

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 1

Январь 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 1, 2023

Новые потенциальные механизмы иммуносупрессии, опосредованной регуляторными В-клетками <i>Э.А. Жеремян, А.С. Устюгова, А.И. Радько, Е.М. Стасевич, А.Н. Уварова, Н.А. Митькин, Д.В. Купраш, К.В. Корнеев</i>	3
Эпителиально-мезенхимальный переход клеток рака молочной железы при активации транскрипционного фактора SNAIL1 <i>Н.И. Литовка, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова</i>	14
Инкапсулины: структура, свойства, применение в биотехнологии (обзор) <i>Н.С. Чмелюк, В.В. Ода, А.Н. Габашвили, М.А. Абакумов</i>	29
«Старение» клеток при терапии опухолей: механизмы и пути преодоления (обзор) <i>М.А. Замкова, Н.А. Персиянцева, В.В. Татарский, А.А. Штиль</i>	47
Влияние структуры N-концевого домена белка оболочки Х-вируса картофеля и вируса мозаики альтернантеры на структуру и физико-химические свойства вирионов <i>А.Л. Ксенофонтов, М.В. Петухов, В.В. Матвеев, Н.В. Федорова, П.И. Семенюк, А.М. Арутюнян, Т.И. Манухова, Е.А. Евтушенко, Н.А. Никитин, О.В. Карпова, Э.В. Штыкова</i>	68
Влияние химических шаперонов на процессы агрегации белков, протекающие в различных кинетических режимах <i>В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, Б.И. Курганов</i>	83
Ингибиторы галактонолактонооксидазы из <i>Trypanosoma cruzi</i> на основе аллилполиалкокксибензолов <i>А.А. Чудин, И.Д. Злотников, С.С. Крылов, В.В. Семенов, Е.В. Кудряшова</i>	97
Мелатонин может усиливать действие препаратов, применяемых при лечении лейкемии <i>А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Р.С. Фадеев, Я.В. Ломовская, М.И. Кобякова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина</i>	110
Влияние делеции генов, кодирующих Pho3p и Bgl2p, на уровень полифосфатов, адаптацию к стрессу и закрепление этих белков в клеточной стенке <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Т.С. Калебина, Е.В. Кулаковская, В.В. Рекстина, Л.В. Трилисенко, Р.Х. Зиганшин, Н.В. Мармий, Д.С. Есипов, Т.В. Кулаковская</i>	125
Влияние неспецифических поринов наружной мембраны <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> на ткани коры головного мозга мышей <i>О.Ю. Портнягина, Д.Н. Ивашкевич, И.В. Дюйзен, Л.С. Шевченко, О.Д. Новикова</i>	136
Ацилирование белков мозга крысы изменяется при специфическом ингибировании пируватдегидрогеназы <i>in vivo</i> <i>В.А. Алешин, Д.А. Сибирякина, А.В. Казанцев, А.В. Граф, В.И. Буник</i>	147

КОММЕНТАРИЙ

О статье Л.А. Гаврилова и Н.С. Гавриловой «Исторические тренды видовой продолжительности жизни человека и актуарной скорости старения», опубликованной в т. 87, вып. 12, с. 1998–2011 <i>А.И. Михальский</i>	164
---	-----

CONTENTS

Vol. 88, Issue 1, 2023

Novel Potential Mechanisms of Regulatory B Cell-Mediated Immunosuppression <i>E. A. Zheremyan, A. S. Ustiugova, A. I. Radko, E. M. Stasevich, A. N. Uvarova, N. A. Mitkin, D. V. Kuprash, and K. V. Korneev</i>	3
Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells Activated by SNAIL1 Transcription Factor <i>N. I. Litovka, I. Y. Zhitnyak, and N. A. Gloushankova</i>	14
Encapsulins: Structure, Properties, Application in Biotechnology (Review) <i>N. S. Chmelyuk, V. V. Oda, A. N. Gabashvili, and M. A. Abakumov</i>	29
Therapy Induced Tumor Cell Senescence: Mechanisms and Ways to Overcome (Review) <i>M. A. Zamkova, N. A. Persiyantseva, V. V. Tatarskiy, and A. A. Shtil</i>	47
Influence of the Structure of the Coat Protein N-Terminal Segment in Potato Virus X and Alternanthera Mosaic Virus on the Structure and Physico-Chemical Properties of Virions <i>A. L. Ksenofontov, M. V. Petoukhov, V. V. Matveev, N. V. Fedorova, P. I. Semenyuk, A. M. Arutyunyan, T. I. Manukhova, E. A. Evtushenko, N. A. Nikitin, O. V. Karpova, and E. V. Shtykova</i>	68
Effect of Chemical Chaperones on Processes of Protein Aggregation Proceeding in Different Kinetic Regimes <i>V. V. Mikhaylova, T. B. Eronina, N. A. Chebotareva, and B. I. Kurganov</i>	83
Inhibitors of Galactonolactone Oxidase From <i>Trypanosoma cruzi</i> Based on Allylpolyalkoxybenzenes <i>A. A. Chudin, I. D. Zlotnikov, S. S. Krylov, V. V. Semenov, and E. V. Kudryashova</i>	97
Melatonin Can Enhance the Effect of Drugs Used in the Treatment of Leukemia <i>A. I. Lomovskiy, Yu. L. Baburina, R. S. Fadeev, Y. V. Lomovskaya, M. I. Kobyakova, R. R. Krestinin, L. D. Sotnikova, and O. V. Krestinina</i>	110
The Effect of Deletions of Genes Encoding Pho3p and Bgl2p on the Polyphosphate Level, Stress Adaptation and Attachment of These Proteins in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cell Wall <i>T. S. Kalebina, E. V. Kulakovskaya, V. V. Rekstina, L. V. Trilisenko, R. H. Ziganshin, N. V. Marmiy, D. S. Esipov, and T. V. Kulakovskaya</i>	125
Non-Specific Porins From the Outer Membrane of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Effect on Mice Brain Cortex Tissues <i>O. Yu. Portnyagina, D. N. Ivashkevich, I. V. Duizen, L. S. Shevchenko, and O. D. Novikova</i>	136
Acylation of the Rat Brain Proteins is Affected by the Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase <i>in vivo</i> <i>V. A. Aleshin, D. A. Sibiryakina, A. V. Kazantsev, A. V. Graf, and V. I. Bunik</i>	147

COMMENTARY

On the Paper by Leonid A. Gavrilov and Natalia S. Gavrilova entitled “Trends in Human Species-Specific Lifespan and Actuarial Aging Rate” Published in Biokhimiya, Vol. 87, N. 12, pp. 1998-2011 <i>A. I. Mikhalsky</i>	164
--	-----

НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ РЕГУЛЯТОРНЫМИ В-КЛЕТКАМИ

© 2023 Э.А. Жеремян^{1,2*}, А.С. Устюгова¹, А.И. Радько³, Е.М. Стасевич^{1,3},
А.Н. Уварова^{1,2}, Н.А. Митькин¹, Д.В. Купраш^{1,2,3}, К.В. Корнеев^{1,4*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
119991 Москва, Россия; электронная почта: elyazheremyan@mail.ru; kirkorneev@gmail.com

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

³ Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,
125167 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.10.2022

После доработки 11.11.2022

Принята к публикации 16.11.2022

В-Лимфоциты играют важную роль в регуляции иммунного ответа как в норме, так и при патологических состояниях. Традиционно основной функцией В-лимфоцитов считалась продукция антител и презентация антигенов, однако за последние десятилетия было обнаружено несколько субпопуляций регуляторных В-лимфоцитов (Bregs), поддерживающих иммунологическую толерантность и предотвращающих избыточную активацию иммунной системы. В контексте изучения роли таких В-клеток в различных патологиях человека обычно рассматривают субпопуляции регуляторных В-клеток памяти (mBregs, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) и транзиторных Bregs (tBregs, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}), однако механизмы, за счет которых эти субпопуляции Bregs осуществляют иммуносупрессивную активность, остаются недостаточно изученными. В данной работе с помощью биоинформатического анализа открытых данных РНК-секвенирования были предложены потенциальные механизмы реализации иммуносупрессии каждой из субпопуляций регуляторных В-клеток. Анализ дифференциальной экспрессии генов до и после активации данных субпопуляций позволил идентифицировать 6 кандидатных молекул, которые могут определять функциональность mBregs и tBregs. IL411-, SIRPA- и SLAMF7-зависимые механизмы иммуносупрессии могут быть свойственны обоим субпопуляциям Bregs, а NID1-, CST7- и ADORA2B-зависимые механизмы могут быть характерны, преимущественно, для tBregs. Глубокое понимание молекулярных механизмов противовоспалительного иммунного ответа В-лимфоцитов является важной задачей как фундаментальной науки, так и прикладной медицины и может способствовать внедрению новых подходов к терапии комплексных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляторные В-клетки, иммуносупрессия, противовоспалительные молекулы, регуляция иммунного ответа.

DOI: 10.31857/S0320972523010013, **EDN:** PAZXJS

ВВЕДЕНИЕ

Впервые иммуносупрессивные свойства В-клеток были показаны на модели отложенной гиперчувствительности почти полвека назад [1]. Однако, поскольку молекулярные механизмы функционирования таких В-клеток

были неизвестны, то концепция противовоспалительных В-лимфоцитов не была широко принята научным сообществом. Сам термин «регуляторные В-клетки» (Bregs) возник относительно недавно после публикации данных об иммуносупрессивной роли В-лимфоцитов в воспалительных заболеваниях кишечника [2].

Принятые сокращения: ADO – аденозин; Bregs – регуляторные В-лимфоциты; mBregs – регуляторные В-клетки памяти; tBregs – транзиторные регуляторные В-клетки; iNKT – инвариантные естественные киллерные Т-клетки; NK – естественные киллеры; SLAMF7 – 7-й член семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов; TCR – Т-клеточный рецептор; Tregs – регуляторные Т-лимфоциты.

* Адресат для корреспонденции.

Регуляторные В-клетки могут дифференциально регулировать патогенез различных заболеваний: с одной стороны, показана их протективная роль при аутоиммунных патологиях (ревматоидный артрит, псориаз, рассеянный склероз, диабет типа I, синдром Шегрена, системная красная волчанка), аллергии, миокардите и реакции «трансплантат против хозяина», с другой стороны, Bregs могут усугубить течение бактериальных и вирусных инфекций, а также онкологических заболеваний [3–5]. Кроме того, известна способность некоторых субпопуляций В-регуляторных клеток подавлять эффекторные Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK) в опухолевом микро-

окружении, что облегчает ускользание опухоли от иммунного ответа [6, 7].

Наиболее известным механизмом иммуносупрессии, осуществляемой В-регуляторными клетками, является продукция противовоспалительного цитокина IL10. Не так давно был описан репертуар молекулярных механизмов В-клеточной иммуносупрессии. Среди молекул, определяющих функциональность Bregs, есть как растворимые факторы, так и мембранные молекулы (см. таблицу) [8–13].

В литературе встречаются лишь единичные сравнительные исследования механизмов иммуносупрессии основных субпопуляций регуляторных В-клеток периферической крови чело-

Наиболее известные молекулы регуляторных В-лимфоцитов, опосредующие иммуносупрессию

Класс	Название	Роль
Растворимые факторы	IL10	IL10, IL35 и TGFβ – противовоспалительные цитокины, которые подавляют иммунный ответ [14]; их действие опосредовано механизмами, включающими как врожденные, так и адаптивные ветви иммунитета; такие механизмы включают ингибирование выработки провоспалительных цитокинов в иммунных клетках, снижение экспрессии одного из главных комплексов гистосовместимости, МНС-II, и ограничение экспрессии костимулирующих молекул [15]; эти цитокины продуцируются клетками с регуляторным фенотипом (такими как Tregs и Bregs) и способствуют индукции и поддержанию пула регуляторных клеток в целом
	IL35	
	TGFβ	
	GrB	сериновая протеаза, индуцирующая апоптоз при проникновении в клетку за счет перфорин-опосредованного порообразования [16]; существуют сведения о том, что GrB способствует деградации ζ-цепей Т-клеточного рецептора (TCR) CD4 ⁺ Т-клеток [17]
Мембранные молекулы	PD-L1	является лигандом для PD-1, который экспрессируется на поверхности Т-клеток; такое связывание приводит к инактивации эффекторных клеток и приобретению ими регуляторного фенотипа [18]
	CD1d	CD1d является МНС-I-подобной липид-презентирующей молекулой, которая опосредует взаимодействие с инвариантными естественными киллерными Т-клетками (iNKT), экспрессирующими CD1d-рестриктированный TCR; презентация CD1d-липидов В-клетками необходима для активации иммунных клеток и выполнения эффекторной функции в iNKT-клетках; индукция супрессивных iNKT-клеток является способом повышения иммунной толерантности для борьбы с аутоиммунными заболеваниями за счет опосредованной iNKT-клетками регуляции патогенных Т-хелперных клеток [19]
	FasL	FasL индуцирует апоптоз при связывании с Fas, экспрессируемым на эффекторных Т-клетках, а также других иммунocyтах и неиммунных клетках [20]
	TIM-1	естественным лигандом для TIM-1 является фосфатидилсерин, который обычно находится на поверхности апоптотических клеток [21]
	CD39 и CD73	CD39 (NTPDase1) – эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза, гидролизующая АТФ до АМР, который может быть преобразован в аденозин (ADO) молекулой CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); АДО принимает участие в индукции иммуносупрессивного ответа, так как он усиливает противовоспалительную функцию регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) и подавляет эффекторные ответы Т-клеток [22]; избыток АДО при мутациях в гене аденозиндеаминазы приводит к тяжелому иммунодефициту [23]; CD39 широко представлен на В-клетках, но высокая экспрессия CD39 в комбинации с CD73 специфичны для В-клеток с иммуносупрессивной активностью [4]

века — $CD24^{hi}CD27^{+}$ и $CD24^{hi}CD38^{hi}$ Bregs [24]. Надо иметь в виду, что эти субпопуляции скорее обогащены регуляторными В-клетками, чем полностью являются регуляторными, поскольку четкое фенотипическое разделение Bregs на субпопуляции является предметом дискуссии [25, 26]. Обычно субпопуляцию лимфоцитов $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ рассматривают в качестве регуляторных В-клеток памяти (mBregs), а $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ клетки — как транзиторные tBregs [4, 27, 28].

Определение возможных механизмов реализации иммуносупрессии представляет особый интерес, поскольку разные субпопуляции Bregs могут вносить дифференциальный вклад в патогенез различных заболеваний: так, показано преимущественное участие tBregs в прогрессии инвазивной карциномы молочной железы и рака желудка [29, 30], в то же время при системной красной волчанке и аллергическом рините наиболее выражено нарушение функционирования mBregs [31, 32]. Понимание основных молекулярных механизмов иммуносупрессии субпопуляциями Bregs может способствовать развитию подходов по тонкой настройке их противовоспалительной активности, что в случае онкологических заболеваний позволит преодолеть нежелательные эффекты, связанные с иммуносупрессией, а в случае аллергии и аутоиммунных заболеваний — усилить активность Bregs.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск данных РНК-секвенирования, оценка их качества и количественное определение чтений. Поиск данных РНК-секвенирования регуляторных В-клеток происходил с помощью общедоступного открытого геномного репозитория NCBI Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Для дальнейшего анализа был использован набор данных GSE151415 в формате FASTQ, полученный в работе Hasan et al. [33] путем РНК-секвенирования (платформа Illumina NextSeq 500) В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови 6 здоровых доноров. Нами были проанализированы сиквенсы из P1 ($CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}IgD^{+}$) субпопуляции, а также объединенные сиквенсы из P2 ($CD19^{+}CD27^{+}CD39^{hi}IgD^{+}$) и P4 ($CD19^{+}CD27^{+}CD39^{hi}IgD^{-}$) субпопуляций В-клеток до и после 16-часовой активации с помощью CpG. Для оценки качества образцов использовалась программа MultiQC [34], которая производит анализ качества данных секвенирования и составляет отчет о них в

формате HTML. Внутри себя MultiQC использует такие инструменты, как Subread featureCounts [35], STAR (универсальный выравниватель РНК-секвенирования) [36], Cutadapt (находит и удаляет последовательности адаптеров, праймеры, хвосты поли-А и другие типы нежелательных последовательностей из прочтений) [37], а также FastQC (программа контроля качества для последовательностей, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования).

Для количественного анализа результатов РНК-секвенирования с высокой точностью использовалась программа Kallisto [38], которая позволяет проводить псевдо-выравнивание нуклеотидных последовательностей. На выходе Kallisto выдавал экспрессию генов в estimated counts (количество чтений, которые были выравнены на транскрипт в каждом образце).

Анализ дифференциальной экспрессии генов и визуализация. Для идентификации дифференциально экспрессируемых транскриптов внутри образцов нестимулированных и активированных tBregs (P1) и mBregs (P2 + P4) субпопуляций была использована программа edgeR (программный пакет Bioconductor) [39]. Дифференциальная экспрессия оценивалась для каждого гена с использованием точного теста, аналогичного точному тесту Фишера, но адаптированного для сверхдисперсных данных. Для подсчета дифференциальной экспрессии применялся $\log_2FC$. FC (fold change) — это мера, показывающая изменение величины между значениями, она определяется как отношение между двумя величинами (в нашем случае — экспрессия каждого гена до и после активации). Логарифм использовался для упрощения интерпретации результатов. Для анализа отбирались гены, разница дифференциальной экспрессии которых имела значение $p < 0,05$.

Тепловая карта была построена с помощью функции heatmap из пакета seaborn (библиотека визуализации данных Python; <https://seaborn.pydata.org/generated/seaborn.heatmap.html>) [40].

Анализ обогащения функциональных групп генов (enrichment analysis). Для идентификации биологических процессов, в которые вовлечены наиболее дифференциально экспрессируемые гены после активации Bregs была использована интегральная онлайн-платформа metascape.org [41], с помощью которой также были получены $-\log_{10}(P)$ значения обогащения групп генов, позволяющие судить о достоверности такого обогащения. Для аннотации генов данная платформа, используя словарь генной онтологии (Gene Ontology, GO),

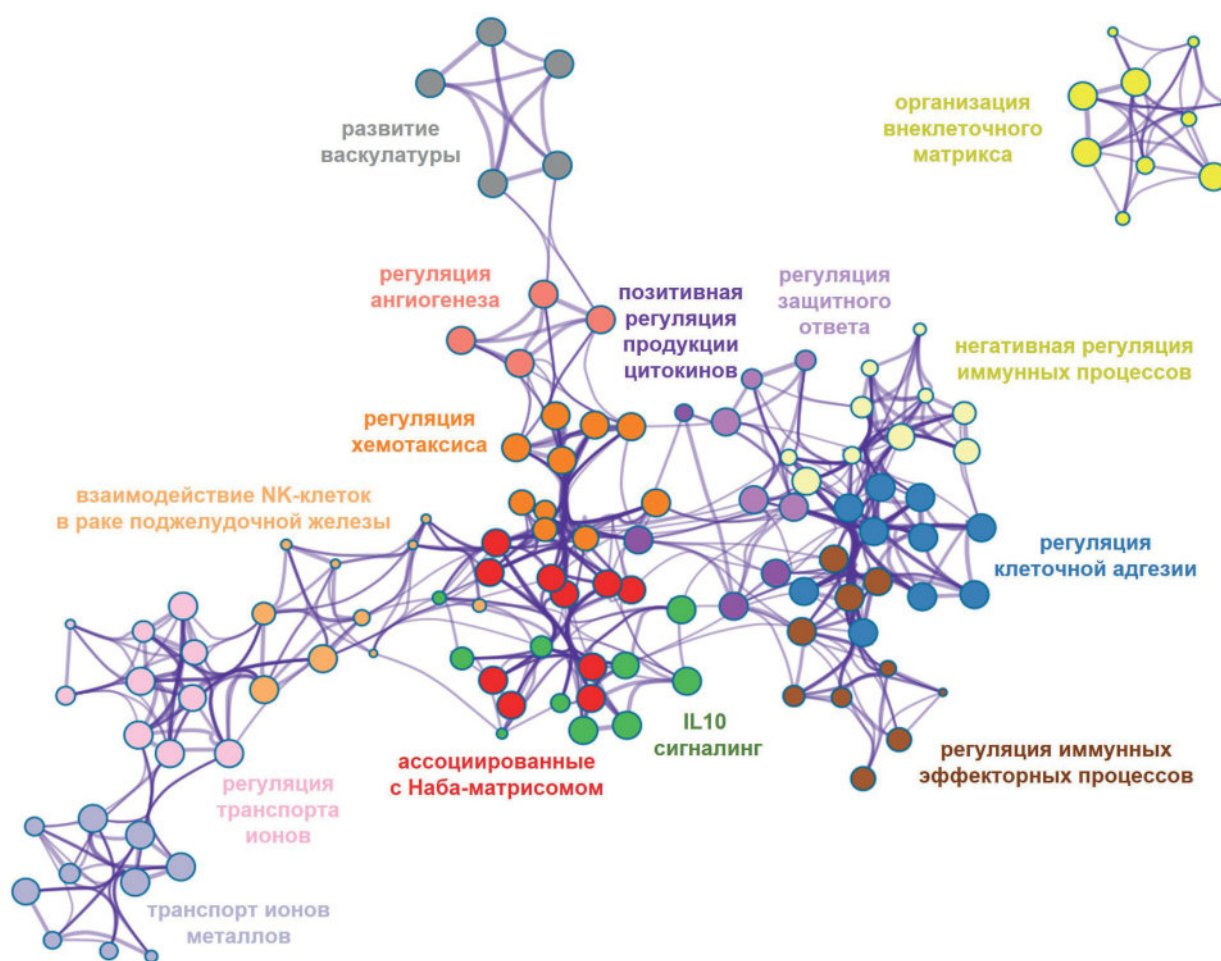
присваивала каждому гену термин GO (GO term) на основании трех переменных: специфической молекулярной функции, клеточной локализации и участия в комплексных биологических процессах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования потенциальных механизмов реализации иммуносупрессии каждой из субпопуляций регуляторных В-клеток мы

провели биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования из работы Hasan et al. [33]. В этой статье было выделено несколько субпопуляций В-клеток, из которых субпопуляция $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}IgD^+$ (P1) соответствовала tBregs, а субпопуляции $CD19^+CD27^+CD39^{hi}IgD^+$ (P2) и $CD19^+CD27^+CD39^{hi}IgD^-$ (P4) были объединены в mBregs. Субпопуляции P2 и P4 отличаются лишь по экспрессии IgD, т.е. являются клетками памяти с непереклоченным и переключенным изотипом соответственно. В рамках нашей работы статус

а



б

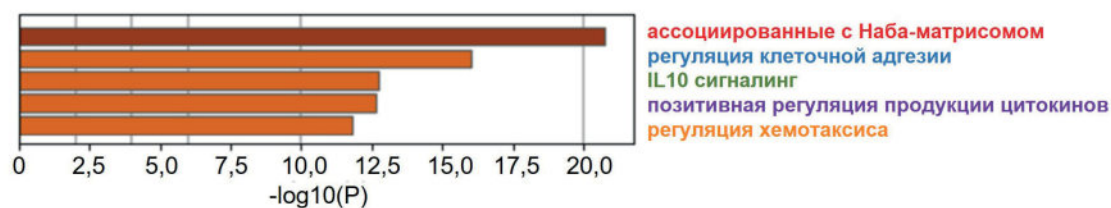


Рис. 1. Дифференциально экспрессируемые после активации mBregs и tBregs гены ($p < 0,05$) кластеризуются в иммунологически релевантные группы по данным интегральной платформы metascapre.org. Каждый круг представляет собой термин GO, причем его размер пропорционален количеству распределенных в него генов, а цвет идентифицирует кластерную принадлежность (а). Наиболее обогащенные ключевые функциональные кластеры групп генов, ранжированные согласно $-\log_{10}(P)$ значениям обогащения групп генов (б)

экспрессии IgD не имеет функционального значения, поэтому сиквенсы были объединены. Данные в формате FASTQ мы использовали для расчета дифференциальных экспрессий при помощи пакета edgeR. Чтобы определить биологические процессы, в которые вовлечены 1000 наиболее дифференциально экспрессируемых генов после активации каждой из изучаемых субпопуляций Bregs, мы провели анализ обогащения функциональных групп генов (enrichment analysis). В результате было выявлено большое число таких генов в группах, связанных с межклеточными контактами и цитокиновым сигналингом (рис. 1). Это согласуется с основными механизмами реализации иммуносупрессии Bregs.

Далее в результате дополнительного анализа существующих литературных данных из объединенного списка наиболее дифференциально экспрессируемых генов (с достоверно увеличивающейся или уменьшающейся экспрессией) были отобраны 12 генов, кодирующих молекулы, потенциально задействованные в реализации иммуносупрессии. Продукты экспрессии отобранных генов представляли собой как цитокины (IL10, IL411, TGF β , IL35, IL27 и др.), так и мембранные молекулы (PD-L1, NID1 и др.). Отбор кандидатных генов производился на основании существующих литературных данных с использованием следующих критериев: 1) способность молекулы подавлять активность клеток-эффекторов; 2) способность молекулы индуцировать приобретение супрессорного фенотипа окружающими клетками; 3) высокая экспрессия молекулы раковыми клетками и/или опухоль-ассоциированными клетками. Затем была построена тепловая карта дифференциальной экспрессии выбранных генов в субпопуляциях mBregs и tBregs с помощью функции heatmap из пакета seaborn (рис. 2).

Анализ дифференциальной экспрессии генов до и после активации позволил идентифицировать кандидатные молекулы, которые могут определять функциональность mBregs и tBregs: как ранее известные PD-L1, EBI3, IL2RA, TIGIT, IL10, IL27, так и на данный момент не охарактеризованные в контексте Bregs — ADORA2B, CST7, SIRPA, SLAMF7, NID1, IL411. Далее мы предположили несколько вариантов возможного участия выбранных молекул в реализации иммуносупрессивной функции Bregs на основании имеющейся информации об их функциональности (рис 3).

SLAMF7 является трансмембранным гликопротеином из семейства сигнальных лимфоцитарных молекул активации и экспрессиру-

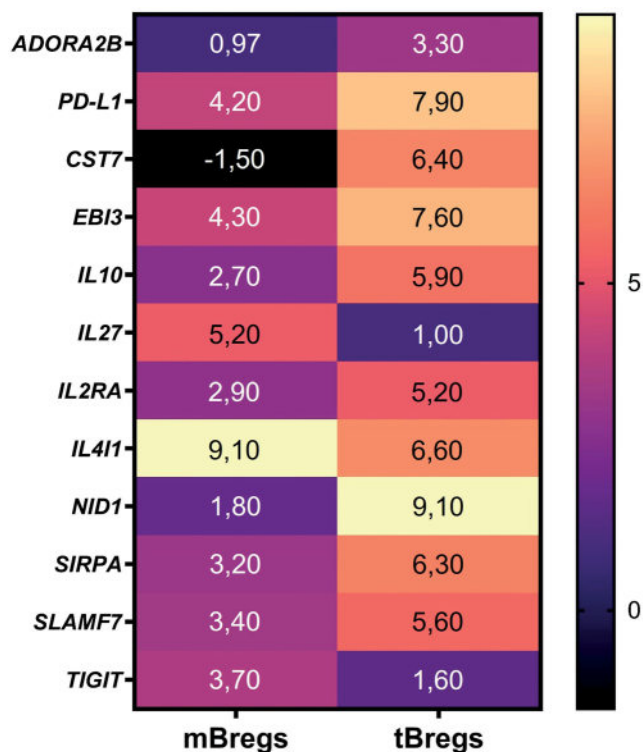


Рис. 2. Тепловая карта $\log_2FC$ значений дифференциальной экспрессии отобранных кандидатных генов в субпопуляциях mBregs и tBregs. Положительные значения $\log_2FC$ свидетельствуют о повышении уровня экспрессии соответствующего гена после активации клеток. Цветовая шкала указывает на уровень экспрессии гена от низкого (темный) до высокого (светлый)

ется макрофагами, Т- и NK-клетками, а также на высоком уровне представлен на поверхности опухолей В-клеточного происхождения, в частности при множественной миеломе, где представляет собой перспективную терапевтическую мишень [42]. O'Connell et al. [43] показали, что в экспериментах *ex vivo* взаимодействия SLAMF7—SLAMF7 между опухоль-ассоциированными макрофагами и CD8⁺ Т-клетками индуцировали экспрессию ингибиторных рецепторов Т-клетками, а также способствовали приобретению ими истощенного фенотипа. Также они обнаружили, что мыши, нокаутные по SLAMF7, менее восприимчивы к экспериментальной пересаживаемой меланоме. Анализ дифференциальной экспрессии генов показывает, что SLAMF7 на высоком уровне представлен в активированных регуляторных В-клетках, особенно в субпопуляции tBregs (рис. 2). Согласно нашей гипотезе, Bregs могут реализовывать свою иммуносупрессивную активность за счет образования контактов SLAMF7—SLAMF7 с эффекторными клетками, инактивируя их, а также с опухолевыми клетками, способствуя их пролиферации (рис. 3).

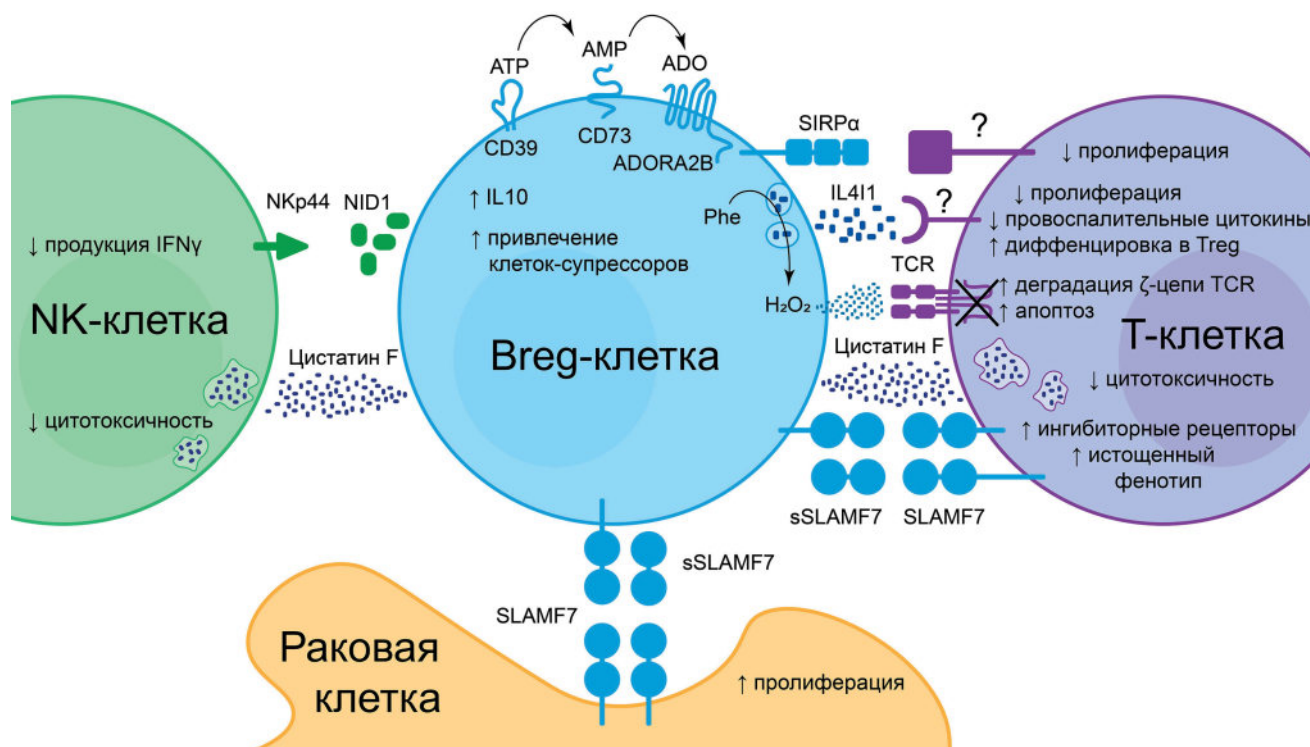


Рис. 3. Новые потенциальные механизмы функционирования регуляторных В-клеток

Также существуют сведения о том, что клетки множественной миеломы способны производить растворимый SLAMF7 (sSLAMF7), повышенные концентрации которого обнаруживаются в сыворотке больных [44, 45]. Мы предполагаем, что Bregs также могут осуществлять иммуносупрессию и способствовать пролиферации опухолевых клеток не только за счет мембранных взаимодействий SLAMF7–SLAMF7, но и при помощи продукции растворимой формы sSLAMF7.

IL4I1 является IL4-индуцируемой оксидазой аминокислот и может катаболизировать фенилаланин до перекиси водорода, которая вызывает деградацию ζ-цепей TCR и индуцирует апоптоз Т-клеток [46]. В то же время особым действием этот фермент обладает по отношению к наивным Т-клеткам: он способствует их дифференцировке в Tregs [47]. Boulland et al. [48] показали, что IL4I1 оказывает антипролиферативное действие на Т-клетки, причем в качестве клеток-продуцентов IL4I1 изучали дендритные клетки, которые способны образовывать иммунологический синапс с Т-клетками в ходе презентации антигена. Ранее также было показано, что макрофаги, экспрессирующие IL4I1, аутокринно воздействуют сами на себя, приобретая M2-фенотип [49], также известно, что этот фермент производится В-клетками под воздействием IL4 [50]. Результаты нашего анализа показывают, что

экспрессия *IL4I1* значительно возрастает в обеих субпопуляциях после активации (рис. 2). Мы предполагаем, что при воспалительных реакциях Bregs также способны продуцировать IL4I1, что может привести к H₂O₂-зависимому подавлению функции эффекторных клеток и образованию Tregs и M2-макрофагов (рис. 3).

Цистатин F, кодируемый геном *CST7*, является ингибитором цистеиновых пептидаз, в частности, катепсинов С и Н, активирующих гранзимы, и катепсина L – активатора перфорины [51], т.е. является естественным регулятором активности цитотоксических лимфоцитов [52]. Prunk et al. [53] доказали, что повышенный уровень цистатина F коррелирует с пониженной цитотоксической активностью клеток-эффекторов. В другой работе было выдвинуто предположение, что супрессия катепсина С цистатином F может представлять собой новый механизм противовоспалительного действия нейтрофилов [54]. Интересно, что по результатам анализа дифференциальной экспрессии генов транскрипция *CST7* значительно усиливается после активации tBregs, но понижается после активации субпопуляции mBregs (рис. 2). Мы предполагаем, что секретируемый tBregs цистатин F способен также ингибировать ферменты, вовлеченные в активацию гранзимов и перфоринов, тем самым подавляя цитотоксическую активность лимфоцитов (рис. 3).

NID1 является лигандом рецептора NKp44, экспрессируемого NK-лимфоцитами, причем взаимодействие этого активирующего рецептора с секретируемой формой NID1 приводит к нарушению продукции провоспалительных цитокинов, в частности IFN γ , естественными киллерами [55]. В ходе анализа дифференциальной экспрессии генов оказалось, что уровень транскрипции *NID1* существенно возрастает после активации tBregs, но не mBregs (рис. 2). Мы предполагаем, что субпопуляция tBregs может оказывать супрессивное воздействие на NK-лимфоциты в том числе и путем NID1-зависимой активации их рецептора NKp44 (рис. 3).

