеточной культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и растворители. Диметилформамид (ДМФА), ацетонитрил и метиленхлорид (МХ), 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) получены от «Sigma-Aldrich» (США). ГК (98%, б/в) получена от «Диа-М» (Россия), N-метилпирролидон получен от «Panreac» (Испания). Fmoc-аминокислоты, Оксима (OximaPure), гидроксibenзотриазол (HOBt), диизопропилкарбодиимид (DIC) и смола ChemMatrix были получены от «IRIS Biotech» (Германия) и «AAPPTEC» (США). Используемые антиоксиданты/скавенджеры – этандитиол, фенол и тиоанизол – получены от «Merck» (Германия). Деионизованную воду получали на аппарате MicroPure («Thermo Fisher Scientific», США).

Спектры. Электронные спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Cary 100 UV-Vis («Agilent Technologies», США) в диапазоне от 190 до 800 нм, используя кварцевую кювету с толщиной 1 см. Масс-спектры регистрировали на приборе Microflex™ LT MALDI-TOF («Bruker Daltonics», США), матрица – α-циано-4-гидроксидинаммовая кислота.

Синтез пептидов. Синтез пептидов проводили твердофазным методом, используя автоматический синтезатор пептидов PS3 Peptide Synthesizer («Gyros Protein Technologies Inc.», США) по протоколу Fmoc-химии, используя смесь N-гидроксibenзотриазола с диизопропилкарбодиимидом как конденсирующий агент (HOBt/DIC). В синтезе использовали стартовые Fmoc-аминоацил-полимеры, смолу гелевого типа Rink Amide ChemMatrix («IRIS BioTech», Канада). Боковые карбоксильные и гидроксильные группы аминокислот несли

защиту в форме трет-бутильной группы (t-Bu), ε-аминогруппа лизина – в форме Boc, SH-группа цистеина – Trt, гуанидиновая функция аргинина – Pbf, карбоксильные и гидроксильные группы аминокислот имели защиту в форме трет-бутиловых эфиров. Стандартный цикл включал: промывку (ДМФА), удаление Fmoc-защиты (20%-ный 4-метилпиперидин в ДМФА), предварительное активирование Fmoc-аминокислоты (DIC/HOBt) и реакцию конденсации в среде ДМФА/N-метилпирролидон при двукратном избытке карбоксильного компонента (~0,5–1 ч). Контроль за полнотой реакции осуществляли методом Кайзера (нингидриновый тест), и при необходимости реакцию конденсации повторяли (0,5 ч). Конечные пептиды отщепляли от полимера трифторуксусной кислотой в присутствии скавенджеров. Сырой продукт осаждали сухим метил-трет-бутиловым эфиром, экстрагировали водной уксусной кислотой, и экстракт лиофилизировали, используя сублиматор VirTis AdVantage 2.0 EL («SP Scientific», США).

Очистка пептида и подтверждение его структуры. Пептиды очищали ВЭЖХ (препаративный хроматограф LC-20 Shimadzu) на колонке с обращённой фазой (C18), используя ацетонитрил – 0,1%-ная водная трифторуксусная кислота в качестве подвижной фазы (градиентная элюция, от 5% ацетонитрила до 70% 23 мин). Фракции вещества, выходящие с колонки, детектировали с помощью встроенного спектрофотометрического детектора при длине волны 220 и 280 нм. Жидкую фракцию с подходящей молекулярной массой содержащегося продукта (гомогенный пик), идентифицированную по данным масс-спектрометрии, подвергали упариванию под вакуумом и оставшийся водный раствор высушивали лиофильно. Полученный продукт (пептид) анализировали на гомогенность методом зонного капиллярного электрофореза на приборе Капель-105М («Люмекс», Россия) с фотометрической детекцией при 226 нм. Для анализа использовали кварцевый незаполненный капилляр, в качестве фонового электролита использовали раствор 0,1 М фосфорной кислоты и 0,05 М Tris в деионизованной воде. Молекулярную массу анализировали, используя масс-спектрометр Microflex™ LT MALDI-TOF («Bruker Daltonics»).

Анализ антирадикальной активности. Применение ДФПГ-теста для оценки антирадикальной активности ранее было описано в литературе [32]. В данной работе для оценки активности исследуемых образцов использовали раствор ДФПГ в метаноле различных концентраций (200, 150, 75, 50, 25, 10 и 5 мкг/мл) и чистый метанол в качестве отрицательного контроля. Растворы пептидов и аскорбиновой кислоты (положительный контроль) с концентрацией 2,8 мкмоль/мл готовили в деионизованной воде. Их переносили в дубликатах

по 2,5 мкл в 96-луночный планшет, после чего в каждую лунку вносили растворы ДФПГ в объёме 200 мкл. Оптическую плотность окрашенного раствора измеряли на приборе Thermo Fisher Multiscan FC при 520 нм. Активность образцов рассчитывали относительно активности аскорбиновой кислоты в мольном отношении в %.

Оценка гемолитической активности. Цельную кровь донора отбирали в вакуумную пробирку с ЭДТА (Sarstedt S-Monovette EDTA K3E) в объёме 5 мл, центрифугировали при 500 *g* 5 мин, отделяли эритроциты от плазмы, смешивали их с 10 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,4, с последующим центрифугированием. Процедуру отмывки эритроцитов повторяли 4 раза, после чего супернатант декантировали, получая взвесь эритроцитов. Исследуемые образцы пептидов готовили в растворе ФСБ в концентрациях 2,8, 0,28 и 0,028 ммоль/л и вносили по 200 мкл в 96-луночный планшет, после чего добавляли отмывку суспензию эритроцитов в объёме 2 мкл (1%-ная суспензия). Анализируемые образцы тестировали в дублях. Планшеты с образцами инкубировали в термостате при 37 °C 30 мин и затем центрифугировали при 500 *g* в течение 5 мин. Измерение оптической плотности супернатанта проводили на спектрофотометре Multiscan GO при длинах волн 405/630 нм. Процент лизиса эритроцитов рассчитывали относительно положительного контроля, которым являлась деионизованная вода (1):

$$\% \text{ лизиса} = (E - C) / (M - C) \times 100, \quad (1)$$

где *E* – оптическая плотность тестируемого образца пептида, *C* – оптическая плотность отрицательного контроля (в ФСБ), *M* – оптическая плотность положительного контроля.

Трансфекционная активность. Оценку способности полученных соединений в форме комплексов с нуклеиновой кислотой (плазмид) осуществлять трансмембранный перенос проводили *in vitro* на клеточной линии HEK293T (получена из коллекции клеточных культур Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) с использованием плазмиды pGL3, кодирующей репортерный ген люциферазы, с использованием описанной ранее методики [19]. С этой целью в 48-луночный планшет засевали 80 тыс. клеток на лунку в 300 мкл среды DMEM («ПанЭко», Россия). Клетки инкубировали 24 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, после чего в лунки вносили трансфекционную смесь: 40 мкл бессывороточной среды Opti-MEM («Thermo Fisher Scientific»), 0,25 мкг pGL3 и 20 или 10 мкг исследуемого пептида или 0,3 мкл положительного контроля, которым являлся Lipofectamine™ 3000 («Thermo Fisher Scientific»). Перед

внесением трансфекционную смесь инкубировали в течение 15 мин. В качестве отрицательного контроля использовали 0,25 мкг плазмиды без добавления трансфецирующего агента. Клетки инкубировали в течение 24 ч, после чего вносили 150 мкл лизирующего буфера Glo («Promega», США). Далее к лизату клеток добавляли 50 мкл субстрата (люциферина). Интенсивность люминесценции определяли на люминометре GloMax 20/20 («Promega»).

Трансфецирование клеточной культуры HEK293T *in vitro* с использованием флуоресцентного биосенсора HyPer. Для оценки антиоксидантной активности *in vitro* использовали описанный ранее в литературе флуоресцентный биосенсор HyPer [33]. Клетки почки эмбриона человека (HEK293T) засевали в 48-луночный планшет в количестве 80 тыс. клеток на лунку в объёме 300 мкл среды DMEM. Через 24 ч клетки трансфецировали плазмидой pHyPer-cyto («Евроген», Россия). Состав трансфекционной смеси был следующим: 0,2 мкг плазмиды, 0,2 мкл реактива p3000, 0,3 мкл реактива Lipofectamine™ 3000 («Thermo Fisher Scientific»), объём доводили до 10 мкл средой Opti-MEM. Растворы пептидов вносили в концентрации 1 мг/мл и в объёме 10 мкл через 24 ч после трансфекции. В контрольные лунки вносили по 10 мкл ФСБ. Спустя 4 ч инкубации клеточную среду отбирали, клетки инкубировали 5 мин в 50 мкл раствора трипсина-ЭДТА и переносили клеточную суспензию в планшет для флуориметрии. Объём суспензии доводили до 100 мкл ФСБ. Далее в опытные лунки вносили по 10 мкл раствора пероксида водорода (50 мМ), в контрольные образцы – по 10 мкл ФСБ. Определение оптической плотности проводили на приборе Thermo Fisher Scientific Fluoroscan («Thermo Fisher Scientific») при длине волны поглощения 485 нм и длине волны испускания 538 нм.

Анализ цитотоксичности пептидов. Цитотоксичность исследуемых соединений определяли на четырёх линиях клеток (A549, HeLa, Wi-38, mells, получены из коллекции клеточных культур Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). 2 × 10⁴ клеток в полной питательной среде DMEM засевали в 96-луночный планшет и инкубировали сутки при 37 °C в CO₂-инкубаторе до достижения 75%-ной конфлюентности. Далее вносили исследуемые образцы в концентрациях 0,7; 2,1; 6,2; 18,5; 55,6; 167 и 500 мкг/мл и инкубировали 24 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Затем в каждую лунку добавляли по 25 мкл МТТ в ФСБ с концентрацией 4 мг/мл и помещали в CO₂-инкубатор. Через 4 ч добавляли 50 мкл SDS (20%-ный SDS в воде с 0,02 N H₂SO₄) и инкубировали сутки. Разницу оптической плотности (ОП) раствора при 570 и 650 нм определяли, используя планшетный ридер (BIO RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader, программа «Земфира»).

Количество живых клеток рассчитывали по отношению оптической плотности среды в лунке с пептидом (ОП пепт) к оптической плотности среды без пептида (ОП контроль) (2):

$$\begin{aligned} &\text{количество живых клеток, \%} = \\ &= (\text{ОП пепт} / \text{ОП контроль}) \times 100\%. \end{aligned}$$

(2)

Каждое значение получали путём усреднения трёх параллельных измерений. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀) определяли по графику зависимости полученных значений количества живых клеток от концентрации соединения.

Статистический анализ. На предварительном этапе статистического анализа нормальность распределения интенсивности флуоресценции зонда NuPer оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для оценки различий использовали *t*-критерий Стьюдента, критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (*p*) принимали равным 0,05. Данные флуоресценции и люминесценции представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения (M ± SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые нами ранее исследования по конструированию КП с хорошей проникающей активностью и низкой токсичностью показали, что дендримерные структуры имеют заметное преимущество [19]. При этом в их активность значительный вклад дают позитивно заряженные аминоконцевые участки ветвей пептида, содержащие аминокислоты лизин и аргинин, взаимодействующие с отрицательно заряженными молекулами мембраны клеток. Как изменится их активность после *N*-концевой модификации ГК, было неизвестно. Линейные пептиды были использованы, чтобы оценить в целом, как будет меняться их антиоксидантная активность после этой модификации. Выбор ГК в качестве антиоксиданта был обусловлен её высокой радикал-нейтрализующей активностью [32] и довольно простой химической процедурой её присоединения к amino-соединениям. Синтез ГК-содержащих пептидов проводили твердофазным методом с использованием Fmoc-протокола, где в качестве конденсирующего агента применяли DIC в присутствии Оксима (катализатор).

Структура, антирадикальная и цитотоксическая активности синтетических линейных и дендримерных пептидов

Код	Последовательность аминокислот*	Молекулярная масса, г/моль (заряд +)	Антирадикальная активность, мольный %	IC ₅₀ , мкмоль/л			
				A549	HeLa	Wi-38	mells
AB-9	Ga-YYKK	752 (2)	217	666	2214	665	955
AB-10	Ga-YYLK	737 (1)	187	1136	1145	678	981
AB-11	(Ga-KKIRRLK) ₂ KYAC	2633 (10)	332	100	100	151	167
AB-12	Ga-KKIRARLK ₂ KYAC	1501 (5)	302	206	231	268	293
AB-13	R ₈ K ₄ K ₂ KACAC	2512 (16)	62	69	129	115	98
AB-14	(WKKIRVRLS) ₂ KAC	2652 (10)	25	18	64	93	19
AB-15	(Ga-KKIRARLK) ₂ KYAC	2773 (10)	330	20	68	123	59
AST-1	Ga-KK	444 (2)	356	935	1002	1126	1173
ST-10	(KKLRLKTAFK) ₂ KAC	2749 (12)	20	91	17	33	35
AB-32	AKKYRRFRYKYKGKYFYAC	2539 (9)	41	141	115	132	122
AB-33	Ga-AKKYRRFRYKYKGKYFYAC	2692 (8)	161	190	262	192	160
	Галловая кислота	170	197	2941	982	1482	653
	Аскорбиновая кислота	176	100				
	Эпирубицин			92	298	344	13

* Примечание. У всех пептидов C-концевая аминокислота находится в форме амида, свободные аминогруппы протонированы, находятся в форме соли с трифторуксусной кислотой, чьё мольное содержание равно числу позитивного заряда пептида при нейтральном pH. Антирадикальная активность рассчитана как % от активности аскорбиновой кислоты в молярном эквиваленте, среднее из трёх измерений.

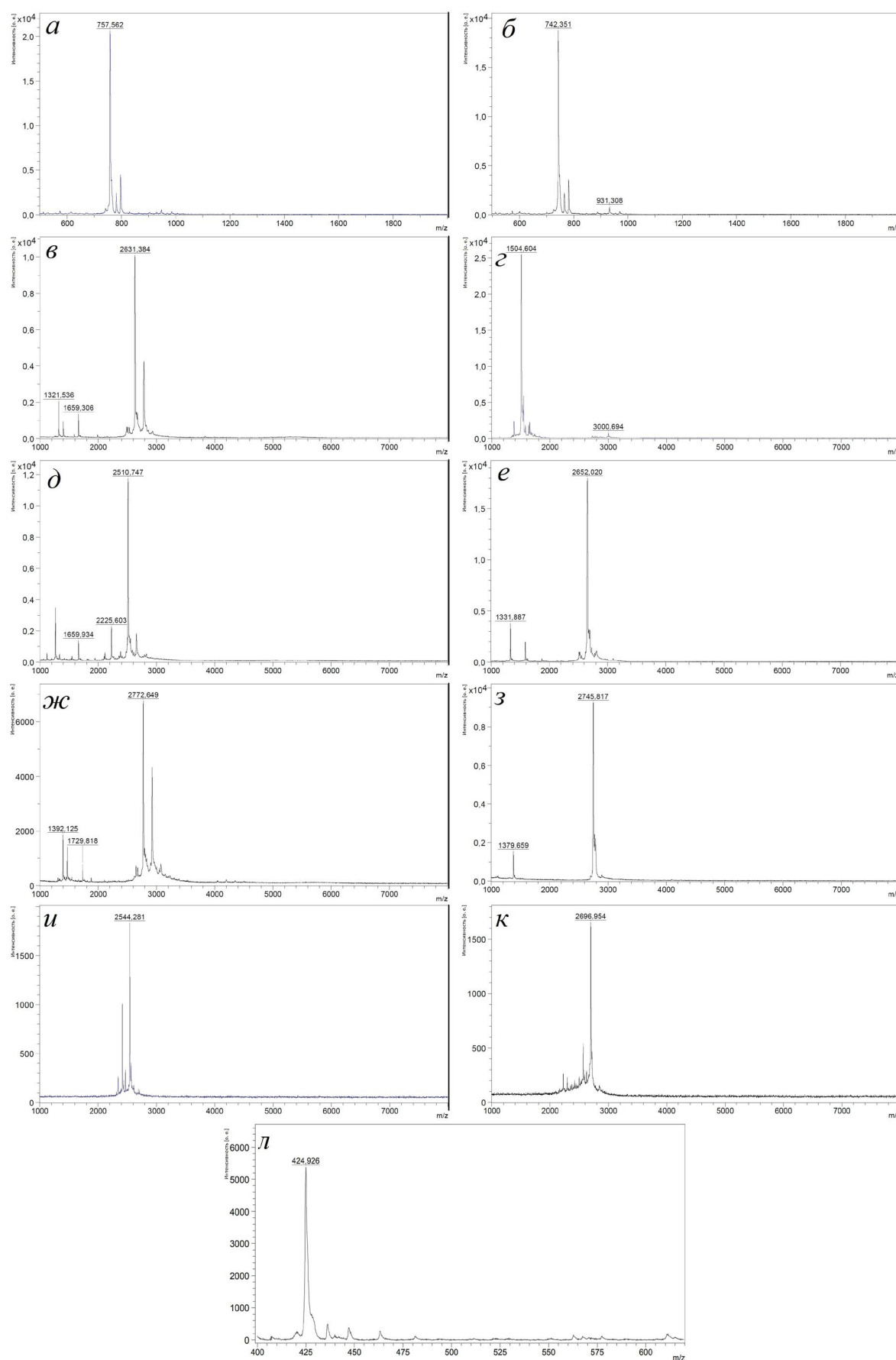


Рис. 1. Масс-спектры (MALDI-TOF) синтезированных пептидов: *а* – АВ-9, *б* – АВ-10, *в* – АВ-11, *г* – АВ-12, *д* – АВ-13, *е* – АВ-14, *ж* – АВ-15, *з* – ST-10, *и* – АВ-32, *к* – АВ-33, *л* – AST-1

ГК использовали без защиты её фенольных гидроксильных групп, её присоединяли после завершения синтеза пептидной цепи и удаления *N*-концевой Fmoc-группы. Поскольку эти фенольные группы довольно реакционноспособны, они могут реагировать с собственной карбоксильной группой в присутствии карбодиимида/DIC. Попытки использовать 3-кратный мольный избыток ГК (стандартный протокол пептидного синтеза) по отношению к пептиду приводили к неудовлетворительному выходу целевого ГК-пептида, его очистка путём ВЭЖХ была затруднена. Дальнейшие эксперименты показали, что приемлемым вариантом являлось применение 8–16-кратных мольных избытков ГК по отношению к пептиду в присутствии эквивалентных количеств DIC и Оксима. Избыточное количество ГК и побочных продуктов отделяли фильтрацией при промывке смолы растворителями на стадии отщепления пептида от смолы. Последнюю операцию проводили в среде трифторуксусной кислоты в присутствии сканденджеров: фенола, воды, этандитиола или диметилсульфида. Очистку пептидов проводили путём ВЭЖХ на колонке с обращённой фазой C18. В результате было синтезировано 11 КП, включая линейные и дендримерные структуры, из них 7 пептидов содержали ГК (таблица). Структуру полученных соединений на основе идентичности масс подтверждали масс-спектрами (рис. 1).

Наличие фенольного компонента в пептидах было также подтверждено УФ-спектрами по нали-

чию полосы с максимумом при 270 нм, одинаковой для всех ГК-модифицированных пептидов (рис. 2).

Далее была проведена оценка биологических свойств полученных соединений, важных в физиологическом плане: гемолитическая, цитотоксическая, антиоксидантная и трансфекционная активности.

Для анализа степени гемолиза были использованы эритроциты человека. В качестве положительного контроля использовали дистиллированную воду, что обеспечивало близкий к 100% лизис клеток. Оказалось, что среди пептидов заметной гемолитической активностью обладали только немодифицированный дендримерный пептид АВ-14 и ГК-содержащий пептид АВ-15. Степень лизиса в их присутствии составляла около 16 и 18% при максимальной концентрации (1 мг/мл), для остальных же пептидов данный показатель был близок к 0% (рис. 3). Можно предположить, что возможная причина литической активности АВ-14 и АВ-15, по-видимому, обусловлена тем, что их длинные ветви с последовательностями WKKIRVRLS и Ga-KKIRARLK соответственно содержат гидрофобные и гидрофильные позитивно заряженные аминокислоты, формирующие амфифильные структуры, способные вызывать нарушение липидной мембраны клетки [18]. На *N*-конце оба пептида содержат гидрофобные остатки, триптофан и ГК. Кроме того, оказалось, что оба пептида обладают высокой антибактериальной активностью против штамма *Escherichia coli* Dh5a [34].

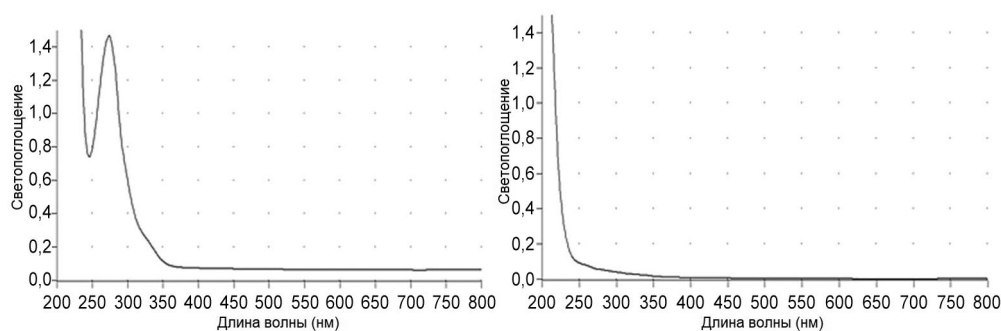


Рис. 2. Спектры поглощения в УФ- и видимой области: слева – АВ-33, справа – АВ-32.

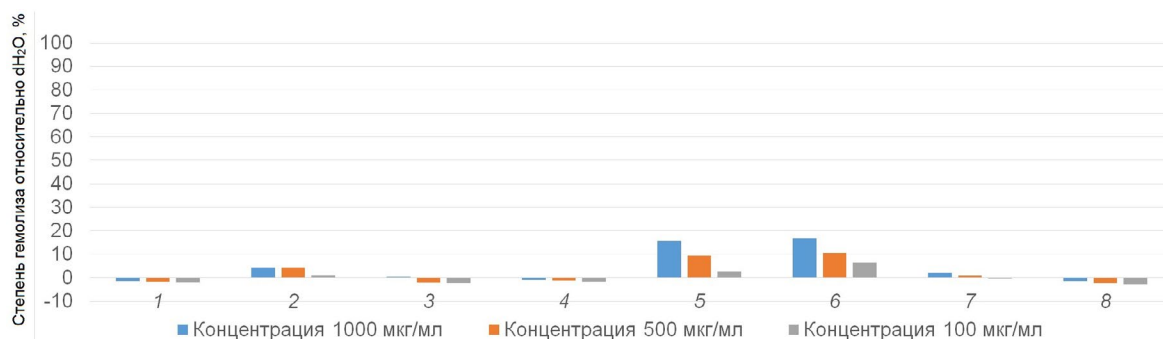


Рис. 3. Гемолитическая активность пептидов, % от гемолиза эритроцитов в дистиллированной воде: 1 – АВ-10, 2 – АВ-11, 3 – АВ-12, 4 – АВ-13, 5 – АВ-14, 6 – АВ-15, 7 – ST-10, 8 – AST-1

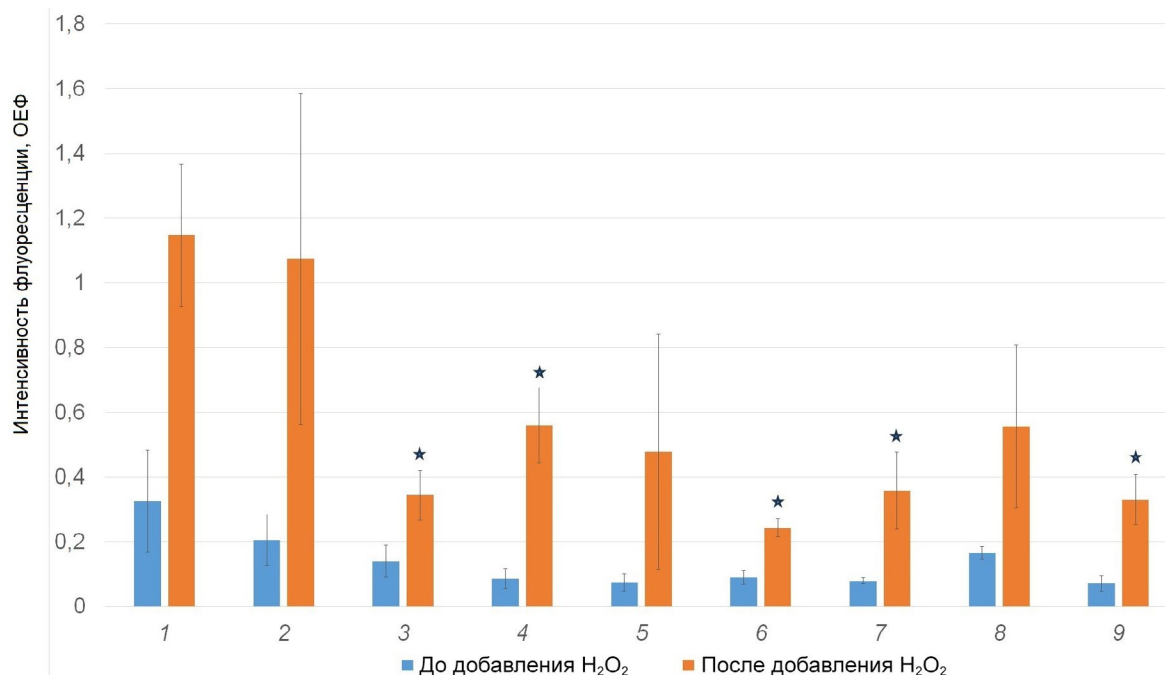


Рис. 4. Уровень флуоресценции (538 нм) внутриклеточного сенсора HyPer в присутствии пептидов, измеренный перед добавлением и после добавления пероксида водорода. 1 – Положительный контроль, 2 – АВ-10, 3 – АВ-11, 4 – АВ-12, 5 – АВ-13, 6 – АВ-14, 7 – АВ-15, 8 – АСТ-1, 9 – СТ-10. Звёздочками помечены пептиды, интенсивность флуоресценции которых после внесения пероксида водорода статистически значимо ($p < 0,05$) отличалась от положительного контроля

Токсичность полученных соединений оценивали *in vitro*, используя МТТ-анализ. Анализ проводили на линии клеток HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека), A549 (аденокарцинома лёгкого человека), mells (меланома человека), Wi-38 (диплоидная линия фибробластов человека). В качестве контрольного препарата с цитостатическим действием был выбран Эпирубицин. Результаты тестирования (таблица) показали, что токсический эффект пептидов менялся в зависимости от типа клеток, присоединение ГК не приводило к повышению токсичности соединения. Однако два пептида, АВ-14 и АВ-15, показали токсичность для опухолевых линий A549 и mells, которая приближалась к значениям Эпирубицина (выделено жирным шрифтом), однако в отношении нормальных клеток (культура Wi-38) указанные пептиды не проявляли такой значительной токсичности, как Эпирубицин. В целом, следует отметить, что все короткие ГК-содержащие пептиды отличались низкой токсичностью.

На следующем этапе работы мы изучали антиоксидантную активность полученных соединений путём постановки 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил-теста (ДФПГ-тест). Полученные результаты подтвердили, что присоединение ГК к КП резко увеличивает их антиоксидантную активность, в 2–3 раза превышающую таковую аскорбиновой кислоты (таблица). Этот эффект наиболее хорошо виден при сравнении значений антирадикальной актив-

ности для пептидов АВ-32 и АВ-33, структура которых отличается только наличием или отсутствием остатка ГК. Антирадикальная активность относительно аскорбиновой кислоты для них составила 41 и 161% соответственно. Второй способ оценки антиоксидантной активности пептидов уже на клеточном уровне основан на использовании генетически кодируемого биосенсора HyPer. Известна высокая скавенджирующая активность ГК против пероксида водорода [35]. В отличие от обычно используемых производных дихлорфлуоресцеина (DCF), HyPer обладает высокой специфичностью к пероксиду, не продуцирует АФК под действием света и нечувствителен к супероксиду, окисленному глутатиону, оксиду азота и пероксинитриту [36]. Полученные результаты отображены на рис. 4, где показаны уровни флуоресценции внутриклеточного сенсора HyPer в присутствии пептидов, измеренные перед добавлением и после добавления пероксида водорода. Видно, что пептиды влияют на уровень флуоресценции сенсора до добавления пероксида, снижая его по сравнению с контролем (ФСБ). Все исследованные пептиды, за исключением АВ-13 и АСТ-1, обладали способностью статистически значимо снижать концентрацию пероксида водорода в клетках ($p < 0,05$). Наиболее значимое снижение наблюдалось для пептидов АВ-11 и АВ-14. Это можно объяснить тем, что АВ-11 имел в составе ГК, а АВ-14 содержал триптофан, который способен взаимодействовать с пероксидом.