SIRPA является ингибиторным рецептором, взаимодействующим с CD47. Такое взаимодействие блокирует фагоцитоз за счет нарушения интегринового сигналинга в макрофагах [56]. Известно, что субпопуляция SIRPA⁺-макрофагов оказывала супрессивное воздействие на функциональность Т-лимфоцитов. Кроме того, было показано, что клетки CD14⁺SIRPA⁺ подавляют пролиферативные способности CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток *in vitro*, в то время как SIRPA⁻-макрофаги не влияли на скорость деления Т-лимфоцитов, однако механизм данного процесса пока неизвестен [57]. mBregs и tBregs после активации экспрессируют *SIRPA* на высоком уровне (рис. 2), поэтому существует вероятность, что эти субпопуляции Bregs способны подавлять активность Т-лимфоцитов, а также другие эффекторные клетки подобным образом (рис. 3).

ADORA2B — один из четырех рецепторов естественного иммуносуппрессанта аденозина. ADORA2B активно экспрессируется на опухолевых клетках [58]. Bregs экспрессируют CD39 и CD73, которые в результате последовательных реакций метаболизируют АТФ в АДО [12]. Взаимодействие АДО—ADORA2B запускает внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к подавлению иммунного ответа путем повышения экспрессии хемокинов, привлекающих клетки-супрессоры в опухолевое микроокружение [59] или продукции IL10 клетками опухолевого микроокружения [60]. Согласно проведенному анализу, ADORA2B-опосредованная иммуносупрессия наиболее характерна для

субпопуляции tBregs (рис. 2). Мы полагаем, что Bregs, экспрессирующие рецептор ADORA2B, могут в ходе аденозин-зависимой активации продуцировать противовоспалительный цитокин IL10 и хемокины, тем самым привлекая к месту воспаления дополнительные регуляторные клетки иммунной системы и повышая уровень иммуносупрессии (рис. 3).

В представленном исследовании были выдвинуты гипотезы о возможном существовании новых, ранее не исследованных механизмов иммуносупрессии, осуществляемых основными субпопуляциями регуляторных В-клеток периферической крови человека. В ходе последовательного анализа открытых транскриптомных данных было отобрано 6 кандидатных генов, которые могут определять иммуносупрессивную активность субпопуляций mBregs и tBregs. Причем IL4I1-, SIRPA- и SLAMF7-зависимые механизмы иммуносупрессии могут быть свойственны для обеих субпопуляций Bregs, а CST7-, NID1- и ADORA2B-зависимые механизмы могут быть характерны, преимущественно, для субпопуляции tBregs. Для подтверждения предложенных гипотез планируется экспериментальная верификация роли отобранных кандидатных молекул в релевантных клеточных системах.

Вклад авторов. Э.А. Жеремян и К.В. Корнеев — концепция и руководство работой; Э.А. Жеремян, А.С. Устюгова, А.И. Радько, К.В. Корнеев — экспериментальная работа; Э.А. Жеремян и Е.М. Стасевич — подготовка иллюстраций; А.Н. Уварова, Н.А. Митькин и Д.В. Купраш — обсуждение результатов исследования; Э.А. Жеремян — написание текста; Д.В. Купраш и К.В. Корнеев — редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-00106 (биоинформатический анализ) и грант № 22-14-00398 (анализ литературных данных)).

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. Katz, S. I., Parker, D., and Turk, J. L. (1974) B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions, *Nature*, **251**, 550-551, doi: 10.1038/251550a0.
2. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., and Bhan, A. K. (2002) Chronic intestinal inflammatory condition generates IL10-

- producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation, *Immunity*, **16**, 219-230, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00274-1.
3. Wu, H., Su, Z., and Barnie, P. A. (2020) The role of B regulatory (B10) cells in inflammatory disorders and their potential as therapeutic targets, *Int. Immunopharmacol.*, **78**, 106111, doi: 10.1016/j.intimp.2019.106111.
 4. Jansen, K., Cevhertas, L., Ma, S., Satitsuksanoa, P., Akdis, M., and van de Veen, W. (2021) Regulatory B cells, A to Z, *Allergy*, **76**, 2699-2715, doi: 10.1111/all.14763.
 5. Yanaba, K., Kamata, M., Ishiura, N., Shibata, S., Asano, Y., Tada, Y., Sugaya, M., Kadono, T., Tedder, T. F., and Sato, S. (2013) Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation, *J. Leukoc. Biol.*, **94**, 563-573, doi: 10.1189/jlb.1112562.
 6. Inoue, S., Leitner, W. W., Golding, B., and Scott, D. (2006) Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity, *Cancer Res.*, **66**, 7741-7747, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3766.
 7. Sarvaria, A., Madrigal, J. A., and Saudemont, A. (2017) B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity, *Cell. Mol. Immunol.*, **14**, 662-674, doi: 10.1038/cmi.2017.35.
 8. Mauri, C., and Menon, M. (2015) The expanding family of regulatory B cells, *Int. Immunol.*, **27**, 479-486, doi: 10.1093/intimm/dxv038.
 9. Nouel, A., Pochard, P., Simon, Q., Segalen, I., Le Meur, Y., Pers, J. O., and Hillion, S. (2015) B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner, *J. Autoimmun.*, **59**, 53-60, doi: 10.1016/j.jaut.2015.02.004.
 10. Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R. A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang V. D., Jaimes, Y., Daridon, C., Li, R., Jouneau, L., Boudinot, P., Wilantri, S., Sakwa, I., Miyazaki, Y., Leech, M. D., McPherson, R. C., Wirtz, S., Neurath, M., Hoehlig, K., Meinl, E., Grutzkau, A., Grun, J. R., Horn, K., Kuhl, A. A., Dorner, T., Bar-Or, A., Kaufmann, S. H. E., Anderton, S. M., and Fillatreau, S. (2014) IL35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases, *Nature*, **507**, 366-370, doi: 10.1038/nature12979.
 11. Xu, L., Liu, X., Liu, H., Zhu, L., Zhu, H., Zhang, J., Ren, L., Wang, P., Hu, F., and Su, Y. (2017) Impairment of granzyme B-producing regulatory B cells correlates with exacerbated rheumatoid arthritis, *Front. Immunol.*, **8**, 768, doi: 10.3389/fimmu.2017.00768.
 12. Figueiro, F., Muller, L., Funk, S., Jackson, E. K., Battastini, A. M., and Whiteside, T. L. (2016) Phenotypic and functional characteristics of CD39(high) human regulatory B cells (Breg), *Oncoimmunology*, **5**, e1082703, doi: 10.1080/2162402X.2015.1082703.
 13. Sokolov, A. V., Shmidt, A. A., and Lomakin, Y. A. (2018) B cell regulation in autoimmune diseases, *Acta Naturae*, **10**, 11-22, doi: 10.32607/20758251-2018-10-3-11-22.
 14. Matsushita, T. (2019) Regulatory and effector B cells: friends or foes? *J. Dermatol. Sci.*, **93**, 2-7, doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.11.008.
 15. Kalampokis, I., Yoshizaki, A., and Tedder, T. F. (2013) IL10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease, *Arthritis Res. Ther.*, **15**, S1, doi: 10.1186/ar3907.
 16. Bots, M., and Medema, J. P. (2006) Granzymes at a glance, *J. Cell Sci.*, **119**, 5011-5014, doi: 10.1242/jcs.03239.
 17. Wieckowski, E., Wang, G. Q., Gastman, B. R., Goldstein, L. A., and Rabinowich, H. (2002) Granzyme B-mediated degradation of T-cell receptor zeta chain, *Cancer Res.*, **62**, 4884-4889.
 18. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, *Nat. Med.*, **5**, 1365-1369, doi: 10.1038/70932.
 19. Oleinika, K., Rosser, E. C., Matei, D. E., Nistala, K., Bosma, A., Drozdov, I., and Mauri, C. (2018) CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells, *Nat. Commun.*, **9**, 684, doi: 10.1038/s41467-018-02911-y.
 20. Tao, H., Lu, L., Xia, Y., Dai, F., Wang, Y., Bao, Y., Lundy, S. K., Ito, F., Pan, Q., Zhang, X., Zheng, F., Shu, G., Fang, B., Jiang, J., Xia, J., Huang, S., Li, Q., and Chang, A. E. (2015) Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL10, *Eur. J. Immunol.*, **45**, 999-1009, doi: 10.1002/eji.201444625.
 21. Cherukuri, A., Mohib, K., and Rothstein, D. M. (2021) Regulatory B cells: TIM-1, transplant tolerance, and rejection, *Immunol. Rev.*, **299**, 31-44, doi: 10.1111/imr.12933.
 22. Zacca, E. R., Amezcua Vesely, M. C., Ferrero, P. V., Acosta, C. D. V., Ponce, N. E., Bossio, S. N., Mus-sano, E., Onetti, L., Cadile, I., Acosta Rodriguez, E. V., Montes, C. L., and Gruppi, A. (2021) B cells from patients with rheumatoid arthritis show conserved CD39-mediated regulatory function and increased CD39 expression after positive response to therapy, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166687, doi: 10.1016/j.jmb.2020.10.021.
 23. Moens, L., Hershfield, M., Arts, K., Aksentijevich, I., and Meyts, I. (2019) Human adenosine deaminase 2 deficiency: a multi-faceted inborn error of immunity, *Immunol. Rev.*, **287**, 62-72, doi: 10.1111/imr.12722.
 24. Hasan, M. M., Thompson-Snipes, L., Klintmalm, G., Demetris, A. J., O'Leary, J., Oh, S., and Joo, H. (2019) CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ human regulatory B cells display common and distinct functional characteristics, *J. Immunol.*, **203**, 2110-2120, doi: 10.4049/jimmunol.1900488.

25. Catalán, D., Mansilla, M. A., Ferrier, A., Soto, L., Oleinika, K., Aguilón, J. C., and Aravena, O. (2021) Immunosuppressive mechanisms of regulatory B cells, *Front. Immunol.*, **12**, 611795, doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.
26. Glass, M. C., Glass, D. R., Oliveria, J. P., Mbiribindi, B., Esquivel, C. O., Krams, S. M., Bendall, S. C., and Martinez, O. M. (2022) Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets, *Cell Rep.*, **39**, 110728, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110728.
27. Zhou, Y., Zhang, Y., Han, J., Yang, M., Zhu, J., and Jin, T. (2020) Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases, *J. Transl. Med.*, **18**, 1-12, doi: 10.1186/s12967-020-02289-w.
28. Lomakin, Y. A., Zvyagin, I. V., Ovchinnikova, L. A., Kabilov, M., Staroverov, D. B., Mikelov, A., Tupikin, A. E., Zakharova, M. Y., Bykova, N. A., Mukhina, V. S., Favorov, A. V., Ivanova, M., Simaniv, T., Rubtsov, Y. P., Chudakov, D. M., Zakharova, M. N., Illarioshkin, S. N., Belogurov, A. A. Jr., and Gabibov, A. G. (2022) Deconvolution of B cell receptor repertoire in Multiple Sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation, *Front. Immunol.*, **13**, 803229, doi: 10.3389/fimmu.2022.803229.29.
29. Guan, H., Wan, Y., Lan, J., Wang, Q., Wang, Z., Li, Y., Zheng, J., Zhang, X., Wang, Z., Shen, Y., and Xie, F. (2016) PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer, *Sci. Rep.*, **6**, 35651, doi: 10.1038/srep35651.
30. Murakami, Y., Saito, H., Shimizu, S., Kono, Y., Shishido, Y., Miyatani, K., Matsunaga, T., Fukumoto, Y., Ashida, K., Sakabe, T., Nakayama, Y., and Fujiwara, Y. (2019) Increased regulatory B cells are involved in immune evasion in patients with gastric cancer, *Sci. Rep.*, **9**, 1-9, doi: 10.1038/s41598-019-49581-4.
31. Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., and Mauri, C. (2010) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients, *Immunity*, **32**, 129-140, doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
32. Kamekura, R., Shigehara, K., Miyajima, S., Jitsukawa, S., Kawata, K., Yamashita, K., Nagaya, T., Kumagai, A., Sato, A., Matsumiya, H., Ogasawara, N., Seki, N., Takano, K., Kokai, Y., Takahashi, H., Himi, T., and Ichimiya, S. (2015) Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma, *Clin. Immunol.*, **158**, 204-211, doi: 10.1016/j.clim.2015.02.016.
33. Hasan, M. M., Nair, S. S., O'Leary, J. G., Thompson-Snipes, L., Nyarige, V., Wang, J., Park, W., Stegall, M., Heilman, R., Klintmalm, G. B., Joo, H., and Oh, S. (2021) Implication of TIGIT⁺ human memory B cells in immune regulation, *Nat. Commun.*, **12**, 1534, doi: 10.1038/s41467-021-21413-y.
34. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., and Kaller, M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report, *Bioinformatics*, **32**, 3047-3048, doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.
35. Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, **30**, 923-930, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
36. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
37. Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, *EMBnet J.*, **17**, 10-12, doi: 10.14806/ej.17.1.200.
38. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 525-527, doi: 10.1038/nbt.3519.
39. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139-140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
40. Waskom, M. L. (2021) Seaborn: statistical data visualization, *J. Open Source Software*, **6**, 3021, doi: 10.21105/joss.03021.
41. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S. K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets, *Nat. Commun.*, **10**, 1523, doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
42. Awwad, M. H. S., Mahmoud, A., Bruns, H., Echchannaoui, H., Kriegsmann, K., Lutz, R., Raab, M. S., Bertsch, U., Munder, M., Jauch, A., Weisel, K., Maier, B., Weinhold, N., Salwender, H. J., Eckstein, V., Hanel, M., Fenk, R., During, J., Brors, B., Benner, A., Muller-Tidow, C., Goldschmidt, H., and Hundemer, M. (2021) Selective elimination of immunosuppressive T cells in patients with multiple myeloma, *Leukemia*, **35**, 2602-2615, doi: 10.1038/s41375-021-01172-x.
43. O'Connell, P., Hyslop, S., Blake, M. K., Godbehere, S., Amalfitano, A., and Aldhamen, Y. A. (2021) SLAMF7 signaling reprograms T cells toward exhaustion in the tumor microenvironment, *J. Immunol.*, **206**, 193-205, doi: 10.4049/jimmunol.2000300.
44. Kikuchi, J., Hori, M., Iha, H., Toyama-Sorimachi, N., Hagiwara, S., Kuroda, Y., Koyama, D., Izumi, T., Yasui, H., Suzuki, A., and Furukawa, Y. (2020) Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma

- cells via homophilic interaction with surface SLAMF7, *Leukemia*, **34**, 180–195, doi: 10.1038/s41375-019-0525-6.
45. Ishibashi, M., Soeda, S., Sasaki, M., Handa, H., Imai, Y., Tanaka, N., Tanosaki, S., Ito, S., Odajima, T., Sugimori, H., Asayama, T., Sunakawa, M., Kaito, Y., Kinoshita, R., Kuribayashi, Y., Onodera, A., Moriya, K., Tanaka, J., Tsukune, Y., Komatsu, N., Inokuchi, K., and Tamura, H. (2018) Clinical impact of serum soluble SLAMF7 in multiple myeloma, *Oncotarget*, **9**, 34784–34793, doi: 10.18632/oncotarget.26196.
 46. Otsuji, M., Kimura, Y., Aoe, T., Okamoto, Y., and Saito, T. (1996) Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13119–13124, doi: 10.1073/pnas.93.23.13119.
 47. Cousin, C., Aubatin, A., Le Gouvello, S., Apetoh, L., Castellano, F., and Molinier-Frenkel, V. (2015) The immunosuppressive enzyme IL4I1 promotes FoxP3(+) regulatory T lymphocyte differentiation, *Eur. J. Immunol.*, **45**, 1772–1782, doi: 10.1002/eji.201445000.
 48. Boulland, M. L., Marquet, J., Molinier-Frenkel, V., Moller, P., Guiter, C., Lasoudris, F., Copie-Bergman, C., Baia, M., Gaulard, P., Leroy, K., and Castellano, F. (2007) Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation, *Blood*, **110**, 220–227, doi: 10.1182/blood-2006-07-036210.
 49. Yue, Y., Huang, W., Liang, J., Guo, J., Ji, J., Yao, Y., Zheng, M., Cai, Z., Lu, L., and Wang, J. (2015) IL4I1 is a novel regulator of M2 macrophage polarization that can inhibit T cell activation via L-tryptophan and arginine depletion and IL10 production, *PLoS One*, **10**, e0142979, doi: 10.1371/journal.pone.0142979.
 50. Prevost-Blondel, A., and Richard, Y. (2019) Interleukin 4-induced gene 1 as an emerging regulator of B-cell biology and its role in cutaneous melanoma, *Crit. Rev. Immunol.*, **39**, 39–57, doi: 10.1615/CritRevImmunol.2019030020.
 51. Ni, J., Fernandez, M. A., Danielsson, L., Chillakuru, R. A., Zhang, J., Grubb, A., Su, J., Gentz, R., and Abrahamson, M. (1998) Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **273**, 24797–24804, doi: 10.1074/jbc.273.38.24797.
 52. Kos, J., Nanut, M. P., Prunk, M., Sabotic, J., Dautovic, E., and Jewett, A. (2018) Cystatin F as a regulator of immune cell cytotoxicity, *Cancer Immunol. Immunother.*, **67**, 1931–1938, doi: 10.1007/s00262-018-2165-5.
 53. Prunk, M., Nanut, M. P., Sabotic, J., Svajger, U., and Kos, J. (2019) Increased cystatin F levels correlate with decreased cytotoxicity of cytotoxic T cells, *Radiol. Oncol.*, **53**, 57–68, doi: 10.2478/raon-2019-0007.
 54. Sawyer, A. J., Garand, M., Chaussabel, D., and Feng, C. G. (2021) Transcriptomic profiling identifies neutrophil specific upregulation of cystatin f as a marker of acute inflammation in humans, *Front. Immunol.*, **12**, 634119, doi: 10.3389/fimmu.2021.634119.
 55. Gaggero, S., Bruschi, M., Petretto, A., Parodi, M., Del Zotto, G., Lavarello, C., Prato, C., Santucci, L., Barbuto, A., Bottino, C., Candiano, G., Moretta, A., Vitale, M., Moretta, L., and Cantoni, C. (2018) Nidogen-1 is a novel extracellular ligand for the NKp44 activating receptor, *Oncoimmunology*, **7**, e1470730, doi: 10.1080/2162402X.2018.1470730.
 56. Morrissey, M. A., Kern, N., and Vale, R. D. (2020) CD47 ligation repositions the inhibitory receptor SIRPA to suppress integrin activation and phagocytosis, *Immunity*, **53**, 290–302, doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.008.
 57. Chen, Y. P., Kim, H. J., Wu, H., Price-Troska, T., Villasboas, J. C., Jalali, S., Feldman, A. L., Novak, A. J., Yang, Z. Z., and Ansell, S. M. (2019) SIRPalpha expression delineates subsets of intratumoral monocyte/macrophages with different functional and prognostic impact in follicular lymphoma, *Blood Cancer J.*, **9**, 84, doi: 10.1038/s41408-019-0246-0.
 58. Mittal, D., Sinha, D., Barkauskas, D., Young, A., Kalimutho, M., Stannard, K., Caramia, F., Haibe-Kains, B., Stagg, J., Khanna, K. K., Loi, S., and Smyth, M. J. (2016) Adenosine 2B receptor expression on cancer cells promotes metastasis, *Cancer Res.*, **76**, 4372–4382, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0544.
 59. Ryzhov, S., Novitskiy, S. V., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Carbone, D. P., Biaggioni, I., Dikov, M. M., and Feoktistov, I. (2008) Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth, *Neoplasia*, **10**, 987–995, doi: 10.1593/neo.08478.
 60. Morello, S., and Miele, L. (2014) Targeting the adenosine A2b receptor in the tumor microenvironment overcomes local immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells, *Oncoimmunology*, **3**, e27989, doi: 10.4161/onci.27989.

NOVEL POTENTIAL MECHANISMS OF REGULATORY B CELL-MEDIATED IMMUNOSUPPRESSION

E. A. Zheremyan^{1,2*}, A. S. Ustiugova¹, A. I. Radko³, E. M. Stasevich^{1,3}, A. N. Uvarova^{1,2},
N. A. Mitkin¹, D. V. Kuprash^{1,2,3}, and K. V. Korneev^{1,4*}

¹ *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: elyazheremyan@mail.ru, kirkorneev@gmail.com*

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

³ *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

⁴ *National Research Center for Hematology, 125167 Moscow, Russia*

B lymphocytes play an important role in the regulation of immune response in both normal and pathological conditions. Traditionally, the main functions of B cells were considered to be antibody production and antigen presentation, but in recent decades there have been discovered several subpopulations of regulatory B lymphocytes (Bregs) which maintain immunological tolerance and prevent overactivation of the immune system. Memory (mBregs, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) and transitional (tBregs, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) subpopulations of Bregs are usually considered in the context of studying the role of these B cells in various human pathologies. However, the mechanisms by which these Breg subpopulations exert their immunosuppressive activity remain poorly understood. In this work, we used bioinformatic analysis of open-source RNA sequencing data to propose potential mechanisms of B cell immunosuppression. Analysis of differential gene expression before and after activation of these subpopulations allowed us to identify six candidate molecules that may determine the functionality of mBregs and tBregs. IL4I1-, SIRPA-, and SLAMF7-dependent mechanisms of immunosuppression may be characteristic of both Breg subsets, while NID1-, CST7-, and ADORA2B-dependent mechanisms may be predominantly characteristic of tBregs. An in-depth understanding of the molecular mechanisms of anti-inflammatory immune response of B lymphocytes is an important task for both basic science and applied medicine and can facilitate the introduction of new approaches to the therapy of complex diseases.

Keywords: regulatory B cells, immunosuppression, anti-inflammatory molecules, immune response regulation

УДК 616-006.6

ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *SNAIL1*

© 2023 Н.И. Литовка*, И.Ю. Житняк*, Н.А. Глушанкова*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
115478 Москва, Россия; электронная почта: natglu@hotmail.com

Поступила в редакцию 01.09.2022

После доработки 27.10.2022

Принята к публикации 11.11.2022

Программа эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) используется опухолевыми клетками при активации инвазионно-метастатического каскада. С помощью конфокальной и видеомикроскопии нами изучены изменения цитоскелетных структур клеток линии рака молочной железы MCF-7 в ходе ЭМП при активации транскрипционного фактора *Snail1*. В работе была использована линия клеток MCF-7, стабильно экспрессирующая *tetOff*-регулируемую конструкцию *SNAIL1* (MCF-7-SNAIL1). При отмывке от тетрациклина и активации *Snail1* клетки MCF-7-SNAIL1 вступали в ЭМП и приобретали миграционный фенотип, сохраняя при этом экспрессию Е-кадгерина. Мы выделили пять вариантов мезенхимального фенотипа, различающихся по морфологии клеток и скорости миграции. Мигрирующие клетки обладали выраженной пластичностью и были способны быстро изменять как фенотип, так и скорость движения. Как показала иммунофлуоресцентная микроскопия, в основе изменений фенотипа клеток MCF-7-SNAIL1 при ЭМП лежат *Ap2/3*-зависимая полимеризация актиновой сети в ламеллиподиях на ведущем крае, активация контрактильности миозина в зоне за ядром, перераспределение белков межклеточной адгезии из зон межклеточного взаимодействия на ведущий край и реорганизация сети промежуточных кератиновых филаментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевая клетка, *Snail1/SNAIL1*, эпителиально-мезенхимальный переход, клеточная миграция, пластичность опухолевых клеток, межклеточная адгезия, цитоскелет, актин, миозин.

DOI: 10.31857/S0320972523010025, EDN: PAZYU

ВВЕДЕНИЕ

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), в результате которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип и способность к миграции, играет важную роль в эмбриональном развитии [1]. Опухолевые клетки используют программу ЭМП для инициации инвазионно-метастатического каскада [2]. В опухолях активация ЭМП связана с дерегуляцией или активацией сигнальных путей (EGF, HGF, Wnt, TGF- β , IGF, Notch-сигналингом) в результате мутаций генов рецепторов и других компонентов сигнальных путей; сигналами от матрикса и от клеток опу-

холевого микроокружения; гипоксией [3–5]. Одним из признаков ЭМП является гиперэкспрессия транскрипционных факторов ЭМП из семейств *Snail*, *Twist*, *Zeb*, которые подавляют экспрессию эпителиальных генов и активируют экспрессию мезенхимальных генов [6, 7]. Во многих случаях опухолевые клетки, вступая в ЭМП, переходят в гибридное эпителиально-мезенхимальное состояние. Такое состояние не является стационарным, позволяя опухолевым клеткам претерпевать дальнейшие изменения, а также способствует их выживанию и диссеминации [8, 9].

Транскрипционный фактор *Snail1*, относящийся к семейству *Snail*, имеет четыре цинковых пальца, домены SNAG, NES и богатый серином SRD-домен. Основной мишенью *Snail1* является ген *CDH1*, продукт которого — белок межклеточных адгезионных контактов (АК) Е-кадгерин [10–12]. Посредством цинковых пальцев *Snail1* связывается с

Принятые сокращения: ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход; АК — межклеточные адгезионные контакты.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Е-боксами (5'-CACCTG-3') промоторной области гена *CDH1*, а N-концевой SNAG-домен взаимодействует с корепрессорными комплексами, что приводит к репрессии транскрипции гена *CDH1* через эпигенетические модификации хроматина (метилование и деацетилирование гистонов H3 и H4) [6, 13]. При исследовании образцов рака молочной железы, рака желудка, рака толстой кишки и гепатокарцином была показана обратная корреляция между уровнем экспрессии Snail1 и Е-кадхерина [14]. В клетках плоскоклеточной карциномы полости рта было обнаружено также, что Snail1 может активировать эндоцитозный путь деградации Е-кадхерина [15]. Подавление экспрессии или аккумуляции Е-кадхерина на цитоплазматической мембране сопровождается разрушением АК, что приводит к ослаблению связи опухолевой клетки с соседними клетками, активирует миграцию, инвазию и метастазирование [10, 11]. Наряду с Е-кадхерином, Snail1 подавляет также экспрессию других эпителиальных маркеров, таких как белки клеточной полярности Crumbs3, Pals1, Patj, белки плотных контактов окклюдин и клаудины, белки десмосом десмоплакин и плакофилин, цитокератины 17, 18, 19, 20, интегрины $\alpha 6$, $\beta 4$ [10, 11, 16–20]. Snail1 рекрутирует коактиваторы к промоторам мезенхимальных генов, и тем самым индуцирует экспрессию виментина, N-кадхерина, металлопротеиназ MT1-MMP, MMP 1, 2, 7, интегринов $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 3$, коллагена, фибронектина, клаудина 11, что может стимулировать миграцию опухолевых клеток [11, 21–23]. В тестах *in vitro* показано, что экспрессия экзогенного Snail1 индуцирует миграционную и инвазивную активность эпителиальных клеток [24]. Оверэкспрессия Snail1 обнаружена на инвазивном фронте многих карцином [11, 25]. В опухолевых клетках, экспрессирующих Snail1, индукцию миграции связывают с активным Rac1 [21, 26]. Также показано, что в клетках рака простаты Snail1 подавляет экспрессию RKIP (Raf kinase inhibitor protein) – ингибитора Raf/MEK/ERK и NF- κ B сигнальных путей, вовлеченных в активацию метастазирования [27]. Вместе с тем до настоящего времени остаются практически не изученными изменения структур цитоскелета, определяющие возникновение миграционного фенотипа у опухолевых клеток при активации драйвера ЭМП – Snail1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, антитела и реагенты. В работе использовали линию рака молочной

железы человека MCF-7 и ее производную MCF-7-SNAIL с tetOff-регулируемой экспрессией гена *SNAIL* [28]. В работе также использовали линию эпителия молочной железы человека MCF-10A («ATCC», США). Клеточные линии предоставлены проф. А. Готро.

В работе использовали первичные мышечные моноклональные антитела: анти-Е-кадхерин, клон 36 и анти- β -катенин, клон 14 («BD Transduction Laboratories», США); анти- β -актин, клон 4C2 («Merck Millipore», США); анти- α -тубулин, клон DM1A; анти-винкулин, клон hVin1; анти- α -актинин-1, клон BM-75.2; анти- γ -тубулин, клон GTU88 («Sigma-Aldrich», США); анти- α -катенин, клон 15D9 («Enzo», США), анти-кератин-8, клон H1 [29], кроличьи поликлональные антитела: анти-p34-Arc/ARPC2 («Upstate, Merck», Германия), анти-фосфорилированные легкие цепи миозина («Cell Signaling Technology», США), анти-Snail1 и крысиные поликлональные антитела, анти-Snail1 («Cell Signaling Technology»). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с флуорохромами AlexaFluor 488, AlexaFluor 594 или AlexaFluor 647 («Jackson ImmunoResearch», США). В качестве вторичных антител для Вестерн-блоттинга также использовали вторичные антитела козы к иммуноглобулинам мыши и крысы, конъюгированные с пероксидазой («Jackson ImmunoResearch»). Также использовали флуоресцентные красители, которые добавляли вместе со вторичными антителами: Phalloidin, конъюгированный с AlexaFluor 488 («Molecular Probes», США) или с TRITC («Fluka», США); DAPI («Sigma-Aldrich»).

Видеомикроскопия, обработка видео и кимограммы. DIC (differential interference contrast)-видеомикроскопию проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ti («Nikon», Япония) с использованием объектива Plan Apo 20 $\times$ /0.75 DIC N2 («Nikon») на разных сроках отмывки клеток от тетрациклина (24, 48, 72 ч). Для съемки использовали 35-мм чашки со стеклянным дном («MatTek Corporation», США) или меченые стекла («Bellco Biotechnologies», США), помещенные в 35-мм чашки со стеклянным дном («Greiner Bio-One», Австрия). Непосредственно перед съемкой культуральную среду DMEM («Sigma-Aldrich») заменяли на DMEM/F12 («Sigma-Aldrich»). Съемку проводили с частотой 1 кадр в мин. С помощью программы ImageJ 1.53C («NIH», США) и плагина Manual Tracking были определены координаты клеток для построения треков и анализа характера их перемещения. С помощью программы Excel были построены диаграммы и графики. Для построения кимограмм клеточного края

снимали видео с частотой 1 кадр в 4 с с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti с объективом Plan Apo VC 100×/1.40 Oil («Nikon»). С помощью программы ImageJ и плагина Multi KymoGraph были построены кимограммы вдоль вектора перемещения клетки. Ширина линии для построения кимограммы – 1 пиксель.

Коиммунопреципитация и Вестерн-блоттинг.

Для лизирования клеток использовали буфер (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,025% Na-дезоксихолат, PIC (коктейль ингибиторов протеаз, «Roche» США). Для промывок использовали Wash-буфер (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA). При проведении коиммунопреципитации клеточные лизаты инкубировали 20 мин с антителами, затем добавляли Protein-G агарозу («Invitrogen», «Thermo Fisher Scientific», США) на 2,5 ч. Вестерн-блоттинг проводили стандартным способом с помощью ячейки Bio-RAD («Bio-RAD Laboratories», США): вертикальный электрофорез в 10%-ном ПААГ, затем перенос на мембрану Hybond™-C или Hybond™-P («Amersham», Великобритания).

Флуоресцентная микроскопия, анализ флуоресцентных изображений. Для флуоресцентного окрашивания клетки фиксировали 3,7%-ным параформальдегидом с последующей пермеабиллизацией 0,25% (w/v) Triton X-100 или 1%-ным параформальдегидом с дофиксацией метанолом. Для флуоресцентной микроскопии использовали микроскоп Nikon Eclipse Ti с объективом Plan Fluor 40×/1.30 oil DIC H/N2 («Nikon») и сканирующий лазерный конфокальный микроскоп Leica SP5 («Leica», Германия) с объективом PL APO HCX 63×/1.40-0.60 oil («Leica»). Для отслеживания конкретных фенотипов и поведения клеток непосредственно перед фиксацией проводили DIC-видеомикроскопию на меченых стеклах, которые затем окрашивали для со-

поставления сюжетов. С помощью программы ImageJ проводили измерения интенсивности флуоресценции (ИФ) Snail1 в ядрах, используя параметр Mean Grey Value (MGV) для ядра и околоядерной зоны (фона). Далее вычисляли ИФ по формуле:

$$\text{ИФ} = (\text{MGV}_{\text{ядра}} - \text{MGV}_{\text{фона}}) / \text{MGV}_{\text{фона}}.$$

Диаграммы строили в программе GraphPad Prism 6 («GraphPad Software», США).

Статистическая обработка данных. При статистической обработке использовали *t*-критерий Стьюдента и *h*-критерий Краскела–Уоллиса (для объединенных выборок). Данные представляли как средние значения ± ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы было изучение миграционной активности опухолевых клеток, вступивших в ЭМП при активации Snail1, анализ цитоскелетных структур, определяющих изменения клеточной морфологии при прохождении ЭМП. В работе была использована культура клеток линии рака молочной железы MCF-7, стабильно экспрессирующей tetOff-регулируемую конструкцию *SNAIL1* (MCF-7-SNAI1) [28]. При наличии в культуральной среде тетрациклина клетки MCF-7-SNAI1 сохраняли фенотип, близкий к фенотипу родительской линии MCF-7, образуя островки плотно сцепленных клеток. В редкой культуре одиночные клетки MCF-7-SNAI1 имели два варианта фенотипа: дискоидные распластанные клетки с невысокой ламеллярной активностью по всему периметру (M0) и неполяризованные клетки, образующие дискретные протрузии (M1). Клетки обоих фенотипов не меняли местоположение (рис. 1).

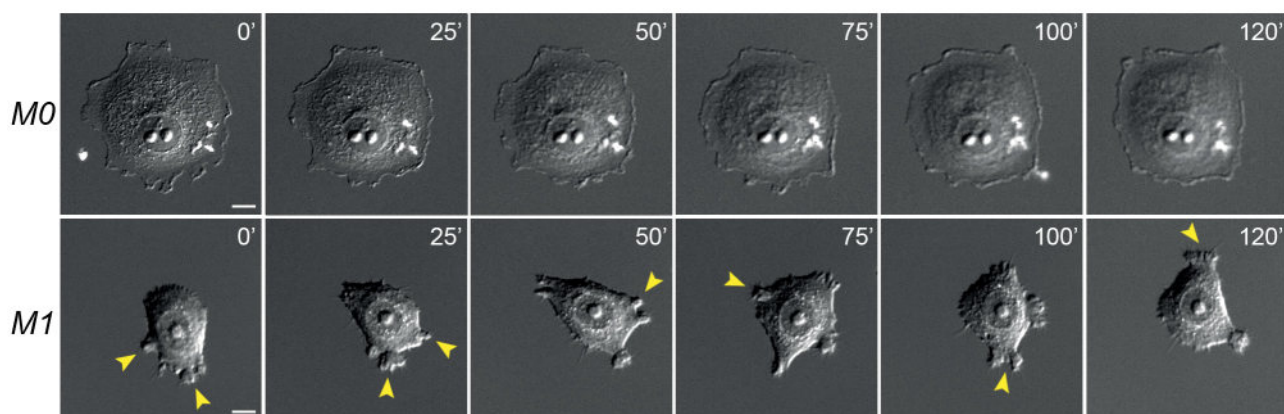


Рис. 1. Клетки MCF-7-SNAI1 в присутствии тетрациклина (tet+, контроль), варианты фенотипов. Флажками указаны протрузии. DIC-видеомикроскопия. Шкала – 10 мкм

При отмывке от тетрациклина клетки MCF-7-SNAI1 уже через 4 ч начинали экспрессировать Snail1, а к 24 ч его содержание в клетках (при определении Вестерн-блоттингом) выходило на плато (рис. 2). Уровень экспрессии Snail1, анализируемый по интенсивности флуоресценции ядер на препаратах, окрашенных специфическими антителами к Snail1, мог различаться значительно, в некоторых клетках MCF-7-SNAI1 в среде без тетрациклина Snail1 не определялся совсем. По данным Vetter et al. [30], получивших линию MCF-7-SNAI1, уровень экспрессии мРНК Е-кадгерина при активации Snail1 снижался в 3–4 раза, однако на уровне белка исследования не проводились. Вместе с тем при анализе содержания Е-кадгерина в клетках MCF-7-SNAI1 с использованием Вестерн-блоттинга мы не обнаружили снижения уровня его экспрессии при активации Snail1 (рис. 2, *з*). При анализе клеточных лизатов с помощью коиммунопреципитации было обнаружено, что на протяжении 96 ч после начала отмывки от тетрациклина в клетках сохранялись белковые комплексы межклеточной адгезии, включающие Е-кадгерин, α -катенин и β -катенин. Сохранение высокого уровня экспрессии эпителиальных генов, в частности Е-кадгерина, и включение его в состав АК в клетках MCF-7, трансфицированных трансгеном *SNAIL1* *6SA*, продукт которого

более стабилен по сравнению со *SNAIL1*, также было показано недавно в работе Wee et al. [31]. Ранее при изучении панели из более чем 60 опухолевых линий было обнаружено, что содержание Е-кадгерина в клетках не коррелирует с уровнем экспрессии *SNAIL1*, в отличие от транскрипционных факторов Snail2, TCF8 и ZFN1B [32]. Экспрессия Е-кадгерина в клетке может регулироваться на нескольких уровнях, включая метилирование промотора Е-кадгерина, регуляцию на уровне транскрипции и трансляции, при этом микроРНК регулируют уровень экспрессии транскрипционных факторов ЭМП.

Вместе с тем Snail1, не влияя на уровень экспрессии Е-кадгерина, приводил к появлению миграционной активности у клеток MCF-7-SNAI1: при активации Snail1 клетки утрачивали эпителиальный фенотип, выходили из островков и мигрировали по подложке, то есть входили в ЭМП (рис. 3, *а*). Как показало конфокально-микроскопическое исследование, радикальное изменение морфологии и приобретение клетками MCF-7-SNAI1 мезенхимального фенотипа при активации Snail1 было связано с реорганизацией актинового цитоскелета, полимеризацией актина на свободном крае, что определяло образование активных протрузий, а также с разрушением стабильных АК (рис. 3, *б*). В контрольной культуре

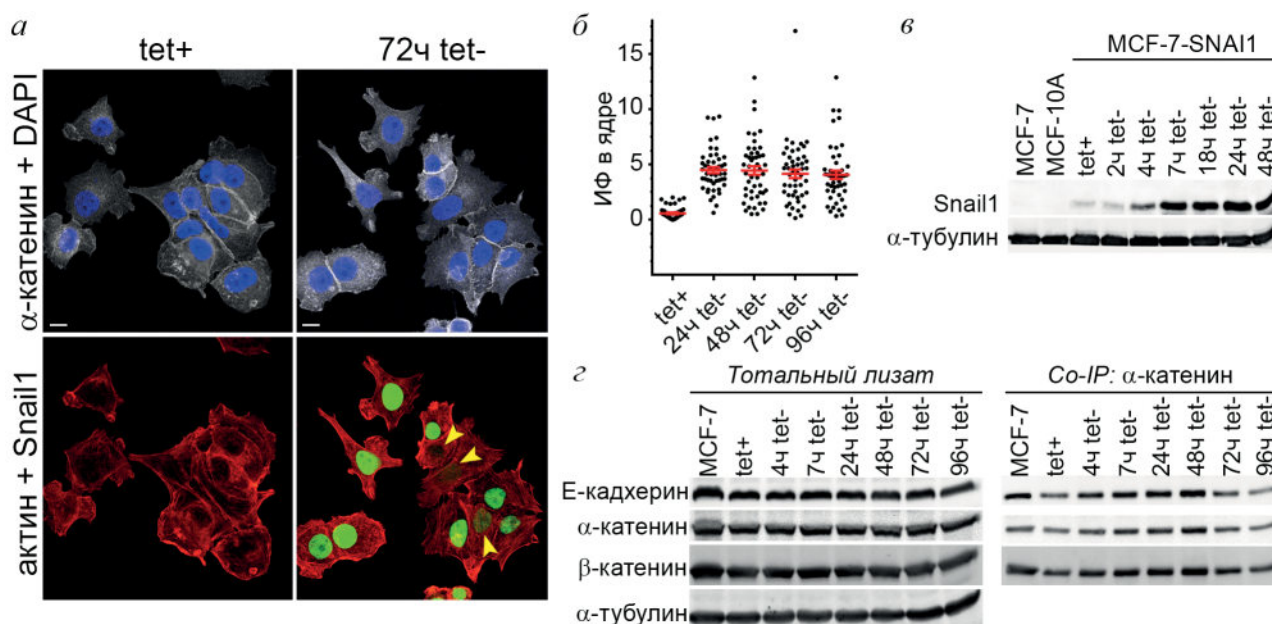


Рис. 2. Активация Snail1 в клетках MCF-7-SNAI1 при отмывке от тетрациклина. *а* — Snail1 (зеленый канал) в ядрах при отмывке клеток от тетрациклина. Иммунофлуоресцентное окрашивание. Флажки указывают на ядра с низкой экспрессией Snail1. Конфокальная микроскопия. Шкала — 10 мкм. *б* — Диаграмма интенсивности флуоресценции Snail1 в ядрах на разных сроках отмывки от тетрациклина. Среднее значение $\pm$ ошибка среднего, $n = 55$. *в* — Вестерн-блоттинг лизатов клеток MCF-7, MCF-10A и MCF-7-SNAI1 на разных сроках отмывки от тетрациклина. *з* — Коиммунопреципитация белков межклеточных адгезионных контактов в клетках MCF-7 и MCF-7-SNAI1 на разных сроках отмывки от тетрациклина. α -Тубулин — маркер загрузки

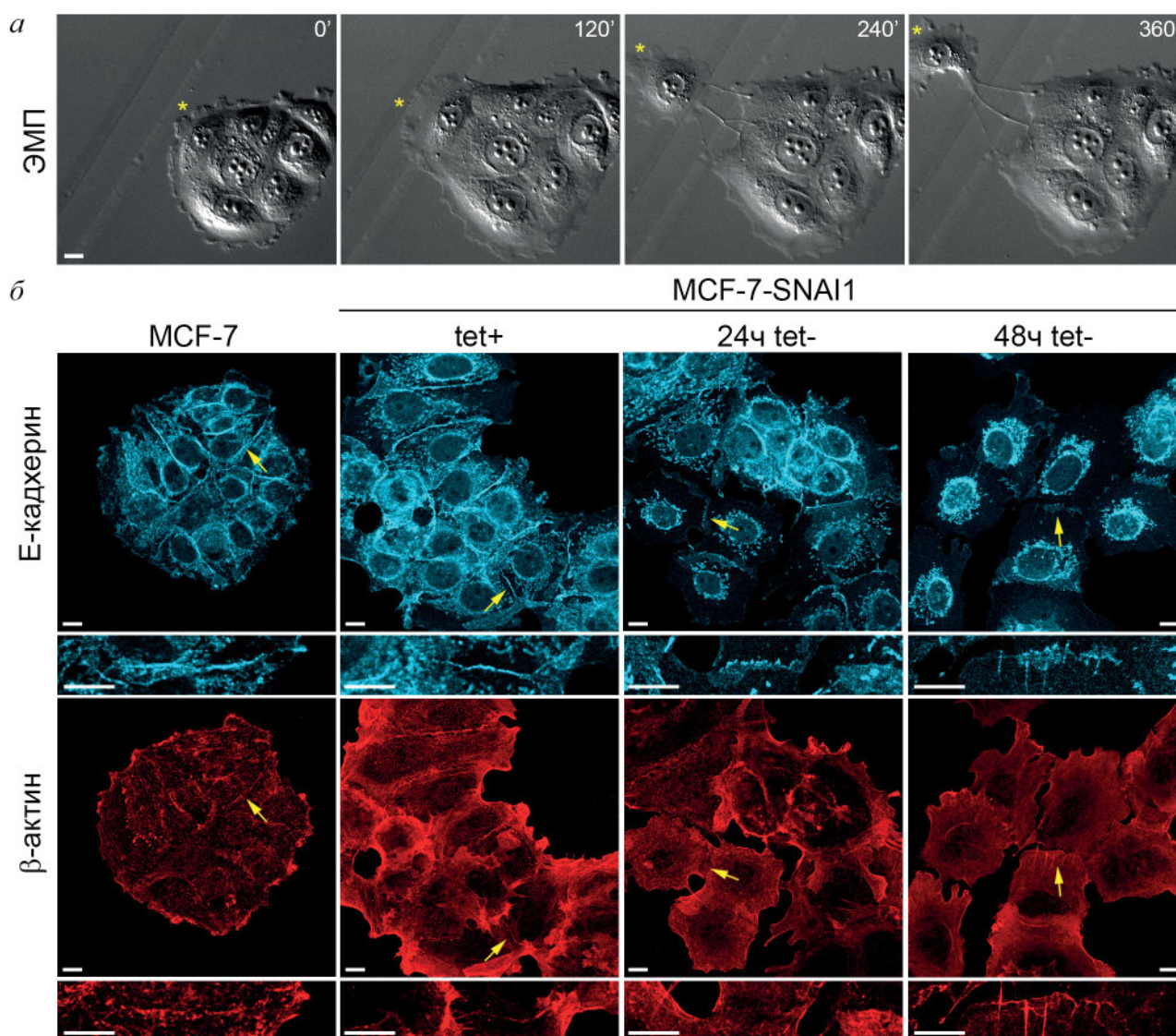


Рис. 3. ЭМП клеток MCF-7-SNAI1 при отмывке от тетрациклина. *a* – DIC-видеомикроскопия (начало съемки – 24 ч tet–). Выход клетки из островка (помечена звездочкой). Шкала – 10 мкм. *б* – Окрашивание на Е-кадхерин и β-актин. Контрольные клетки MCF-7 и MCF-7-SNAI1 tet+, клетки MCF-7-SNAI1 tet– на разных сроках отмывки от тетрациклина. Стрелками отмечены межклеточные контакты, показанные ниже при большем увеличении. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм

контактирующие клетки MCF-7-SNAI1 так же, как и исходные клетки MCF-7, образовывали плотные островки, в апикальной части которых располагались узкие кольцевые актиновые пучки, ассоциированные со стабильными тангенциальными АК, образованными кадгерин-катениновыми комплексами. На свободных краях в некоторых клетках были видны краевые актиновые пучки. В клетках, вступивших в ЭМП при активации Snail1, происходила фрагментация или полное разрушение кольцевого актинового пучка, на межклеточных границах появлялись ламеллиподии. Вместе с тем клетки могли сохранять контакты друг с другом, однако тангенциальные АК в зонах межклеточных взаимодействий во многих случаях

замещались радиальными или точечными АК. Радиальные АК могли быть ассоциированы с прямыми актиновыми пучками. Как мы показали ранее [33, 34], радиальные и точечные контакты нестабильны. Клетки MCF-7-SNAI1 при активации Snail1, несмотря на сохранение экспрессии Е-кадгерина, также утрачивали стабильную межклеточную адгезию, они отрывались от соседних клеток и мигрировали по субстрату.

Важным событием, определяющим ослабление межклеточной адгезии в ходе ЭМП, является фрагментация кольцевого актинового пучка, который отвечает за стабильность тангенциальных Е-кадхериновых АК, характерных для эпителия [34]. Мы предложили гипотезу,

объясняющую закономерности превращения неподвижных эпителиоцитов в мигрирующие клетки, разрывающие связи с соседними клетками. Согласно этой гипотезе, разрушение кольцевого актинового пучка при активации ЭМП приводит к высвобождению мономерного актина. В свете имеющихся данных о существовании в клетке конкуренции между актиновыми системами за глобулярный актин [35], высвобождение G-актина из разрушающегося кольцевого актинового пучка на ранних этапах ЭМП может приводить к включению актина во вновь образующуюся сеть ламеллиподий, что стимулирует миграцию.

Полимеризация актиновой сети, определяющая образование ламеллиподий, лежит в основе мезенхимального типа миграции. Клетки, экспрессирующие Snail1, активно образовывали ламеллиподии на свободном крае (рис. 3, *a*). Хорошо известно, что малая ГТФаза Rac индуцирует WAVE2-зависимую полимеризацию актина и образование ламеллиподий [36]. Ранее было показано, что Rac1 активирует миграцию клеток рака поджелудочной железы, экспрессирующих экзогенный Snail1 [21]. Ключевую роль в формировании сети актиновых филаментов в составе ламеллиподий и мезенхимальной миграции играет комплекс Arp2/3 [37]. При конфокально-микроскопическом исследовании клеток MCF-7-SNAI1 с активным Snail1 мы обнаружили аккумуляцию белка ArpC2, входящего в комплекс Arp2/3, на внешнем крае формирующихся ламеллиподий (рис. 4, *a*). Как показало окрашивание на винкулин, в активно мигрирующих клетках ламеллиподии прикреплялись к подложке посредством многочисленных мелких фокальных адгезий (рис. 4, *a*), в отличие от крупных штриховых фокальных адгезий, типичных для контрольных клеток, хорошо прикрепленных к подлежащему субстрату. Клетки с активированным Snail1 также отличались от контрольных клеток внутриклеточным распределением актин-связывающих белков α -катенина и α -актинина-1. В контрольных клетках MCF-7-SNAI1 α -катенин входил в состав тангенциальных АК. α -Катенин играет важную роль в привлечении актина в зоны межклеточной адгезии и стабилизации АК [38]. В клетках MCF-7-SNAI1 с активным Snail1 α -катенин, наряду с участием в построении АК, перемещался на ведущий край активно мигрирующих клеток. В узкой зоне активной полимеризации актина также аккумуляровался другой актин-связывающий белок — α -актинин-1 (рис. 4). Таким образом, вхождение в ЭМП при активации Snail1 сопровождалось кардинальной реорганизацией актинового цитоскелета,

перераспределением α -катенина и α -актинина-1 на ведущий край клеток. Недавно было показано, что взаимодействие α -катенина с винкулином необходимо для распластывания фибробластов и механо-сенсинга подлежащего субстрата [39]. Ранее было показано, что α -актинин-1 участвует в сборке актина в инвадоподиях, и его нокдаун угнетает образование инвадоподий клетками рака молочной железы [40]. Мы предполагаем, что оба этих актин-связывающих белка могут быть вовлечены в активацию образования ламеллиподий при прохождении клетками ЭМП.

Мы также исследовали положение центра организации микротрубочек, ассоциированных с centrosомой, в мигрирующих клетках. Для этого после 6 ч видеосъемки клеток 24 ч tet— на меченых стеклах проводили окрашивание на маркер центра организации микротрубочек — γ -тубулин. С помощью разметки на меченом стекле отыскивали отснятые с помощью DIC-микроскопии сюжеты и снимали их с помощью флуоресцентной микроскопии. Центр организации centrosомальных микротрубочек был виден не во всех клетках, однако во многих мигрирующих клетках MCF-7-SNAI1 он выявлялся сзади ядра. Как недавно стало ясно, такое его положение определяется балансом сил, влияющих на сеть микротрубочек со стороны актина—миозина [41].

Культура клеток MCF-7-SNAI1, вошедших в ЭМП при активации Snail1, отличалась значительной гетерогенностью. Уже через 24 ч после начала отмывки от тетрациклина при видеомикроскопическом исследовании можно было видеть мигрирующие клетки с мезенхимальным фенотипом. Клетки различались существенно как по форме, так и по скорости миграции. Мы выделили пять вариантов мезенхимальных фенотипов (рис. 5 и 6, *a*): 1) клетки с фибробласто-подобным фенотипом, образующие широкие плоские ламеллиподии на ведущем крае и хвостовую часть, прикрепленную к подложке (M2); 2) быстро мигрирующие кератоцито-подобные клетки с активным ведущим краем, не имеющие хвостовой части (M2к); 3) медленно мигрирующие поляризованные клетки со складчатой ламеллой, в которую могло смещаться ядро, и хвостовой частью (M3); 4) быстро мигрирующие клетки, не имеющие хвостовой части, в ведущей ламелле которых располагалось ядро (M4); 5) клетки с промежуточным мезенхимально-амебоидным фенотипом, образующие как ламеллиподии, так и блябы (MA). Клетки могли также не проявлять направленной миграционной активности (M0 — малоподвижный фенотип и M1 — фенотип,

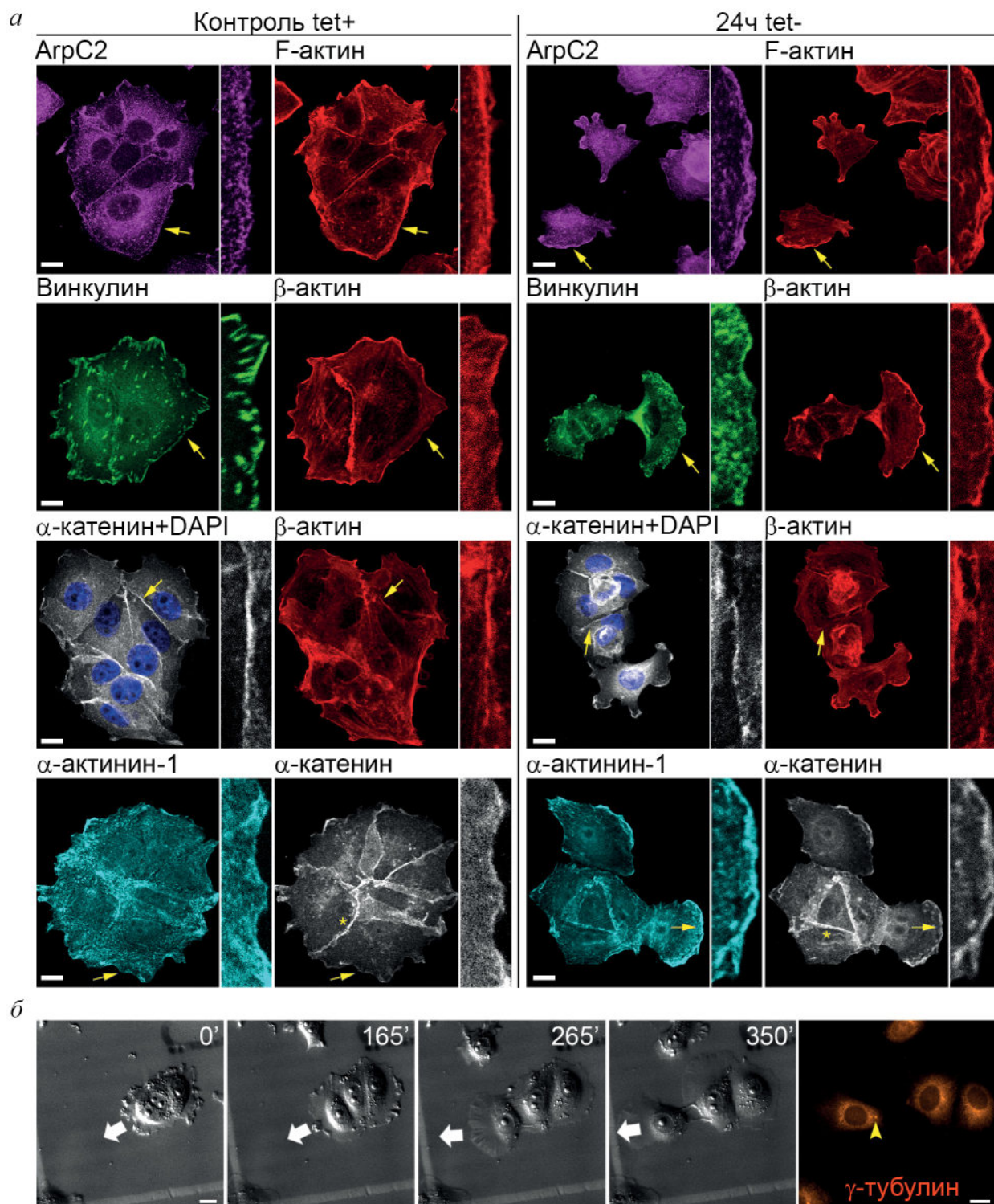


Рис. 4. Актиновый цитоскелет, межклеточные адгезионные контакты, актин-связывающие белки и центр организации микротрубочек в клетках MCF-7-SNAI1, проходящих ЭМП при индукции Snail1. *а* — Флуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия. Стрелки указывают на зоны врезок. Звездочками отмечены АК. *б* — Положение центра организации микротрубочек (флажок) в клетке, проходящей ЭМП. Слева — кадры видеосъемки. Стрелка показывает направление миграции клетки из островка. Справа — окрашивание на γ -тубулин. Шкала — 10 мкм

у которого протрузии образуются не направленно). Мезенхимальная миграция, сопровождающаяся перемещением ядра на ведущий край, описана нами впервые.

С помощью DIC-микроскопии на разных сроках отмывки от тетрациклина анализировали поведение клеток в культуре. Были определены скорость, пройденный путь и дистанция,

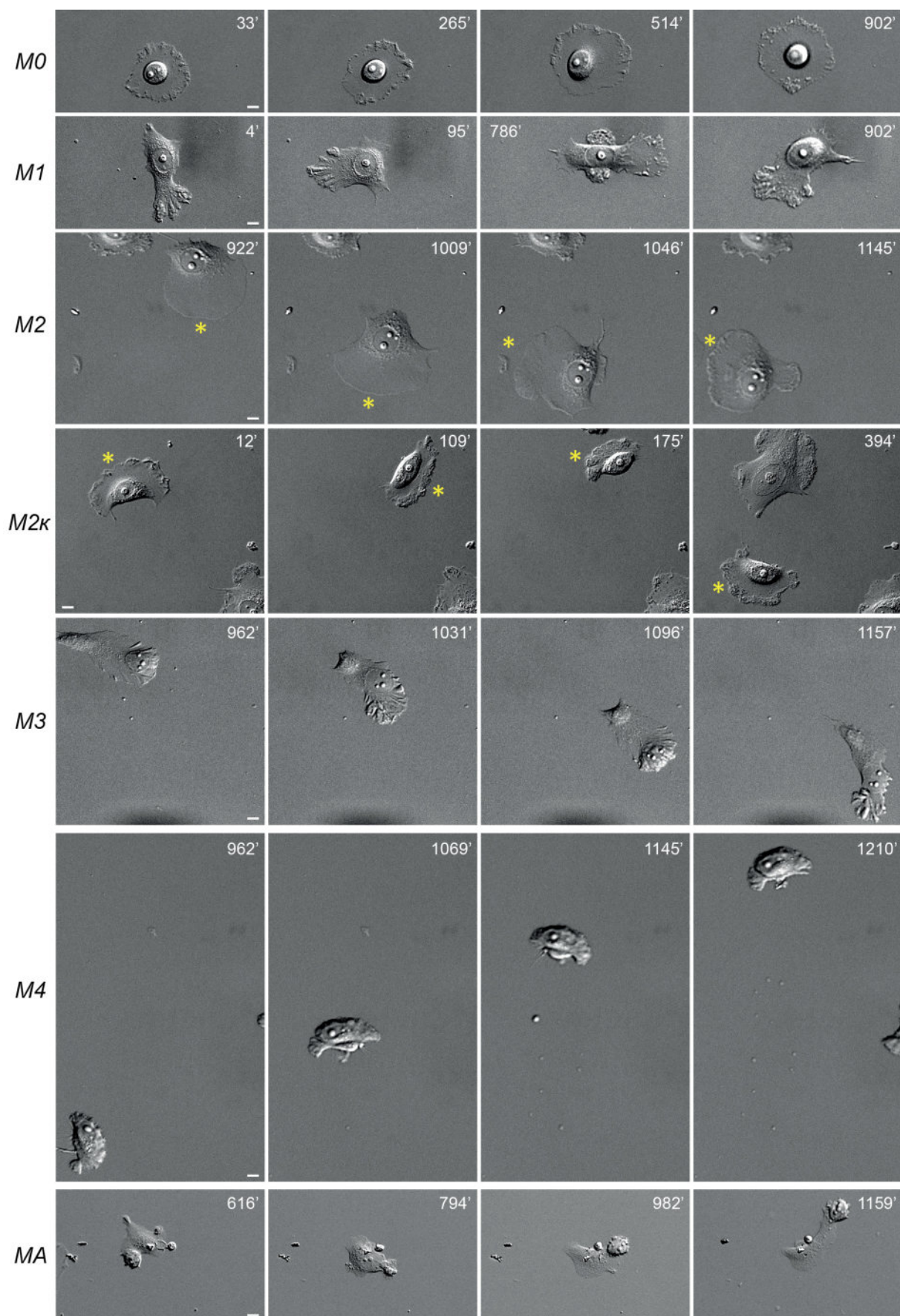
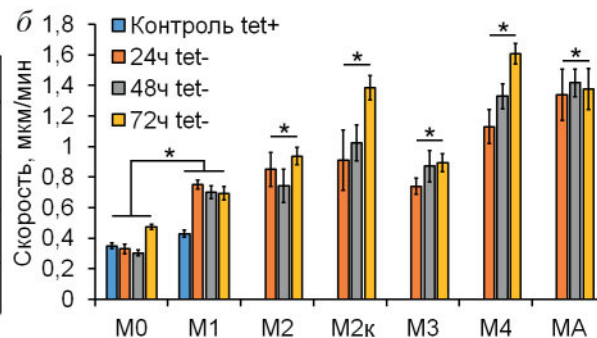


Рис. 5. Варианты фенотипов клеток MCF-7-SNAI1 при отмывке от тетрациклина (72 ч tet–). Звездочки маркируют клетку с определенным фенотипом, если в кадре больше одной клетки. DIC-видеомикроскопия. Шкала — 10 мкм

а Соотношение фенотипов, %

	M0	M1	M2	M2к	M3	M4	MA
Контроль tet+ (107)	36	64					
24ч tet- (147)	10	61	5	3	6	7	8
48ч tet- (135)	22	38	12	4	5	10	9
72ч tet- (207)	20	22	18	6	6	16	12



б

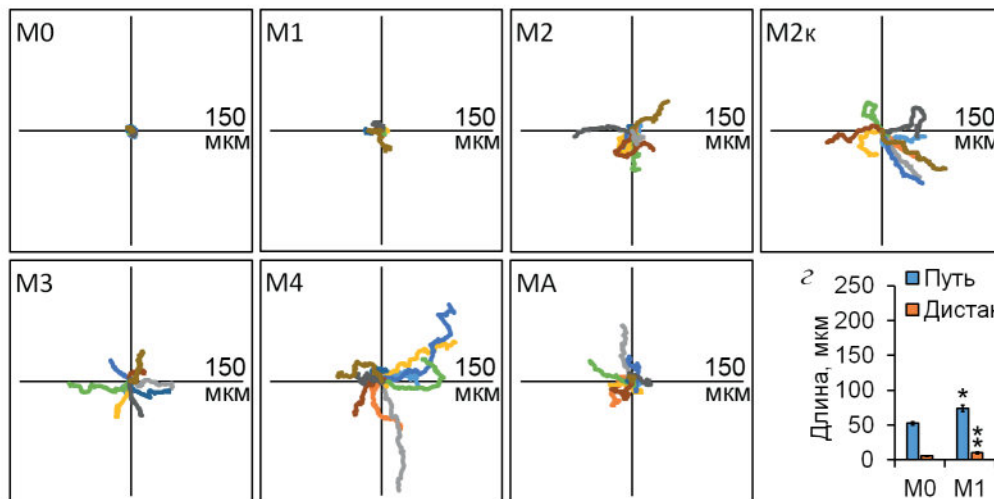
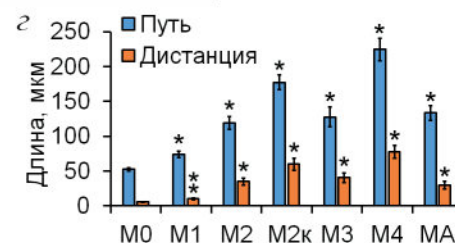
72ч tet-
1,54* $p < 0,001$
** $p < 0,005$ 

Рис. 6. Фенотипы клеток MCF-7-SNAI1. а – Встречаемость фенотипов в культуре на разных сроках отмытки от тетрациклина в процентах. б – Скорости миграции клеток различных фенотипов (h-критерий Краскала–Уоллиса, скорости клеток с определенным фенотипом относительно скоростей клеток M0 и M1). в – Траектории движения клеток различных фенотипов за 1,5 ч (72 ч tet-), $n = 10$. г – Средние значения пройденного за 1,5 ч пути и дистанции, на которую удалились клетки от начальной точки, для разных фенотипов (t-критерий Стьюдента относительно M0 и M1)

на которую переместились клетки, построены траектории движения 10 клеток каждого фенотипа за 1,5 ч видеонаблюдения (рис. 6, в–г). Наиболее быстро мигрирующими клетками были клетки с фенотипами M2к и M4 через 72 ч после начала отмытки от тетрациклина.

Важнейшей характеристикой опухолевых клеток MCF-7-SNAI1, вошедших в ЭМП при активации Snail1, была фенотипическая пластичность: клетки в течение нескольких минут могли менять свой фенотип, направление и скорость миграции (рис. 7).

Как видно из таблицы (рис. 7, б), в контроле (в присутствии тетрациклина) клетки имели только фенотипы M0 и M1, контрольные клетки значительно чаще переходили из M1 к более распластанному фенотипу M0. Через 24 ч после начала отмытки от тетрациклина и активации Snail1 можно было наблюдать несколько вариантов переходов. Самыми частыми были переходы M1 → M4 и M1 → M3. Далее (через 48–72 ч после начала отмытки от тетрациклина) наблюдалось еще большее разнообразие вариантов переходов. Самыми частыми вариантами переходов через 48 ч после начала отмытки от

тетрациклина были M1 → M4 и M1 → M0. В культуре клеток через 72 ч после начала отмытки от тетрациклина фенотип клеток становился более стабильным, значительная часть клеток могла в течение 1,5–2 ч поддерживать определенную морфологию, что не коррелировало с уровнем экспрессии Snail1. Молекулярные механизмы, приводящие к смене фенотипов, на данный момент не ясны и требуют дальнейшего изучения.

При большем увеличении мы исследовали характер образования протрузий клеток и с использованием плагина Multi Kymograph построили кимограммы, отражающие динамику протрузий на активном крае клеток и смещение активного края в результате миграции (рис. 8, а). Активный край клеток MCF-7-SNAI1 с мезенхимальным фенотипом был образован непрерывно формирующимися ламеллиподиями, во многих клетках более проксимальная часть ламеллы становилась объемной, образование таких вздутий связано, по-видимому, с дефектностью актинового кортекса в опухолевых клетках (рис. 8).

Были изучены особенности организации цитоскелетных структур в клетках MCF-7-SNAI1,

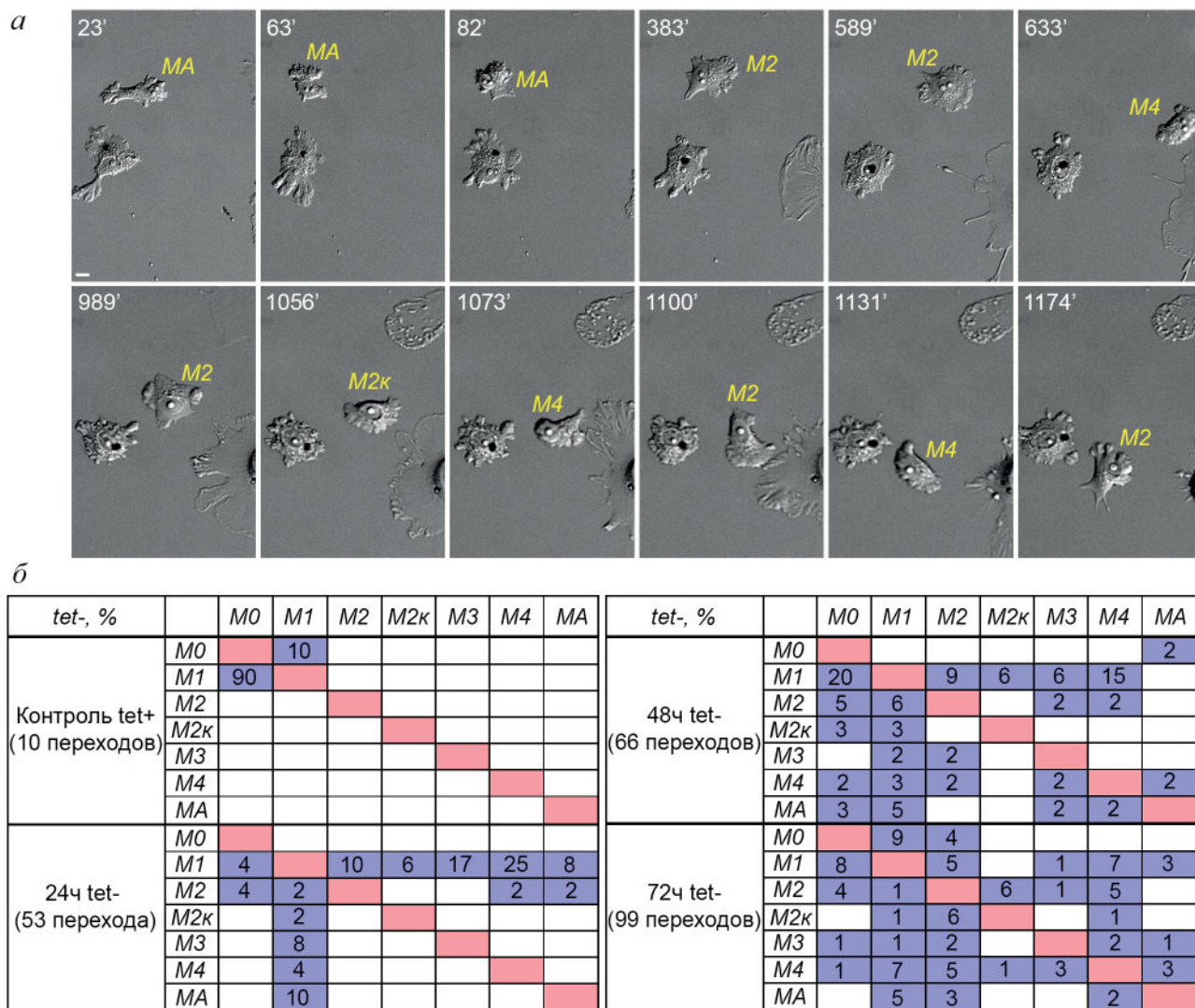


Рис. 7. Варианты переходов между различными фенотипами клеток MCF-7-SNAI1. *a* – DIC-видеомикроскопия клеток MCF-7-SNAI1 (72 ч tet–). Шкала – 10 мкм. *б* – Результаты анализа видео, 24-часовая съемка. Строки – исходные фенотипы, столбцы – конечные фенотипы. Значения указаны в процентах от общего числа переходов для каждой временной точки отмычки от тетрациклина

имеющих различный миграционный фенотип: проведено флуоресцентное окрашивание актина, миозина и промежуточных филаментов. Как известно, одним из основных белков, определяющих перестройки актинового цитоскелета, является миозин, контрактильная функция которого активируется при фосфорилировании легких цепей миозина [42]. Активный миозин можно детектировать специфическими антителами к фосфорилированным легким цепям миозина (p-MLC). В контрольной культуре MCF-7-SNAI1 в присутствии тетрациклина активный миозин в составе тонких акто-миозиновых пучков детектировался в цитоплазме (рис. 9).