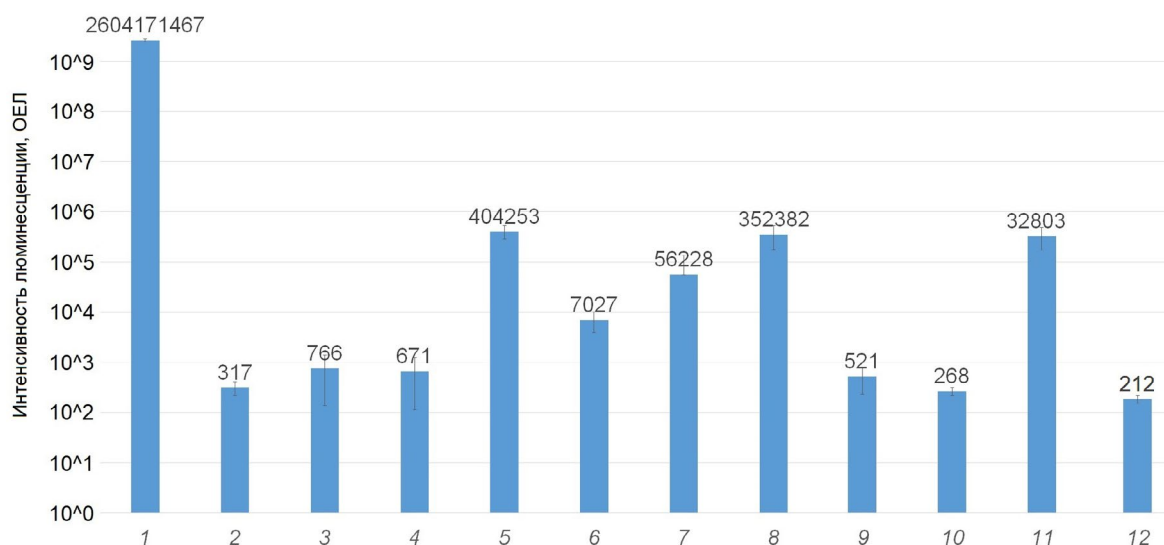


Рис. 5. Сравнительная активность пептидов в стимуляции трансфекции плазмиды pGL3, кодирующей репортерный ген люциферазы, выраженная как средние значения $\pm$ SE. 1 – Lipofectamine 3000, 2 – АВ-10, 3 – АВ-11, 4 – АВ-12, 5 – АВ-13, 6 – АВ-14, 7 – АВ-15, 8 – АВ-32, 9 – АВ-33, 10 – АСТ-1, 11 – СТ-10, 12 – ФСБ (отрицательный контроль)

При этом АВ-11 также показывал высокую активность в ДФПГ-тесте. Активность же АВ-14 может быть связана с более высокой способностью проникать через мембрану клетки. К сожалению, при статистической обработке полученных данных величина SE (стандартной ошибки) не позволила оценить антиоксидантную активность других пептидов.

Эксперименты по трансфекции имели целью прояснить вопрос проникновения этих пептидов в цитоплазму в составе комплекса с плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы. Уровень проникновения комплекса в клетки примерно пропорционален уровню свечения лизата клетки, при этом липофектамин 3000 служит сильным позитивным контролем. Результаты приведены на рис. 5, где показана относительная активность пептидов (log-шкала) как носителей для доставки плазмиды в клетки НЕК293. Их возрастающую активность можно расположить в ряд: АВ-13 ~ СТ-10 ~ АВ-32 > АВ-15 > АВ-14 > АВ-11 ~ АВ-12 ~ АВ-33 > АВ-10 ~ АСТ-1. Из этого ряда лишь пептид АВ-15 содержит ГК, более активные пептиды имеют свободную N-концевую аминогруппу. Интересно, что присоединение ГК к пептиду АВ-32 снижало трансфекционную активность продукта (пептид АВ-33) почти на три порядка.

Очевидно, что присоединение ГК к N-концу КП нежелательно, если иметь в виду его потенциальное использование для внутриклеточного транспорта; блокирование N-конца ведёт к существенной потере заряда, повышению гидрофобности за счёт появления фенольного остатка. В условиях физиологического pH фенольные гидроксилы несут слабый отрицательный заряд, в результате чего может

иметь место эффект электростатического отталкивания между молекулами пептида и отрицательно заряженными фосфатами клеточной мембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют, что КП после присоединения ГК приобретают новые свойства, проявляют антиоксидантную активность, даже превосходя активность самой ГК (в мольном отношении). Конъюгирование не приводит к повышению их токсичности для нормальных клеток и не повышает их гемолитическую активность, однако наблюдается некоторая тенденция к повышению избирательной токсичности для опухолевых клеток. Будущие исследования предполагают изучение ГК-содержащих пептидов в отношении антивирусной, антибактериальной и противоопухолевой активности. Поэтому одним из перспективных применений таких соединений может стать их использование в качестве антиоксидантных агентов в терапии сепсиса, тяжёлого патологического состояния, обусловленного микробной инфекцией и бурным развитием воспаления, где окислительный стресс составляет основу практически всех цитотоксических реакций [37, 38]. В качестве примера можно привести публикацию, где продукт конденсации лейцина с ГК показывал хорошую активность в модели нейтрализации ЛПС-индуцированного эндотоксического шока [39]. Использование синтетических пептидов с подобной модификацией позволяет значительно более гибко подходить к дизайну подобных соединений. Поскольку информации

относительно свойств ГК-конъюгатов ещё очень мало, необходимы дальнейшие работы по расширению спектра пептидных производных ГК (причём с использованием и других фенольных кислот) и изучению механизмов их действия. Кроме того, учитывая полученные результаты, дизайн таких конъюгатов должен включать возможность селективного выбора места присоединения к пептиду фенольного компонента. Возможный вариант – тиол-малеимидная конденсация, где фенольный компонент, содержащий малеимидную группу, присоединяется к пептиду, имеющему остаток цистеина в нужной позиции.

Вклад авторов. Андреев С.М., Хайтов М.Р. – концепция и руководство работой; Шатилов А.А.,

Шатилова А.В., Турецкий Е.А., Курмашева Р.А., Болякина Д.К., Бабикина М.О., Сапрыгина Л.В. – проведение экспериментов; Шершакова Н.Н., Турецкий А.А., Смирнов В.В., Шиловский И.П., Андреев С.М. – обсуждение результатов исследования, написание текста и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России (программа «Дендример 21»).

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. Alam, M. S., and Czajkowsky, D. M. (2021) SARS-CoV-2 infection and oxidative stress: Pathophysiological insight into thrombosis and therapeutic opportunities, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **63**, 44-57, doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.11.001.
2. Lozano-Sepulveda, S., Bryan-Marrugo, O. L., Cordovo-Fletes, C., Gutierrez-Ruiz, M. C., and Rivas-Estilla, A. M. (2015) Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells, *World J. Hepatol.*, **7**, 2880-2889, doi: 10.4254/wjh.v7.i29.2880.
3. Soomro, S. (2019) Oxidative stress and inflammation, *Open J. Immun.*, **9**, 1-20, doi: 10.4236/oji.2019.91001.
4. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., and Bitto, A. (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2017**, 8416763, doi: 10.1155/2017/8416763.
5. Nauser, T., and Gebicki, J. M. (2017) Reaction rates of glutathione and ascorbate with alkyl radicals are too slow for protection against protein peroxidation *in vivo*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **633**, 118-123, doi: 10.1016/j.abb.2017.09.011.
6. Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрасилов Б. С., Музафаров Е. Н. (2013) Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина, *Пушино*, Synchronbook.
7. Andreev, S. M., Shershakova, N. N., Kozhikhova, K. V., Shatilov, A. A., Timofeeva, A. V., Turetskiy, E. A., Kudlai, D. A., and Khaitov, M. R. (2020) Promising compounds from natural sources for the COVID-19 therapy, *Russ. J. Allergy*, **17**, 18-25, doi: 10.36691/RJA132.
8. Вейко А. Г. (2020) Молекулярная структура, квантово-химические параметры, механизм цитопротективного действия и вклад функциональных групп в антиоксидантный потенциал флавоноидов, *Вестник ВГМУ*, **19**, 27-39; doi: 10.22263/2312-4156.2020.5.27.
9. Trembl, J., and Šmejkal, K. (2016) Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals, *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, **15**, 720-738, doi: 10.1111/1541-4337.12204.
10. Briguglio, G., Costa, C., Pollicino, M., Giambo, F., Catania, S., and Fenga, C. (2020) Polyphenols in cancer prevention: new insights (Review), *Int. J. Func. Nutr.*, **1**, 9, doi: 10.3892/ijfn.2020.9.
11. Зверев Я. Ф. (2019) Противоопухолевая активность флавоноидов, *Бюлл. Сибирской медицины*, **18**, 181-194, doi: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
12. Perron, N. R., and Brumaghim, J. L. (2009) A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol, *Cell. Biochem. Biophys.*, **53**, 75-100, doi: 10.1007/s12013-009-9043-x.
13. Das, J., Ramani, R., and Suraju, M. O. (2016) Polyphenol compounds and PKC signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 2107-2121, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.06.022.
14. Mulder, T. P. J., van Platerink, C. J., Schuyt, P. J. W., and van Amlsvoort, J. M. M. (2001) Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *J. Chrom. B, Biomed. Sci. Appl.*, **760**, 271-279, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00285-7.
15. Mullen, W., Archeveque, M. A., Edwards, C. A., Matsumoto, H., and Crozier, A. (2008) Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 11157-11164, doi: 10.1021/jf801974v.
16. Paolino, D., Cosco, D., Cilurzo, F., and Fresta, M. (2007) Innovative Drug Delivery systems for the administration of natural compounds, *Curr. Bioact. Comp.*, **3**, 262-277, doi: 10.2174/157340707783220301.

17. Aatif, M. (2023) Current understanding of polyphenols to enhance bioavailability for better therapies, *Biomedicines*, **11**, 2078, doi: 10.3390/biomedicines11072078.
18. Xie, J., Bi, Y., Zhang, H., Dong, S., Teng, L., Lee, R. J., and Yang, Z. (2020) Cell-penetrating peptides in diagnosis and treatment of human diseases: from preclinical research to clinical application, *Front. Pharmacol.*, **11**, 697, doi: 10.3389/fphar.2020.00697.
19. Kozhikhova, K. V., Andreev, S. M., Shilovskiy, I. P., Timofeeva, A. V., Gaisina, A. R., Shatilov, A. A., Turetskiy, E. A., Andreev, I. M., Smirnov, V. V., Dvornikov, A. S., and Khaitov, M. R. (2018) A novel peptide dendrimer LTP efficiently facilitates transfection of mammalian cells, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, 8181-8190, doi: 10.1039/c8ob02039f.
20. Khaitov, M., Nikonova, A., Shilovskiy, I., Kozhikhova, K., Kofiadi, I., Vishnyakova, L., Nikolskii, A., Gatteringer, P., Kovchina, V., Barvinskaia, E., Yumashev, K., Smirnov, V., Maerle, A., Kozlov, I., Shatilov, A., Timofeeva, A., Andreev, S., Koloskova, O., Kuznetsova, N., Vasina, D., Nikiforova, M., Rybalkin, S., Sergeev, I., Trofimov, D., Martynov, A., Berzin, I., Gushchin, V., Kovalchuk, A., Borisevich, S., Valenta, R., Khaitov, R., and Skvortsova, V. (2021) Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation, *Allergy*, **76**, 2840-2854, doi: 10.1111/all.14850.
21. Шиловский И. П., Андреев С. М., Кожихова К. В., Никольский А. А., Хаитов М. Р. (2019) Перспективы использования пептидов против респираторно-синцитиального вируса, *Мол. Биология*, **53**, 541-560, doi: 10.1134/S002689841904013X.
22. Piccoli, J. P., and Cilli, E. M. (2014) Synthesis and activity of conjugates Gallic acid-GnRH-III, *BMC Proceed.*, **8**, 41, doi: 10.1186/1753-6561-8-S4-P41.
23. Lee, H., Kim, K., Oh, C., Park, C.-H., Aliya, S., Kim, H.-S., Bajpai, V. K., and Huh, Y. S. (2021) Antioxidant and anti-aging potential of a peptide formulation (Gal2-Pep) conjugated with gallic acid, *RSC Adv.*, **11**, 29407-29415, doi: 10.1039/d1ra03421a.
24. Sanches, P. R. S., Carneiro, B. M., Batista, M. N., Braga, A. C. S., Lorenzón, E. N., Rahal, P., and Cilli, E. M. (2015) A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity, *Amino Acids*, **47**, 1433-1443, doi: 10.1007/s00726-015-1980-7.14-16.
25. Pereira, D., Pinto, M., Correa-da-Silva, V., and Cidade, H. (2022) Recent advances in bioactive flavonoid hybrids linked by 1,2,3-triazole ring obtained by click chemistry, *Molecules*, **27**, 230, doi: 10.3390/molecules27010230.
26. Ghamry, H. I., Belal, A., El-Ashrey, M. K., Tawfik, H. O., Alsantali, R. I., Obaidullah, A. J., El-Mansi, A. A., and Abdelrahman, D. (2023) Evaluating the ability of some natural phenolic acids to target the main protease and AAK1 in SARS CoV-2, *Sci. Rep.*, **13**, 7357, doi: 10.1038/s41598-023-34189-6.
27. Sehrawat, R., Rathee, R., Akkol, E. K., Khatkar, S., Lather, A., Redhu, N., and Khatkar, A. (2022) Phenolic acids – versatile natural moiety with numerous biological applications, *Curr. Topics Med. Chem.*, **22**, 1472-1484, doi: 10.2174/1568026622666220623114450.
28. Choi, H. J., Song, J. H., Bhatt, L. R., and Baek, S. H. (2010) Anti-human rhinovirus activity of gallic acid possessing antioxidant capacity, *Phytother. Res.*, **24**, 1292-1296, doi: 10.1002/ptr.3101.
29. Kratz, J. M., Andrighetti-Fröhner, C. R., Kolling, D. J., Leal, P. C., Cirne-Santos, C. C., Yunes, R. A., Nunes, R. J., Trybala, E., Bergström, T., Frugulhetti, I. C., Barardi, C. R., and Simões, C. M. (2008) Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentylgallate, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **103**, 437-442, doi: 10.1590/s0074-02762008000500005.
30. Yang, K., Zhang, L., Liao, P., Xiao, Z., Zhang, F., Sindaye, D., Xin, Z., Tan, C., Deng, J., Yin, Y., and Deng, B. (2020) Impact of gallic acid on gut health: focus on the gut microbiome, immune response, and mechanisms of action, *Front. Immunol.*, **11**, 580208, doi: 10.3389/fimmu.2020.580208.11-13.
31. Al Zahrani, N. A., El-Shishtawy, R. M., and Asiri, A. M. (2020) Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: a review, *Eur. J. Med. Chem.*, **204**, 112609, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112609.
32. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.*, **76**, 270-276, doi: 10.1002/(sici)1097-0010(199802)76:2<270::aid-jsfa945>3.0.co;2-9.17.
33. Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., and Lukyanov, S. (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, *Nat. Methods*, **3**, 281-286, doi: 10.1038/nmeth866.
34. Галкина А. А., Болякина Д. К., Шатилова А. В., Шатилов А. А., Бабикина М. О., Голомидова А. К., Андреев С. М., Шершакова Н. Н., Хаитов М. Р. (2023) Разработка и оценка эффективности ранозаживляющих соединений на основе катионных пептидов и фуллерена, *Медицина экстремальных ситуаций*, **3**, 56-64, doi: 10.47183/mes.2023.036.
35. Özyürek, M., Bektasoglu, B., Güçlü, K., Güngör, N., and Apak, R. (2010) A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology, *J. Food Comp. Analysis*, **23**, 689-698, doi: 10.1016/j.jfca.2010.02.013.
36. Mishina, N. M., Markvicheva, K. N., Fradkov, A. F., Zagaynova, E. V., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V. V. (2013) Imaging H2O2 microdomains in receptor tyrosine kinases signaling, *Methods Enzymol.*, **526**, 175-187, doi: 10.1016/B978-0-12-405883-5.00011-9.