Промежуточные филаменты в клетках MCF-7 представлены кератинами, нами были использованы антитела к кератину-8. Керати-

новые филаменты формировали сеть, заполняя всю цитоплазму и концентрируясь вокруг ядра (рис. 10, *a*). Известно, что промежуточные филаменты в клетках стабилизируют положение ядра и его форму [43].

В клетках с мезенхимальным фенотипом M2 на ведущем крае собиралась сеть актиновых микрофиламентов, сеть промежуточных филаментов в этой зоне была более разреженной, более плотная сеть промежуточных филаментов концентрировалась за ядром. Акто-миозиновые пучки, включающие фосфо-миозин, располагались вдоль боковых краев клетки. Такие пучки ограничивают псевдоподиальную активность и определяют подтягивание задней хвостовой части клетки во время движения. В клетках M2к, как и в кератоцитах, актин образовывал сеть микрофиламентов в ламеллиподиях на ведущем

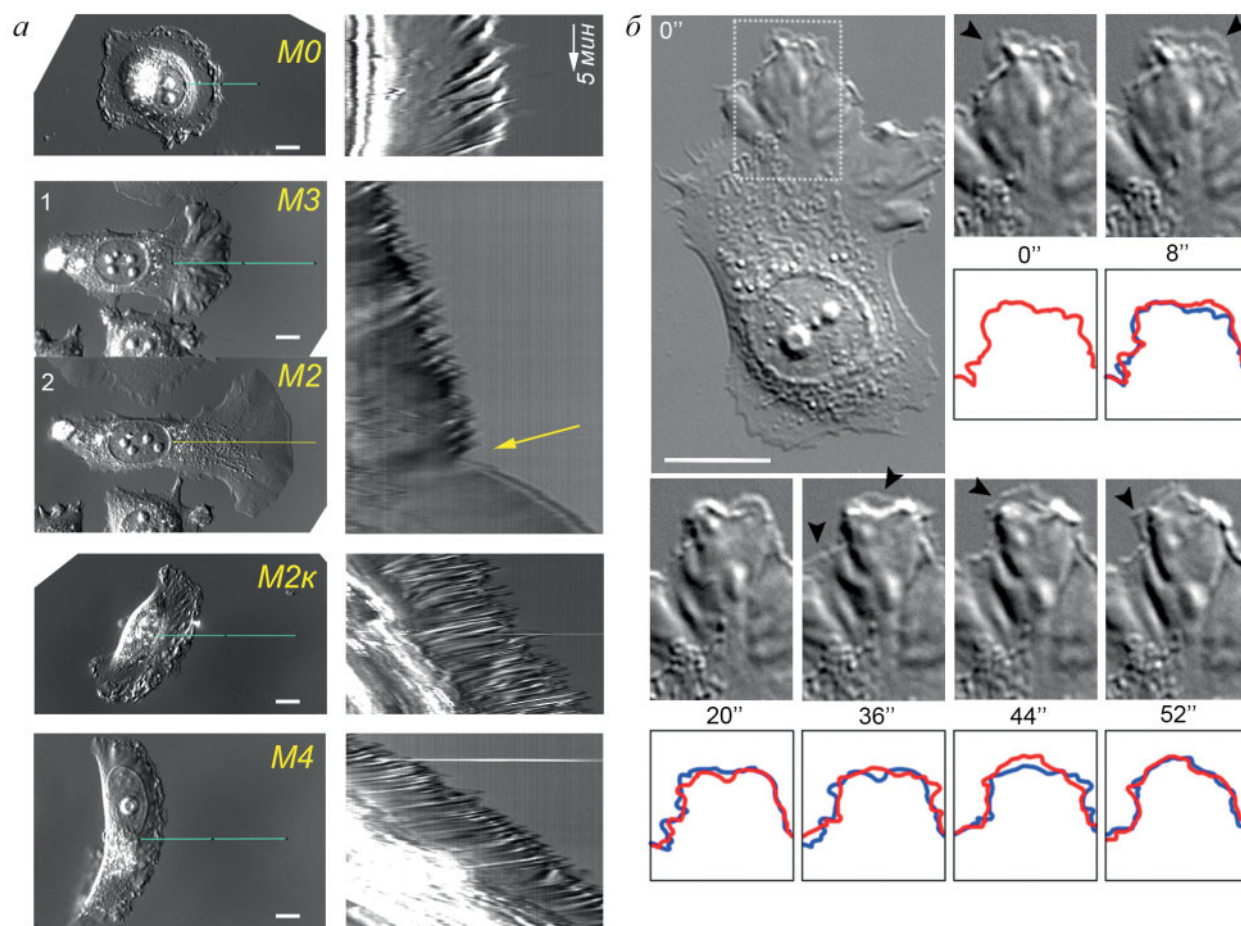


Рис. 8. Динамика активного края клеток MCF-7-SNAI1 (72 ч tet-). *а* – Кимограммы активного края. Слева – клетка в начальной точке построения кимограммы (голубая линия), или в конечной точке (желтая линия). Справа – соответствующая кимограмма. Цифрами 1 и 2 обозначены две временные точки одного сюжета, между которыми произошла смена типа выбрасываемой протрузии (желтая стрелка на кимограмме). Шкала – 10 мкм. Временная шкала (5 мин) соответствует длине белой стрелки. *б* – Образование протрузий на активном крае. DIC-видеоимикроскопия, интервалы в секундах. Флажки указывают на вновь формирующиеся ламеллиподии. Кадры из видеоимикроскопии продублированы контуром края клетки, где красная линия отражает текущий контур, а синяя линия дублирует контур из предыдущей показанной временной точки для сравнения

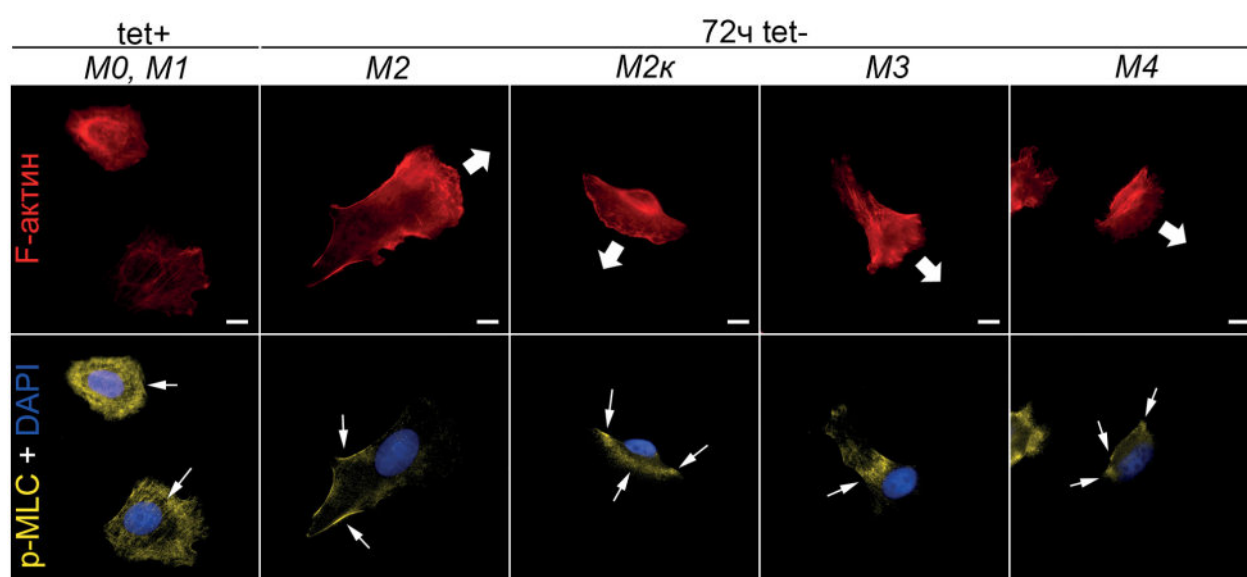


Рис. 9. Распределение актинового цитоскелета и фосфорилированных легких цепей миозина (p-MLC) в клетках MCF-7-SNAI1 разных фенотипов. Толстые стрелки показывают направление клеточной миграции. Тонкие стрелки указывают на локализацию p-MLC. Флуоресцентная микроскопия. Шкала – 10 мкм

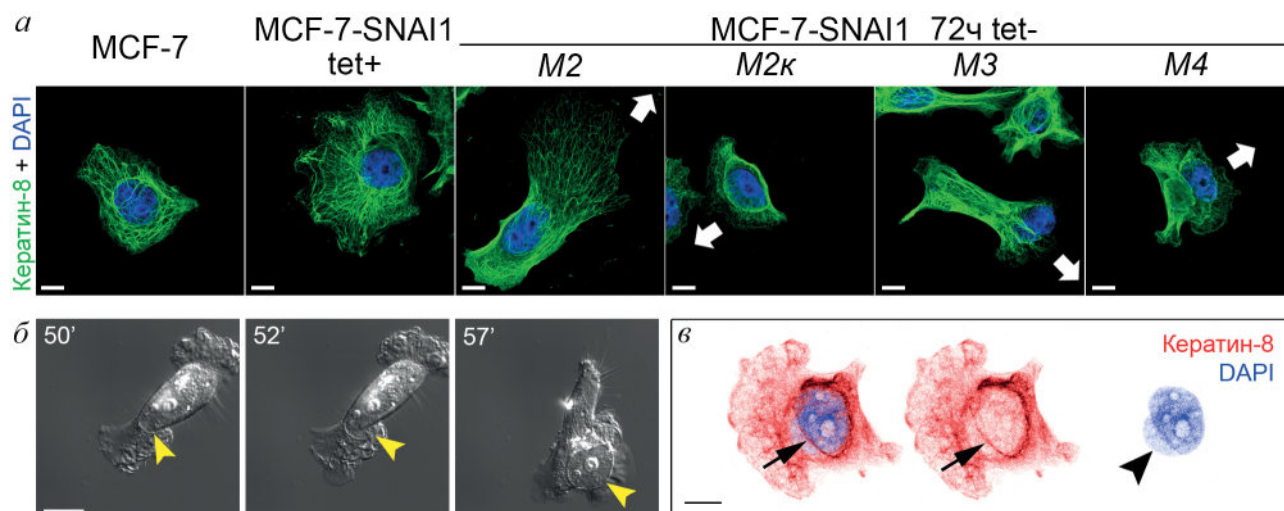


Рис. 10. Локализация ядра и промежуточных филаментов в клетках разных фенотипов. *a* — Распределение кератина-8 в клетках MCF-7 и MCF-7-SNAI1 разных фенотипов. Стрелки показывают направление клеточной миграции. Конфокальная микроскопия. Шкала — 10 мкм. *б* — Клетка MCF-7-SNAI1 (72 ч tet[−]) выталкивает ядро на край. DIC-видео микроскопия. Шкала — 10 мкм. Флажки указывают на ядро. *в* — Клетка MCF-7-SNAI1 (24 ч tet[−]) с деформированным ядром, которое переходит в ламеллу (переход M1/M2 → M4). Стрелкой показаны промежуточные филаменты, концентрирующиеся вокруг ядра. Флажком показана деформированная часть ядра. Конфокальная микроскопия. Шкала — 10 мкм

крае и арко-подобный, содержащий фосфомиозин, пучок, параллельный ведущему краю, над ядром концентрировались кератиновые промежуточные филаменты. Полимеризация актиновой сети и сокращение арко-подобных пучков определяют перемещение таких клеток. В клетках с M3-фенотипом актиновые микрофиламенты заполняли всю цитоплазму, а фосфорилированный миозин концентрировался за ядром. Можно предположить, что сокращение акто-миозиновых пучков в этой области обуславливало выталкивание ядра на клеточный край. Промежуточные филаменты при этом смещались в заднюю часть клетки. В клетках с фенотипом M4 акто-миозиновые пучки, ориентированные параллельно ведущему краю, располагались за ядром, их сокращение, по-видимому, и приводило к перемещению ядра на ведущий край. Мы предполагаем, что особенности миграции клеток MCF-7 с активированным SNAI1 определяются не только активной полимеризацией актина на ведущем крае, но также и выраженной контрактностью актина—миозина в области за клеточным ядром, что приводит к выталкиванию ядра на край клетки. При перемещении на ведущий край клетки ядро высвобождалось из сети промежуточных филаментов и часто при этом деформировалось (рис. 10, *б* и *в*).

Проведенные исследования показали, что направленная клеточная миграция при ЭМП, как результат активации Snail1, ассоциирована с разрушением стабильных тангенциальных АК, полимеризацией актиновой сети на

ведущем крае клеток, активацией контрактности актина—миозина, перераспределением белков актин-катенинового комплекса и актин-связывающих белков, перераспределением фокальных контактов и реорганизацией сети промежуточных филаментов. Миграционный фенотип опухолевых клеток чрезвычайно пластичен, реорганизации актинового цитоскелета лежат в основе такой пластичности.

Вклад авторов. Н.А. Глушанкова — концепция и руководство работой; Н.И. Литовка, И.Ю. Житняк — проведение экспериментов; И.Ю. Житняк — анализ результатов; Н.И. Литовка, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова — обсуждение результатов исследования; И.Ю. Житняк — подготовка рисунков; Н.А. Глушанкова, И.Ю. Житняк — написание текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00347).

Благодарности. Выражаем благодарность А. Готро (Политехническая школа, Франция) за клетки MCF-7-SNAI1, MCF-7-CTRL3, MCF-10A, А.М. Щербакову (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) за антитела к Snail1, И.Н. Бычкову за участие в экспериментах на начальной стадии выполнения проекта.

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

- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., and Thiery, J. P. P. (2016) EMT: 2016, *Cell*, **166**, 21-45, doi: 10.1016/J.CELL.2016.06.028.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., and Weinberg, R. A. (2017) Emerging biological principles of metastasis, *Cell*, **168**, 670-691, doi: 10.1016/J.CELL.2016.11.037.
- Dongre, A., and Weinberg, R. A. (2019) New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 69-84, doi: 10.1038/S41580-018-0080-4.
- Nikolaou, S., and Machesky, L. M. (2020) The stressful tumour environment drives plasticity of cell migration programmes, contributing to metastasis, *J. Pathol.*, **250**, 612-623, doi: 10.1002/PATH.5395.
- Joseph, J. P., Harishankar, M. K., Pillai, A. A., and Devi, A. (2018) Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC, *Oral Oncol.*, **80**, 23-32, doi: 10.1016/J.ORALONCOLOGY.2018.03.004.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 415-428, doi: 10.1038/NRC2131.
- Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2019) Non-redundant functions of EMT transcription factors, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 102-112, doi: 10.1038/S41556-018-0196-Y.
- Thompson, E. W., and Nagaraj, S. H. (2018) Transition states that allow cancer to spread, *Nature*, **556**, 442-444, doi: 10.1038/D41586-018-04403-X.
- Lu, W., and Kang, Y. (2019) Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis, *Dev. Cell*, **49**, 361-374, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2019.04.010.
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and De Herreros, A. G. (2000) The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 84-89, doi: 10.1038/35000034.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000) The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 76-83, doi: 10.1038/35000025.
- Kaufhold, S., and Bonavida, B. (2014) Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **33**, 62, doi: 10.1186/S13046-014-0062-0.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., and Zhou, B. (2014) The role of Snail in EMT and tumorigenesis, *Curr. Cancer Drug Targets*, **13**, 963-972, doi: 10.2174/15680096113136660102.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M. A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer, *Development*, **132**, 3151-3161, doi: 10.1242/DEV.01907.
- Kume, K., Haraguchi, M., Hijioka, H., Ishida, T., Miyawaki, A., Nakamura, N., and Ozawa, M. (2013) The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 889-94, doi: 10.1016/J.BBRC.2012.12.060.
- De Craene, B., Gilbert, B., Stove, C., Bruyneel, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005) The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program, *Cancer Res.*, **65**, 6237-6244, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3545.
- Whiteman, E. L., Liu, C. J., Fearon, E. R., and Margolis, B. (2008) The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes, *Oncogene*, **27**, 3875-3879, doi: 10.1038/ONC.2008.9.
- Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail, *J. Cell Sci.*, **116**, 1959-1967, doi: 10.1242/JCS.00389.
- Vincent, T., Neve, E. P. A., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P. L., Crystal, R. G., de Herreros, A. G., Moustakas, A., Pettersson, R. F., and Fuxe, J. (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 943-950, doi: 10.1038/NCB1905.
- Haraguchi, M., Okubo, T., Miyashita, Y., Miyamoto, Y., Hayashi, M., Crotti, T. N., McHugh, K. P., and Ozawa, M. (2008) Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23514-23523, doi: 10.1074/JBC.M801125200.
- Shields, M. A., Krantz, S. B., Bentrem, D. J., Dangi-Garimella, S., and Munshi, H. G. (2012) Interplay between β 1-integrin and Rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by snail and slug proteins, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6218-6229, doi: 10.1074/JBC.M111.308940.
- Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., and Nagayama, M. (2003) Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas, *Int. J. Oncol.*, **22**, 891-898, doi: 10.3892/IJO.22.4.891.
- Li, C. F., Chen, J. Y., Ho, Y. H., Hsu, W. H., Wu, L. C., Lan, H. Y., Hsu, D. S. S., Tai, S. K., Chang, Y. C.,

- and Yang, M. H. (2019) Snail-induced claudin-11 prompts collective migration for tumour progression, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 251-262, doi: 10.1038/S41556-018-0268-Z.
24. Santamaria, P. G., Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2017) EMT: present and future in clinical oncology, *Mol. Oncol.*, **11**, 718-738, doi: 10.1002/1878-0261.12091.
 25. Usami, Y., Satake, S., Nakayama, F., Matsumoto, M., Ohnuma, K., Komori, T., Semba, S., Ito, A., and Yokozaki, H. (2008) Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression, *J. Pathol.*, **215**, 330-339, doi: 10.1002/path.2365.
 26. Henderson, V., Smith, B., Burton, L. J., Randle, D., Morris, M., and Otero-Marah, V. A. (2015) Snail promotes cell migration through PI3K/AKT-dependent Rac1 activation as well as PI3K/AKT-independent pathways during prostate cancer progression, *Cell Adhes. Migr.*, **9**, 255-264, doi: 10.1080/19336918.2015.1013383.
 27. Beach, S., Tang, H., Park, S., Dhillon, A. S., Keller, E. T., Kolch, W., and Yeung, K. C. (2008) Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells, *Oncogene*, **27**, 2243, doi: 10.1038/SJ.ONC.1210860.
 28. Yatskou, M., Novikov, E., Vetter, G., Muller, A., Barillot, E., Vallar, L., and Friederich, E. (2008) Advanced spot quality analysis in two-colour microarray experiments, *BMC Res. Notes*, **1**, 80, doi: 10.1186/1756-0500-1-80.
 29. Guelstein, V. I., Tchypysheva, T. A., Ermilova, V. D., Litvinova, L. V., Troyanovsky, S. M., and Bannikov, G. A. (1988) Monoclonal antibody mapping of keratins 8 and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast cancer, *Int. J. Cancer*, **42**, 147-153, doi: 10.1002/IJC.2910420202.
 30. Vetter, G., Le Béhec, A., Muller, J., Muller, A., Moes, M., Yatskou, M., Al Tanoury, Z., Poch, O., Vallar, L., and Friederich, E. (2009) Time-resolved analysis of transcriptional events during SNAI1-triggered epithelial to mesenchymal transition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 485-491, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.025.
 31. Wee, K., Hediye-Zadeh, S., Duszyc, K., Verma, S., Nanavati, B. N., Khare, S., Varma, A., Daly, R. J., Yap, A. S., Davis, M. J., and Budnar, S. (2020) Snail induces epithelial cell extrusion by regulating RhoA contractile signalling and cell-matrix adhesion, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs235622, doi: 10.1242/jcs.235622.
 32. Reinhold, W. C., Reimers, M. A., Lorenzi, P., Ho, J., Shankavaram, U. T., Ziegler, M. S., Bussey, K. J., Nishizuka, S., Ikediobi, O., Pommier, Y. G., and Weinstein, J. N. (2010) Multifactorial regulation of E-cadherin expression: an integrative study, *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 1-16, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0321.
 33. Ayollo, D. V., Zhitnyak, I. Y., Vasiliev, J. M., and Gloushankova, N. A. (2009) Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell-cell interactions, *PLoS One*, **4**, e8027, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008027.
 34. Zhitnyak, I. Y., Rubtsova, S. N., Litovka, N. I., and Gloushankova, N. A. (2020) Early events in actin cytoskeleton dynamics and E-cadherin-mediated cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, *Cells*, **9**, 578, doi: 10.3390/CELLS9030578.
 35. Suarez, C., and Kovar, D. R. (2016) Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 799-810, doi: 10.1038/NRM.2016.106.
 36. Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac, *EMBO J.*, **17**, 6932-6941, doi: 10.1093/EMBOJ/17.23.6932.
 37. Campellone, K. G., and Welch, M. D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 237-251, doi: 10.1038/NRM2867.
 38. Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., Nelson, W. J., and Dunn, A. R. (2014) The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force, *Science*, **346**, 1254211, doi: 10.1126/SCIENCE.1254211.
 39. Mukherjee, A., Melamed, S., Damouny-Khoury, H., Amer, M., Feld, L., Nadjar-Boger, E., Sheetz, M. P., and Wolfenson, H. (2022) α -Catenin links integrin adhesions to F-actin to regulate ECM mechanosensing and rigidity dependence, *J. Cell Biol.*, **221**, e202102121, doi: 10.1083/JCB.202102121.
 40. Yamaguchi, H., Ito, Y., Miura, N., Nagamura, Y., Nakabo, A., Fukami, K., Honda, K., and Sakai, R. (2017) Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells, *Eur. J. Cell Biol.*, **96**, 685-694, doi: 10.1016/J.EJCB.2017.07.005.
 41. Jimenez, A. J., Schaeffer, A., De Pascalis, C., Letort, G., Vianay, B., Bornens, M., Piel, M., Blanchoin, L., and Théry, M. (2021) Acto-myosin network geometry defines centrosome position, *Curr. Biol.*, **31**, 1206-1220.e5, doi: 10.1016/j.cub.2021.01.002.
 42. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S., and Horwitz, A. R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 778, doi: 10.1038/NRM2786.
 43. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H., and Goldma, R. D. (2015) Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function, *J. Biol. Chem.*, **290**, 17145, doi: 10.1074/JBC.R115.640359.

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION OF BREAST CANCER CELLS ACTIVATED BY SNAIL1 TRANSCRIPTION FACTOR

N. I. Litovka[#], I. Y. Zhitnyak[#], and N. A. Gloushankova^{*}

*N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation,
115478 Moscow, Russia; e-mail: natglu@hotmail.com*

Cancer cells use the program of epithelial-mesenchymal transition for initiation of the invasion-metastasis cascade. Using confocal and video-microscopy, in breast cancer MCF-7 cells undergoing Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition reorganization of cytoskeleton was studied. We used the line of MCF-7 cells stably expressing tetOff *SNAIL1* construct (MCF-7-SNAIL1 cells). After tetracycline washing and Snail1 activation MCF-7-SNAIL1 cells underwent EMT and acquired a migratory phenotype retaining expression of E-cadherin. We identified five variants of the mesenchymal phenotype, differing in cell morphology and migration rate. Migrating cells had high degree of plasticity which allowed them to quickly change both the phenotype and the speed of movement. The changes of phenotype of MCF-7-SNAIL1 cells are based on Arp2/3-mediated branched actin polymerization in lamellipodia, myosin-based contractility in the zone behind the nucleus, redistribution of adhesive proteins from cell-cell contacts to the leading edge and reorganization of intermediate keratin filaments.

Keywords: cancer cell, Snail1/SNAIL1, epithelial-mesenchymal transition, cell migration, cancer cell plasticity, cell-cell adhesion, cytoskeleton, actin, myosin

ИНКАПСУЛИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Обзор

© 2023 Н.С. Чмелюк^{1,2}, В.В. Ода¹, А.Н. Габашвили¹, М.А. Абакумов^{1,2*}

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
119049 Москва, Россия; электронная почта: abakumov1988@gmail.com

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Минздрава России, 117977 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.09.2022

После доработки 04.11.2022

Принята к публикации 07.11.2022

В 1994 году был обнаружен новый класс прокариотических компартментов, получивших собирательное название «инкапсулины» или «нанокompартменты». Белки-протомеры оболочек инкапсулинов самоорганизуются с образованием икосаэдрических структур различных диаметров (24–42 нм). Внутри оболочек нанокompартментов могут быть инкапсулированы один или несколько грузовых белков, разнообразных по своим функциям. Кроме того, в нанокompартменты могут быть загружены ненативные грузовые белки, а поверхности оболочек возможно модифицировать при помощи различных соединений, что позволяет создавать системы направленной доставки препаратов, метки для оптической и МРТ-визуализации, а также использовать инкапсулины в качестве биореакторов. В настоящем обзоре описывается ряд подходов к применению инкапсулинов в различных областях науки, включая биомедицину и нанобиотехнологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инкапсулины, самоорганизация, наноконтэйнерные системы, направленная доставка, генетические метки, отслеживание клеток.

DOI: 10.31857/S0320972523010037, EDN: PBIQDI

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что для поддержания гомеостаза у млекопитающих используются различные механизмы: например, транспорт железа в клетках осуществляется трансферринами, а его накопление, в том числе для защиты от оксидативного стресса, происходит за счет ферритинов; Na/K-АТФаза контролирует количество ионов натрия и калия внутри клетки. Практически все реакции в живых организмах протекают при участии различных ферментов, которые могут содержать в себе ионы таких металлов, как Fe, Zn, Cu и др., однако количество этих металлов в организме невелико, а их сильный избыток или недостаток при изменяющихся внешних факторах может приводить к разным тяжелым,

часто необратимым последствиям. Главными «депо» для избытка солей тяжелых металлов являются кровеносное русло и печень. Прокариотические клетки обычно лишены мембранных компартментов, характерных для эукариот, но вместо этого содержат множество белковых компартментов, способных накапливать большое количество молекул. Впервые особые белковые нанокompартменты, позднее названные инкапсулинами, были обнаружены в 1994 году в надосадочной жидкости культуры бактерий штамма *Brevibacterium linens*, проявлявших бактериостатическую активность в отношении различных штаммов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* и *Listeria* [1]. Впоследствии подобные белковые комплексы были идентифицированы в надосадочной жид-

Принятые сокращения: Bfr – бактериоферритин; CLP – пептид загрузки; DHFR – дигидрофолатредуктаза; DyP – пероксидаза, обесцвечивающая краситель; eMIONs – магнитные наночастицы оксида железа, продуцируемые инкапсулином; FLP – ферритиноподобный белок; FolB – фермент, отвечающий за синтез фолиевой кислоты; IMEF – железоминерализующий инкапсулин-ассоциированный белок Firmicute; miniSOG – мини-генератор синглетного кислорода; OVA – овалбумин; T – триангуляционное число.

* Адресат для корреспонденции.

кости культур *Mycobacterium tuberculosis* (*Мyc. tuberculosis*) [2] и *Thermotoga maritima* [3], причем оказалось, что эти структуры содержат в себе протеолитические ферменты. В ходе ряда исследований инкапсулины были обнаружены также у бактерий *Mycobacterium leprae*, *Streptomyces* и позднее — у *Quasibacillus thermotolerans* [4–9]. Однако в последующих исследованиях протеолитическая активность не была подтверждена, и на сегодняшний день считается, что инкапсулины выполняют по большей степени структурную функцию [10]. В середине 2000-х годов было установлено, что наблюдаемые структуры с высокой молекулярной массой представляют собой белковые капсидоподобные комплексы [10–12].

С течением времени исследования нанокompартментов были продолжены. Часть исследований была направлена на поиск новых белковых компартментов и изучение их свойств, а также выяснение физиологической роли инкапсулинов и их грузовых белков в естественном бактериальном «контексте». Другие работы были посвящены применению таких структур в качестве биореакторов, систем доставки препаратов, а также эндогенных меток [13–20]. Биоинформационный анализ секвенированных геномов позволил выявить тысячи систем нанокompартментов как в бактериях, так и в археях с огромным разнообразием грузовых белков [19, 21–24]. Позднее на основании

проведенных исследований была создана база данных бактериальных микрокомпартментов, включающая в себя также описание и различные характеристики инкапсулинов [25].

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ОБОЛОЧКИ НАНОКОМПАРТМЕНТОВ

Оболочки инкапсулинов представляют собой икосаэдрические (12 вершин, 20 граней, 30 ребер) комплексы, образующиеся путем самосборки белков-протомеров, гомологичных по своей структуре gp5 — основному капсидному белку фага НК97 [26]. Как и в случае вирусных капсидов, белки оболочки инкапсулинов могут собираться в икосаэдры различных размеров. На сегодняшний день известно 3 различных типа инкапсулинов, которые характеризуют с помощью триангуляционного числа (Т), представляющего собой частное от деления числа протомеров в оболочке инкапсулина на 60 [27]. Например, инкапсулинами с $T = 1$ являются *T. maritima* [10], *Мyc. tuberculosis* [22] и *Rhodococcus jostii* [21] (диаметр оболочки 20–24 нм, оболочка состоит из 60 идентичных субъединиц белка-протомера). В качестве примера инкапсулинов с $T = 3$ можно привести нанокompартменты бактерий *Pyrococcus furiosus* [12], *Kuenenia stuttgartiensis* [28, 29] и *Mycobacterium xanthus*

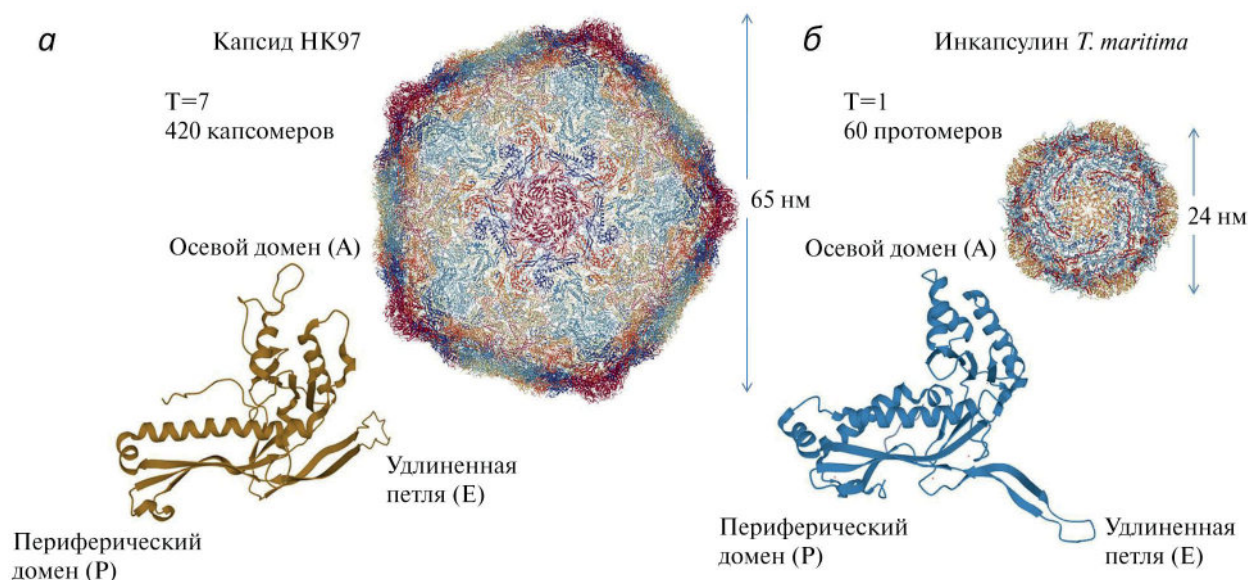


Рис. 1. Структура белкового капсида бактериофага НК97 (а). Капсид имеет диаметр 65 нм и состоит из 420 белковых-капсомеров (PDB-ID 2FT1). Ниже приведена структура отдельного капсомера (gp5). Структура оболочки инкапсулина бактерии *T. maritima* (б). Инкапсулин *T. maritima* образован 60 идентичными белками-протомерами, диаметр белковой оболочки составляет 24 нм (PDB-ID 3DKT). Ниже приведено строение белка-протомера оболочки инкапсулина *T. maritima*. Как в структуре белка-протомера оболочки инкапсулина, так и в структуре капсомера gp5 имеется 3 консервативных домена: периферический домен (Р), осевой домен (А) и удлиненная петля (Е)

(*Myx. xanthus*) [23] (диаметр оболочки 30–32 нм, 180 протомеров). Наконец, самыми крупными инкапсулинами, обнаруженными на сегодняшний день, являются инкапсулины бактерии *Q. thermotolerans* с $T = 4$ (диаметр оболочки 42 нм, 240 протомеров) [30].

В структуре белка-протомера оболочки инкапсулина, подобно капсомеру gp5 фага НК97, имеется 3 консервативных домена. Первым является периферический домен (Р), содержащий несколько α -спиралей и β -складок, второй — осевой домен (А), который также имеет несколько α -спиралей и β -складок и образует ось симметрии пятого порядка, и, наконец, третий — удлинённая петля (Е), которая важна для сборки инкапсулина и определяет симметрию всего комплекса [4, 10, 13, 27, 30]. Из рис. 1 хорошо видно, насколько гомологично строение капсомера фага НК97 (рис. 1, а) и белка-протомера оболочки инкапсулина *T. maritima* (рис. 1, б).

Однако несмотря на высокую структурную гомологию протомеров инкапсулинов и капсомеров фага НК97, гомология аминокислотных последовательностей в этих белках невелика. Таким образом, согласно классификации базы данных семейств белковых доменов Pfam, инкапсулины и НК97 являются членами одного и того же клана (CL0373), но разделяются на отдельные семейства (инкапсулины относятся к семейству PF04454, а бактериофаг НК97 — к PF05065) [31].