37. Никитин Е. А., Клейменов К. В., Батиенко Д. Д., Акуленко Д. А., Селиверстов П. В., Добрица В. П., Радченко В. Г. (2019) Новые подходы к воздействию на патогенетические звенья сепсиса, *Медицинский совет*, **21**, 240-246, doi: 10.21518/2079-701X-2019-21-240-246.
38. Aisa-Alvarez, A., Soto, M. E., Guarner-Lans, V., Camarena-Alejo, G., Franco-Granillo, J., Martínez-Rodríguez, E. A., Gamboa, Á. R., Manzano, P. L., and Pérez-Torres, I. (2020) Usefulness of antioxidants as adjuvant therapy for septic shock: a randomized clinical trial, *Medicina*, **56**, 619, doi: 10.3390/medicina56110619.20.
39. Cheng, Y., Li, X., Tse, H.-F., and Rong, J. (2018) Gallic acid-L-leucine conjugate protects mice against LPS-induced inflammation and sepsis via correcting proinflammatory lipid mediator profiles and oxidative stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 1081287, doi: 10.1155/2018/1081287.

SYNTHESIS OF PLYPHENOL-CONTAINING CATIONIC LINEAR AND DENDRIMERIC PEPTIDES WITH ANTI-OXIDANT ACTIVITY

A. A. Shatilov¹, S. M. Andreev^{1*}, A. V. Shatilova¹, E. A. Turetskiy^{1,2},
R. A. Kurmasheva^{1,2}, M. O. Babikhina^{1,3}, L. V. Saprigina^{1,3}, N. N. Shershakova¹,
D. K. Bolyakina¹, V. V. Smirnov^{1,2}, I. P. Shilovsky¹, and M. R. Khaitov^{1,4}

¹ "NRC Institute of Immunology" FMBA of Russia, 115522 Moscow, Russia; e-mail: sm.andreev@nrcii.ru

² Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia

³ MIREA – Russian Technological University, 119454 Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

Natural polyphenols are of great interest from the point of view of their use for the pharmacological control of oxidative stress and many diseases. However, the low bioavailability and rapid metabolism of polyphenols in the form of glycosides or aglycones stimulates the search for effective means of delivery into systemic circulation. Conjugation of polyphenols with cationic amphiphilic peptides can result in compounds with strong antioxidant activity and the ability to cross biological barriers. Such compounds may be in demand as drugs for antioxidant therapy, including for the treatment of viral, oncological and neurodegenerative diseases due to the diverse range of biological activities inherent in polyphenols and peptides. In this work, cationic linear and dendrimer amphiphilic cationic peptides were synthesized by the solid phase method, and a number of peptides were conjugated to gallic acid (Ga). Ga is a non-toxic natural phenolic acid and an important functional element of many flavonoids with high antioxidant activity. It was shown that the resulting Ga-peptide conjugates exhibited antioxidant (antiradical) activity that was 2-3 times higher than that of ascorbic acid. Other tests indicated that the addition of Ga did not affect the toxicity and hemolytic activity of the conjugates. Ga-modified peptides stimulated the transmembrane transfer of the pGL3 plasmid encoding the luciferase reporter gene; however, the addition of Ga to the N-terminus of the peptide reduced its transfection activity. Some of the resulting compounds had noticeable inhibitory activity against the *E. coli*-Dh5a strain.

Keywords: cationic peptides, dendrimers, gallic acid, antiradical activity, hemolysis, cytotoxicity, ROS, HyPer, transfection

НАРУШЕНИЕ СБОРКИ ПОЛНОЦЕННЫХ ВИМЕНТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ ПОДАВЛЯЕТ ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ И СОЗРЕВАНИЯ ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ И ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ ТИПА КЛЕТОЧНЫХ ПРОТРУЗИЙ

© 2024 А.О. Жолудева¹, Н.С. Потапов², Е.А. Козлова²,
М.Е. Ломакина¹, А.Ю. Александрова^{1*}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: tonya_alex@yahoo.com

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

Поступила в редакцию 04.09.2023

После доработки 01.12.2023

Принята к публикации 03.12.2023

Клеточная миграция во многом определяется типом протрузий, которые образует клетка. Мезенхимальная миграция осуществляется за счёт образования ламеллиподий и/или филоподий, а основной амебoidalной миграции являются мембранные блебы. Изменение условий миграции может приводить к смене характера клеточного движения, например, ингибирование Arp2/3-зависимой полимеризации актина ингибитором СК-666 вызывает переход от мезенхимального движения к амебoidalному. Способность клеток переключаться с одного типа движения на другой называется пластичностью миграции. Клеточные механизмы, регулирующие миграционную пластичность, изучены плохо. Одним из факторов, определяющих возможность миграционной пластичности, может быть наличие и организация виментиновых промежуточных филаментов (ВПФ). Чтобы ответить на вопрос, влияет ли организация ВПФ на способность фибробластов формировать мембранные блебы, мы использовали крысиные эмбриональные фибробласты REF52 с нормальной организацией ВПФ, с нокаутом ВПФ (REF^{-/-}) и с мутацией, ингибирующей сборку полноценных ВПФ (REF117). Образование блебов вызывали обработкой клеток СК-666. Нокаут виментина не привёл к статистически значимому увеличению количества клеток, образующих блебы. Среди фибробластов с виментином в виде коротких фрагментов существенно возросло количество клеток с блебами как в контрольной культуре, так и под действием СК-666. Нарушение организации ВПФ не вызывало изменения микротрубочек или фосфорилирования малой цепи миозина, но приводило к значительному изменению фокальных контактов (ФК). Наиболее заметное и статистически достоверное уменьшение размеров и количества ФК наблюдалось в клетках REF117. Мы считаем, что регуляция мембранного блеббинга ВПФ опосредуется их действием на систему ФК. При культивировании фибробластов с различной организацией ВПФ в трёхмерном коллагеновом геле было показано, что организация ВПФ определяет характер образуемых клеткой протрузий, что, в свою очередь, определяет характер движения клеток. Показана новая роль ВПФ как регулятора мембранного блеббинга, характеризующего переход к амебoidalному движению.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: виментиновые промежуточные филаменты, филоподия, блеб, фокальные контакты, актиновый кортекс.

DOI: 10.31857/S0320972524010115 EDN: YQMZJC

ВВЕДЕНИЕ

Первым шагом клеточной миграции является формирование специфических выростов – про-

трузий, причём форма и характер этих протрузий определяют характер миграции клеток [1]. Для высокоподвижных мезенхимальных клеток характерно образование широких плоских про-

Принятые сокращения: ВПФ – виментиновые промежуточные филаменты; ФК – фокальные контакты; DIC-микроскопия – дифференциально-интерференционно-контрастная микроскопия; MLC – лёгкая цепь миозина.

* Адресат для корреспонденции.

трузий – ламеллиподий – или тонких узких филоподий, обеспечивающих миграцию по мезенхимальному механизму. Мезенхимальная миграция осуществляется за счёт полимеризации актиновых филаментов, регулируется активностью малых ГТФаз Rac и/или Cdc42 и зависит от взаимодействия клеток с субстратом, формирования адгезионных структур – фокальных контактов (ФК), а также от активности матриксных металлопротеаз [2]. Ещё одним типом протрузий являются мембранные блебы – пузырьобразные выросты мембраны, образующиеся под действием внутриклеточного давления, которые после образования быстро заполняются цитоскелетными структурами и могут сокращаться. В отличие от ламеллиподий, для формирования блебов необходима активность малой ГТФазы Rho, не требуется образования адгезионных контактов с субстратом и активности металлопротеаз. Динамика образования и структура блебов описана несколькими группами [3–5]. Ранее образование блебов было отмечено у делящихся клеток и считалось признаком митоза или апоптоза [6]. В последнее время было показано, что блебы являются лидирующими протрузиями в случае так называемого амёбoidного движения клеток – быстрого движения в 3D-субстрате, независимого от активности матриксных металлопротеаз [7–9]. Амёбoidное движение характерно для амёб, клеток лейкоцитарного ряда, для стволовых и опухолевых клеток [10]. Некоторые клетки могут переключаться с одного способа движения на другой в зависимости от микроокружения. Способность клеток изменять характер движения называется пластичностью миграции и даёт возможность мигрирующим клеткам «выбрать» наиболее оптимальный для конкретных условий способ движения [11, 12]. Переход с зависимого от образования ламеллиподий/филоподий мезенхимального движения на блеб-зависимое амёбoidное движение (мезенхимально-амёбoidный переход, МАП) показан для агрессивно мигрирующих опухолевых клеток (меланомы, глиобластомы) при движении в 3D-субстрате (коллагене, матригеле) или при движении в ограниченном пространстве [13–15] для стволовых клеток. Формирование блебов происходит за счёт повышения внутриклеточного давления в результате усиления акто-миозиновой сократимости или за счёт внешних воздействий, например, сжатия клетки или миграции в условиях ограниченного пространства [16]. Показано, что формирование блебов может быть инициировано нарушением целостности актинового подмембранного цитоскелета – актинового кортекса [17], или ослаблением связи между клеточной мембраной и подлежащим актиновым кортексом [18]. Однако даже в одной и той же культуре не все клетки демонстрируют миграционную пластичность

при одних и тех же условиях и воздействиях [19]. Какими особенностями обладают клетки, способные формировать блебы и переходить на амёбoidное движение, остаётся неизвестным.

В основе движения клеток лежит реорганизация клеточного цитоскелета. Характер и эффективность клеточной миграции во многом определяется взаимодействием трёх основных систем цитоскелета: микротрубочек, актиновых филаментов и промежуточных филаментов [20]. Роль микрофиламентов и микротрубочек в регуляции миграции изучена очень хорошо [2, 21, 22], а про участие промежуточных филаментов в регуляции клеточной подвижности остаётся много вопросов. В разных типах клеток содержатся разные промежуточные филаменты. Для высокоподвижных мезенхимальных клеток характерны виментиновые филаменты – промежуточные филаменты, относящиеся к III типу. Основными функциями виментиновых промежуточных филаментов (ВПФ) считаются регуляция жёсткости клеток [23], защита клетки от механических повреждений [24], участие в регуляции клеточной адгезии и подвижности [25]. Экспрессия ВПФ является общепринятым маркером эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), процесса приобретения эпителиальными клетками подвижного фенотипа [26]. ЭМП наблюдается в процессе эмбрионального развития при формировании клеточных слоёв, в процессе заживления ран или при опухолевом метастазировании. Показано, что экспрессия виментина сама по себе может стимулировать мезенхимальную миграцию клеток [27], а также формирование специфических протрузий, характерных для метастазирующих клеток – инвадоподий [28–29]. Поэтому широко обсуждается возможность подавления экспрессии виментина в опухолевых клетках в качестве терапевтического воздействия для остановки метастазирования при лечении злокачественных заболеваний [30]. В пользу такого подхода говорят результаты, полученные на дендритных клетках, свидетельствующие о том, что виментин необходим и для амёбoidного движения [31]. Однако в последнее время появились данные, показывающие, что ингибирование виментина приводит к усилению миграции клеток меланомы в условиях ограниченного пространства: через мелкие поры и в узких щелях, и вызывает активацию амёбoidного движения опухолевых клеток [32–34]. Каким образом ВПФ могут регулировать возможность перехода к амёбoidному движению, остаётся неизвестным.

Ранее было показано, что ВПФ могут находиться в клетке в различном состоянии [35], что определяется степенью их сборки и посттрансляционными модификациями. В частности, они могут быть представлены зрелыми филаментами,

организованными в густую сеть, или короткими филаментами различной длины. Наиболее короткие из них – unit-length filament (ULF) – представляют из себя филаменты, собранные из восьми тетрамеров виментина, длиной около 65 нм [36]. По данным других авторов, длина ULF, измеренная с помощью иммунофлуоресценции, достигает 130 нм [37]. ULF могут объединяться концами и формировать полномерные неполярные виментиновые филаменты [38].

Целью настоящей работы была проверка выдвинутой нами гипотезы о том, что способность к формированию мембранных блебов у фибробластов зависит от наличия и состояния системы ВПФ. Для анализа влияния организации ВПФ на формирование различных протрузий в клетках мы использовали клетки с ярко выраженными отличиями в строении ВПФ – линию клеток эмбриональных крысиных фибробластов REF52 с нормальными, хорошо выраженными ВПФ, и производные этих клеток с нокаутом ВПФ и мутацией в гене виментина, нарушающей сборку филаментов. Блеббинг мы стимулировали обработкой клеток ингибитором Arp2/3-зависимой полимеризации актина СК-666, что, как было показано ранее, приводит к формированию краевого блеббинга у клеток фибросаркомы HT1080 [19] и стимулирует переход клеток на амебоидное движение [39]. Выявление роли ВПФ в регуляции формирования блебов и, следовательно, в определении возможности перехода клеток на амебоидное движение является демонстрацией новой и очень важной функции виментиновых филаментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Были использованы три линии эмбриональных фибробластов крысы: контрольная линия клеток REF52, а также полученные на её основе с помощью CRISPR/Cas9-системы клетки REF^{-/-}, в которых отсутствуют виментиновые филаменты, и REF117 – клетки с мутацией в гене виментина (замена Tyr117 на Leu), которая приводит к нарушению сборки зрелых полноразмерных ВПФ [23]. Клетки были любезно предоставлены А.А. Мининым (Институт белка РАН). Клетки культивировали в среде DMEM («Sigma-Aldrich», США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телёнка (FCS) («Biowest», Франция) и антибиотики (по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина), при 37 °C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂.

Флуоресцентная микроскопия. Для проведения флуоресцентного окрашивания и выявления внутриклеточной локализации актина, ФК, виментина и клеточных ядер применяли фикса-

цию 3,7%-ным параформальдегидом (PFA) («Sigma-Aldrich»). Для визуализации микротрубочек применяли фиксацию холодным 100%-ным метанолом. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела к виментину (клон V9, «Sigma-Aldrich»), моноклональные мышинные антитела к α -тубулину (клон DM1A, «Sigma-Aldrich»), моноклональные кроличьи антитела к винкулину (клон 42H89L44, «Thermo Fisher Scientific», США). В качестве вторичных антител использовали анти-мышинные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa-488 («Jackson Immuno Research», США), и анти-кроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa-594 («Jackson Immuno Research»). Активные филаменты выявляли с помощью фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентными красителями (Alexa Fluor 488 phalloidin («MolecularProbes», США) и TRITC-phalloidin («Sigma-Aldrich»)), а ядра метили красителем DAPI («Sigma-Aldrich»). При окрашивании антитела использовали в разведениях, рекомендованных производителями. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse-Ti («Nikon», Япония).

Измерение площади ФК. Для измерения площади ФК с помощью программы Fiji/ImageJ анализировали препараты иммунофлуоресцентно-окрашенного винкулина, отснятые при увеличении 40 × 1,5. Выбирали одиночную клетку, после чего использовали функцию Threshold Moments для выделения интересующих нас контактов; площадь и количество ФК обсчитывали с помощью функции Analyze particles. В случае, если Threshold выделял частицы, не являющиеся контактами, такие объекты отфильтровывали вручную и в расчёт не брали. Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prism.

Индукция блеббинга с использованием СК-666. Клетки сажали в концентрации 40 тыс. клеток/мл на 3,5-см чашки Петри со стеклянным дном («MatTek», США). Через 24 ч снимали общий вид культуры с помощью дифференциально-интерференционно-контрастной (DIC) микроскопии (микроскоп Nikon Eclipse-Ti с объективом Plan-fluar ×20 (× 1,5)), применялась цифровая камера с охлаждением Hamamatsu с программным обеспечением NIS-Elements AR. Клетки были сфотографированы на 10 случайно выбранных полях зрения.

Для того чтобы индуцировать блеббинг, клетки в течение часа были обработаны ингибитором Arp2/3-зависимой полимеризации актиновых филаментов СК-666 в концентрации 200 мкМ. После инкубации клетки снова фотографировали с помощью DIC с теми же увеличениями на 10 случайно выбранных полях зрения. Полученные фотографии вручную обсчитывали для определения процента клеток с блебами. В расчёт брали

одиночные клетки и клетки, которые контактируют не более чем с двумя соседними клетками, делящиеся и апоптотические клетки не учитывали.

Вестерн-блот. Данный метод использовали для анализа экспрессии интересующих нас белков – винкулина, виментина, лёгкой цепи миозина (MLC) и фосфорилированной формы миозина (pMLC). Для получения белковых лизатов клетки предварительно высаживали на чашки, культивировали в течение 24 ч при 37 °C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. Затем клетки лизировали, используя лизис-буфер RIPA с коктейлем ингибиторов протеаз («Roche», Германия). Нормализованные по концентрации белка образцы клеточных лизатов наносили на 12,5%-ный SDS-полиакриламидный гель и проводили вертикальный электрофорез согласно протоколу («Bio-Rad», США). Белки после электрофореза переносили с гелей на нитроцеллюлозные мембраны Amersham Hybond-C («GE Healthcare», США). Мембраны блокировали 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина («ПанЭко», Россия) на фосфатном буфере (1× TBS, pH 7,4) с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 («AppliChem», Испания) в течение 1 ч на качалке. Далее мембраны инкубировали с первичными антителами 16 ч при 4 °C. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела к виментину (клон V9, «Sigma-Aldrich»), кроличьи моноклональные рекомбинантные антитела к винкулину (клон 42H89L44, «Thermo Fisher Scientific»), кроличьи поликлональные антитела к лёгкой цепи миозина 2 (клон D18E2, «Cell Signaling», США); кроличьи поликлональные антитела к фосфорилированной лёгкой цепи миозина 2 (Ser19) (клон 3671, «Cell Signaling»). В качестве контроля загрузки белков использовали моноклональные мышинные антитела к актину C4 («Sigma-Aldrich») и мышинные моноклональные антитела к γ -тубулину GTU-88 («Sigma-Aldrich»). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой («Jackson ImmunoResearch», Великобритания). Сигнал детектировали с помощью субстрата Pierce ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fisher Scientific»), изображения получали с помощью прибора Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare»). Для денситометрии использовали программу ImageJ.

3D-Миграция в коллагеновом матриксе. Для изучения морфологии образуемых протрузий и характера миграции клеток в 3D-субстрате использовали коллаген I типа из крысиных хвостов («Corning», США). Для приготовления 300 мкл смеси коллагена на льду смешивали 15,3 мкл 10× PBS, 3 мкл 1N NaOH, 79 мкл среды DMEM («Sigma-Aldrich»), содержащей 20% FCS, и 153 мкл коллагена, на каждом этапе хорошо перемешивали раствор, не допуская образования пузырей. После

этого вносили 50 мкл клеток, разведённых в DMEM («Sigma-Aldrich»), содержащей 20% FCS в концентрации 600 тыс. кл./мл. Полученный раствор заливали в самодельную камеру: на предметное стекло притирали 3 слоя парафильма, вырезали камеры размером примерно 1,5 см на 1,5 см, после чего накрывали их покровным стеклом и запаивали с помощью нагретого парафина, оставляя зазор для заполнения коллагеном. После заполнения раствором коллагена камеру полностью запаивали парафином и оставляли на час в термостате при 37 °C. Далее проводили съёмку в режиме DIC-микроскопии (микроскоп Nikon Eclipse-Ti с объективом Plan-fluar ×20 (×1,5)), применялась цифровая камера с охлаждением Hamamatsu с программным обеспечением NIS-Elements AR.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения ответа на вопрос о том, каким образом наличие ВПФ и их внутриклеточная организация влияет на возможность формирования мембранных блебов, мы использовали линию крысиных эмбриональных фибробластов (REF52), её производные с нокаутом виментина (REF^{-/-}) и нокаутные клетки с трансфицированным мутантным виментином, в котором тирозин в позиции 117 заменён на лейцин (REF117). Такая мутация приводит к тому, что виментин не собирается в длинные зрелые филаменты, а остаётся в виде коротких предшественников как *in vitro*, так и при трансфекции в клетки [40].

Морфологическая характеристика фибробластов с разной организацией ВПФ. Клетки всех трёх линий являются типичными фибробластами с наличием активного края, хорошо выраженными пучками микрофиламентов и развитой системой микротрубочек (рис. 1).

В культуре REF52 ВПФ представлены густой сетью филаментов, распределённой практически по всей клетке. В культуре REF^{-/-} ВПФ отсутствуют. В клетках REF117 ВПФ представлены мелкими точечными структурами, в основном сосредоточенными в центральной части клетки и вокруг ядра. При этом степень расплывчатости этих клеток на субстрате в редкой культуре (когда клетки расположены не группами, а в основном поодиночке) после культивирования в течение 24 ч несколько различается (рис. 2).

Клетки REF52 при съёмке живой культуры в режиме DIC выглядят как хорошо распластанные фибробласты, среди REF^{-/-} наравне с типичными фибробластами наблюдается довольно много слабо прикреплённых и плохо распластанных клеток. Ещё больше плохо распластанных клеток наблюдается в культуре REF117, что хорошо видно

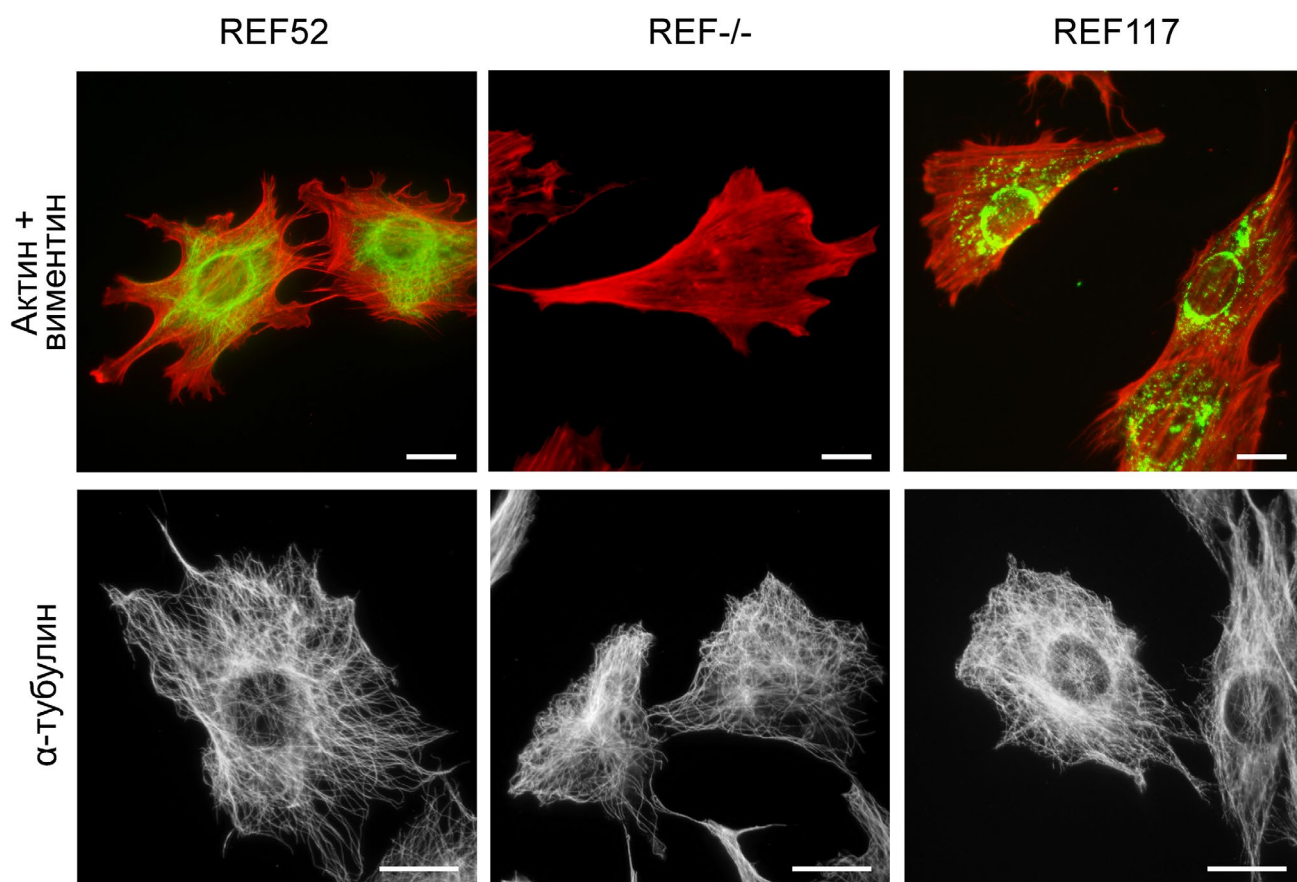


Рис. 1. Цитоскелет фибробластов с разной организацией ВПФ. Иммунофлуоресцентное окрашивание. Верхний ряд – актин (красный) и виментин (зелёный), нижний ряд – микротрубочки. Масштабный отрезок – 10 мкм

на рис. 2, б по значительному увеличению фракции клеток малой площади. При фиксации эти клетки легко отделяются от субстрата, а на препарате остаются лучше прикреплённые клетки, практически не отличающиеся по морфологии от контрольных REF52. Именно слабым прикреплением части клеток в случае нокаута или нарушения сборки ВПФ мы можем объяснить отличие в нашем описании этих культур от данных предыдущих исследователей, говорящих о том, что отсутствие или недостаточная сборка ВПФ не оказывает существенного влияния на морфологию фибробластов [23]. Анализ площадей живых клеток после 24 ч культивирования показал, что лучше всего распластаны клетки REF52, средняя площадь клеток REF^{-/-} несколько меньше, а наименьшая средняя площадь у клеток REF117 (рис. 2). Различия статистически достоверны. Увеличение сроков культивирования до 48 ч не приводило к существенным изменениям степени расплывания клеток.

Отличия в морфологии образуемых протрузий у фибробластов с разной организацией ВПФ. Основным типом протрузий у клеток всех трёх типов являются широкие ламеллиподии или

тонкие филоподии, иногда наблюдается спонтанное формирование блебов, причём в основном на слабо распластаных поджатых клетках. Таких «спонтанных» блебов практически нет в культуре REF52, в культуре REF^{-/-} средний процент клеток с блебами несколько выше ($6,65 \pm 1,1\%$ и $12,3 \pm 1,6\%$ соответственно), однако статистической разницы между двумя линиями нет. В культуре REF117 доля клеток, спонтанно образующих блебы, существенно увеличена ($56,8 \pm 3,4\%$) (рис. 2).