В местах соединения протомеров оболочек нанокompартментов имеются множественные поры, диаметр которых составляет 3–7 Å [10, 12]. Поры, вероятно, служат барьером проницаемости для более крупных молекул, позволяя проходить через оболочку небольшим молекулам и ионам. Например, низкомолекулярные субстраты инкапсулированных ферментов, такие как перекись водорода или двухвалентное железо, способны проходить через оболочку, в то время как белки и другие крупные молекулы — нет [16, 17, 21, 24]. В инкапсулинах присутствуют грузовые белки, обладающие каталитической функцией, что может указывать на избирательность транспорта субстрата через оболочку [10], при этом транспорт будет зависеть от типа инкапсулированного фермента [32]. Считается, что наиболее вероятные транспортные каналы расположены вдоль пор, образующихся в местах соединения пяти протомеров (так называемые 5-fold pores), поскольку эти поры являются самыми крупными [10, 30].

Недавно было показано, что поры могут различаться по своим электростатиче-

ским свойствам. Например, в инкапсулинах *T. maritima* поры в местах соединения пяти протомеров состоят из пяти остатков гистидина и имеют положительный заряд, а поры в местах соединения трех протомеров состоят из трех остатков фенилаланина и не имеют заряда [33]. А в инкапсулинах *Q. thermotolerans* все поры имеют отрицательный заряд, что позволяет транспортировать положительно заряженные субстраты [30]. Кроме того, известно, что внутренняя поверхность оболочки инкапсулина имеет много отрицательно заряженных аминокислотных остатков, что указывает на существование определенного пути к ферритиноподобному белку (FLP, ferritin-like protein) для ионов железа после попадания в инкапсулин [34].

Поры инкапсулина *Synechococcus elongatus* (*Syn. elongatus*) отличаются от *T. maritima* и имеют положительно заряженные аминокислотные остатки снаружи [32]. Это, возможно, некая адаптация, позволяющая транспортировать отрицательно заряженный депротонированный субстрат (L-цистеин). Поры инкапсулинов *Mycobacterium smegmatis* также имеют положительно заряженные гистидины, что позволяет селективно пропускать внутрь отрицательно заряженные субстраты для своего грузового белка — фермента пероксидазы [34].

Поры в оболочках инкапсулинов могут иметь не только различные заряды, но и разные конформации. Существует интересная работа, в которой были обнаружены две конформации пор у инкапсулина *Haliangium ochraceum*: закрытые и открытые [35]. Это позволяет предположить, что поры могут реагировать на внешние раздражители.

Также известно, что размер пор может быть искусственно увеличен. Например, в одном из исследований была описана возможность увеличения пор в оболочке инкапсулина *T. maritima* с 3 до 11 Å, то есть в 3,7 раза [36]. Авторы работы исследовали влияние аминокислотных замен и делеций в петле, формирующей пору в местах соединения пяти белков-протомеров, на структурную целостность оболочки инкапсулина. В инкапсулине *T. maritima* такая петля состоит из 13 а.о. Авторами было создано несколько мутантных штаммов *T. maritima*, имеющих различные замены и/или делеции аминокислот в этой петле. Согласно полученным данным, самым оптимальным мутантом оказался штамм с делецией 7 а.о. в петле. Диаметр пор в оболочке такого инкапсулина увеличился до 11 Å, при этом целостность оболочки не нарушилась.

ГРУЗОВЫЕ БЕЛКИ ИНКАПСУЛИНОВ

Впервые понимание механизма инкапсуляции грузового белка возникло при изучении кристаллической структуры инкапсулина *T. maritima*. Методом рентгеновской кристаллографии было установлено наличие небольшого количества дополнительной электронной плотности, относящейся к гидрофобному карману на люминальной поверхности оболочки инкапсулина, что соответствовало короткой (около 10 а.о.) С-концевой последовательности FLP, обнаруженной рядом с геном оболочки инкапсулина в геноме *T. maritima* [10]. Методом биоинформационного анализа было установлено, что эта С-концевая последовательность сохраняется у разных видов бактерий, в которых гены грузового белка и гены оболочки инкапсулина находятся вместе в предполагаемом опероне. Примеры таких «предсказанных» грузовых белков включают: FLP, DyP (пероксидаза, обесцвечивающая краситель, Dye-decolorizing peroxidase), гемеритрин и руберитрин [10, 19].

Было показано, что эта С-концевая последовательность, в дальнейшем названная пептидом загрузки (cargo loading peptide (CLP)), является достаточной для инкапсуляции грузового белка в оболочку нанокompартмента (рис. 2, а). Последовательность, кодирующая CLP, может находиться как на 3'-конце, так и на 5'-конце гена, кодирующего грузовой белок. Удаление последовательности CLP нарушает инкапсуляцию грузового белка, в то время как слияние CLP с С-концом гетерологичных белков, таких как зеленый флуоресцентный белок или люци-

фераза, приводит к их загрузке [10, 14, 16, 17, 19, 22]. Однако существуют альтернативные модели, описывающие взаимодействие между грузовыми белками и белками оболочки инкапсулина. В некоторых случаях, как, например, в инкапсулинах *P. furiosus*, CLP отсутствует, однако ген, кодирующий оболочку, слит с геном, кодирующим грузовой белок, в результате чего образуется один полипептид (рис. 2, б) [12]. В инкапсулинах, обнаруженных у бактерий типа Firmicute существует одна особенность: загрузка грузовых белков может происходить и через С-конец, и через N-конец CLP. Такой нанокompартмент содержит 2 грузовых белка: С-конец CLP связан с железоминерализующим инкапсулин-ассоциированным белком Firmicute IMEF (iron-mineralizing encapsulin-associated Firmicute protein), участвующим в минерализации железа, а депонирующий железо белок ферредоксин – с N-концом CLP [19].

Известно, что в одну оболочку нанокompартмента может быть инкапсулировано несколько грузовых белков. Например, показано, что в инкапсулинах бактерий *Myc. xanthus* присутствует 3 разных грузовых белка: EncB, EncC и EncD [23], а у *Myc. tuberculosis* присутствуют белки: Mt-DyP, Mt-BfrB (бактериоферритин) и Mt-FolB (фермент биосинтеза фолиевой кислоты) [22].

Еще одним важным вопросом, связанным с загрузкой, является доля, занимаемая грузовым белком в нанокompартменте. Каждый белок-протомер оболочки в инкапсулине имеет сайт связывания с CLP, но, очевидно, что количество груза ограничено объемом оболочки. При этом важно понимать, что стехиометрия

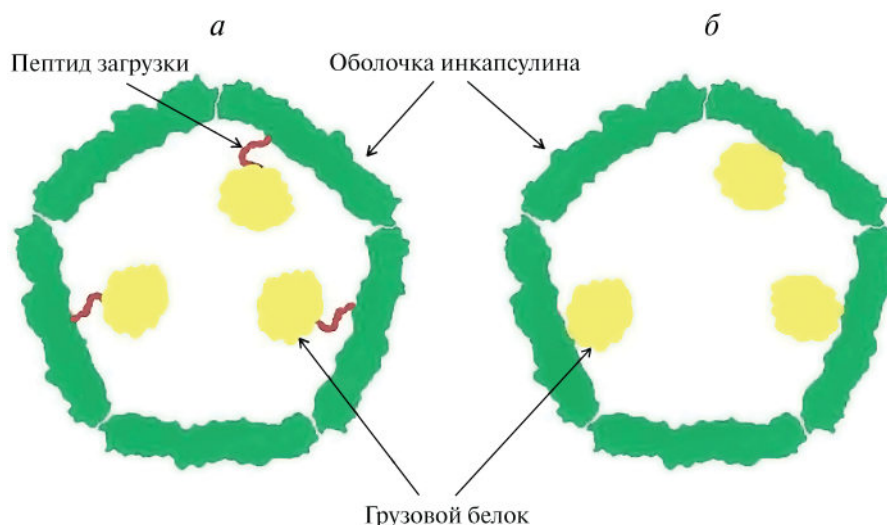


Рис. 2. Грузовой белок может быть инкапсулирован в оболочку нанокompартмента посредством пептида загрузки (а). В некоторых случаях ген, кодирующий грузовой белок, и ген, кодирующий оболочку инкапсулина, слиты, что сводит на нет необходимость в пептиде загрузки (б)

зависит не только от размера оболочки инкапсулина, но и от состояния олигомеризации грузового(ых) белка(ов). Работы по моделированию показали, что из-за возникновения стерических затруднений невозможно достичь соотношения груза и белка-протомера более, чем 1 : 1 [10]. В качестве примера здесь можно привести нанокompартмент *B. linens*, грузовым белком которого является уже упомянутый выше фермент DyP, собирающийся в гексамер

(тример димеров) диаметром 89 Å. Было предсказано, что стерические затруднения ограничат загрузку одним таким гексамером на нанокompартмент [10], а измерения методом нативной масс-спектрометрии подтвердили наличие 6 мономеров DyP в нанокompартменте с $T = 1$, что дает соотношение грузового белка к белку-протомеру 1 : 10 [37]. В таблице приведены данные о загрузке различных грузовых белков в нанокompартменты.

Загрузка нативных грузовых белков в различных инкапсулиновых системах

Инкапсулин (количество протомеров)	Грузовой белок (количество субъединиц)	Число загруженных субъединиц	Соотношение загруженного белка к количеству протомеров*	Метод оценки	Источники
<i>Rhodococcus jostii</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 8,6**	спектроскопия в видимом диапазоне	[21]
<i>Brevibacterium linens</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 10	нативная МС	[37]
		6	1 : 10	крио-ЭМ	[38]
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 10	ЭМ	[39]
		6 и 12	1 : 10 и 1 : 5	крио-ЭМ	[40]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 10	ЭМ	[22]
	FolB (4 или 8)	4 или 8	1 : 15 или 1 : 7,5		
	BfrB (24)	24	1 : 2		
<i>Pyrococcus furiosus</i> (180)	FLP (10)	180	1 : 1	—	[12]
<i>Thermotog maritima</i> (60)	FLP (10)	30, 40 и 50	1 : 2, 1 : 1,5 и 1 : 1,2	крио-ЭМ	[41]
<i>Haliangium ochraceum</i> (60)	FLP (10)	40	1 : 1,2	крио-ЭМ	[35]
<i>Mycobacterium xanthus</i> (180)	EncB EncC EncD	36 EncB 92 EncC 47 EncD	1 : 1	SDS-PAGE	[23]
		86 ± 3 EncB 93 ± 9 EncC 50 ± 15 EncD	1 : 1		[42]
<i>Quasibacillus thermotolerans</i> (240)	IMEF (2)	240	1 : 1	SDS-PAGE	[30]
		84	1 : 2,9	крио-ЭМ	
<i>Bacillaceae bacterium</i> (180)	IMEF (2)	150	1 : 1,2	SDS-PAGE	[4]
	Fd (1)	10	1 : 18		
<i>Synechococcus elongatus</i> (60)	CyD (2)	1 или 2	1 : 30 или 1 : 15	крио-ЭМ	[32]

Примечание. Fd — ферродоксин; CyD — цистеиндисульфураса, ЭМ — электронная микроскопия, МС — масс-спектрометрия.

* Загрузку определяют как соотношение между количеством мономерных единиц грузового белка и количеством протомеров инкапсулиновой оболочки.

** Загрузка груза путем разборки и сборки инкапсулиновой оболочки в кислых условиях.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ НАНОКОМПАРТМЕНТОВ

О том, какую роль инкапсулины играют в процессах метаболизма бактерий и архей, известно не так много. На сегодняшний день наиболее информативные результаты получены в исследованиях инкапсулинов, содержащих FLP. Данные позволяют предположить, что нанокompартменты способны депонировать железо, снижая оксидативный стресс — ярким примером здесь являются бактерии *Q. thermotolerans*, в геноме которых отсутствуют ферритины [27]. В другой работе при исследовании клеток *Мух. xanthus* в условиях аминокислотного голодания было обнаружено, что экспрессия генов протомера оболочки инкапсулина (EncA) и трех его грузовых белков FLP (EncB, EncC и EncD) значительно повышалась [23]. Авторы выдвинули гипотезу о том, что инкапсулин может выступать в роли вторичной ферритиноподобной системы, имеющей большую емкость, и способной накапливать железо во время стресса при вынужденной «голодовке» или секвестрировать железо во время оксидативного стресса. Когда двухвалентное железо (Fe^{2+}) подвергается воздействию активных форм кислорода, происходит реакция Фентона, в которой Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} с образованием побочного продукта — гидроксильного радикала [43, 44], ферритины же защищают клетки от токсического действия, обусловленного этим продуктом. Например, в работе McNugh et al. [23] было продемонстрировано, что мутантный штамм *Мух. xanthus* с делецией в последовательности генов, кодирующих оболочки инкапсулинов, оказался более чувствителен к добавлению перекиси водорода, по сравнению с *Мух. xanthus* дикого типа. В условиях оксидативного стресса, вызванного инкубацией бактерий с 0,5 мМ раствором перекиси водорода в течение 6 часов, жизнеспособность мутантного штамма *Мух. xanthus* оказалась существенно ниже по сравнению с жизнеспособностью *Мух. xanthus* дикого типа (25% и 75% жизнеспособных бактерий соответственно). Такое же свойство есть и у *Мус. tuberculosis* [22]: каждый из трех грузовых белков, о которых уже было сказано ранее (BfrB, FolB и Dyp), в инкапсулинах *Мус. tuberculosis* обладает антиоксидантной активностью [45–48].

В дополнение к потенциальной роли в снижении оксидативного стресса, Dyp-содержащие инкапсулины также участвуют в катаболизме [21]. Например, мутантный штамм

бактерии *R. jostii* RHA1 с делецией гена, кодирующего Dyp, не способен к деградации лигнина [49], в то время как в бактериях штамма дикого типа катаболизм лигнина происходит активно. Исследования также показали, что активность комплекса инкапсулин-DypB в отношении деградации нитрированного лигнина в 8 раз выше по сравнению с неинкапсулированным ферментом DypB [21]. Увеличение ферментативной активности при инкапсуляции позволяет предположить, что нанокompартмент может действовать либо путем стабилизации грузового белка, либо путем увеличения локальной концентрации субстрата для фермента, тем самым усиливая ферментативную реакцию [50].

Например, предполагается, что для выполнения ферментативной функции такого грузового белка, как Dyp, инкапсуляция не требуется [10]. Однако наблюдения подтверждают гипотезу о том, что инкапсуляция позволяет увеличить стабильность и/или продолжительность жизни грузовых белков, например, путем повышения устойчивости к протеазам. К примеру, инкапсулины *T. maritima* крайне устойчивы к воздействию высокой температуры и денатурации [10, 17], а инкапсулины *B. linens* стабильны в крайне широком диапазоне pH [38]. Подобно капсидам вирусных фагов, оболочки нанокompартментов демонстрируют минимальную деградацию после обработки неспецифическими протеазами [16, 17]. Резистентность к протеазам также распространяется и на грузовые белки, например, люцифераза светлячка, упакованная в инкапсулины *Rhodococcus erythropolis* N771, не подвергалась деградации после обработки трипсином, в то время как неинкапсулированная люцифераза полностью деградировала [16].

Инкапсулины часто обнаруживаются в супернатанте бактериальной культуры [1, 2, 21], в связи с чем была выдвинута гипотеза, что нанокompартменты являются продуктом бактериальной секреции. Это было частично подтверждено в ходе наблюдения за локализацией инкапсулинов на мембранах клеток [2], однако такая локализация наблюдается далеко не у всех прокариот, например, нанокompартменты *Streptomyces griseus* находятся в цитоплазме [9]. Помимо этого, не существует известного механизма секреции интактного 24–42-нм белкового комплекса [51]. Принимая во внимание крайне высокие химическую стабильность и устойчивость к протеазам, более вероятно предположить, что инкапсулины накапливаются в надосадочной жидкости культуры после лизиса клеток [52].

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОКОМПАРТМЕНТОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Суммируя все вышесказанное, инкапсулины — это особые белковые наночастицы, имеющие два основных преимущества. Во-первых, как и все наночастицы, инкапсулины обладают развитой поверхностью ($S_{уд.} \gg V_{уд.}$) и, что самое главное, имеют две поверхности — внутреннюю и внешнюю поверхности оболочки инкапсулина. Во-вторых, инкапсулины кодируются генетически (т.е. происходит их биосинтез) и поэтому могут быть получены в биологических системах со 100%-ной воспроизводимостью, чего нельзя достичь никакими физическими или химическими методами синтеза наночастиц любых составов. В отличие от химического и физического синтеза биосинтез более экономичен и, что немаловажно, безопасен для окружающей среды, поскольку в процессе биосинтеза не образуется токсичных побочных продуктов, которые необходимо утилизировать специальным образом.

Инкапсулины в качестве платформы для доставки лекарств. Известно, что за последнее десятилетие было разработано большое количество наноразмерных систем направленной доставки на основе мицелл [53, 54], липосом [55], неорганических [56] и полимерных [57] наночастиц, а также белковых компартментов [58, 59]. Все эти частицы с загруженными на них препаратами используются с целью увеличить эффективность доставки, уровень накопления препаратов в сравнении с неинкапсулированными лекарственными средствами, время циркуляции в кровотоке и снизить количество побочных эффектов [60]. Помимо этого, препараты для направленной доставки могут сыграть свою роль и в диагностике заболеваний путем взаимодействия со специфическими молекулярными мишенями, экспрессирующимися при той или иной патологии. Как уже упоминалось выше, инкапсулины — это крайне стабильные и прочные структуры, что позволяет применять их в качестве платформы для решения различных задач биомедицины.

Например, в одном из исследований [13] инкапсулины *T. maritima* были использованы в качестве системы направленной доставки зондов с флуорофором и терапевтического препарата. Оболочки нанокompартментов были модифицированы путем добавления на них SP94-пептида, специфически связывающегося с белком GRP78 (Glucose-regulated protein, 78 кДа), избыточно экспрессированным в различных опухолевых клетках, в том числе

в клетках линии HepG2 [61, 62]. Белок оболочки *T. maritima* (Encap) содержит два остатка цистеина (C123 и C197), C123 расположен на внешней поверхности Encap, что позволяет конъюгировать пептид SP94 и флуоресцентную метку (флуоресцеин) на поверхность оболочки инкапсулина. Таким образом, получившееся «наноустройство» было способно специфически связываться с клетками HepG2 и визуализировать их за счет присутствия флуорофора (рис. 3, а). В дальнейшем было показано, что в полученную конструкцию может быть загружен альдоксорубин (6-малеимидокапроил) гидразон из доксорубина, являющийся пролекарством и высвобождающийся при кислом pH внутри опухолевых клеток. Также была установлена дозозависимая цитотоксичность препарата в отношении клеток HepG2.

В работе Putri et al. [38] было обнаружено, что инкапсулины *B. linens*, загруженные TFP (teal fluorescent protein, бирюзовый флуоресцентный белок), успешно захватывались макрофагами мыши J774 в культуре *in vitro*, что приводило к флуоресценции клеток. При этом инкапсулины оставались в цитоплазме макрофагов и не попадали в ядро. Авторы работы отмечают, что выбранный модельный грузовой белок с флуоресцентными свойствами возможно заменить на терапевтический агент и использовать для его доставки технологию на основе инкапсулинов.

В одном из исследований [63] в оболочки инкапсулинов *T. maritima* был загружен биологический фотосенсибилизатор miniSOG (мини-генератор синглетного кислорода, mini-Singlet Oxygen Generator) путем слияния CLP с C-концом белка miniSOG. Получившийся фоточувствительный нанореактор был назван Enc-mSOG. Авторами была проведена оценка образования активных форм кислорода в клетках рака легкого A549 после облучения синим лазером. Предварительно клетки были инкубированы со свободным miniSOG либо с Enc-mSOG в течение 7 часов. В качестве контроля использовали клетки без добавления фотосенсибилизатора. Исследование показало, что наибольший уровень активных форм кислорода после облучения синим лазером наблюдался в клетках, инкубированных с Enc-mSOG [63]. Подобные системы были получены для направленной терапии HER2 положительной карциномы молочной железы [64]. В данной работе авторы также использовали в качестве платформы генетически кодируемую оболочку инкапсулина *T. maritima*, содержащую внутри себя фотосенсибилизатор miniSOG, за счет слияния C-конца белка с CLP. Поверхность

инкапсулина была насыщена DARPin9.29 (Designed Ankyrin repeat protein), способным селективно связываться с рецептором эпидермального фактора роста 2 (HER2), избыточно экспрессированным на поверхности клеток карциномы молочной железы. DARPin9.29 был клонирован в рамке считывания с геном инкапсулина *T. maritima* для получения слитого белка TmEnc-DARPin-STII. Полученная система показала высокую активность по отношению к выбранной модели рака и низкую специфичность по отношению к контрольным клеткам, не имеющим на своей поверхности белок HER2. Авторы исследования показали, что модифицированные инкапсулины способны специфически связываться с клетками линии SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека), интернализироваться внутрь и доставлять, таким образом, в клетки инкапсулированную форму miniSOG. После облучения клеток SK-BR-3 синим светом, авторы отмечают существенное снижение жизнеспособности клеток (до 48%), обусловленное действием miniSOG. Примечательно, что в качестве контрольных клеток в вышеописанной работе использовали мезенхимные стволовые клетки человека, и подобного драматического снижения жизнеспособности отмечено не было. Главным преимуществом данной системы является принципиальная возможность создания действующего препарата на основе инкапсулина из одной плазмиды, в которой были закодированы все три составляющие: носитель (оболочка инкапсулина), вектор (DARPin9.29) для доставки и действующее вещество (miniSOG).

Системы доставки на основе инкапсулинов также нашли применение в иммунотерапии рака. Например, в одном из исследований [18] инкапсулины *T. maritima* использовали в качестве наноконтейнеров для доставки к дендритным клеткам антигена (OT-1-пептида), представляющего собой эпитоп белка OVA (овальбумин). Презентация OT-1-пептида дендритными клетками приводит к активации Т-клеточного иммунного ответа с образованием OT-1-специфических цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов. У мышей, на *in vivo* модели подкожных опухолей, полученных путем имплантации трансгенных клеток меланомы мыши B16 с экспрессией OT-1 (B16-OVA), было продемонстрировано, что вакцинация мышей при помощи инкапсулинов, содержащих OT-1, существенно препятствовала развитию опухолей. Кроме того, было показано, что опухоли обширно инфильтрированы CD8 Т-клетками.

Кроме того, было продемонстрировано что инкапсулины *T. maritima* могут быть ге-

нетически модифицированы таким образом, чтобы экспрессировать на своей поверхности пептид, связывающий Fc-домен IgG (IgG Fc domain-binding peptide; FcBP) [65], имеющий высокую аффинность к Fc-фрагменту иммуноглобулина G кролика [66]. При помощи методов поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени и пьезоэлектрического микровзвешивания было показано, что FcBP действительно присутствует на внешней поверхности инкапсулина и доступен для связывания Fc IgG кролика. Полученная векторная конструкция была способна специфически связываться с клетками линии SCC-7 (плоскоклеточная карцинома мыши). Moon et al. [65] предполагают, что полученная конструкция может быть использована в качестве наноплатформы при разработке многофункциональной системы для тераностики плоскоклеточной карциномы.

Также было показано, что поверхность оболочки инкапсулина бактерии *R. erythropolis* N771, о которой уже шла речь выше, может быть успешно покрыта полиэтиленгликолем (ПЭГ). Хорошо известно, что ПЭГ является биосовместимым модификатором носителей лекарственных средств. Его присутствие затрудняет распознавание носителей клетками моноцитарно-макрофагальной системы, а также снижает агрегацию. Кроме того, авторы исследования показали, что ПЭГилирование не препятствует сборке нанокompартмента [20].

Инкапсулины в качестве платформы для создания вакцин. Ни для кого не секрет, что разработка новых безопасных вакцин является одной из важнейших задач человечества. Инкапсулины благодаря их возможности одновременного синтеза как протомеров инкапсулина, так и других белков могут быть важной платформой для создания вакцин. Например, имеется интересная работа, посвященная использованию инкапсулинов *T. maritima* в качестве носителя эктодомена белка M2 вируса гриппа А (M2e-эпитоп) [67] (рис. 3, б). Белок M2 формирует ионные каналы на поверхности вириона и является необходимым для транспорта вирусных рибонуклеопротеиновых комплексов в цитоплазму клетки-носителя. Его аминокислотная последовательность крайне консервативна, а иммуногенность в процессе природной инфекции достаточно низка [68]. Эти свойства делают M2e хорошим кандидатом для создания вакцины широкого спектра действия. В работе было продемонстрировано присутствие специфических антител к M2e-эпитопу в сыворотке мышей после иммунизации полученными конструкциями.

Инкапсуляция флуорофоров. Фотопереключаемые флуорофоры и, в частности, спиропираны представляют собой важный инструмент, применяемый в микроскопии сверхвысокого разрешения. Сам процесс фотопереключения метки необходим для того, чтобы стало возможным картирование флуоресцентных точек, достигающееся путем стохастической активации некоторого количества флуорофоров в определенный момент времени, в то время как остальные флуорофоры «выключены». Затем изображения сверхвысокого разрешения могут быть реконструированы из множества таких полученных флуоресцентных изображений. Кроме того, возможность «включения» и «выключения» флуоресценции может оказаться полезной, чтобы избежать перекрытия флуоресцентных сигналов в присутствии различных меченых структур. Инкапсулины могут быть модифицированы с помощью фотопереключаемых флуорофоров [69], в частности, инкапсулин *B. linens* был модифицирован по карбодиимидному методу флуорофорами на основе спиропиранов — органических соединений, обладающих фотохромными свойствами. При облучении ультрафиолетовым и видимым светом спиропираны способны обратимо переключаться между своим флуоресцентным фотоизомером мероцианином и безызлучательным изомером, что позволяет «включать» и «выключать» флуоресценцию [70] (рис. 3, в). Очень важным здесь является то, что инкапсулины сохраняли свою структурную целостность как минимум в течение 5 циклов фотопереключения.

Накопление неорганических наночастиц в инкапсулинах. Особо стоит отметить возможность контролируемой «разборки» инкапсулинов на белковые субъединицы при добавлении кислоты с загрузкой грузового белка интереса за счет аффинности к тем или иным белковым последовательностям оболочки с последующим восстановлением структуры нанокompартмента при возвращении pH к нейтральному. Таким образом, возможно загружать в оболочку инкапсулина молекулы/частицы, размер которых превышает диаметр пор. Интересным примером является работа Künzle et al. [71], где авторы выбрали в качестве груза наночастицы золота диаметром 13 ± 1 нм, покрытые бромидом (11-меркаптоундецил)-N,N,N-триметиламмония. Данные наночастицы были загружены в оболочку инкапсулинов *T. maritima* при помощи частичной замены стабилизирующего наночастицы лиганда на CLP, упомянутый ранее. Подобный подход потенциально может быть применен в фототермальной терапии опухо-

лей, требующей введения стабильных и биосовместимых наночастиц золота в область интереса с последующим облучением требуемой длиной волны и гибелью опухолевых клеток, более чувствительных к повышению температуры по сравнению со здоровыми клетками.

Инкапсулиновые системы, способные к биоминерализации железа, могут быть применены в магнито-гипертермической терапии (МГТ). В работе Zhang et al. [72] инкапсулины бактерии *Myc. xanthus* были использованы для синтеза магнитных наночастиц, получивших название eMIONs (encapsulin-produced magnetic iron oxide nanoparticles, магнитные наночастицы оксида железа, продуцируемые инкапсулином). Было показано, что частицы являются моодисперсными, устойчивыми к экстремальным значениям pH и расщеплению протеазами. При воздействии переменного магнитного поля eMIONs эффективно поглощали магнитную энергию, что привело к выраженному повышению температуры *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, eMIONs способны разлагать H_2O_2 с образованием O_2 , тем самым вызывая специфическую гибель опухолевых клеток из-за повышенной концентрации H_2O_2 в них. Учитывая высокую проникающую способность магнитных полей, eMIONs являются перспективным терапевтическим средством для лечения солидных опухолей.

Помимо наночастиц оксида железа, нанокompартменты способны синтезировать наночастицы серебра. Например, инкапсулины *T. maritima* использовались в качестве платформы для получения моодисперсных наночастиц серебра со средним диаметром 13,5 нм [19].

Стоит отметить, что способность инкапсулинов накапливать в себе ионы металлов может быть использована для очистки воды. Известно, что, например, Zn^{2+} в значительной степени выбрасывается в воду во многих отраслях промышленности и представляет серьезную угрозу для окружающей среды. Wang et al. [73] предложили систему, состоящую из модифицированных бактерий *Escherichia coli*, имеющих в своем геноме ген, кодирующий инкапсулин cEnc *Candidatus Brocadia fulgida*, который может накапливать и восстанавливать ионы цинка. Полученные результаты позволяют обеспечить эффективную стратегию повышения толерантности бактерий к токсичным металлам для восстановления Zn^{2+} , что в перспективе может быть использовано для восстановления окружающей среды.

Инкапсулины в качестве генетически кодируемых меток. Помимо накопления неорганических наночастиц для понижения концентрации

металлов вне оболочки инкапсулина, нельзя не отметить блок работ, посвященных отслеживанию клеток при помощи МРТ за счет накопления железосодержащих инкапсулинов в клетках эукариот. На данный момент существует два основных подхода, применяющихся для мечения клеток. Первым подходом является прямое мечение, при котором экзогенные метки добавляются в ростовую среду к клеткам на этапе культивирования. При этом в качестве меток могут быть использованы магнитные наночастицы, радиоизотопы, а также низкомолекулярные флуорофоры [74, 75]. Второй подход основан на введении в геном клеток генетических последовательностей, кодирующих эндогенные метки, такие как люцифераза или флуоресцентные белки [76]. Для оптического мониторинга с использованием первого подхода в качестве меток чаще всего применяют квантовые точки и флуорофоры [77, 78], для ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) и ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография) — радионуклиды, для МРТ — суперпарамагнитные частицы (СМЧ) оксида железа [79–84]. Важным недостатком здесь является то, что в процессе деления клеток накопление метки будет уменьшаться, и интенсивность сигнала снизится, в силу чего мечение с использованием экзогенных агентов не вполне подходит для длительного мониторинга клеток.

При проведении исследований, требующих длительного отслеживания клеток после введения, применяют не прямое специфическое мечение с использованием репортерных генов. Чаще всего это гены, кодирующие флуоресцентные белки [85–93] или люциферазу светлячка [94]. Для таких методов, как ОФЭКТ и ПЭТ, также существуют свои генетические метки, а именно магнитно-резонансные репортерные гены, продуцирующие внутриклеточные металлопротеины, такие как трансферрин, ферритин, тирозиназа [95]. Как уже было упомянуто выше, некоторые инкапсулиновые системы способны депонировать железо. Это свойство позволяет использовать нанокompартменты в качестве генетически кодируемых меток для МРТ-визуализации клеток. Существует ряд исследований, посвященных гетерологичной экспрессии генов, кодирующих инкапсулиновые системы, в клетках млекопитающих. Так, в работе Sigmund et al. [42] методом транзитрной котрансфекции в клетках линии НЕК293Т была достигнута экспрессия генов инкапсулинов *Q. thermotolerans* и *Мух. xanthus*. Трансфекция клеток производилась плазмидными ДНК, кодирующими оболочку инкапсулина, его гру-

зовой белок, представляющий собой фермент феррооксидазу, а также переносчик железа, необходимый для более эффективного транспорта железа в клетки. Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавляли сульфат аммония железа, являющийся источником двухвалентного железа, окисляемого феррооксидазой с образованием магнитных наночастиц внутри инкапсулинов (рис. 3, г). В случае инкапсулина *Q. thermotolerans* криоэлектронная микроскопия показала, что в клетках его оболочка самоорганизуется в нанокompартменты с икосаэдрической симметрией $T = 4$ и диаметром ~ 42 нм. Кроме того, было установлено, что нативный грузовой белок сохраняет свою феррооксидазную активность, что позволяет эффективно биоминерализовать железо. В частности, показано, что ферритиноподобный грузовой белок *Мух. xanthus* был способен минерализовать до 30 000 атомов железа на нанокompартмент, что примерно на порядок больше того количества, которое может депонироваться в ферритинах.

В другом исследовании [96] было продемонстрировано, что в инкапсулины *Мух. xanthus* могут быть загружены сразу два грузовых белка: флуоресцентный РAmCherry и ферритиноподобный белок В. Авторы работы также показали, что клетки НЕК293Т, экспрессирующие инкапсулины, настолько хорошо накапливают железо, что успешно поддаются магнитной сортировке на коммерческих сортировочных колонках (порядка 5% от исходной популяции клеток) и даже могут быть обнаружены *in vivo* методом МРТ при введении в головной мозг крысы. Стоит отметить, что, в отличие от экзогенных меток на основе наночастиц оксида железа, наночастицы, образующиеся в инкапсулинах, не выбрасываются клетками, а, следовательно, и не фагоцитируются соседними клетками, например клетками микроглии. Это существенное преимущество, позволяющее избежать искажения МР-сигнала с течением времени, а также ошибок в интерпретации результатов исследования. Гетерологичная транзитрная экспрессия генов инкапсулинов может быть достигнута не только в клетках линии НЕК293Т, но и в других клеточных линиях, например, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 [97].

Кроме того, имеются работы, в которых показана возможность получения стабильных клеточных линий, содержащих инкапсулиновые системы, депонирующие железо. Например, было показано, что мезенхимальные стволовые клетки человека способны стабильно экспрессировать гены инкапсулина *Мух. xanthus* [98], а клетки карциномы молоч-

ной железы мыши 4T1 — гены инкапсулина *Q. thermotolerans* [99]. И в первом, и во втором случае было показано, что наличие такой генетической метки не влияло на жизнеспособность и пролиферацию клеток, а время релаксации T2 для генетически модифицированных клеток, содержащих инкапсулины, было ниже по сравнению с контрольными клетками, что позволяло детектировать клетки методом МРТ. Это очень важное преимущество, выгодно выделяющее инкапсулины на фоне остальных меток, которые часто оказываются токсичны и способны влиять на пролиферацию клеток. Помимо этого, в упомянутых работах было показано, что формирование наночастиц в инкапсулинах протекало достаточно быстро и занимало около 24 часов, в противоположность получению наночастиц методом химического синтеза, который очень часто может занимать несколько дней с учетом выделения, очистки и функционализации поверхности, после чего

частицы еще должны быть охарактеризованы, а их токсичность должна быть протестирована на клеточной линии, чтобы убедиться в безопасности их применения [100].