Для того чтобы стимулировать блеббинг, мы обрабатывали клетки ингибитором Arp2/3-зависимой полимеризации актиновых филаментов СК-666 в течение 1 ч, а затем снимали живые клетки в режиме DIC. Съёмка живых клеток для оценки эффективности перехода к блеббингу была необходима, потому что при фиксации часть мембранных блебов лопаются и не регистрируется на фиксированных или окрашенных препаратах. Во всех трёх исследуемых клеточных линиях обработка СК-666 приводила к существенному поджатию ламеллиподий, часть клеток ошарилась. При этом во всех культурах статистически достоверно увеличивалось количество клеток с блебами (рис. 2). Важно отметить, что в фибробластах с ви-

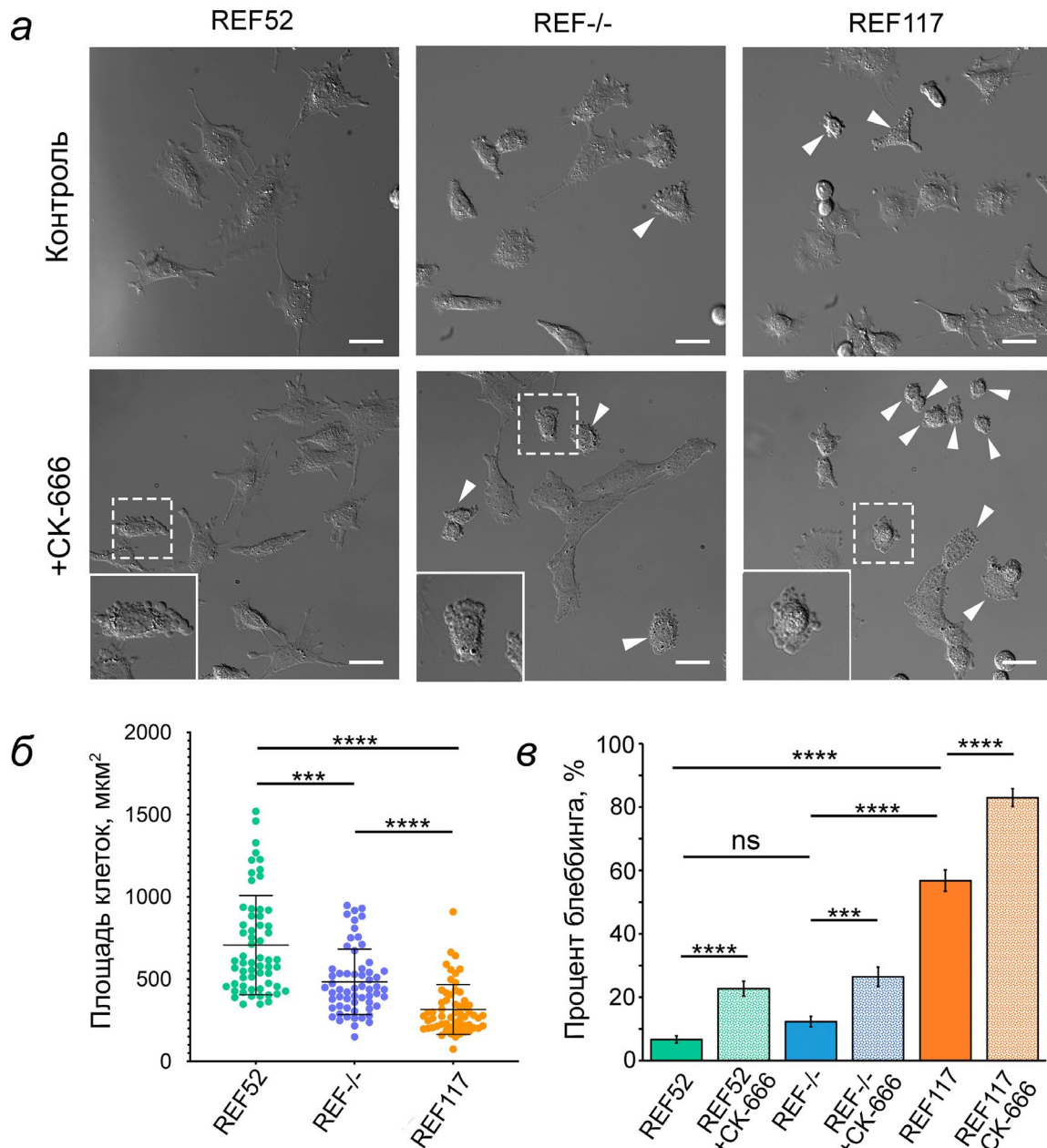


Рис. 2. Различия в способности к мембранному блебингу у фибробластов с разной организацией ВПФ. **а** – Морфология контрольных клеток (верхний ряд) и клеток после обработки 200 мкМ СК-666 в течение 1 ч (нижний ряд). DIC-Микроскопия, масштабный отрезок 20 мкм. Клетки с мембранным блебингом обозначены белыми стрелками. На врезках большое увеличение клеток с блебами, выделенных на рисунке пунктирным квадратом. **б** – Точечная диаграмма, иллюстрирующая площадь клеток REF52, REF^{-/-}, REF117, распластанных на субстрате, представлены средние значения со стандартными отклонениями. Представлены результаты 4 экспериментов, статистическая обработка выполнена с помощью программы GraphPad Prism, критерий Краскелла–Уоллиса (с апостериорным тестом Данна): *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – статистически незначимые изменения, $N = 60$ клеток для каждой группы. **в** – Доля клеток, образующих блебы в культурах до и после обработки СК-666. Для статистического анализа использовали дисперсионный анализ ANOVA: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – статистически незначимые изменения, $N = 30$ полей зрения для каждой группы

ментинном в виде коротких фрагментов количество клеток с блебами после обработки СК-666 достигало $83 \pm 2,8\%$ по сравнению с $22,7 \pm 2,3\%$ и $26,4 \pm 3,1\%$ у клеток REF52 и REF^{-/-} соответственно (рис. 2).

Таким образом, на способность клеток к образованию мембранных блебов наибольшее влияние

оказывает не отсутствие ВПФ, а нарушение сборки полноценных виментиновых филаментов.

Анализ причин, вызывающих повышенное формирование блебов в клетках с нарушенной организацией ВПФ. Мы поставили задачей выявить факторы, которыми можно было бы

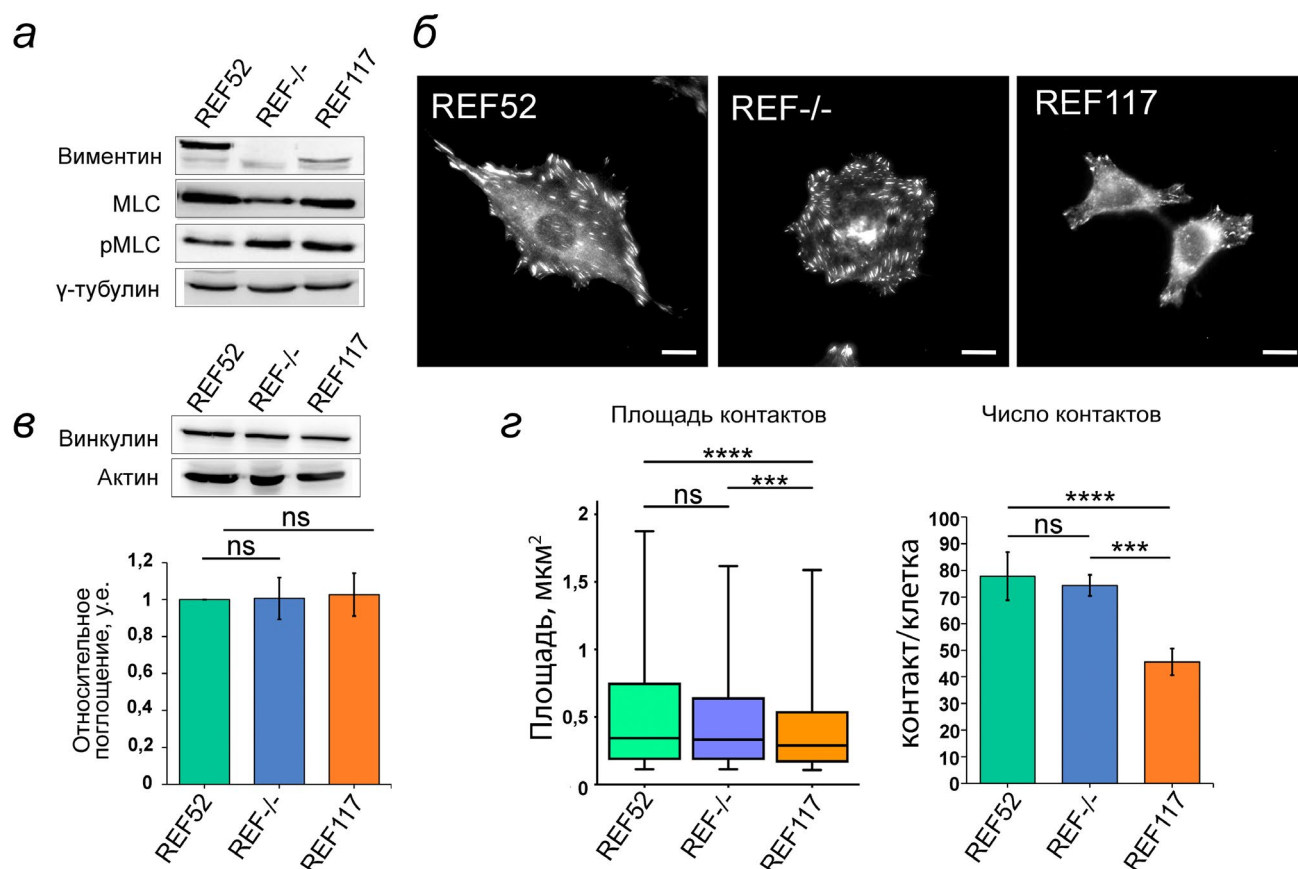


Рис. 3. Экспрессия MLC; pMLC и различия в системе ФК у фибробластов с разной организацией виментина. *а* – Репрезентативный Вестерн-блот, регистрирующий изменения экспрессии виментина, лёгкой цепи миозина (MLC), фосфорилированной лёгкой цепи миозина (pMLC). Для контроля нанесения белков использован гамма-тубулин. *б* – Морфология ФК у клеток исследуемых культур, иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к винкулину. Масштабный отрезок 20 мкм. *в* – Вестерн-блот, демонстрирующий экспрессию винкулина в трёх культурах, актин использован для контроля нанесения белков, денситометрия выполнена на основе анализа 4-х экспериментов. *г* – Диаграммы, иллюстрирующие изменение размеров (левая) и количества (правая) ФК в исследованных культурах. Диаграмма показывает 90%-ный интервал значений площадей и количества индивидуальных контактов на клетку. Статистическая обработка выполнена с помощью программы GraphPad Prism. Для проверки статистической достоверности в различиях площади ФК в трёх культурах REF использовался критерий Краскела–Уоллиса (с апостериорным тестом Данна): *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – статистически незначимые изменения, $N \geq 1004$ контактов

объяснить разную способность клеток к образованию мембранных блебов в этих трёх культурах. Ранее было показано, что блеббинг может быть вызван нарушением организации микротрубочек [41, 42]. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к тубулину мы показали, что существенных различий в строении микротрубочек у этих трёх культур не наблюдается и микротрубочки представлены густой сетью, распределённой по всей клетке (рис. 1). Поскольку образование блебов связано с возрастанием внутриклеточного гидростатического давления [9, 42], что может быть вызвано ростом сократимости [8], мы провели с помощью Вестерн-блота анализ изменения в наших клетках экспрессии лёгкой цепи миозина (MLC) и наличие активированной (фосфорилированной) лёгкой цепи миозина (pMLC) (рис. 3).

Мы не обнаружили статистически достоверных отличий в изменении количества MLC и pMLC в этих культурах, которые свидетельствовали бы о существенном изменении сократимости, вызванной отсутствием ВПФ или нарушением формирования зрелых промежуточных филаментов.

Ранее в нескольких работах было показано, что ВПФ взаимодействуют с ФК, и наличие и организация ВПФ влияют на формирование адгезионных структур [36, 39, 43, 44]. Мы проанализировали изменение в строении ФК у фибробластов с разным статусом ВПФ в нашей системе. С помощью Вестерн-блота было показано, что делеция виментина или нарушение образования зрелых ВПФ у мутантных клеток REF117 не влияет на количество экспрессируемого белка ФК винкулина (рис. 3, в). Однако распределение и размер ФК