Инкапсулины как биореакторы. Еще одним способом применения инкапсулинов является их использование в качестве биореакторов. Известно, что тонкий химический синтез может быть проведен при помощи различных ферментов, что позволяет сильно упростить условия проведения реакции. Огромное количество реакций в химии и химической промышленности протекает в присутствии катализаторов, а сами катализаторы для гетерофазных систем представляют собой различные мелкодисперсные частицы или же наносятся на пористый носитель для увеличения эффективности процесса. В одной из работ в качестве такого носителя были использованы инкапсулины *T. maritima*, а «нанесение» катализатора осуществлялось при помощи связывания необходимых ферментов

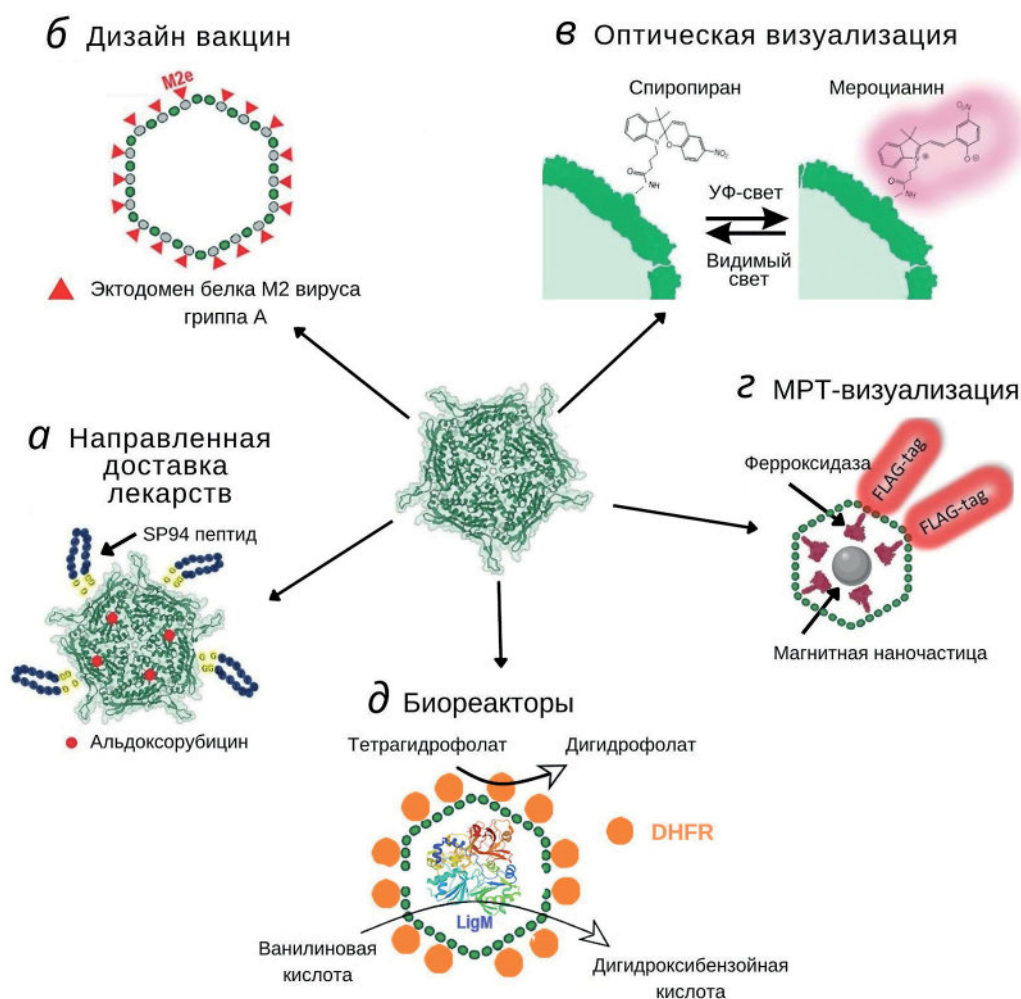


Рис. 3. Использование инкапсулинов для решения различных биотехнологических задач: а — наноконтейнерные системы для адресной доставки лекарств; б — новые типы вакцин; в — фотопереключаемые метки; г — генетически кодируемые метки для МРТ-визуализации; д — биосинтез при помощи инкапсулированных ферментов

с поверхностями (внутренней и внешней) белкового компартмента. Инкапсулины на основе *T. maritima* были сконструированы следующим образом: на внешней оболочке при помощи технологии SpyCatcher/SpyTag C-конец протомера был конъюгирован с фибронектином FbaB58, а затем последовательно связан с N-концом дигидрофолатредуктазы *E. coli* (DHFR), а внутрь инкапсулина был загружен тетрагидрофолат-зависимый фермент (деметилаза LigM). На оболочке инкапсулина удалось ковалентно связать порядка 60 копий DHFR (рис. 3, д).

Тетрагидрофолат, продуцируемый на внешней оболочке при помощи DHFR, был способен управлять деметилированием арильного субстрата, полученного из лигнина, упакованными деметилазами. Было показано, что последующее введение делеции, увеличивающей поры в оболочке инкапсулина, усиливает обмен метаболитов. Таким образом, такая конструкция на основе инкапсулина функционирует со скоростью, эквивалентной скорости двух ферментов, свободно диспергированных в растворе [101].

Благодаря своему внутреннему размеру белковые компартменты являются превосходной имитацией замкнутого внутриклеточного окружения и позволяют изучать кинетику ферментов в более естественных условиях [102, 103]. Было показано, что в оболочку инкапсулина *R. erythropolis* могут быть загружены такие белки, как GFP и люцифераза светлячка (Luc), не являющиеся нативными для этого бактериального штамма [16]. При этом GFP сохранял способность флуоресцировать, а люцифераза проявляла ферментативную активность в отношении своего субстрата, люциферина. Подобное исследование было проведено с инкапсулинами *B. linens*. C-Концевая последовательность нативного грузового белка DyP была слита с C-концом TFP [104]. После подтверждения структурной целостности изолированных нанокомпарментов было определено, что в среднем в одном инкапсулине содержится 12 молекул TFP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несомненно, инкапсулины на данный момент остаются относительно новым объектом исследований, не все свойства и их изначальное предназначение в прокариотах определены и изучены. Однако практическое применение инкапсулинов в области биотехнологии становится все более многообещающим. Такие свойства нанокомпарментов, как небольшой

размер и возможность функционализации поверхности для селективного взаимодействия со специфическими белками, позволяют создавать различные системы направленной доставки препаратов или меток. Инкапсулины могут выступать в роли нанореакторов, что позволяет получать очень гомологичные друг другу наночастицы или же использовать этот эффект для устранения ионов металлов из окружающей среды. Также инкапсулины могут быть платформой для конъюгации с различными ферментами, что позволяет изучать их кинетику в естественных условиях. Инкапсулиновые системы, биоминерализующие железо с образованием магнитных наночастиц, могут быть использованы в качестве контрастных агентов для МРТ при мониторинге распространения клеток в организме.

Проводя сравнение инкапсулинов с другими наночастицами, использующимися в биотехнологии, немаловажным преимуществом первых, на наш взгляд, является высокая воспроизводимость биосинтеза инкапсулинов в клетках. Будь то прокариотические клетки или же эукариотические — синтез инкапсулинов имеет генетическую основу, в то время как химический синтез представляет собой крайне многофакторный процесс, успех которого зависит от чистоты и качества реактивов, выбранных методик т.д. Если более подробно остановиться именно на магнитных наночастицах, использующихся для мониторинга клеток методом МРТ, то здесь наночастицы, образующиеся в инкапсулинах, проигрывают экзогенным магнитным меткам в интенсивности создаваемого ими МР-сигнала. Однако экзогенные магнитные наночастицы обладают существенным недостатком. Дело в том, что наночастицы железа, захватываемые клетками на этапе культивирования, могут выбрасываться после введения клеток в ткани и в дальнейшем захватываться другими клетками, например макрофагами, что будет приводить к искажению МР-сигнала и затруднять локализацию введенных клеток. Еще одним важным недостатком наночастиц, получаемых методами химического синтеза, является их токсичность в отношении различных клеточных культур, особенно это касается первичных культур стволовых клеток. Помимо магнитных наночастиц, существуют также генетически кодируемые метки для МРТ, например, метки на основе ферритинов, но подобные метки проигрывают железозапасующим инкапсулинам в емкости (ферритин способен накопить около 3000 атомов железа, в то время как инкапсулин *Q. thermotolerans* — на порядок больше). Другим

вопросом, касающимся применения различных наноконтейнерных систем на основе инкапсулинов, является их возможная иммуногенность *in vivo*. Предполагается, что частично эта проблема может быть решена путем покрытия инкапсулинов ПЭГом. В настоящее время *in vivo* оценки иммуногенности инкапсулинов, выделенных из бактерий или эукариотических клеток, не было проведено, однако было показано, что уже упомянутые в настоящем обзоре злокачественные клетки карциномы молочной железы мыши 4T1, стабильно экспрессирующие гены инкапсулиновой системы *Q. thermotolerans*, успешно формировали подкожные опухоли после имплантации иммунокомпетентным мышам, а динамика роста этих опухолей не отличалась от динамики роста опухолей, полученных из клеток 4T1, не содержащих каких-либо трансгенов.

Несмотря на вышеописанные недостатки, инкапсулины уже сейчас показали себя инте-

ресной альтернативой конвенциональным наноплатформам. С каждым годом открываются новые типы инкапсулинов у различных штаммов бактерий и архей, в свете чего дальнейшее исследование этих структур и их свойств видится весьма перспективным для широкого круга биомедицинских задач.

Вклад авторов. Н.С. Чмелюк, В.В. Ода — написание текста, подготовка иллюстраций; А.Н. Габашвили, М.А. Абакумов — редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-00096).

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. Valdes-Stauber, N., and Scherer, S. (1994) Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3809-3814, doi: 10.1128/aem.60.10.3809-3814.1994.
2. Rosenkrands, I., Rasmussen, P. B., Carnio, M., Jacobsen, S., Theisen, M., et al. (1998) Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate recognized by mouse memory effector cells, *Infect. Immun.*, **66**, 2728-2735, doi: 10.1128/iai.66.6.2728-2735.1998.
3. Hicks, P. M., Rinker, K. D., Baker, J. R., and Kelly, R. M. (1998) Homomultimeric protease in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* has structural and amino acid sequence homology to bacteriocins in mesophilic bacteria, *FEBS Lett.*, **440**, 393-398, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01451-3.
4. Giessen, T. W., and Silver, P. A. (2017) Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17029, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.29.
5. Winter, N., Triccas, J. A., Rivoire, B., Pessolani, M. C. V., Eiglmeier, K., et al. (1995) Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of *Mycobacterium leprae*, *Mol. Microbiol.*, **16**, 865-876, doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02314.x.
6. Triccas, J. A., Roche, P. W., Winter, N., Feng, C. G., Ruth Butlin, C., et al. (1996) A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*, *Infect. Immun.*, **64**, 5171-5177, doi: 10.1128/iai.64.12.5171-5177.1996.
7. Kawamoto, S., Watanabe, M., Saito, N., Hesketh, A., Vachalova, K., et al. (2001) Molecular and functional analyses of the gene (*eshA*) encoding the 52-kilodalton protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) required for antibiotic production, *J. Bacteriol.*, **183**, 6009-6016, doi: 10.1128/JB.183.20.6009-6016.2001.
8. Kwak, J., McCue, L. A., Trezianka, K., and Kendrick, K. E. (2001) Identification and characterization of a developmentally regulated protein, EshA, required for sporogenic hyphal branches in *Streptomyces griseus*, *J. Bacteriol.*, **183**, 3004-3015, doi: 10.1128/JB.183.10.3004-3015.2001.
9. Saito, N., Matsubara, K., Watanabe, M., Kato, F., and Ochi, K. (2003) Genetic and biochemical characterization of EshA, a protein that forms large multimers and affects developmental processes in *Streptomyces griseus*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5902-5911, doi: 10.1074/jbc.M208564200.
10. Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., et al. (2008) Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 939-947, doi: 10.1038/nsmb.1473.
11. Namba, K., Hagiwara, K., Tanaka, H., Nakaishi, Y., Chong, K. T., et al. (2005) Expression and molecular characterization of spherical particles derived from the genome of the hyperthermophilic euryarchaeote *Pyrococcus furiosus*, *J. Biochem.*, **138**, 193-199, doi: 10.1093/jb/mvi111.
12. Akita, F., Chong, K. T., Tanaka, H., Yamashita, E., Miyazaki, N., et al. (2007) The crystal structure

- of a virus-like particle from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* provides insight into the evolution of viruses, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1469-1483, doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.075.
13. Moon, H., Lee, J., Min, J., and Kang, S. (2014) Developing genetically engineered encapsulin protein cage nanoparticles as a targeted delivery nanoplatform, *Biomacromolecules*, **15**, 3794-3801, doi: 10.1021/bm501066m.
 14. Rurup, W. F., Snijder, J., Koay, M. S. T., Heck, A. J. R., and Cornelissen, J. J. L. M. (2014) Self-sorting of foreign proteins in a bacterial nanocompartment, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 3828-3832, doi: 10.1021/ja410891c.
 15. Snijder, J., Van De Waterbeemd, M., Damoc, E., Denisov, E., Grinfeld, D., et al. (2014) Defining the stoichiometry and cargo load of viral and bacterial nanoparticles by orbitrap mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 7295-7299, doi: 10.1021/ja502616y.
 16. Tamura, A., Fukutani, Y., Takami, T., Fujii, M., Nakaguchi, Y., et al. (2015) Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 13-20, doi: 10.1002/bit.25322.
 17. Cassidy-Amstutz, C., Oltrogge, L., Going, C. C., Lee, A., Teng, P., et al. (2016) Identification of a minimal peptide tag for *in vivo* and *in vitro* loading of encapsulin, *Biochemistry*, **55**, 3461-3468, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00294.
 18. Choi, B., Moon, H., Hong, S. J., Shin, C., Do, Y., et al. (2016) Effective delivery of antigen-encapsulin nanoparticle fusions to dendritic cells leads to antigen-specific cytotoxic T cell activation and tumor rejection, *ACS Nano*, **10**, 7339-7350, doi: 10.1021/acsnano.5b08084.
 19. Giessen, T. W., and Silver, P. A. (2016) Converting a natural protein compartment into a nanofactory for the size-constrained synthesis of antimicrobial silver nanoparticles, *ACS Synth. Biol.*, **5**, 1497-1504, doi: 10.1021/acssynbio.6b00117.
 20. Sonotaki, S., Takami, T., Noguchi, K., Odaka, M., Yohda, M., et al. (2017) Successful PEGylation of hollow encapsulin nanoparticles from: *Rhodococcus erythropolis* N771 without affecting their disassembly and reassembly properties, *Biomater. Sci.*, **5**, 1082-1089, doi: 10.1039/c7bm00207f.
 21. Rahmanpour, R., and Bugg, T. D. H. (2013) Assembly *in vitro* of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment, *FEBS J.*, **280**, 2097-2104, doi: 10.1111/febs.12234.
 22. Contreras, H., Joens, M. S., McMath, L. M., Le, V. P., Tullius, M. V., et al. (2014) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* nanocompartment and its potential cargo proteins, *J. Biol. Chem.*, **289**, 18279-18289, doi: 10.1074/jbc.M114.570119.
 23. McHugh, C. A., Fontana, J., Nemecek, D., Cheng, N., Aksyuk, A. A., et al. (2014) A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from oxidative stress, *EMBO J.*, **33**, 1896-1911, doi: 10.15252/embj.201488566.
 24. He, D., Hughes, S., Vanden-Hehir, S., Georgiev, A., Altenbach, K., et al. (2016) Structural characterization of encapsulated ferritin provides insight into iron storage in bacterial nanocompartments, *Elife*, **5**, e18972, doi: 10.7554/eLife.18972.
 25. Ochoa, J. M., Bair, K., Holton, T., Bobik, T. A., and Yeates, T. O. (2021) MCPdb: The bacterial microcompartment database, *PLoS One*, **16**, e0248269, doi: 10.1371/journal.pone.0248269.
 26. Wikoff, W. R., Liljas, L., Duda, R. L., Tsuruta, H., Hendrix, R. W., et al. (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid, *Science*, **289**, 2129-2133, doi: 10.1126/science.289.5487.2129.
 27. Caspar, D. L., and Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1-24, doi: 10.1101/SQB.1962.027.001.005.
 28. Almeida, A. V., Carvalho, A. J., and Pereira, A. S. (2021) Encapsulin nanocages: protein encapsulation and iron sequestration, *Coord. Chem. Rev.*, **448**, 214188, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214188.
 29. Tracey, J. C., Coronado, M., Giessen, T. W., Lau, M. C. Y., Silver, P. A., et al. (2019) The discovery of twenty-eight new encapsulin sequences, including three in anammox bacteria, *Sci. Rep.*, **9**, 20122, doi: 10.1038/s41598-019-56533-5.
 30. Giessen, T. W., Orlando, B. J., Verdegaa, A. A., Chambers, M. G., Gardener, J., et al. (2019) Large protein organelles form a new iron sequestration system with high storage capacity, *Elife*, **8**, e46070, doi: 10.7554/eLife.46070.
 31. El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., et al. (2019) The Pfam protein families database in 2019, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D427-D432, doi: 10.1093/nar/gky995.
 32. Nichols, R. J., LaFrance, B., Phillips, N. R., Radford, D. R., Oltrogge, L. M., et al. (2021) Discovery and characterization of a novel family of prokaryotic nanocompartments involved in sulfur metabolism, *Elife*, **10**, e59288, doi: 10.7554/eLife.59288.
 33. Wiryaman, T., and Toor, N. (2021) Cryo-EM structure of a thermostable bacterial nanocompartment, *IUCrJ*, **8**, 342-350, doi: 10.1107/S2052252521001949.
 34. Wiryaman, T., and Toor, N. (2022) Recent advances in the structural biology of encapsulin bacterial nanocompartments, *J. Struct. Biol. X*, **6**, 100062, doi: 10.1016/j.yjsbx.2022.100062.
 35. Ross, J., McIver, Z., Lambert, T., Piergentili, C., Bird, J. E., et al. (2022) Pore dynamics and asymmetric cargo loading in an encapsulin nanocompartment, *Sci. Adv.*, **8**, eabj4461, doi: 10.1126/sciadv.abj4461.
 36. Williams, E. M., Jung, S. M., Coffman, J. L., and Lutz, S. (2018) Pore engineering for enhanced mass transport

- in encapsulin nanocompartments, *ACS Synth. Biol.*, **7**, 2514-2517, doi: 10.1021/acssynbio.8b00295.
37. Snijder, J., Kononova, O., Barbu, I. M., Uetrecht, C., Rurup, W. F., et al. (2016) Assembly and mechanical properties of the cargo-free and cargo-loaded bacterial nanocompartment encapsulin, *Biomacromolecules*, **17**, 2522-2529, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00469.
 38. Putri, R. M., Allende-Ballester, C., Luque, D., Klem, R., Rousou, K. A., et al. (2017) Structural characterization of native and modified encapsulins as nanoplatforms for *in vitro* catalysis and cellular uptake, *ACS Nano*, **11**, 12796-12804, doi: 10.1021/acsnano.7b07669.
 39. Kyrkiewicz, A. M., and Woodward, J. D. (2020) Shotgun EM of mycobacterial protein complexes during stationary phase stress, *Curr. Res. Struct. Biol.*, **2**, 204-212, doi: 10.1016/j.crstbi.2020.09.002.
 40. Tang, Y., Mu, A., Zhang, Y., Zhou, S., Wang, W., et al. (2021) Cryo-EM structure of *Mycobacterium smegmatis* DyP-loaded encapsulin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **118**, e2025658118, doi: 10.1073/pnas.2025658118.
 41. LaFrance, B. J., Cassidy-Amstutz, C., Nichols, R. J., Oltrogge, L. M., Nogales, E., et al. (2021) The encapsulin from *Thermotoga maritima* is a flavoprotein with a symmetry matched ferritin-like cargo protein, *Sci. Rep.*, **11**, 22810, doi: 10.1038/s41598-021-01932-w.
 42. Sigmund, F., Pettinger, S., Kube, M., Schneider, F., Schifferer, M., et al. (2019) Iron-sequestering nanocompartments as multiplexed electron microscopy gene reporters, *ACS Nano*, **13**, 8114-8123, doi: 10.1021/acsnano.9b03140.
 43. Imlay, J. A., Chin, S. M., and Linn, S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction *in vivo* and *in vitro*, *Science*, **240**, 640-642, doi: 10.1126/science.2834821.
 44. Andrews, S. C. (1998) Iron storage in bacteria, *Adv. Microb. Physiol.*, **40**, 281-351, doi: 10.1038/279015a0.
 45. Goulding, C. W., Apostol, M. I., Sawaya, M. R., Phillips, M., Parseghian, A., et al. (2005) Regulation by oligomerization in a mycobacterial folate biosynthetic enzyme, *J. Mol. Biol.*, **349**, 61-72, doi: 10.1016/j.jmb.2005.03.023.
 46. Sugano, Y., Muramatsu, R., Ichianagi, A., Sato, T., and Shoda, M. (2007) DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases, *J. Biol. Chem.*, **282**, 36652-36658, doi: 10.1074/jbc.M706996200.
 47. Pandey, R., and Rodriguez, G. M. (2012) A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice, *Infect. Immun.*, **80**, 3650-3659, doi: 10.1128/IAI.00229-12.
 48. Reddy, P. V., Puri, R. V., Khera, A., and Tyagi, A. K. (2012) Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection, *J. Bacteriol.*, **194**, 567-575, doi: 10.1128/JB.05553-11.
 49. Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D., et al. (2011) Identification of DyPB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase, *Biochemistry*, **50**, 5096-5107, doi: 10.1021/bi101892z.
 50. Bobik, T. A., Lehman, B. P., and Yeates, T. O. (2015) Bacterial microcompartments: widespread prokaryotic organelles for isolation and optimization of metabolic pathways, *Mol. Microbiol.*, **98**, 193-207, doi: 10.1111/mmi.13117.
 51. Green, E. R., and Mecsas, J. (2016) Bacterial secretion systems: an overview, *Microbiol. Spectr.*, **4**, doi: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0012-2015.
 52. Wang, P., Robert, L., Pelletier, J., Dang, W. L., Taddei, F., et al. (2010) Robust growth of *Escherichia coli*, *Curr. Biol.*, **20**, 1099-1103, doi: 10.1016/j.cub.2010.04.045.
 53. Gong, J., Chen, M., Zheng, Y., Wang, S., and Wang, Y. (2012) Polymeric micelles drug delivery system in oncology, *J. Control. Release*, **159**, 312-323, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.12.012.
 54. Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M., and Klok, H. A. (2012) Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, **53**, 95-108, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.026.
 55. Allen, T. M., and Cullis, P. R. (2013) Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 36-48, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
 56. Wang, A. Z., Langer, R., and Farokhzad, O. C. (2012) Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.*, **63**, 185-198, doi: 10.1146/annurev-med-040210-162544.
 57. Haag, R., and Kratz, F. (2006, February 13) Polymer therapeutics: Concepts and applications, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **45**, 1198-215, doi: 10.1002/anie.200502113.
 58. Ma, Y., Nolte, R. J. M., and Cornelissen, J. J. L. M. (2012) Virus-based nanocarriers for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 811-825, doi: 10.1016/j.addr.2012.01.005.
 59. MaHam, A., Tang, Z., Wu, H., Wang, J., and Lin, Y. (2009) Protein-based nanomedicine platforms for drug delivery, *Small*, **5**, 1706-1721, doi: 10.1002/sml.200801602.
 60. Brigger, I., Dubernet, C., and Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 631-651, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00044-3.
 61. Toita, R., Murata, M., Tabata, S., Abe, K., Narahara, S., et al. (2012) Development of human hepatocellular carcinoma cell-targeted protein cages, *Bioconjug. Chem.*, **23**, 1494-1501, doi: 10.1021/bc300015f.
 62. Toita, R., Murata, M., Abe, K., Narahara, S., Piao, J. S., et al. (2013) A nanocarrier based on a genetically engineered protein cage to deliver doxorubicin to human hepatocellular carcinoma cells, *Chem. Commun.*, **49**, 7442-7444, doi: 10.1039/c3cc44508a.

63. Diaz, D., Vidal, X., Sunna, A., and Care, A. (2021) Bioengineering a light-responsive encapsulin nano-reactor: a potential tool for *in vitro* photodynamic therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13**, 7977-7986, doi: 10.1021/acsami.0c21141.
64. Van de Steen, A., Khalife, R., Colant, N., Mustafa Khan, H., Deveikis, M., et al. (2021) Bioengineering bacterial encapsulin nanocompartments as targeted drug delivery system, *Synth. Syst. Biotechnol.*, **6**, 231-241, doi: 10.1016/j.synbio.2021.09.001.
65. Moon, H., Lee, J., Kim, H., Heo, S., Min, J., et al. (2014) Genetically engineering encapsulin protein cage nanoparticle as a SCC-7 cell targeting optical nanoprobe, *Biomater. Res.*, **18**, 21, doi: 10.1186/2055-7124-18-21.
66. Jung, Y., Kang, H. J., Lee, J. M., Jung, S. O., Yun, W. S., et al. (2008) Controlled antibody immobilization onto immunoanalytical platforms by synthetic peptide, *Anal. Biochem.*, **374**, 99-105, doi: 10.1016/j.ab.2007.10.022.
67. Lagoutte, P., Mignon, C., Stadthagen, G., Potisopon, S., Donnat, S., et al. (2018) Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design, *Vaccine*, **36**, 3622-3628, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.034.
68. Cho, K. J., Schepens, B., Seok, J. H., Kim, S., Roose, K., et al. (2015) Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody, *J. Virol.*, **89**, 3700-3711, doi: 10.1128/jvi.02576-14.
69. Putri, R. M., Fredy, J. W., Cornelissen, J. J. L. M., Koay, M. S. T., and Katsonis, N. (2016) Labelling bacterial nanocages with photo-switchable fluorophores, *ChemPhysChem*, **17**, 1815-1818, doi: 10.1002/cphc.201600013.
70. Klajn, R. (2014) Spiropyran-based dynamic materials, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 148-184, doi: 10.1039/c3cs60181a.
71. Künzle, M., Mangler, J., Lach, M., and Beck, T. (2018) Peptide-directed encapsulation of inorganic nanoparticles into protein containers, *Nanoscale*, **10**, 22917-22926, doi: 10.1039/c8nr06236f.
72. Zhang, Y., Wang, X., Chu, C., Zhou, Z., Chen, B., et al. (2020) Genetically engineered magnetic nanocages for cancer magneto-catalytic theranostics, *Nat. Commun.*, **11**, 5421, doi: 10.1038/s41467-020-19061-9.
73. Wang, Q., Zhou, Y.-M., Xing, C.-Y., Li, W.-C., Shen, Y., et al. (2022) Encapsulins from *Ca. Brocadia fulgida*: An effective tool to enhance the tolerance of engineered bacteria (pET-28a-cEnc) to Zn²⁺, *J. Hazard. Mater.*, **435**, 128954, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128954.
74. Kim, T., Momin, E., Choi, J., Yuan, K., Zaidi, H., et al. (2011) Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2955-2961, doi: 10.1021/ja1084095.
75. Di Corato, R., Gazeau, F., Le Visage, C., Fayol, D., Levitz, P., et al. (2013) High-resolution cellular MRI: gadolinium and iron oxide nanoparticles for in-depth dual-cell imaging of engineered tissue constructs, *ACS Nano*, **7**, 7500-7512, doi: 10.1021/nn401095p.
76. Schrepfer, S., Deuse, T., Reichenspurner, H., Fischbein, M. P., Robbins, R. C., et al. (2007) Stem cell transplantation: the lung barrier, *Transplant. Proc.*, **39**, 573-576, doi: 10.1016/j.transproceed.2006.12.019.
77. Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., et al. (2005) Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics, *Science*, **307**, 538-544, doi: 10.1126/science.1104274.
78. Kalchenko, V., Shvitiel, S., Malina, V., Lapid, K., Haramati, S., et al. (2006) Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing, *J. Biomed. Opt.*, **11**, 050507, doi: 10.1117/1.2364903.
79. Himes, N., Min, J. Y., Lee, R., Brown, C., Shea, J., et al. (2004) *In vivo* MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction, *Magn. Reson. Med.*, **52**, 1214-1219, doi: 10.1002/mrm.20220.
80. Arbab, A. S., Bashaw, L. A., Miller, B. R., Jordan, E. K., Bulte, J. W. M., et al. (2003) Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques, *Transplantation*, **76**, 1123-1130, doi: 10.1097/01.TP.0000089237.39220.83.
81. Frank, J. A., Miller, B. R., Arbab, A. S., Zywicke, H. A., Jordan, E. K., et al. (2003) Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents, *Radiology*, **228**, 480-487, doi: 10.1148/radiol.2281020638.
82. Bos, C., Delmas, Y., Desmoulière, A., Solanilla, A., Hauger, O., et al. (2004) *In vivo* MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver, *Radiology*, **233**, 781-789, doi: 10.1148/radiol.2333031714.
83. Di Tucci, A. A., Matta, G., Deplano, S., Gabbas, A., Depau, C., et al. (2008) Myocardial iron overload assessment by T2* magnetic resonance imaging in adult transfusion dependent patients with acquired anemias, *Haematologica*, **93**, 1385-1388, doi: 10.3324/haematol.12759.
84. Ittrich, H., Lange, C., Tögel, F., Zander, A. R., Dahnke, H., et al. (2007) *In vivo* magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T, *J. Magn. Reson. Imaging*, **25**, 1179-1191, doi: 10.1002/jmri.20925.
85. Massoud, T. F., and Gambhir, S. S. (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light, *Genes Dev.*, **17**, 545-580, doi: 10.1101/gad.1047403.
86. Wu, J. C., Tseng, J. R., and Gambhir, S. S. (2004) Molecular imaging of cardiovascular gene prod-

- ucts, *J. Nucl. Cardiol.*, **11**, 491-505, doi: 10.1016/j.nuclcard.2004.04.004.
87. Contag, C. H., Jenkins, D., Contag, P. R., and Negrin, R. S. (2000) Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease *in vivo*, *Neoplasia*, **2**, 41-52, doi: 10.1038/sj.neo.7900079.
 88. Herschman, H. R. (2004) Noninvasive imaging of reporter gene expression in living subjects, *Adv. Cancer Res.*, **92**, 29-80, doi: 10.1016/S0065-230X(04)92003-9.
 89. Inubushi, M., and Tamaki, N. (2007) Radionuclide reporter gene imaging for cardiac gene therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **34 Suppl 1**, S27-S33, doi: 10.1007/s00259-007-0438-x.
 90. Joo, H. K., and Chung, J. K. (2008) Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression, *J. Nucl. Med.*, **49 Suppl 2**, 164S-179S, doi: 10.2967/jnumed.107.045955.
 91. Gambhir, S. S., Barrio, J. R., Phelps, M. E., Iyer, M., Namavari, M., et al. (1999) Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2333-2338, doi: 10.1073/pnas.96.5.2333.
 92. Phelps, M. E. (2000) Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9226-9233, doi: 10.1073/pnas.97.16.9226.
 93. Zhang, S. J., and Wu, J. C. (2007) Comparison of imaging techniques for tracking cardiac stem cell therapy, *J. Nucl. Med.*, **48**, 1916-1919, doi: 10.2967/jnumed.107.043299.
 94. Okada, S., Ishii, K., Yamane, J., Iwanami, A., Ikegami, T., et al. (2005) *In vivo* imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury, *FASEB J.*, **19**, 1839-1841, doi: 10.1096/fj.05-4082fje.
 95. Gilad, A. A., Winnard, P. T., van Zijl, P. C. M., and Bulte, J. W. M. (2007) Developing MR reporter genes: promises and pitfalls, *NMR Biomed.*, **20**, 275-290, doi: 10.1002/nbm.1134.
 96. Sigmund, F., Massner, C., Erdmann, P., Stelzl, A., Rolbieski, H., et al. (2018) Bacterial encapsulins as orthogonal compartments for mammalian cell engineering, *Nat. Commun.*, **9**, 1990, doi: 10.1038/s41467-018-04227-3.
 97. Efremova, M. V., Bodea, S.-V., Sigmund, F., Semkina, A., Westmeyer, G. G., et al. (2021) Genetically encoded self-assembling iron oxide nanoparticles as a possible platform for cancer-cell tracking., *Pharmaceutics*, **13**, 397, doi: 10.3390/pharmaceutics13030397.
 98. Gabashvili, A. N., Vodopyanov, S. S., Chmelyuk, N. S., Sarkisova, V. A., Fedotov, K. A., et al. (2021) Encapsulin based self-assembling iron-containing protein nanoparticles for stem cells MRI visualization., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12275, doi: 10.3390/ijms222212275.
 99. Gabashvili, A. N., Efremova, M. V., Vodopyanov, S. S., Chmelyuk, N. S., Oda, V. V., et al. (2022) New approach to non-invasive tumor model monitoring via self-assemble iron containing protein nanocompartments, *Nanomaterials*, **12**, 1657, doi: 10.3390/nano12101657.
 100. Roy, N., Gaur, A., Jain, A., Bhattacharya, S., and Rani, V. (2013) Green synthesis of silver nanoparticles: an approach to overcome toxicity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **36**, 807-812, doi: 10.1016/j.etap.2013.07.005.
 101. Jenkins, M. C., and Lutz, S. (2021) Encapsulin nanocontainers as versatile scaffolds for the development of artificial metabolons, *ACS Synth. Biol.*, **10**, 857-869, doi: 10.1021/acssynbio.0c00636.
 102. Maity, B., Fujita, K., and Ueno, T. (2015) Use of the confined spaces of apo-ferritin and virus capsids as nanoreactors for catalytic reactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **25**, 88-97, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.12.026.
 103. Safont-Sempere, M. M., Fernández, G., and Würthner, F. (2011) Self-sorting phenomena in complex supramolecular systems, *Chem. Rev.*, **111**, 5784-5814, doi: 10.1021/cr100357h.
 104. Ai, H. W., Henderson, J. N., Remington, S. J., and Campbell, R. E. (2006) Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging, *Biochem. J.*, **400**, 531-540, doi: 10.1042/BJ20060874.

ENCAPSULINS: STRUCTURE, PROPERTIES, APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY

Review

N. S. Chmelyuk^{1,2}, V. V. Oda¹, A. N. Gabashvili¹, and M. A. Abakumov^{1,2*}

¹ National Research Technological University "MISiS",
119049 Moscow, Russia; E-mail: abakumov1988@gmail.com

² Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117977 Moscow, Russia

In 1994 a new class of prokaryotic compartments was discovered, collectively called “encapsulins” or “nanocompartments”. Encapsulin shell protomer proteins self-assemble to form icosahedral structures of various diameters (24–42 nm). Inside of nanocompartments shells, one or several cargo proteins, diverse in their functions, can be encapsulated. In addition, non-native cargo proteins can be loaded into nanocompartments, and shell surfaces can be modified via various compounds, which makes it possible to create targeted drug delivery systems, labels for optical and MRI imaging, and to use encapsulins as bioreactors. This review describes a number of approaches to the application of encapsulins in various fields of science, including biomedicine and nanobiotechnologies.

Keywords: encapsulins, self-organization, nanocontainer systems, targeted delivery, genetic tags, cell tracking

«СТАРЕНИЕ» КЛЕТОК ПРИ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ: МЕХАНИЗМЫ И ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ

Обзор

© 2023 М.А. Замкова^{1,2*}, Н.А. Персиянцева^{1,2}, В.В. Татарский¹, А.А. Штиль^{2,3}

¹ ФГБУН Институт биологии гена РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: zamkovam@gmail.com

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.10.2022

После доработки 08.12.2022

Принята к публикации 08.12.2022

Пластичность (многообразие процессов молекулярной регуляции) позволяет опухолевым клеткам «ускользнуть» от цитотоксического действия химио- и лучевой терапии и выживать. Механизм «ускользания» — адаптация (перепрограммирование) метаболизма. Благодаря сходству с явлениями, протекающими при естественном старении, особые признаки выживших клеток определяются как индуцированное терапией «старение» (therapy induced senescence-like phenotype). Опухоль, приобретающая этот фенотип, отличается от первичной; важную роль играют лекарственная устойчивость и формирование агрессивных клонов. Актуальность проблемы обусловлена общебиологической значимостью регуляции транскрипции генов как приспособительного механизма при стрессе, а также практической необходимостью мишень-направленных воздействий на механизмы транскрипции. В обзоре рассматриваются механизмы становления и исхода, индуцированного терапевтическими воздействиями «старения» опухолевых клеток, а также комбинации противоопухолевых лекарств и модуляторов транскрипции для преодоления этого клинически неблагоприятного феномена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансформированные клетки, цитотоксичность, внутриклеточные сигналы, индуцированное терапией «старение» клеток, транскрипция генов, терапия опухолей.

DOI: 10.31857/S0320972523010049, EDN: PBMZFS

ВВЕДЕНИЕ

Главная цель противоопухолевой терапии — индукция гибели как можно большего количества опухолевых клеток при минимальном повреждении неопухолевых. Однако высокие концентрации химиопрепаратов (вызывающие гибель клетки) и/или их длительное применение могут приводить к возникновению общерезорбтивной токсичности [1, 2].

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход; *BIRC5* — ген, кодирующий белок сурвивин; CDK — циклинзависимая протеинкиназа; SASP — секреторный фенотип, связанный со старением.

* Адресат для корреспонденции.

¹ Для облегчения восприятия в дальнейшем изложении термин употребляется без кавычек.

Снижение дозы позволяет уменьшить токсичность [3], однако при этом отдельные опухолевые клетки не погибают, а приобретают фенотип(ы) «старения»¹ (senescence-like phenotype) [4]. Указанная взаимосвязь известна для важнейших лекарств: доксорубицина [5, 6], этопозида [7], цисплатина [5, 8], паклитакселя [5, 9], и ионизирующего излучения [10].

Клеточное старение при противоопухолевой (лекарственной, лучевой) терапии — состояние, при котором нарушается клеточный цикл и происходит остановка или замедление пролиферации клеток [11]. Важную роль в становлении фенотипа старения играют сигнальные пути p53/p21^{CIP1} и/или p16^{INK4a}/pRb. Активация этих механизмов происходит в ответ на повреждение ДНК, вызванные противоопухолевым воздействием [12, 13]. Ранее считали,

что клеточное старение — терапевтически оправданный результат, однако в последнее время накапливаются данные, указывающие на неблагоприятные последствия этого процесса — формирование клонов, устойчивых к стрессовым воздействиям (в частности, лекарственная устойчивость), увеличение экспрессии генов-маркеров стволовых клеток, негативное влияние на микроокружение (индукция секреторного фенотипа) [14, 15]. В клетке, выжившей после терапевтического воздействия и приобретающей при этом признаки старения, изменяется транскрипция генов, кодирующих белки, важные для выживания [9, 16]. Во-первых, происходит активация транскрипционных факторов, в частности, ядерный фактор карпа В (nuclear factor kappa B, NF-κB), регулирующий секреторный фенотип (SASP, senescence-associated secretory phenotype), характерный для клеточного старения, и экспрессию анти-апоптотических белков семейства Bcl-2 [17, 18]. Результатом активации SASP могут являться возобновление пролиферации опухолевых клеток, их способности к миграции, инвазии и ангиогенезу, а также эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — признаки прогрессии опухоли [19].

Во-вторых, изменения затрагивают гены-регуляторы клеточного цикла: остановка позволяет репарировать повреждения, вызванные лечебным воздействием. В частности, повышается экспрессия генов *p21^{CIP1}*, *p16^{INK4a}* и *p27*, являющихся негативными регуляторами клеточного цикла. Также для старения характерно увеличение экспрессии генов *p53*, *p19^{ARF}* и *PAI-1* [20, 21].

В-третьих, изменяется транскрипция генов, кодирующих маркеры стволовых клеток: CD133, CD44, CD24, NANOG и др. Повышение уровня этих белков также способствует выходу клеток из старения и формированию вторичных опухолей [22–24]. Изменяется профиль экспрессии генов, продукты которых участвуют в метаболизме: увеличивается уровень гликолиза [9, 25]. Наконец, происходят изменения транскрипции в ответ на нарушение фолдинга белков (unfolded protein response) и аутофагии [9, 26]. Возникновение фенотипа старения также сопровождается нарушением эпигенетических модификаций гистонов и, следовательно, дезорганизацией баланса активного и непермиссивного состояния хроматина. В целом, баланс смещается в сторону «открытого» хроматина и сопровождается нестабильностью генома [27].

К негативным последствиям клеточного старения, индуцированного химиотерапией,

относят выход клетки из стадии с последующим формированием новых более агрессивных и устойчивых к терапии клонов, а также аутокринное и паракринное влияние компонентов SASP, способствующих развитию опухоли [28]. Поэтому в настоящее время активно исследуется применение комбинированной терапии, когда в схему лечения, наряду с основным химиопрепаратом (или лучевой терапией), вводят соединение (сенолитик), мишенью действия которого являются клетки в стадии клеточного старения. Такой подход позволяет снизить риск возникновения побочных эффектов ввиду применения низких доз химио- и лучевой терапии и элиминировать «стареющие» клетки, обладающие в долгосрочной перспективе негативными последствиями для терапии, тем самым улучшая выживаемость пациентов. Важная роль отдается исследованиям, направленным на изучение механизмов регуляции выхода клеток из стадии старения и поиску новых мишеней для комбинированной терапии. Новым подходом также является установление роли регуляции транскрипции в «ускользании» опухолевых клеток и значении мишень-направленных воздействий на этот механизм для повышения эффективности терапии.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК

При воздействии химиопрепаратов или ионизирующего излучения аппарат транскрипции генов претерпевает перепрограммирование (см. раздел «Регуляция выхода клеток из старения, индуцированного противоопухолевыми воздействиями»), что является адаптационным механизмом, направленным на выживаемость клетки. Важным здесь оказывается «выигрыш времени» для репарации повреждений. На этой стадии происходит нарушение (замедление или остановка) смены фаз клеточного цикла; изменяется профиль экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла, пролиферации, выживания, паракринной секреции, репарации ДНК и т.д. [9, 29]. Происходят эпигенетические изменения: снижается уровень гистонов, образуются очаги гетерохроматина, активируются суперэнхансеры в областях генов, регулирующих SASP. Эти и другие изменения определяют фенотип клеточного старения. Их детальный анализ приводится в обзорах Gonzalez-Gualda et al. [30], Davan-Wetton et al. [31] и Hernandez-Segura et al. [32]; ниже приведены краткие сведения.

Биохимические маркеры. Клетки, претерпевающие индуцированное терапией старение, характеризуются измененной морфологией — увеличивается их размер, происходит уплощение, появляется большое количество лизосом. Широко используемым маркером для идентификации фенотипа клеточного старения является измерение активности, ассоциированной со старением, β -галактозидазы (SA- β -gal, senescence-associated β -galactosidase) — лизосомальной гидролазы, активность которой увеличивается в стареющих клетках. Этот фермент расщепляет β -галактозид на моносахариды. При добавлении к бромхлориндолилгалактопиранозиду (X-Gal) происходит его гидролиз и формирование преципитата, определяемого при световой микроскопии [33]. На этой же энзиматической реакции основано определение активности SA- β -gal с помощью проточной цитофлуориметрии — используется субстрат C_{12} FDG (5-додеканоиламинофлуоресцеина ди- β -D-галактопиранозид), при расщеплении которого образуется флуоресцентный продукт [34].

Маркеры пролиферации и повреждений ДНК. Характеристикой фенотипа клеточного старения является реорганизация хроматина и формирование гетерохроматиновых очагов (senescence-associated heterochromatin foci), а также образование многоядерных клеток [35, 36]. Наблюдается значительное снижение экспрессии гена ламина В1, являющегося основным компонентом ядерной ламина [37, 38].

В результате воздействия химиопрепаратов и облучения возникают двухцепочечные разрывы ДНК, активация протеинкиназы АТМ и фосфорилирование белков-мишеней, в частности гистона γ -H2AX, также используемого для характеристики фенотипа старения [39]. Отметим, что γ -H2AX — неспецифический маркер: он выявляется при повреждениях ДНК, образующихся не только при индуцируемом противоопухолевыми воздействиями старении [32].

Торможение или блок пролиферации в стареющих клетках позволяет использовать Ki-67, бромдезоксисуридин (BrdU) или его аналог 5-этинил-2'-дезоксисуридин (EdU) для характеристики фенотипа (негативная окраска на эти маркеры). Отметим, что некоторые клетки могут иметь двойную положительную окраску по SA- β -gal и Ki-67, что может указывать на их способность к возобновлению пролиферации [40, 41].

Экспрессия генов-регуляторов клеточного цикла и ограничение апоптоза. Важным молекулярным механизмом старения является активация сигнальных путей p53/p21^{CIP1} и/или

p16^{INK4a}/pRb, опосредующая замедление или остановку клеточного цикла при повреждениях ДНК, вызванных противоопухолевыми воздействиями [42, 43]. p21 и p16^{INK4a} являются ингибиторами циклинзависимых протеинкиназ (CDK — cyclin-dependent kinase), т.е. негативными регуляторами продвижения клеток по циклу [44]. Продолжительная задержка клеточного цикла может произойти на стадиях G1 и G2/M. В ответ на повреждения структуры ДНК при химиолучевых воздействиях активируются АТМ/ATR. Эти протеинкиназы ингибируют фосфатазу Cdc25, вызывая инактивацию комплексов циклин E1—CDK2. Кроме того, АТМ/ATR фосфорилирует p53; активация гена *p21* вызывает подавление активности комплексов циклин E1—CDK2 и циклин D1—CDK4/6, приводя к остановке цикла на границе G1-S. Блок клеточного цикла может наступить и в G2/M в результате АТМ/ATR-опосредованного ингибирования Cdc25, являющейся активатором комплекса циклин B1—Cdk1, регулирующего вход в митоз. Белок p21 способствует поддержанию блока клеточного цикла на этой стадии за счет активации комплекса APC/C—Cdh1 и деградации циклина B1 [42, 45]. Для некоторых типов клеток также характерно образование полиплоидов при воздействии на них химиопрепаратов и формирования фенотипа клеточного старения (см. ниже) [46–48].

Активация секреторного фенотипа. Клетки, которые приобрели фенотип старения, метаболически активны: изменяется профиль секретируемых белков, что выражается в развитии SASP. Для этого недостаточно гиперэкспрессии ключевых генов клеточного старения — *p21* и/или *p16^{INK4a}* — необходимым условием является повреждение целостности ДНК [42, 49]. В формировании SASP участвуют провоспалительные цитокины (IL-1 α , -1 β , -6), ростовые факторы (VEGF, EGF, HGF, KGF), компоненты внеклеточного матрикса, хемокины (IL-8, CXCL-1-3), матриксные металлопротеиназы и их регуляторы (MMP-1, -3, -10, -12, uPa, TIMP-2) [49, 50]. SASP — пластичный фенотип: состав его компонентов и экспрессия отдельных генов варьируют в разных популяциях стареющих клеток в зависимости от индукторов старения, тканевого происхождения и гистологического типа клеток, микроокружения и продолжительности старения [42, 49]. Ключевыми транскрипционными факторами, регулирующими SASP, признаны NF- κ B и c/EBP β [51, 52]. Их активация приводит к повышению экспрессии генов, ответственных за секрецию наиболее консервативных компонентов SASP — IL-1 β , -6 и -8. Интерлейкины 6

и -8 – важные цитокины SASP – способствуют пролиферации клеток за счет активации транскрипционных факторов STAT3 и с-Мус, формированию ЭМП [50], увеличению инвазии благодаря экспрессии матриксных металлопротеиназ и др. [53]. Эффекты SASP могут по-разному влиять на опухолевые клетки, что зависит от компонентов секреторного фенотипа и микроокружения [54]. С одной стороны, паракринное влияние SASP способствует старению соседних клеток, а аутокринное – поддерживает старение собственной клетки и накопление клеток иммунной системы в очаге. С другой стороны, SASP может способствовать пролиферации опухолевых клеток, индукции ЭМП, а также выходу клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток, из

старения и развитию иммуносупрессивного и провоспалительного микроокружения [52, 55]. Противоопухолевые эффекты проявляются, как правило, при предраке, тогда как прогрессия характерна для злокачественных клеток [52]. Накопленные в последнее время данные указывают на гетерогенность экспрессии генов секреторного фенотипа – профиль их экспрессии зависит как от типа клетки, так и от препарата [54]. Так, один и тот же индуктор старения вызывает повышение экспрессии гена *IL-1A* в эпителиоцитах и гена *HGF* – в фибробластах [56].

Основные характеристики клеток, которые приобрели фенотип старения, индуцированного противоопухолевой терапией, суммированы на рис. 1.

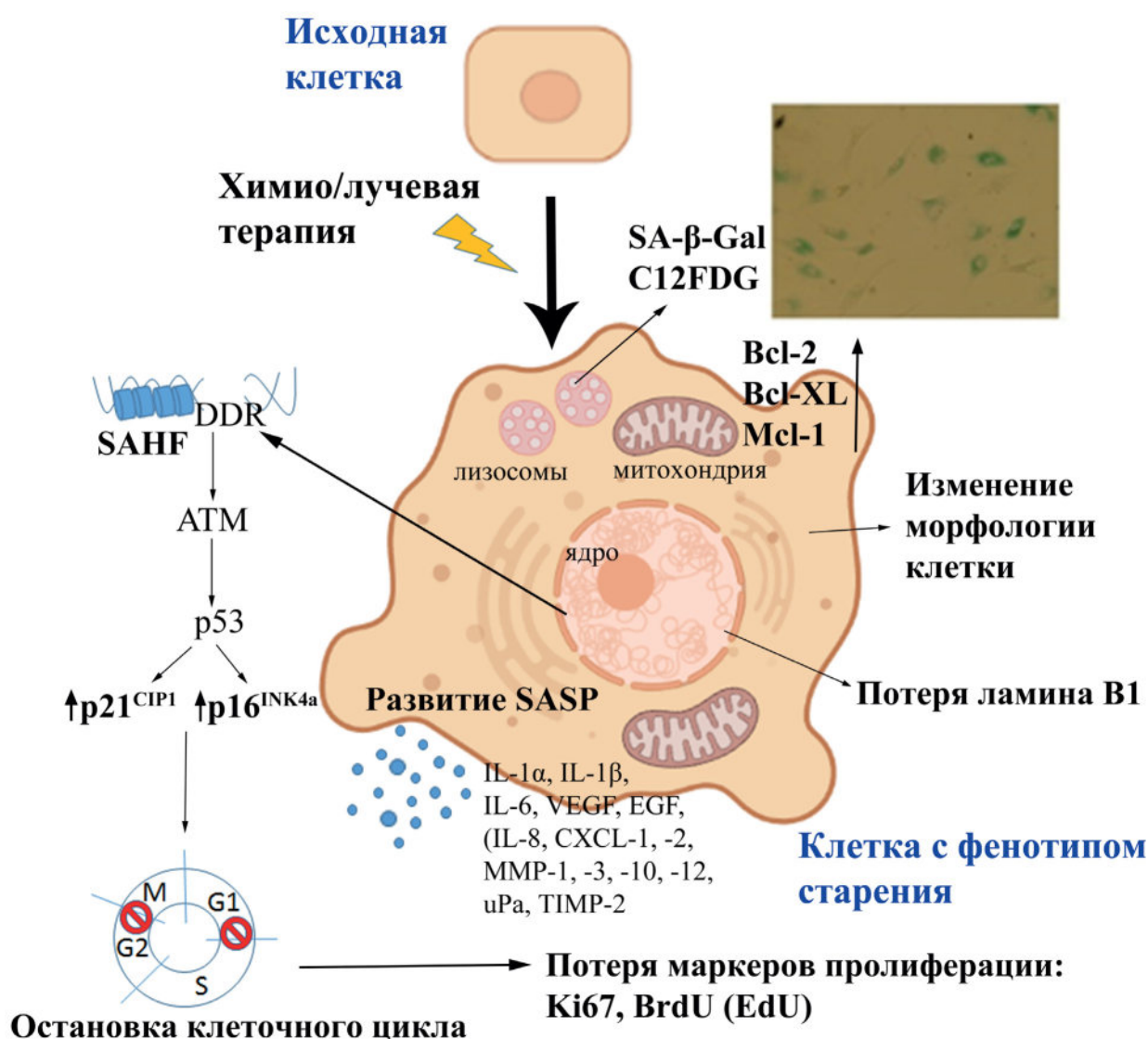


Рис. 1. Фенотип старения в опухолевых клетках, переживших терапевтическое воздействие. DDR – реакция на повреждение ДНК (DNA damage response); SAHF – очаги гетерохроматина, связанные со старением (senescence-associated heterochromatin foci); SASP – секреторный фенотип, связанный со старением (senescence-associated secretory phenotype)

РЕГУЛЯЦИЯ ВЫХОДА КЛЕТОК ИЗ СТАРЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ

В опухолевых клетках, которые приобрели фенотип старения, индуцированного нелетальными дозами химиопрепаратов, перепрограммируется транскрипция генов: профиль экспрессии генов в этих клетках отличается от такового в родительских [22, 57–60]. Особенно важно, что пережившие терапевтическое воздействие клетки могут оказаться агрессивны.

Перепрограммирование — механизм регуляции активно экспрессирующихся генов. Этот механизм опосредован циклин-зависимыми протеиназами 8 и 19 (паралоги CDK8/19), образующими киназный модуль с циклином C и белками Med12 и Med13 комплекса Mediator [61, 62]. Исследование перепрограммирования транскрипции генов в поколениях опухолевых клеток после терапевтического стресса позволит выявить новые мишени лечебных воздействий. Так, деполиплоидизация, как механизм «возврата» клеток из старения к повторной пролиферации, способствует формированию нового транскрипционного профиля в дочерних клетках за счет пропуска контрольных точек митоза. Проявлением изменения транскрипции генов при терапии является активация генов-маркеров стволовых клеток — такие клетки в дальнейшем дают новые опухолевые клоны с отличными от родительской клетки свойствами. Наконец, следствием изменения транскрипционного профиля клетки под воздействием химиотерапии является развитие паракринных эффектов, негативно влияющих на микроокружение опухолевых клеток. Эти аспекты анализированы в нижеследующих разделах.

Экспериментальные работы указывают на способность опухолевых клеток к выходу из индуцированного старения в результате перепрограммирования транскрипции генов [22, 57, 59, 63, 64]. В одних исследованиях говорится, что дочерние клоны, вернувшиеся к повторной пролиферации, являются более агрессивными и приобретают устойчивость к противоопухолевой терапии [57, 59, 60, 64, 65]. С другой стороны, ряд работ указывает на отсутствие отличий в чувствительности к химиопрепаратам между родительскими и дочерними (вышедшими из старения) клетками [14, 66, 67].

Ниже рассматриваются транскрипционные изменения в клетках, претерпевших индуцированное терапией старение, а также при выходе из этой стадии и пролиферации.

p21. Как отмечено выше, ключевым регулятором клеточного старения является белок p21. При вызванных химиолучевыми воздействиями повреждениях ДНК его уровень повышается [68]. Повышение уровня p21, как и активация его регулятора p53, является временным — после остановки клеточного цикла его уровень снижается [13, 43]. Результатом индукции p21 и остановки цикла вследствие воздействия невысоких доз химиотерапевтических агентов является возникновение старения [69]. Однако показана и парадоксальная роль p21 — в зависимости от условий этот белок может способствовать как пролиферации клеток, так и старению [68, 70]. В зависимости от исходного уровня p21 при действии сублетальной дозы доксорубина клетки могут приобрести фенотип старения (высокий или низкий уровень белка) или избежать этой стадии и продолжить пролиферацию (средний уровень белка) [70]. На основе этих данных авторы определили так называемую «Goldilocks» («золотая середина») — модель, согласно которой исходный уровень p21 определяет результат действия доксорубина: при высоком и низком уровне белка — это старение, при среднем — преходящая остановка клеточного цикла и возврат к пролиферации. Важно, что последнее является не выходом клетки из старения, а именно избеганием его формирования.

Rohnalter et al. [13] наблюдали динамику изменения белков в течение 30 дней после обработки клеток карбоплатином с индукцией старения. Пик активации p21 приходился на 14-й день, после чего количество p21 снижалось до начального уровня. Динамика изменения уровня p21 обратно коррелировала с количеством BrdU-положительных клеток — значительное снижение на 7–14 дни и увеличение их количества к 21-му дню до уровня интактного контроля. В течение 14–30 дней наблюдались деполиплоидизация и пролиферация «гигантских» клеток (признак старения), т.е. имело место преодоление (выход) старения. Еще одно исследование, проведенное Saleh et al. [63], также подтверждает корреляцию между снижением p21 через некоторое время после добавления этопозиды (ингибитор топоизомеразы II) и выходом этих клеток из старения. В других работах также обнаружена взаимосвязь между снижением p21 и выходом клеток из индуцированного химиотерапией старения [71–73].

Снижение уровня p21 также способствует выходу клеток из старения, индуцированного aberrантной экспрессией онкогенов [74]. Кроме того, нокдаун гена *p21* стимулировал

пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток на поздних пассажах (репликативное старение) [75]. В этих исследованиях наблюдали корреляцию между снижением p21 и выходом опухолевых клеток из стадии клеточного старения. С другой стороны, ряд работ указывает, что ингибирование экспрессии p21 вызывает апоптоз [12, 47, 76]. Так, нокаут или нокаут p21 и последующее действие химиопрепаратов приводило к апоптозу, а не старению [47, 76, 77]. Выше отмечено, что воздействие на клетки невысоких доз доксорубина приводит к формированию фенотипа старения, сопровождающегося повышением p21. Напротив, при действии высоких доз препарата происходит снижение p21 и апоптоз [12, 78]. Зависимость между дозами доксорубина, уровнем p21 и переключением апоптоза и старения исследована Zhang et al. [79]: авторы указали на ключевую роль ДНК метилтрансферазы 3а (DNMT3a). При действии высоких, вызывающих апоптоз, концентраций доксорубина происходит p53-зависимое увеличение экспрессии гена метилтрансферазы, которая, в свою очередь, ингибирует экспрессию p21 за счет снижения ацетилирования гистонов H3 и H4 в промоторе этого гена. DNMT3a в этом случае действует не как метилтрансфераза, т.е. не влияет на метилирование (по данным анализа 47 CpG-островков в области от -221 п.н. до +214 п.н. от старта транскрипции). DNMT3a способствует обогащению промотора p21 деацетилазой HDAC1, в результате чего снижается ацетилирование гистонов. Похожая картина наблюдается при облучении: результатом нокаута или нокаута p21 является не старение (характерное для экспрессии p21), а апоптоз [80, 81].

Интересно, что зависимость между снижением и/или отсутствием экспрессии p21 и апоптозом в ответ на химиотерапевтические агенты наблюдается именно тогда, когда p21 ингибируется до воздействия: этим клетка избегает старения и подвергается апоптозу. Однако в стареющей клетке снижение p21 способствует не апоптозу, а возврату к пролиферации и выживанию [70]. Это можно объяснить тем, что отсутствие p21 не приводит к остановке клеточного цикла, а накопление повреждений от химиолучевого воздействия приводит к апоптозу. При наступлении старения происходит временное увеличение p21 и задержка клеточного цикла, что позволяет «справиться» с повреждениями. Возможно, эскалация воздействий приводит к массивным неустраняемым повреждениям и гибели клетки, тогда как при использовании сублетальных доз отдельные

клетки выживают; при последующем снижении p21 эти клетки способны к пролиферации.

Гипоксия. Как правило, ответ опухолевых клеток на терапевтические воздействия исследуют в нормоксии (20% O₂). В организме новообразования могут развиваться в условиях гипоксии [71]. В ряде работ обнаружено влияние гипоксии на устойчивость клеток к химиотерапии [82, 83]. В условиях гипоксии (1% O₂) на 7-й день после обработки клеток аденокарциномы легкого A549 цисплатином происходит выход из блока клеточного цикла и возвращение способности клеток пролиферировать [71]. В условиях же нормоксии клетки, перенесшие обработку цисплатином, накапливались в G2/M; наблюдалась полиплоидизация. Авторы указывают на ключевую роль p21 в выходе клеток из старения — после воздействия цисплатином в гипоксии уровень p21 был значительно ниже, чем в клетках, культивировавшихся в нормоксии. Кроме того, в условиях гипоксии наблюдалось увеличение экспрессии ключевых генов-регуляторов перехода из G2 в митоз — циклина B1 и Cdc2, а также мезенхимального маркера N-кадгерина. Схожие результаты получены на линии аденокарциномы толстой кишки HCT116 при действии иринотекана. Авторы заключают, что в гипоксии выход клеток из старения регулируется посредством p53/p21 с последующим переходом из G2 в митоз и развитием ЭМП [71]. На роль CDK1 в выходе из старения также указывает применение ингибиторов этой протеинкиназы, что препятствует преодолению фенотипа старения и вызывает гибель клеток [67].

Депполиплоидизация. В отдельных линиях под действием относительно невысоких доз химиопрепаратов фенотип старения сопровождается образованием гигантских полиплоидных клеток [46, 84]. Этот процесс является одним из механизмов выхода клеток из старения и формирования дочерних клонов [59, 66, 85, 86]. Количество полиплоидных клеток зависит от интенсивности цитотоксического стресса: чем выше концентрация химиопрепарата, тем выше полиплоидизация [48, 87]. Wang et al. [47] показали, что действие камтотецина на клетки рака легкого H1299 приводит к образованию полиплоидов в стареющих клетках; отмечено формирование колоний через 6 дней после обработки препаратом. Повышенная активность CDK1 способствует выживанию полиплоидных клеток, способных пролиферировать. В других исследованиях подтверждается участие этой протеинкиназы в выходе клеток из старения [64, 65, 67].

Влияние деполиплоидизации как механизма возврата клеток к пролиферации подтверждено на линии HCT116 (формирование полиплоидов под действием доксорубина [40]). В этой работе клетки аденокарциномы молочной железы MCF7, которые приобрели фенотип старения без формирования полиплоидных клеток, не образовывали дочерние клоны. Авторы указывают на роль активных форм кислорода (АФК) в выходе клеток из старения. Применение антиоксиданта Trolox перед добавлением доксорубина снижало уровень АФК; такие клетки не образовывали колоний. Предполагается, что АФК необходимы в стадии старения для активации пролиферации. Отметим, что на фенотип старения АФК не влияли [40]. В дочерних клонах снижается уровень АФК; эти клоны — потомство стареющих клеток с высоким уровнем АФК [88].

Vojko et al. [58] показали, что деполиплоидизация гигантских полиплоидов в стареющих клетках MDA-MB-231 сопровождается атипичным делением. Авторы выявили снижение аутофагии в полиплоидных клетках в стадии старения и ее возрастание в клетках, преодолевших эту стадию. Действие на клетки паклитакселя инициирует эндоредупликацию — отдельные клетки становятся гигантскими полиплоидными, остальные подвергаются апоптозу. Полиплоиды сохраняют способность к эндоредупликации, а также к делению с помощью почкования ядра — дочерние клетки «приобретают» цитоплазму, отделяются от гигантской родительской клетки, проходят нормальный клеточный цикл и способны к длительной пролиферации. Изменения генома в таких дочерних клетках могут обуславливать усиление признаков злокачественной трансформации [89, 90]. В ряде исследований подтверждено, что почкование является основным механизмом деполиплоидизации и образования дочерних клонов [86, 91, 92].

Деполиплоидизация может сопровождаться изменениями в транскрипции генов-маркеров стволовых клеток. Так, показано увеличение экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* и *SSEA1* в гигантских клетках в ответ на паклитаксель [90]. В полиплоидных клетках (линия CT116) обнаружено повышение экспрессии генов-маркеров стволовых клеток *NANOG* и *CD24*. Показана способность этих полиплоидов к формированию дочерних колоний [93]. Положительная корреляция между образованием гигантских полиплоидных клеток и повышением экспрессии генов стволовости подтверждена и в других работах [48, 94].

Гены-маркеры стволовых клеток. В опухолевых клетках, которые приобрели фено-

тип старения, индуцированного невысокими дозами химиопрепаратов, происходит перепрограммирование транскрипции генов: транскрипционная программа этих клеток отличается от родительской и направлена на выживание этих клеток [22]. Не удивительно, что многие работы указывают на активацию экспрессии генов-маркеров стволовых клеток (МСК) (*CD44*, *CD133*, *NANOG* и др.) в опухолевых клетках при индуцированном химиопрепаратами старении [22–24]. Одними из первых на это обратили внимание Sabisz и Sklandanowski [85], обнаружившие, что в 1% клеток аденокарциномы легкого A549, преодолевших старение, экспрессируются маркеры стволовости *CD34* и *CD117*. Milanovic et al. [22] показали, что клетки, находящиеся в стадии доксорубин-индуцируемого старения, имеют измененный транскрипционный профиль экспрессии генов стволовости, в частности, *ALDH*, ABC-транспортеров, *CD133* и *CD34*. Результаты получены на линиях клеток различного происхождения, а также на первичных опухолях пациентов и подтверждены для онкоген-индуцируемого (B-Raf) и репликативного старения. Выход клеток из старения авторы связывают именно с приобретением ими свойств стволовости.

В исследовании, проведенном Karabici et al. [23], показано влияние доксорубина на транскрипционный профиль генов-маркеров стволовых клеток при становлении фенотипа старения. Клетки карциномы печени HuH7 были разделены на две популяции по экспрессии в них маркеров $ErCaM^+/CD133^+$ и $ErCaM^-/CD133^-$. В обеих популяциях индуцировалось клеточное старение и показана их способность к выходу из этой стадии. Интересно, что доксорубин приводил к изменению экспрессии генов стволовости (*NANOG*, *OCT4*, *KLF4*, *ErCaM*, *CK19*, *ANXA3*, *LGR5* и *ABCG2*) в обеих популяциях — дальнейшее увеличение в популяции $ErCaM^+/CD133^+$ и появление в популяции $ErCaM^-/CD133^-$, где первоначально гены стволовости не экспрессировались. Клетки из популяции $ErCaM^-/CD133^-$ при выходе из старения пролиферировали быстрее по сравнению с популяцией $ErCaM^+/CD133^+$, а также оказались способны инициировать опухоли *in vivo*. Авторы указывают на Wnt/ β -катенин-опосредованную регуляцию экспрессии генов-маркеров стволовых клеток под воздействием доксорубина [23]. Ингибирование этого сигнального пути приводило к снижению индуцированной доксорубином экспрессии генов-маркеров стволовых клеток: *LGR5*, *CK19*, *NANOG*, *KLF4*, *ANXA3* и *ABCG2*.

Увеличение популяции клеток $CD44^{+}/CD24^{-}$ обнаружено в клонах, переживших старение [24, 88]. В исследованиях профиля экспрессии генов стволовости в потомстве клеток, преодолевших старение, также обнаруживается увеличение экспрессии генов *CD133*, *OCT4*, *ALDH1*, *CD44* [39, 88, 95]. В таких клетках отмечают приобретение устойчивости к химиопрепаратам [96, 97] и активацию репарации ДНК, что также способствует выживанию клеток [98–100]. В клетках, преодолевших старение, отмечена активация транскрипционных факторов, регулирующих ЭМП, и метастатический потенциал [97, 101, 102]. Так, повышенная экспрессия *CD44* и *CD24* при раке носоглотки сопровождается увеличением экспрессии генов-маркеров стволовых клеток *OCT4*, *NANOG*, *KLF4* и *c-MYC* и генов *TWIST* и *SNAIL*, регулирующих ЭМП, т.е. наблюдается перепрограммирование транскрипции. Результатом коэкспрессии *CD44* и *CD24* является также повышенная способность клеток к миграции и инвазии и развитие лекарственной устойчивости. $CD44/CD24$ -индуцированное перепрограммирование транскрипции является Stat3-опосредованным: ингибитор S3I-201 отменяет эффекты гиперэкспрессии *CD44/CD24*: снижается экспрессия *OCT4* и *TWIST*, уменьшается миграционная способность клеток и лекарственная устойчивость [101]. Анализ коэкспрессии Е-кадгерина и виментина в β -катенин-положительных (маркер стволовости) клетках из биоптатов метастазов рака яичника выявил положительную корреляцию указанных маркеров с прогрессией опухоли (ЭМП, метастазирование) [97, 103].

Другие регуляторы. Итак, индуцированное химиотерапией старение клеток сопровождается перепрограммированием транскрипции, направленным на усиление фенотипов стволовости и злокачественной трансформации [22]. У таких клеток высок потенциал преодоления старения и формирования агрессивных клонов. Этот процесс регулируется, в частности, глутамином. Анализируя маркеры стволовости в клонах, образованных клетками MCF7, преодолевшими старение, Pacifco et al. [24] наблюдали увеличение доли клеток $CD44^{+}/CD24^{-/низ}$ в таких клонах. В этих клетках была обнаружена гиперэкспрессия транспортеров глутамин *SLC1A5* и *SNAT1*. Снижение концентрации глутамин в среде или ингибирование *SLC1A5* и *SNAT1* уменьшало популяцию родительских клеток, несущих маркеры стволовости, и снижало их способность к выходу из старения. Эта же группа авторов показала, что трабектедин (см. раздел «Лекарственные комбинации

для преодоления индуцированного старения опухолевых клеток») ингибирует преодоление старения путем снижения уровня транспортера глутамин *SLC1A5* и глутаминсинтетазы [104]. Пропролиферативный эффект транспортера глутамин *SNAT1* показан и в других работах [105–107].

Помимо индукции экспрессии маркеров стволовых клеток, при старении происходят изменения транскрипции и других генов – потенциальных маркеров выхода клеток из этой стадии. С помощью протеомного анализа обнаружен белок AGR2 семейства протеиндисульфидизомераз [108], гиперэкспрессированный в клетках рака молочной железы [109]. Этому белку отводят роль в метастазировании и устойчивости клеток к тамоксифену и доксорубину [110, 111]. Уровень AGR2 увеличивается в клетках MCF7, вышедших из старения, индуцированного доксорубином, но не в клетках, остающихся на этой стадии. Ингибирование AGR2 приводит к значительному снижению количества клонов, способных преодолеть старение. Кроме того, внеклеточный (секретируемый) AGR2 увеличивает количество вышедших из стадии старения клонов. Авторы указывают на mTORC2/Akt-опосредованный механизм действия AGR2 на выход из старения – ингибирование AGR2 – сопровождается снижением фосфорилирования Akt по Ser473, что препятствует выходу клеток из индуцированного доксорубином старения [77, 109]. Этот вывод также подтверждается тем, что результатом ингибирования mTOR и AKT с помощью торина и iAKT1/2 соответственно является предотвращение выхода клеток из стадии клеточного старения [77, 109].