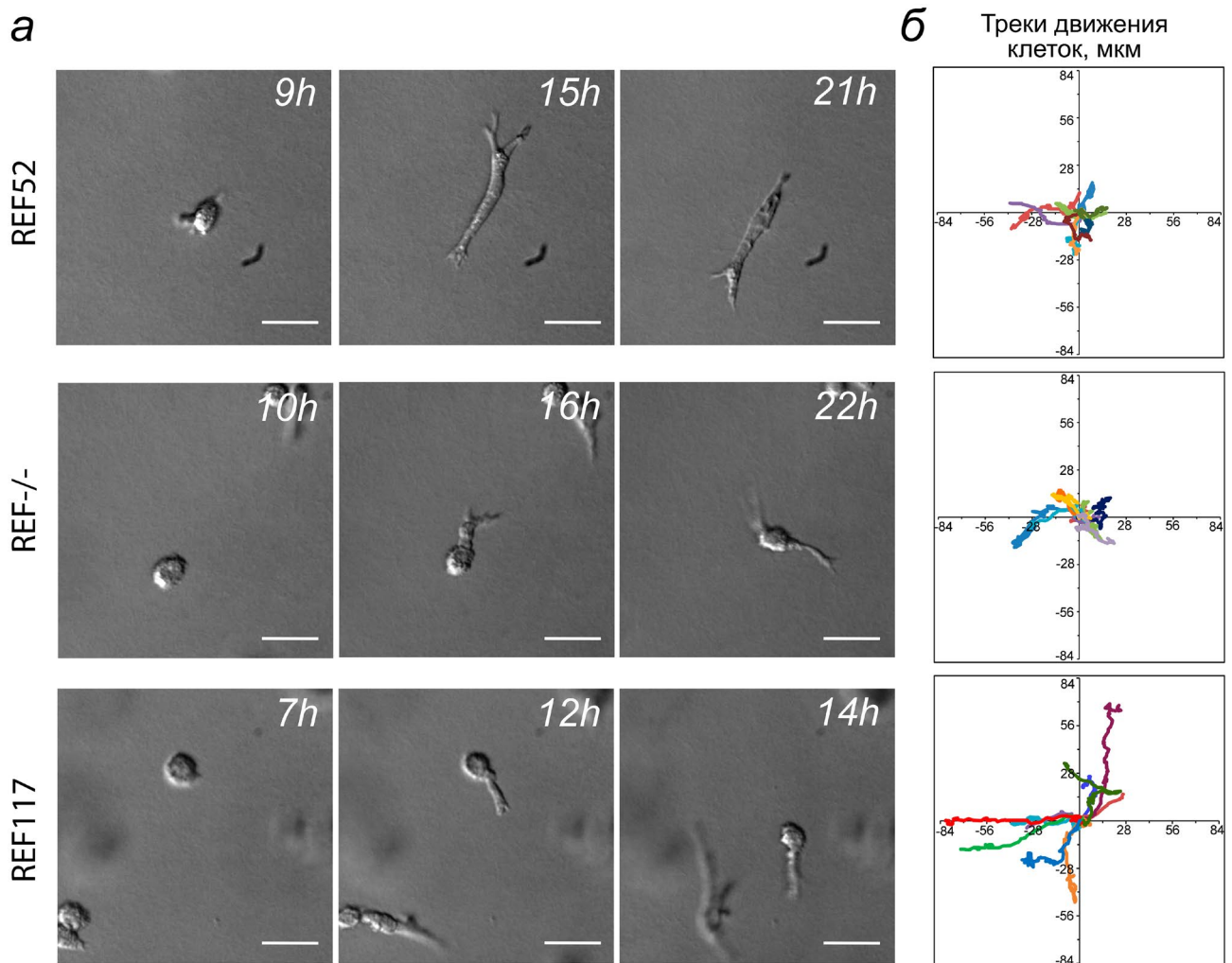


Рис. 4. Разнообразие протрузий, образуемых клетками с разной организацией ВПФ в трёхмерном коллагеновом геле. *а* – Морфология образованных протрузий, отмечено время от начала съёмки для каждого выбранного кадра, масштабный отрезок 40 мкм; *б* – треки движения клеток с разной организацией ВПФ в трёхмерном коллагеновом геле

при этом меняются. Типичная морфология, среднее количество на клетку и средние размеры ФК у исследуемых клеток представлены на рис. 3, б, г. Для клеток REF52 характерно формирование крупных ФК (максимальная площадь 6,5 мкм²) преимущественно на краю клетки (рис. 3, б). Средняя площадь ФК REF52 равна $0,6 \pm 0,03$ мкм² (рис. 3, г). Максимальные размеры регистрируемых ФК у REF^{-/-} – 4,2 мкм², средние значения – $0,51 \pm 0,02$ мкм². Важно отметить, что разница в размерах ФК у клеток REF52 и REF^{-/-} была статистически недостоверна. Также не было отмечено достоверной разницы в количестве ФК между этими культурами. У клеток REF117 количество контактов и их средняя площадь статистически достоверно уменьшаются как по сравнению с контролем, так и с клетками с нокаутом виментина REF^{-/-}. Максимальный размер контактов в этой культуре – 3,8 мкм², средние значения – $0,44 \pm 0,03$ мкм². Как было отмечено выше, среди клеток REF^{-/-} и REF117 наблюдается большое

число поджатых и плохо распластанных клеток. У таких клеток ФК практически отсутствуют, есть лишь несколько очень мелких контактов на самой периферии.

Таким образом, не столько отсутствие (нокаут) виментиновых филаментов, сколько нарушение формирования полноразмерных зрелых ВПФ приводило к существенному ухудшению образования и созревания ФК.

Анализ характера протрузий у фибробластов с различной организацией ВПФ при культивировании в трёхмерном коллагеновом геле. Более приближенной к естественным условиям моделью является культивирование клеток в трёхмерном матриксе. Мы анализировали морфологию клеток при их культивировании в коллагеновом геле, обращая особое внимание на характер протрузий и долю подвижных клеток в каждой культуре. Подвижными мы считали клетки, которые в течение времени съёмки (22 ч) переместились более чем

на один диаметр. Общее количество обсеянных клеток REF52 – 94, REF^{+/–} – 100, REF117 – 79.

В 3D коллагеновом геле контрольные фибробласты REF52 образуют несколько тонких отростков (филоподий), направленных в разные стороны (рис. 4).

Клетки REF52 в основном не демонстрируют направленного эффективного движения: отростки могут поджиматься и снова образовываться, и клетки передвигаются на минимальные расстояния, часто меняя направления. В отсутствие дополнительного стимула в культуре REF52 мигрирует 41% клеток. В культуре REF^{+/–} в коллагеновом геле клетки в основном остаются поджатыми и ошаренными, наблюдается формирование мембранных бляшек. Этот бляббинг не сопряжён с апоптозом, бляшки образуются с разных сторон (неполяризованный бляббинг), клетки перемещаются очень мало, подвижно 30% клеток. Некоторые клетки формируют отростки или в виде филоподий, или в виде утолщённого выроста с боковыми бляшками (лобоподии) [45]. Одна и та же клетка может последовательно формировать разные типы отростков. Такие клетки перемещаются на малые расстояния (1–3 диаметра клетки), и их движение не направлено. Клетки REF117 в трёхмерном коллагеновом геле наиболее подвижны в сравнении с остальными культурами, перемещаются около 63% клеток. Сначала по всей поверхности образуются мембранные бляшки, а потом происходит поляризация клетки, образуется один длинный вырост, часто имеющий боковые бляшки, и клетки начинают направленное движение в сторону выроста.

Таким образом, различная организация ВПФ определяет характер протрузий, образующихся в трёхмерном коллагеновом матриксе, что, в свою очередь, определяет характер движения клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Характер клеточной миграции во многом определяется типом протрузий, которые могут образовывать клетки. Так, для мезенхимального движения характерно формирование ламеллиподий или филоподий, а быстрое амебоидное движение происходит за счёт формирования бляшек. В нашей работе мы не стремились сравнивать амебоидное и мезенхимальное движение хотя бы потому, что амебоидное движение, прежде всего, характерно не для нормальных фибробластов, а для клеток лейкоцитарного ряда, стволовых или опухолевых клеток. Нашей задачей стала проверка гипотезы о том, что даже у нормальных фибробластов организация сети виментиновых филаментов может определять возможность формирования мембранных бляшек. Ранее было показано, что степень

сборки виментиновых филаментов регулирует образование ламеллиподий [46]. В частности, на мышечных эмбриональных фибробластах и клетках линии 3T3 было показано, что в активной ламеллиподии виментиновые филаменты представлены короткими фрагментами, тогда как в клетках, культивируемых в отсутствие сыворотки и не образующих ламеллиподий, виментин собран в длинные филаменты. Более того, искусственная разборка длинных виментиновых филаментов на фрагменты в клетке даже в отсутствие сыворотки стимулирует образование ламеллиподий. Было показано, что короткие фрагменты ВПФ стимулируют Рас-сигнализацию [46], который, в свою очередь, является основным регуляторным путём, отвечающим за формирование ламеллиподий [47].

В нашем случае отсутствие виментиновых филаментов или нарушение сборки длинных ВПФ приводило к статистически значимому уменьшению расплывчатости клеток. По окраске анти-телами к виментину видно (рис. 1), что в культуре REF117 организованные в короткие фрагменты ВПФ располагались в большей степени в центральной части клетки. Вероятно, поэтому мы не отметили активации формирования ламеллиподий на краю клеток, как в работах лаборатории Гольдмана, где описана активация ламеллиподий в случае расщепления пептидом длинных ВПФ, подходящих к самому краю клетки, на короткие филаменты [46]. Ранее влияние сети ВПФ на форму клеток было исследовано несколькими группами авторов [27, 48, 49], но в этих работах в основном рассматривали влияние ВПФ на изменение формы эпителиальных клеток в процессе ЭМП. При исследованиях, проведённых на фибробластах, существенного изменения формы клеток отмечено не было [23]. Вероятно (как было отмечено выше), это объясняется тем фактом, что в культурах REF^{+/–} и REF117 увеличивается количество плохо расплывчатых слабо прикреплённых клеток. Это хорошо видно при исследовании живых культур, а при фиксации часть плохо прикреплённых клеток открепляется от субстрата, и остаются в основном наиболее расплывчатые и хорошо прикреплённые клетки, морфология которых существенно не отличается от морфологии контрольных REF52.

Описанные морфологические изменения у исследованных нами культур были ассоциированы с индукцией формирования мембранных бляшек как спонтанных, так и сформировавшихся под действием СК-666. В культуре REF52 было отмечено мало клеток со спонтанными бляшками, нокаут ВПФ не приводил к статистически достоверному увеличению количества клеток, формирующих бляшки, а наиболее активный спонтанный бляббинг наблюдался в культуре REF117. Обработка СК-666 приводила к активизации бляббинга во всех культурах,

но сильнее всего этот процесс был выражен в культуре REF117 (появление блебов у более чем 80% клеток). Согласно нашим данным, изменения организации ВПФ не приводили к существенным изменениям таких факторов, как строение системы микротрубочек или увеличению экспрессии активированной лёгкой цепи миозина (ρ MLC), что могло бы свидетельствовать об увеличении сократимости фибробластов. Эти факторы часто рассматривают как причины, вызывающие блеббинг. Наибольшее отличие между нашими культурами мы обнаружили на уровне образования ФК. Так, в клетках REF52, наряду с большим количеством мелких ФК, наблюдается большое количество крупных зрелых ФК, типичных для фибробластов, расположенных в основном на периферии клеток. Нокаут виментина приводит к некоторому уменьшению размера ФК, хотя это нарушение прослеживается только на уровне тенденции, поскольку уменьшение средних размеров и количества ФК по сравнению с контрольными клетками REF52 было статистически недостоверно. Наибольшие отличия наблюдались в культуре REF117, в которой ВПФ присутствовали, но в виде коротких частиц, не собирающихся в зрелые филаменты. Контакт в этих клетках было мало, и их размеры были существенно редуцированы.

Связь виментина и ФК была показана очень давно [44]. В недавних работах было показано, что ВПФ разной степени полимеризации ассоциированы с разными ФК [37]. Так, более длинные ВПФ были ассоциированы со зрелыми ФК, тогда как короткие фрагменты виментина находились вблизи мелких фокальных комплексов. Более того, авторы показали, что короткие фрагменты виментина стимулируют уменьшение размеров ФК. Роль ВПФ в регуляции динамики ФК у фибробластов была также хорошо продемонстрирована в недавней работе, где было показано, что виментин регулирует стабильность, размер и ориентацию ФК [50]. В частности, авторы показали, что в клетках, лишённых виментина, скорость разборки ФК значительно выше, чем в контроле, что приводило к общему уменьшению размеров ФК. Эти данные совпадают с полученными нами результатами. Статистически достоверное уменьшение размера и количества ФК, отмеченное нами у клеток REF117 с ВПФ в виде коротких филаментов, может быть вызвано, например, активацией сигналинга малой ГТФазы Ras, которая стимулируется короткими незрелыми ВПФ [37, 49].

Мы показали, что изменение числа и размеров ФК, вызванное изменением системы ВПФ, коррелирует со способностью фибробластов к образованию мембранных блебов. Такая ассоциация ФК и мембранного блеббинга была отмечена и раньше: клетки фибросаркомы HT1080, культивируемые на малоадгезивном субстрате, формировали

блебы [19], быстрые переходы между амебоидным и мезенхимальным движением были показаны для клеток карциносаркомы Уокера 256 при переходе с адгезивного на неадгезивный субстрат [51], а также для клеток, мигрирующих в трёхмерном субстрате в условиях ограниченного пространства на субстратах с различной адгезивностью [16].

Каким образом наличие и размеры ФК могут определять способность клеток к формированию блебов, остаётся неясным. Недавно на примере подоцитов было показано, что нарушения в образовании фокальных адгезий могут приводить к нарушениям структуры актинового кортекса и вызывать блеббинг [52]. При этом в данной работе было показано, что такие нарушения не обязательно связаны с возрастанием сократимости акто-миозина, что согласуется с нашими результатами (см. выше). То, что причиной блеббинга могут быть нарушения целостности подмембранного актинового кортекса, показано ранее несколькими авторами [17], причём такие нарушения могут быть вызваны не только внешними воздействиями, но также являться следствием особенностей строения актинового цитоскелета. Примером может служить ассоциация блеббинга с наличием филоподий, объясняющаяся неравномерностями строения актинового кортекса в основании филоподии [19]. Вероятно, нарушения системы фокальных адгезий вносят существенный вклад в целостность и организацию актинового кортекса, что, в свою очередь, влияет на способность клеток формировать мембранные блебы.

Таким образом, наличие и организация системы промежуточных филаментов в фибробластах, в частности степень их сборки, является важным фактором, определяющим внутреннюю способность клеток формировать мембранные блебы. При этом важным фактором такой регуляции являются изменения в системе адгезионных структур клетка-матрикс под влиянием ВПФ. В нашей работе мы проверили, как внесённые мутации (нокаут виментина или нарушение сборки полноценных филаментов) влияют на основные известные факторы, стимулирующие блеббинг, такие как распределение микротрубочек, увеличение сократимости клетки, изменение формирования адгезионных контактов. Вместе с тем нельзя полностью исключить, что сама процедура внесения этих мутаций (CRISPR/Cas9) ведёт к появлению каких-либо не учтённых нами изменений, в свою очередь, способствующих появлению блебов. Выяснение этих вопросов требует дальнейших исследований.

Анализ формирования протрузий и подвижности фибробластов с разной организацией ВПФ в трёхмерном коллагеновом геле показал, что организация системы ВПФ имеет существенное значение в определении характера миграции клеток.

Среди исследуемых нами культур клетки REF52 образовывали филоподии, типичные для фибробластов в трёхмерном геле, REF⁺ образовывали в основном блябы, но в отсутствии дополнительных стимулов миграция этих клеток была ограничена. Только клетки REF117 мигрировали эффективно и направленно, причём эта миграция осуществлялась за счёт образования специфического выроста, часто имеющего небольшие латеральные блябы по краям и напоминающего лобоподию [1, 53]. Подобное движение было ранее описано у первичных фибробластов в специфическом 3D-матриксе, полученном из дермиса млекопитающих или синтезированном клетками в течение длительного инкубирования. Авторы приходят к выводу, что такой тип миграции происходит в случае отсутствия поляризации в распределении регуляторных молекул Rac1, Cdc42 и RIP3 и определяется внешней организацией внеклеточного матрикса [45]. В нашем случае, поскольку условия миграции клеток были одинаковыми, а различия заключались в организации ВПФ, было ясно продемонстрировано, что не только наличие или отсутствие ВПФ, но и их организация имеет существенное значение, детерминирующее тип протрузий, образованных

клетками и определяющих характер их миграции и миграционную пластичность. Мы впервые показали, что ВПФ могут регулировать тип образующихся протрузий и разные типы миграции не только у трансформированных клеток, но и у нормальных фибробластов. Исследование механизмов, определяющих пластичность клеточной миграции, важно для определения причин нарушения характера и эффективности миграции, возникающих при различных патологиях.

Вклад авторов. А.Ю. Александрова – концепция и руководство работой; А.О. Жолудева, Н.С. Потапов, Е.А. Козлова, М.Е. Ломакина – проведение экспериментов; А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина – написание текста, А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, А.Ю. Александрова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-15-00347).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Petrie, R. J., and Yamada, K. M. (2012) At the leading edge of three-dimensional cell migration, *J. Cell Sci.*, **125**, 5917-5926, doi: 10.1242/jcs.093732.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell*, **112**, 453-465, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00120-x.
- Charras, G. T., Hu, C. K., Coughlin, M., and Mitchison, T. J. (2006) Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs, *J. Cell Biol.*, **175**, 477-490, doi: 10.1083/jcb.200602085.
- Charras, G. T., Coughlin, M., Mitchison, T. J., and Mahadevan, L. (2008) Life and times of a cellular bleb, *Biophys. J.*, **94**, 1836-1853, doi: 10.1529/biophysj.107.113605.
- Chikina, A. S., Svitkina, T. M., and Alexandrova, A. Y. (2019) Time-resolved ultrastructure of the cortical actin cytoskeleton in dynamic membrane blebs, *J. Cell Biol.*, **218**, 445-454, doi: 10.1083/jcb.201806075.
- Laster, S. M., and Mackenzie, J. M. (1996) Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor necrosis factor-induced apoptosis, *Microsc. Res. Tech.*, **34**, 272-280, doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960615)34:3<272::AID-JEMT10>3.0.CO;2-J.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 730-736, doi: 10.1038/nrm2453.
- Fackler, O. T., and Grosse, R. (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing, *J. Cell Biol.*, **181**, 879-884, doi: 10.1083/jcb.200802081.
- Paluch, E. K., and Raz, E. (2013) The role and regulation of blebs in cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**, 582-590, doi: 10.1016/j.ceb.2013.05.005.
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Morandi, A., Ippolito, L., Ramazzotti, M., et al. (2014) Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells, *Cell Commun. Signal.*, **12**, 24, doi: 10.1186/1478-811X-12-24.
- Friedl, P., and Alexander, S. (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity, *Cell*, **147**, 992-1009, doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model, *J. Cell Biol.*, **188**, 11-19, doi: 10.1083/jcb.200909003.
- Balzer, E. M., Tong, Z., Paul, C. D., Hung, W. C., Stroka, K. M., et al. (2012) Physical confinement alters tumor cell adhesion and migration phenotypes, *FASEB J.*, **26**, 4045-4056, doi: 10.1096/fj.12-211441.

14. Holle, A. W., Govindan Kutty Devi, N., Clar, K., Fan, A., Saif, T., et al. (2019) Cancer cells invade confined microchannels via a self-directed mesenchymal-to-amoeoid transition, *Nano Lett.*, **10**, 2280-2290, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b04720.
15. Paul, C., Mistriotis, P., and Konstantopoulos, K. (2017) Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces, *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 131-140, doi: 10.1038/nrc.2016.123.
16. Liu, Y. J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., et al. (2015) Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells, *Cell*, **160**, 659-672, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007.
17. Paluch, E., Piel, M., Prost, J., Bornens, M., and Sykes, C. (2005) Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments, *Biophys. J.*, **89**, 724-733, doi: 10.1529/biophysj.105.060590.
18. Diz-Munoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D. J., et al. (2010) Control of directed cell migration in vivo by membrane-to cortex attachment, *PLoS Biol.*, **8**, e1000544, doi: 10.1371/journal.pbio.1000544.
19. Chikina, A. S., Rubtsova, S. N., Lomakina, M. E., Potashnikova, D. M., Vorobjev, I. A., and Alexandrova, A. Y. (2019) Transition from mesenchymal to bleb-based motility is predominantly exhibited by CD133-positive subpopulation of fibrosarcoma cells, *Biol. Cell*, **111**, 245-261, doi: 10.1111/boc.201800078.
20. Seetharaman, S., and Etienne-Manneville, S. (2020) Cytoskeletal crosstalk in cell migration, *Trends Cell Biol.*, **30**, 720-735, doi: 10.1016/j.tcb.2020.06.004.
21. Kaverina, I., and Straube, A. (2011) Regulation of cell migration by dynamic microtubules, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **22**, 968-974, doi: 10.1016/j.semcdb.2011.09.017.
22. Garcin, C., and Straube, A. (2019) Microtubules in cell migration, *Essays Biochem.*, **63**, 509-520, doi: 10.1042/EBC20190016.
23. Vakhrusheva, A., Endzhievskaya, S., Zhuikov, V., Nekrasova, T., Parshina, E., et al. (2019) The role of vimentin in directional migration of rat fibroblasts, *Cytoskeleton (Hoboken)*, **76**, 467-476, doi: 10.1002/cm.21572.
24. Sivagurunathan, S., Vahabikashi, A., Yang, H., Zhang, J., Vazquez, K., et al. (2022) Expression of vimentin alters cell mechanics, cell-cell adhesion, and gene expression profiles suggesting the induction of a hybrid EMT in human mammary epithelial cells, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 929495, doi: 10.3389/fcell.2022.929495.
25. Leube, R. E., Moch, M., and Windoffer, R. (2015) Intermediate filaments and the regulation of focal adhesion, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **32**, 13-20, doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.011.
26. Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *J. Clin. Invest.*, **119**, 1429-1437, doi: 10.1172/JCI36183.
27. Mendez, M. G., Kojima, S.-I., and Goldman, R. D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition, *FASEB J.*, **24**, 1838-1851, doi: 10.1096/fj.09-151639.
28. Gregor, M., Osmanagic-Myers, S., Burgstaller, G., Wolfram, M., Fischer, I., et al. (2014) Mechanosensing through focal adhesion-anchored intermediate filaments, *FASEB J.*, **28**, 715-729, doi: 10.1096/fj.13-231829.
29. Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D., and Vignjevic, D. M. (2010) Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia, *J. Cell Biol.*, **189**, 541-556, doi: 10.1083/jcb.200909113.
30. Lahat, G., Zhu, Q. S., Huang, K. L., Wang, S. Z., Bolshakov, S., et al. (2010) Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target; insights from *in vitro* and *in vivo* micxenograft studies, *PLoS One*, **5**, e1010, doi: 10.1371/journal.pone.0214006.
31. Strouhalova, K., Přečková, M., Gandalovičová, A., Brábek, J., Gregor, M., and Rosel, D. (2020) Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment, *Cancers*, **12**, 184, doi: 10.3390/cancers12010184.
32. Bergert, M., Erzberger, A., Desai, R. A., Aspalter, I. M., Oates, A. C., et al. (2015) Force transmission during adhesion-independent migration, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 524-529, doi: 10.1038/ncb3134.
33. Lavenus, S. B., Tudor, S. M., Ullo, M. F., Vosatka, K. W., and Logue, J. S. (2020) A flexible network of vimentin intermediate filaments promotes migration of amoeboid cancer cells through confined environments, *J. Biol. Chem.*, **295**, 6700-6709, doi: 10.1074/jbc.RA119.011537.
34. Adams, G., Jr., López, M. P., Cartagena-Rivera, A. X., and Waterman, C. M. (2021) Survey of cancer cell anatomy in nonadhesive confinement reveals a role for filamin-A and fascin-1 in leader bleb-based migration, *Mol. Biol. Cell*, **32**, 1772-1791, doi: 10.1091/mbc.E21-04-0174.
35. Robert, A., Hookway, C., and Gelfand, V. I. (2016) Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters, *Bioessays*, **3**, 232-243, doi: 10.1002/bies.201500142.
36. Mücke, N., Wedig, T., Bürer, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., et al. (2004) Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin, *J. Mol. Biol.*, **340**, 97-114, doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.039.
37. Terriac, E., Coceano, G., Mavajian, Z., Hageman, T., Christ, A., et al. (2017) Vimentin levels and serine 71 phosphorylation in the control of cell-matrix adhesions, migration speed, and shape of transformed human fibroblasts, *Cell*, **6**, 2, doi: 10.3390/cells6010002.
38. Herrmann, H., and Aebi, U. (2016) Intermediate filaments: structure and assembly, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a018242, doi: 10.1101/cshperspect.a018242.
39. Beckham, Y., Vasquez, R. J., Stricker, J., Sayegh, K., Campillo, C., et al. (2014) Arp2/3 inhibition induces amoeboid-like protrusions in MCF10A epithelial cells by reduced cytoskeletal-membrane coupling and focal adhesion assembly, *PLoS One*, **9**, e100943, doi: 10.1371/journal.pone.0100943.

40. Meier, M., Padilla, G. P., Herrmann, H., Wedig, T., Hergt, M., et al. (2009) Vimentin coil 1A-A molecular switch involved in the initiation of filament elongation, *J. Mol. Biol.*, **390**, 245-261, doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.067.
41. Pletjushkina, O. J., Rajfur, Z., Pomorski, P., Oliver, T. N., Vasiliev, J. M., et al. (2001) Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **48**, 235-244, doi: 10.1002/cm.1012.
42. Kanthou, C., and Tozer, G. M. (2002) The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells, *Blood*, **99**, 2060-2069, doi: 10.1182/blood.v99.6.2060.
43. Charras, G. T., Yarrow, J. C., Horton, M. A., Mahadevan, L., and Mitchison, T. J. (2005) Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells, *Nature*, **435**, 365-369, doi: 10.1038/nature03550.
44. Bershadsky, A. D., Tint, I. S., and Svitkina, T. M. (1987) Association of intermediate filaments with vinculin-containing adhesion plaques of fibroblasts, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **8**, 274-283, doi: 10.1002/cm.970080308.
45. Petrie, R. J., Gavara, N., Chadwick, R. S., and Yamada, K. M. (2012) Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration, *J. Cell Biol.*, **197**, 439-455, doi: 10.1083/jcb.201201124.
46. Helfand, B. T., Mendez, M. G., Murthy, S. N., Shumaker, D. K., Grin, B., et al. (2011) Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 1274-1289, doi: 10.1091/mbc.E10-08-0699.
47. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*, **81**, 53-62, doi: 10.1016/0092-8674(95)90370-4.
48. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H., and Goldman, R. D. (2015) Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function, *J. Biol. Chem.*, **290**, 17145-17153, doi: 10.1074/jbc.R115.640359.
49. Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J., and Wang, Y. K. (2015) Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation, *Oncotarget*, **6**, 15966-15983, doi: 10.18632/oncotarget.3862.
50. Venu, A. P., Modi, M., Aryal, U., Tcarenkova, E., Jiu, Y., et al. (2022) Vimentin supports directional cell migration by controlling focal adhesions, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2022.10.02.510295.
51. Bergert, M., Chandradoss, S. D., Desai, R. A., and Paluch, E. (2012) Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 14434-14439, doi: 10.1073/pnas.1207968109.
52. Yasuda-Yamahara, M., Rogg, M., Frimmel, J., Trachte, P., Helmstaedter, M., et al. (2018) FERMT2 links cortical actin structures, plasma membrane tension and focal adhesion function to stabilize podocyte morphology, *Matrix Biol.*, **68-69**, 263-279, doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.003.
53. Petrie, R. J., Harlin, H. M., Korsak, L. I., and Yamada, K. M. (2017) Activating the nuclear piston mechanism of 3D migration in tumor cells, *J. Cell Biol.*, **216**, 93-100, doi: 10.1083/jcb.201605097.

THE IMPAIRMENT OF THE ASSEMBLY OF VIMENTIN FILAMENTS LEADS TO SUPPRESSION OF THE FORMATION AND MATURATION OF FOCAL CONTACTS AND AN ALTERATION OF THE TYPE OF CELLULAR PROTRUSIONS

A. O. Zholudeva¹, N. S. Potapov², E. A. Kozlova²,
M. E. Lomakina¹, and A. Y. Alexandrova^{1*}

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
115478 Moscow, Russia; e-mail: tonya_alex@yahoo.com

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

Cell migration is largely determined by the type of protrusions formed by the cell. Mesenchymal migration is accomplished by the formation of lamellipodia and/or filopodia, and membrane blebs lay at the basis of amoeboid migration. Changing the conditions of migration can lead to an alteration of the character of cell movement, for example, inhibition of Arp2/3-dependent actin polymerization by the CK-666 inhibitor leads to transition from mesenchymal to amoeboid motility type. The ability of cells to switch from one type of motility to another is called migration plasticity. The cellular mechanisms regulating migratory plasticity are poorly understood. One of the factors determining the possibility of migratory plasticity may be the presence and/or organization of vimentin intermediate filaments (VIFs). To investigate whether the organization of the VIF network affects the ability of fibroblasts to form membrane blebs, we used rat embryonic fibroblasts REF52 with normal VIF organization, with VIF knockout (REF^{-/-}) and with a mutation inhibiting the assembly of full-length VIFs (REF117). Blebs formation was induced by treatment of cells with CK-666. Vimentin knockout did not lead to statistically significant increase of number

of cells with blebs. In fibroblasts with short fragments of vimentin the number of cells forming blebs both spontaneously and in presence of CK-666 increased significantly. Disruption of the VIF organization did not lead to the significant changes in microtubules network or myosin light chain phosphorylation, but caused a significant reduction of the focal contact system. The most pronounced and statistically significant decrease in both the size and number of focal adhesions were observed in REF117. We believe that the regulation of membrane blebbing by VIFs is mediated by their effect on the focal adhesion system. Analysis of migration of fibroblasts with different organization of VIFs in a three-dimensional collagen gel showed that the organization of VIFs determines the type of cell protrusions, which in turn determines the character of cell movement. A novel role of VIF as a regulator of membrane blebbing, essential for the manifestation of migratory plasticity, is shown.

Keywords: vimentin intermediate filaments, filopodium, bleb, focal contacts, actin cortex