Jonchere et al. [66] ранее показали способность клеток LS174T к выходу из старения, индуцированного метаболитом иринотекана SN38. Обнаружено, что антиапоптотические белки Mcl-1 и Bcl-xL необходимы для выживания клеток на ранних стадиях ответа на SN38. Кроме того, снижение экспрессии *Mcl-1* с использованием РНК-интерференции, а также ингибирование Mcl-1 и Bcl-xL с помощью пан-Bcl-2, блокатора ABT737, значительно уменьшало долю клеток, преодолевших старение. В других исследованиях подтверждается роль Mcl-1 в этом процессе [74, 112]. Так, показана зависимость выхода из онкоген-индуцированного (H-RasV12) старения, сопровождающегося снижением p21, от экспрессии *Mcl-1* и *Bcl-xL*: нокдаун этих генов приводил к апоптозу, тогда как в родительских клетках такого эффекта не наблюдали [74]. Также гиперэкспрессия *Mcl-1* приводит к увеличению доли

клеток, вышедших из доксорубицин-индуцированного старения [112].

Интересно, что в другой работе применение ингибитора АВТ737 приводило к увеличению дочерних колоний [57]. Такой же результат получен и при нокдауне антиапоптотического гена *Bcl-2*. Постановка эксперимента в этой работе отличалась от экспериментов Jonchere et al. [66]. Yang et al. [57] изучали влияние вторичных воздействий: ингибирования антиапоптотических белков, культивирования в среде без глюкозы, применения другого препарата — после 7-дневной инкубации с доксорубицином — на способность стареющих клеток к повторной пролиферации. Иными словами, ингибитором АВТ737 обрабатывали клетки после 7 дней с доксорубицином, тогда как в работе Jonchere et al. [66] Mcl-1 и Bcl-xL ингибировали одновременно с доксорубицином. Похожая картина наблюдается и в случае с p21 (см. подраздел «p21») — нокаут/нокдаун до воздействия вызывает апоптоз при добавлении химиопрепарата, тогда как снижение p21 через определенное время после воздействия позволяет клеткам возобновить пролиферацию. Так как Bcl-2 способствует остановке клеточного цикла и увеличению p27 [113], то ингибирование функции Bcl-2 в клетках на стадии старения приводит к снижению экспрессии p27 и возврату клеток к пролиферации [57].

В указанной работе проанализировано влияние и других воздействий на выход клеток из старения. Отсутствие глюкозы в среде при культивировании стареющих клеток (7 дней с доксорубицином), а также обработка камптотецином приводят к формированию большего количества дочерних колоний, чем в среде с физиологической концентрацией глюкозы. В дочерних клонах изменен транскрипционный профиль и повышена способность к миграции и инвазии.

В ходе протеомного исследования секрета стареющих клеток идентифицирован тромбоспондин-1 (TSP1), снижение которого приводит к значительному увеличению числа клонов, способных преодолеть старение [72]. Эффект TSP1 опосредован его рецептором CD47; снижение экспрессии последнего также увеличивает способность стареющих клеток к повторной пролиферации. Кроме того, в клетках с низкой экспрессией CD47 снижается уровень p21 и увеличивается экспрессия пролиферативного антигена Ki-67. В соответствии с другими работами (см. выше) ингибирование гена *p21* способствует выходу из старения, которое может быть опосредовано увеличением экспрессии гена *c-MYC*, что приводит к снижению уровня CD47 [72].

Ингибирование mTOR препятствует выходу клеток LS174T (рак толстой кишки) и MCF7 из старения, индуцированного SN38 [73]. Этот же эффект наблюдали при нокдауне гена *RAPTOR*, продукт которого связывается с mTOR и необходим для его активации. Известно, что mTOR является активатором транскрипции генов тРНК в опухолевых клетках [114]. Ингибирование mTOR приводит к снижению тРНК^{Tyr}-GTA и тРНК^{Leu}-CAA. Напротив, в дочерних клонах значительно увеличивались тРНК^{Tyr}-GTA и тРНК^{Leu}-CAA. Эти данные говорят об опосредованном определенными тРНК механизме выхода клеток из старения. Авторы подтвердили этот вывод с помощью ингибирования активности специфических лигаз — LARS (тРНК^{Leu}), YARS (тРНК^{Tyr}) и CARS (тРНК^{Cys}, отрицательный контроль) — и показали, что снижение уровня первых двух лигаз значительно уменьшало количество дочерних колоний. Инактивация YARS связана со снижением экспрессии пропролиферативных генов-мишеней транскрипционного фактора E2F1 в клетках MCF7. Однако в клетках LS174T подобной связи не наблюдали, что указывает на роль контекст-специфических факторов в механизме выхода клеток из старения [73]. Среди таких особенностей — стадия нарушения клеточного цикла. Так, клетки HCT116, в которых задержка цикла происходила на стадии G1 с последующей индукцией старения, формировали больше колоний, чем клетки, в которых остановка цикла происходила на других стадиях [115].

Еще одной потенциальной мишенью для действия ингибиторов индуцированного химиотерапией клеточного старения и/или выхода клеток из этой стадии является белок сурвивин (survivin, BIRC5) из семейства ингибиторов апоптоза (inhibitor of apoptosis, IAP). Гиперэкспрессия гена, кодирующего сурвивин (*BIRC5*), обнаружена в клетках, выходящих из старения, и связана с устойчивостью к химиопрепаратам [116]. Активность гена *BIRC5* регулируется комплексами циклин B–CDK1. Ингибирование экспрессии *BIRC5* до воздействия камптотецином приводит к переключению клеток H1299 со старения (вызываемого той же дозой препарата при отсутствии подавления сурвивина) на апоптоз [116]. При исследовании роли клеточного контекста, концентраций препаратов, сурвивина и апоптоза установлено, что отсутствие сурвивина в клетках тройного негативного рака молочной железы (линия MDA-MB-231) усиливает апоптоз при воздействии невысоких концентраций доцетаксела, тогда как в клетках Hela доля апоптотических клеток при тех же воздействиях снижается [117].

Интересно, что снижение экспрессии *BIRC5* в клетках, преодолевших старение, также приводит к увеличению апоптотической фракции subG1. Этот результат указывает, что даже в клетках, преодолевших старение и вернувшихся к пролиферации, транскрипционная программа отличается от таковой в интактных клетках. Снижение уровня сурвивина после обработки клеток СРТ ингибирует образование колоний [116]. Этот же эффект наблюдается и в клетках Hela после воздействия доцетакселем — ингибирование экспрессии *BIRC5* препятствует выходу клеток из стадии старения [117].

При исследовании роли сурвивина и CDK1 в выходе клеток из стадии старения установлено, что нокдаун *BIRC5* в клетках глиобластомы приводит к значительному снижению колониеобразования после индуцированного темозоломидом старения. Напротив, гиперэкспрессия *BIRC5* и *CDK1* способствовали возврату клеток к пролиферации. Клетки с пониженной экспрессией *BIRC5* более чувствительны к темозоломиду [60]. В целом, сурвивин рассма-

тривается как перспективная мишень противоопухолевой терапии [118].

Ключевыми регуляторами перехода клетки из G2/ M в G1 следующего цикла являются циклин D1 и протеинкиназа CDK4. Уровень циклина D1 повышается при индукции старения, тогда как CDK4 регулирует выход из этой стадии: ингибирование CDK4 палбоциклом или РНК-интерференцией значительно снижает количество клонов, преодолевших старение, индуцированное доксорубицином и SN38 [119]. Мишенью CDK4 является транскрипционный фактор E2F1, регулирующий активность метилтрансферазы EZH2, важной для прогрессии опухоли [120, 121]. Экспрессия этой метилтрансферазы снижается на начальных стадиях старения и возобновляется в клонах, преодолевших старение (вторичная пролиферация). Ингибирование активности метилтрансферазы с помощью 3-деазанепланцина А и GSK343 значительно снижает количество вышедших из старения клонов. Комбинация ингибитора протеинкиназ CDK4/6

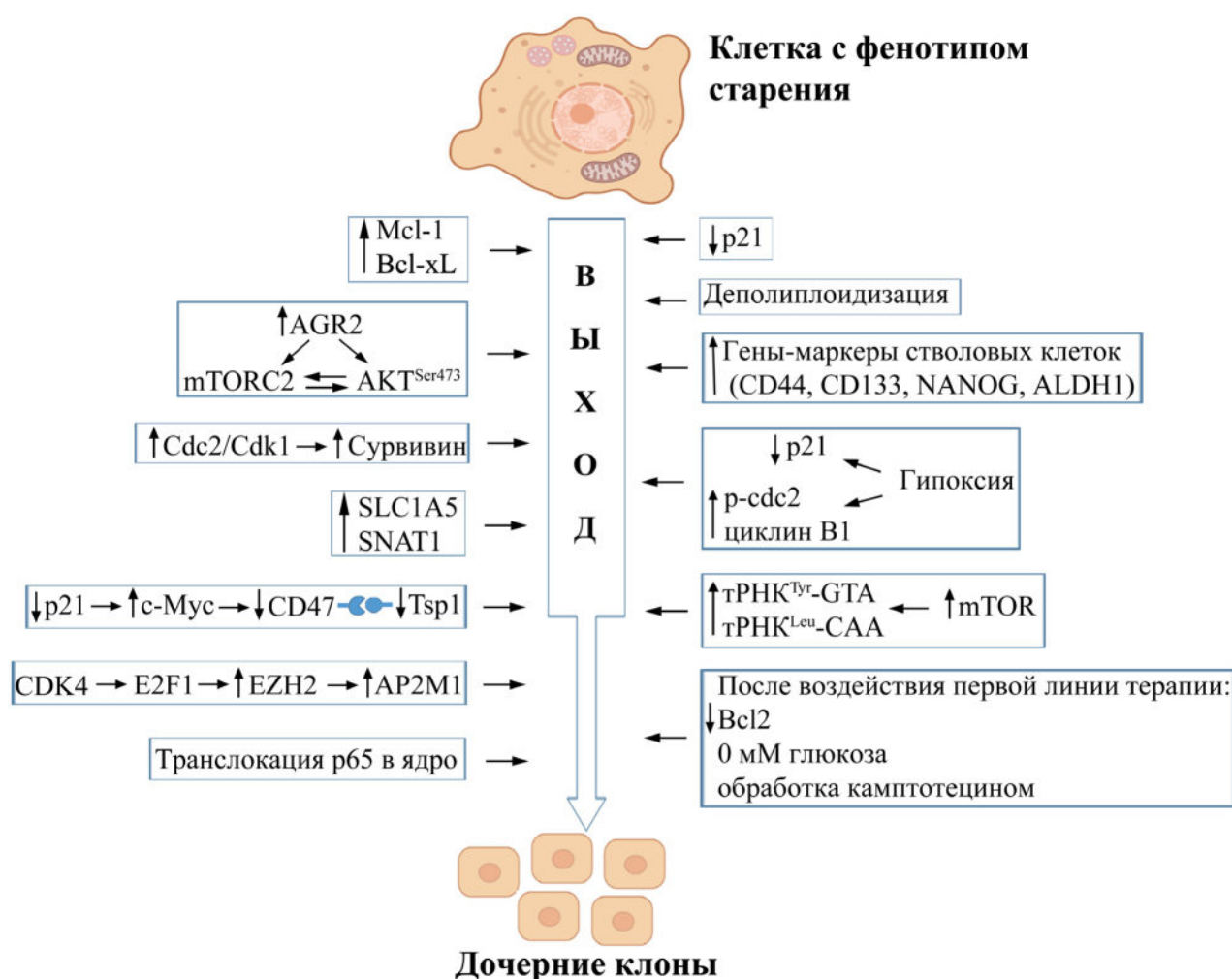


Рис. 2. Регуляция выхода клеток из старения, индуцированного действием химиопрепаратов

(палбоциклиба) и метилтрансферазы (GSK343) усиливает антипролиферативный эффект отдельного соединения. С помощью протеомного анализа обнаружена мишень метилтрансферазы — белок AP2M1, являющийся субъединицей адапторного комплекса AP2. Ингибирование экспрессии AP2M1 препятствует выходу клеток из старения [119].

Возникновение старения сопровождается активацией NF-κB (p65, RelA) и его генов-мишеней. Проявлением этой активности является SASP [51, 122]. Однако недавно обнаружено, что p65 играет роль и в выходе клеток из старения [123]. Для выхода клеток глиобластомы (линии U87, SF268 и первичная культура из опухоли пациента) из индуцированного ципрофлоксацином старения необходима транслокация p65 в ядро: ее ингибирование анакардовой кислотой (anacardic acid) и JSH23 способствует продлению старения и гибели клеток. Данные результаты были также подтверждены *in vivo* — обработанные ципрофлоксацином клетки U87, которые приобрели фенотип старения, при трансплантации мышам образовывали агрессивную опухоль, тогда как комбинация ципрофлоксацина и JSH23 предотвращала формирование опухоли [123].

В процессе рецензирования данного обзора вышла еще одна статья, посвященная исследованию перепрограммирования транскрипции генов, как механизма регуляции пластичности опухолевых клеток и приобретению ими устойчивости к химиотерапии [124]. В своей работе авторы указывают на уникальную роль одного из важнейших компонентов SASP, EREG (эпирегулина), пептидного гормона из семейства эпидермальных ростовых факторов, в малигнизации микроокружения опухолевых клеток, подвергшихся действию химиотерапии, и приобретению ими устойчивости к препаратам. Ген *EREG* активируется в ответ на повреждение ДНК с участием NF-κB и транскрипционного фактора E/CBP. Секреция EREG клетками стромы «перепрограммирует» транскрипционный профиль опухоли: активируются пролиферация и инвазивность, снижается ответ на действие лекарств. Элиминация EREG ингибирует процессы малигнизации микроокружения, что указывает на EREG, как на важнейший компонент SASP и потенциальную мишень для терапии с целью минимизации последствий терапии, в частности становления лекарственной устойчивости [124].

На рис. 2 представлены механизмы регуляции выхода клеток из старения, индуцированного противоопухолевыми воздействиями.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Как следует из вышеизложенного, приобретение опухолевыми клетками фенотипа старения — неблагоприятный результат терапевтических воздействий. Этим обусловлена разработка препаратов, воздействующих преимущественно на стареющие клетки (сенолитическая терапия). Среди таких препаратов в первую очередь ингибиторы механизмов выживания клетки — например, ингибиторы Bcl-2 (Bcl-W и Bcl-xL), навитоклакс и венетоклакс [125, 126]. Для ингибирования SASP целесообразно применение блокаторов NF-κB и C/EBPβ — транскрипционных факторов, регулирующих секреторный фенотип [51, 122], а также ингибиторы mTOR (прототип — рапамицин) для снижения экспрессии IL-1α [127]. Заслуживает внимания элиминация стареющих клеток воздействием на эффекторы иммунной системы: NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты и лимфоциты, несущие специфические химерные рецепторы (CAR-T) для лизиса клеток в стадии старения [128].

Развитие сенолитиков в комбинации с химиолучевыми воздействиями перспективно для снижения риска рецидивирования опухолей. Навитоклакс улучшает эффект противоопухолевой химиотерапии за счет индукции в клетках апоптоза с помощью ингибирования антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [126, 129]. Он обладает широким спектром активности, действуя на разные типы клеточных линий [130, 131]. Однако его применение ограничено из-за тромбоцитопении и нейтропении, обуславливающих общерезорбтивную токсичность [14, 132, 133]. Комбинация дазатиниба (ингибитор тирозинкиназы Abl, применяемый в лечении Bcr-Abl-положительного хронического миелоидного лейкоза) и флавоноида кверцетина также используется для элиминации стареющих клеток [129, 132]. Более эффективный флавоноид физетин [134, 135] оказывает противоопухолевое действие на линиях меланомы, рака легкого, молочной железы, носоглотки, предстательной железы: подавляет пролиферацию, способность клеток к миграции и инвазии, активирует апоптоз [136, 137]. Эти эффекты физетина обусловлены активацией фосфатазы PTEN и подавлением Akt/GSK-3β-зависимого сигналинга в культивируемых клетках MDA-MB-231 (BT549) и *in vivo* [136]. Физетин способен усиливать действие химиопрепаратов, что было показано в ряде работ [138, 139].

Комбинация физетина с низкими дозами 5-фторурацила более эффективна по сравнению с 5-фторурацилом в монотерапии за счет снижения фосфатидилинозитол-3-киназы PI3K и уменьшения фосфорилирования Akt [138]. Кроме того, физетин повышает чувствительность к цисплатину клеток, которые приобрели устойчивость к этому соединению [139].

Повышение p21, индуцированное химио- и лучевыми воздействиями, активация генов-мишеней p21, а также активация транскрипционного фактора NF-κB играют ключевую роль в развитии паракринных эффектов SASP, поддерживающих жизнеспособность опухоли. Группа Roninson установила, что ингибирование p21-зависимой транскрипции может снижать эти эффекты. Селективные ингибиторы транскрипционных протеинкиназ CDK8/19 ограничивали или отменяли паракринную регуляцию в клетках HCT116, обработанных сублетальными концентрациями доксорубина [140]. Важно, что ингибиторы CDK8/19 замедляли становление устойчивости к блокаторам рецептора эпидермального фактора роста — гефитиниба и эрлотиниба — в клетках BT474 и SKBR [141]. Эти важные наблюдения подтверждают роль транскрипционной регуляции, а именно перепрограммирования транскрипции, в формировании признаков старения опухолевых клеток после терапевтических воздействий.

Детальная характеристика сенолитиков и анализ механизмов их действия описаны в недавних обзорах [14, 129, 142]. Ниже суммированы сведения о клинических и экспериментальных соединениях, перспективных для сенолитических комбинаций.

Палбоциклиб — ингибитор протеинкиназ CDK4 и CDK6 — применяется в лечении рака молочной железы [143, 144]. Показано, что он способствует развитию фенотипа старения [145, 146]. Jost et al. [145] показали, что палбоциклиб увеличивает долю клеток, окрашиваемых на маркер старения C₁₂FDG. В сочетании с ионизирующим излучением палбоциклиб значительно снижал экспрессию гена *FOXM1*, продукт которого является ингибитором старения. Окрашивание клеток AGS и HGC-27 на β-галактозидазу выявило значительное увеличение старения в ответ на палбоциклиб и активацию экспрессии генов-маркеров старения — *p16*, *p21* и *Trp53*. Палбоциклиб снижает пролиферацию и колониеобразование; снижается экспрессия *Bcl-2*, увеличиваются уровни Вах и каспазы-3 [146]. Вместе с тем, как описано выше (см. подраздел «Другие регуляторы»), палбоциклиб препятствует выходу клеток из старения, индуцированного доксорубином, за счет

ингибирования сигнального пути CDK4/E2F1/EZH2/AP2M1 [119].

Гидроксихлорохин первоначально применялся для лечения малярии и аутоиммунных заболеваний. Также применяется для терапии злокачественных образований, способствуя апоптозу и регрессии ряда опухолей [147, 148]. Возможно, его использование в комбинированной терапии опухолей — показано, что его воздействие на опухолевые клетки легких, находящиеся в индуцированном цисплатином старении, приводит к снижению количества пролиферирующих клонов в условиях гипоксии и экспрессии маркеров пролиферации — циклина В и фосфорилированной формы Cdc2. Однако гидроксихлорохин может способствовать развитию ЭМП, снижая экспрессию Е-кадгерина при гипоксии [71].

Трабектедин является противоопухолевым интеркалятором [149]. Его воздействие на ряд клеток, находящихся в индуцированном химиопрепаратом клеточном старении, препятствует выходу клеток из этой стадии. Эффект проявляется даже при двух раундах химиотерапии, т.е. когда препаратом повторно воздействуют на клоны, вышедшие из клеточного старения, индуцированного в первом раунде. Использование трабектедина в комбинированной терапии приводит к снижению популяции клеток с фенотипами стволовости — CD44⁺/CD24^{–/низ}, а также к снижению белков метаболизма глутамин: глутаминсинтетазы и SLC1A5 [104, 150].

Использование ингибитора Akt (GSK690693) также снижает способность клеток к выходу из старения. Совместное применение GSK690693 и SN38 приводит к снижению количества клонов в результате активации белка Noxa, вызванной ингибированием Akt, связыванием Noxa с Mcl-1 и индукцией апоптоза [77]. Ингибиторы mTOR рапамицин и торин-1, известные как активаторы аутофагии, также перспективны как сенолитики благодаря снижению количества клеток, вышедших из индуцированного соединением SN38 старения [73]. Оломоуцин — ингибитор CDK1, использующийся главным образом в исследовательских целях. Действие этого соединения на клетки H1299 в стадии старения сопровождается снижением формирования пролиферирующих клонов за счет ингибирования активности CDK1 [67]. Эффект оломоуцина может быть опосредован снижением экспрессии *BRCIP5*: эктопическая экспрессия этого гена приводила к увеличению количества клонов, вышедших из старения, тогда как добавление оломоуцина отменяло этот эффект [116]. JSH23 является селективным ингибитором NF-κB. Его совместное применение

Ингибирование внутриклеточных мишеней в клетках, претерпевающих индуцированное терапией старение

Мишень	Способ ингибирования	Ссылки
SLC1A5/SNAT1	трабектедин	[104, 150]
Mcl-1*	siRNA	[66, 74]
Mcl-1/Bcl-xL	ABT737	[66]
AGR2	siRNA	[109]
mTOR/AKT	iAKT1/2, торин	[77, 109]
AKT	GSK690693	[77]
mTOR	торин-1/папамицин	[73]
лигазы: tPHK-лейцин/тирозин	LARS/YARS/siRNA	[73]
Cdc2/Cdk1	оломоуцин/siRNA	[67, 116]
Survivin*	siRNA	[60, 116, 117]
CDK4	палбоциклиб/siRNA	[119, 146]
EZH2	DZNep/GSK343	[119]
AP2M1	siRNA	[119]
p65 (транслокация в ядро)*	анакардовая кислота/JSH23	[123]
развитие аутофагии (мишень точно не определена)	гидроксихлорохин	[71]

Примечание. * Мишени, ингибирование которых также приводит к апоптозу.

с ципрофлоксацином препятствует выходу клеток из старения за счет ингибирования транслокации субъединицы p65 в ядро (подробно рассмотрено в подразделе «Другие регуляторы») [123].

В таблице суммированы способы ингибирования (фармакологические и РНК-интерференция) определенных мишеней в клетках в стадии клеточного старения (в комбинации с химиопрепаратами), результатом чего является снижение количества повторно пролиферирующих клонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пластичность — свойство, обуславливающее приспособление эукариот к разнообразным внешним раздражителям, в опухолевых клетках выступает как фактор адаптации к терапевтическим воздействиям и, следовательно, прогрессии новообразования. В основе такой способности лежит быстрая реорганизация метаболизма: клетки выживают после однократ-

ного воздействия, а новые свойства закрепятся в потомстве и послужат селективным преимуществом в последующих стрессовых ситуациях. Среди механизмов срочной адаптации мы выделяем перепрограммирование транскрипции генов — особую совокупность молекулярных событий, обеспечивающих оптимальный ответ клетки. Перепрограммированию подлежат не любые гены и не в любых ситуациях; кроме того, этот механизм тканеспецифичен.

Консервативные терапевтические воздействия опосредуются многочисленными путями передачи внутриклеточных сигналов, в результате чего изменяется профиль экспрессии генов. Правомерно предположить, что ответ клеток на терапевтические стимулы обусловлен быстрым приспособлением генной экспрессии. В последние годы показана экспериментальная возможность замедлить или предотвратить развитие признаков прогрессии в опухолевых клетках, переживших терапевтический стресс, благодаря мишень-направленному воздействию на механизмы перепрограммирования транскрипции.

Старение — нежелательный результат терапии: опухоль не просто выживает; проблему усложняет приобретение агрессивных свойств. Поэтому важным является внедрение в клиническую практику сенолитиков. Однако воздействия на клетки со сформированными свойствами могут оказаться недостаточными. Установление механизмов возникновения старения и образования опухоли с новыми фенотипическими признаками, а также развитие медицинской химии модуляторов транскрипции позволяют поставить вопрос о рациональных комбинациях таких соединений с применяемыми в клинике и новыми (проходящими испытания) препаратами для отмены «ускользания» опухолевых клеток и повышения эффективности лечения: добиваться не анти-

пролиферативного эффекта — временного и обратимого, но именно гибели опухоли.

Вклад авторов. Замкова М.А. — написание и редактирование текста; Персиянцева Н.А., Татарский В.В. — редактирование текста; Штиль А.А. — постановка проблемы, написание и финальное редактирование.

Финансирование. Работа при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00212; <https://rscf.ru/project/22-24-00212/>).

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. Kalyanaraman, B. (2020) Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol.*, **29**, 101394, doi: 10.1016/j.redox.2019.101394.
2. White, S. C., Anderson, H., Jayson, G. C., Ashcroft, L., Ranson, M., and Thatcher, N. (2000) Randomised phase II study of cisplatin-etoposide versus infusional carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer and mesothelioma, *Ann. Oncol.*, **11**, 201-206, doi: 10.1023/a:1008328605413.
3. Cai, F., Luis, M. A. F., Lin, X., Wang, M., Cai, L., Cen, C., and Biskup, E. (2019) Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment, *Mol. Clin. Oncol.*, **11**, 15-23, doi: 10.3892/mco.2019.1854.
4. Te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S. P. (2002) DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, **62**, 1876-1883.
5. Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., de Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., Sharpless, N. E., et al. (2017) Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse, *Cancer Discov.*, **7**, 165-176, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
6. Spallarossa, P., Altieri, P., Aloï, C., Garibaldi, S., Barisione, C., Ghigliotti, G., Fugazza, G., Barsotti, A., and Brunelli, C. (2009) Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **297**, H2169-H2181, doi: 10.1152/ajpheart.00068.2009.
7. Probin, V., Wang, Y., Bai, A., and Zhou, D. (2006) Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 551-560, doi: 10.1124/jpet.106.107771.
8. Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001) Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53, *Mol. Cell Biol.*, **21**, 1552-1564, doi: 10.1128/MCB.21.5.1552-1564.2001.
9. Soto-Gamez, A., Quax, W. J., and Demaria, M. (2019) Regulation of survival networks in senescent cells: from mechanisms to interventions, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2629-2643, doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.036.
10. Chen, Z., Cao, K., Xia, Y., Li, Y., Hou, Y., Wang, L., Li, L., Chang, L., and Li, W. (2019) Cellular senescence in ionizing radiation (review), *Oncol. Rep.*, **42**, 883-894, doi: 10.3892/or.2019.7209.
11. Fitsiou, E., Soto-Gamez, A., and Demaria, M. (2022) Biological functions of therapy-induced senescence in cancer, *Semin. Cancer Biol.*, **81**, 5-13, doi: 10.1016/j.semcancer.2021.03.021.
12. Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., and Giordano, A. (2020) Role of p53 in the regulation of cellular senescence, *Biomolecules*, **10**, 420, doi: 10.3390/biom10030420.
13. Rohnalter, V., Roth, K., Finkernagel, F., Adhikary, T., Obert, J., Dorzweiler, K., Bensberg, M., Muller-Brusselbach, S., and Muller, R. (2015) A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistent ovarian

- carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype, *Oncotarget*, **6**, 40005-40025, doi: 10.18632/oncotarget.5552.
14. Saleh, T., Bloukh, S., Carpenter, V. J., Alwohoush, E., Bakeer, J., Darwish, S., Azab, B., and Gewirtz, D. A. (2020) Therapy-induced senescence: An “old” friend becomes the enemy, *Cancers (Basel)*, **12**, 822, doi: 10.3390/cancers12040822.
 15. Shtil, A. A. (2002) Emergence of multidrug resistance in leukemia cells during chemotherapy: mechanisms and prevention, *J. Hematother. Stem Cell Res.*, **11**, 231-241, doi: 10.1089/152581602753658439.
 16. Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marion, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P. J., Munoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gomez-Lopez, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., and Serrano, M. (2016) Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming *in vivo*, *Science*, **354**, aaf4445, doi: 10.1126/science.aaf4445.
 17. Gabellini, C., Castellini, L., Trisciuglio, D., Kracht, M., Zupi, G., and Del Bufalo, D. (2008) Involvement of nuclear factor-kappa B in bcl-xL-induced interleukin 8 expression in glioblastoma, *J. Neurochem.*, **107**, 871-882, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05661.x.
 18. Fan, Y., Mao, R., and Yang, J. (2013) NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer, *Protein Cell*, **4**, 176-185, doi: 10.1007/s13238-013-2084-3.
 19. Wang, B., Kohli, J., and Demaria, M. (2020) Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends Cancer*, **6**, 838-857, doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.004.
 20. Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., and Alimonti, A. (2019) Cellular senescence: aging, cancer, and injury, *Physiol. Rev.*, **99**, 1047-1078, doi: 10.1152/physrev.00020.2018.
 21. Calcinotto, A., and Alimonti, A. (2017) Aging tumour cells to cure cancer: “pro-senescence” therapy for cancer, *Swiss Med. Wkly*, **147**, w14367, doi: 10.4414/smww.2017.14367.
 22. Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Dabritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dorr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I. A., Mendoza-Parra, M. A., Kanashova, T., Metzner, M., Pardon, K., Reimann, M., Trumpp, A., Dorken, B., Zuber, J., Gronemeyer, H., Hummel, M., et al. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness, *Nature*, **553**, 96-100, doi: 10.1038/nature25167.
 23. Karabici, M., Alptekin, S., Firtina Karagonlar, Z., and Erdal, E. (2021) Doxorubicin-induced senescence promotes stemness and tumorigenicity in EpCAM-/CD133- nonstem cell population in hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7, *Mol. Oncol.*, **15**, 2185-2202, doi: 10.1002/1878-0261.12916.
 24. Pacifico, F., Badolati, N., Mellone, S., Stornaiuolo, M., Leonardi, A., and Crescenzi, E. (2021) Glutamine promotes escape from therapy-induced senescence in tumor cells, *Aging (Albany NY)*, **13**, 20962-20991, doi: 10.18632/aging.203495.
 25. Dorr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Dabritz, J. H., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., Kratzat, S., Purfurst, B., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Graler, M., Hummel, M., Keller, U., Buck, A. K., Dorken, B., Willmitzer, L., et al. (2013) Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy, *Nature*, **501**, 421-425, doi: 10.1038/nature12437.
 26. Ratushnyy, A. Y., Rudimova, Y. V., and Buravkova, L. B. (2020) Replicative senescence and expression of autophagy genes in mesenchymal stromal cells, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1169-1177, doi: 10.1134/S0006297920100053.
 27. Yang, N., and Sen, P. (2018) The senescent cell epigenome, *Aging (Albany NY)*, **10**, 3590-3609, doi: 10.18632/aging.101617.
 28. Gonzalez-Meljem, J. M., Apps, J. R., Fraser, H. C., and Martinez-Barbera, J. P. (2018) Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis, *Br. J. Cancer*, **118**, 1283-1288, doi: 10.1038/s41416-018-0066-1.
 29. Zhao, Z., Dong, Q., Liu, X., Wei, L., Liu, L., Li, Y., and Wang, X. (2020) Dynamic transcriptome profiling in DNA damage-induced cellular senescence and transient cell-cycle arrest, *Genomics*, **112**, 1309-1317, doi: 10.1016/j.ygeno.2019.07.020.
 30. Gonzalez-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., and Munoz-Espin, D. (2021) A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*, *FEBS J.*, **288**, 56-80, doi: 10.1111/febs.15570.
 31. Davan-Wetton, C. S. A., Pessolano, E., Perretti, M., and Montero-Melendez, T. (2021) Senescence under appraisal: hopes and challenges revisited, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 3333-3354, doi: 10.1007/s00018-020-03746-x.
 32. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018) Hallmarks of cellular senescence, *Trends Cell Biol.*, **28**, 436-453, doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001.
 33. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9363-9367, doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
 34. Cahu, J., and Sola, B. (2013) A sensitive method to quantify senescent cancer cells, *J. Vis. Exp.*, **2**, 50494, doi: 10.3791/50494.
 35. Mikula-Pietrasik, J., Niklas, A., Uruski, P., Tykarski, A., and Ksiazek, K. (2020) Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**, 213-229, doi: 10.1007/s00018-019-03261-8.
 36. Dikovskaya, D., Cole, J. J., Mason, S. M., Nixon, C., Karim, S. A., McGarry, L., Clark, W., Hewitt, R. N.,

- Sammons, M. A., Zhu, J., Athineos, D., Leach, J. D., Marchesi, F., van Tuyn, J., Tait, S. W., Brock, C., Morton, J. P., Wu, H., Berger, S. L., Blyth, K., et al. (2015) Mitotic stress is an integral part of the oncogene-induced senescence program that promotes multinucleation and cell cycle arrest, *Cell Rep.*, **12**, 1483-1496, doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.055.
37. Matias, I., Diniz, L. P., Damico, I. V., Araujo, A. P. B., Neves, L. D. S., Vargas, G., Leite, R. E. P., Suemoto, C. K., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., Grinberg, L. T., Hol, E. M., Middeldorp, J., and Gomes, F. C. A. (2022) Loss of lamin-B1 and defective nuclear morphology are hallmarks of astrocyte senescence *in vitro* and in the aging human hippocampus, *Aging Cell*, **21**, e13521, doi: 10.1111/acer.13521.
38. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012) Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2066-2075, doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.
39. Liao, C., Xiao, Y., and Liu, L. (2020) The dynamic process and its dual effects on tumors of therapy-induced senescence, *Cancer Manag. Res.*, **12**, 13553-13566, doi: 10.2147/CMAR.S285083.
40. Mosieniak, G., Sliwinska, M. A., Alster, O., Strzeszewska, A., Sunderland, P., Piechota, M., Was, H., and Sikora, E. (2015) Polyploidy formation in doxorubicin-treated cancer cells can favor escape from senescence, *Neoplasia*, **17**, 882-893, doi: 10.1016/j.neo.2015.11.008.
41. Czarnecka-Herok, J., Sliwinska, M. A., Herok, M., Targonska, A., Strzeszewska-Potyrala, A., Bojko, A., Wolny, A., Mosieniak, G., and Sikora, E. (2022) Therapy-induced senescent/polyploid cancer cells undergo atypical divisions associated with altered expression of meiosis, spermatogenesis and EMT genes, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8288, doi: 10.3390/ijms23158288.
42. Kumari, R., and Jat, P. (2021) Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 645593, doi: 10.3389/fcell.2021.645593.
43. Shtutman, M., Chang, B. D., Schools, G. P., and Broude, E. V. (2017) Cellular model of p21-induced senescence, *Methods Mol. Biol.*, **1534**, 31-39, doi: 10.1007/978-1-4939-6670-7_3.
44. Romanov, V. S., Pospelov, V. A., and Pospelova, T. V. (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 575-584, doi: 10.1134/S000629791206003X.
45. Gire, V., and Dulic, V. (2015) Senescence from G2 arrest, revisited, *Cell Cycle*, **14**, 297-304, doi: 10.1080/15384101.2014.1000134.
46. Moein, S., Adibi, R., da Silva Meirelles, L., Nardi, N. B., and Gheisari, Y. (2020) Cancer regeneration: Polyploid cells are the key drivers of tumor progression, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1874**, 188408, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188408.
47. Wang, Q., Wu, P. C., Dong, D. Z., Ivanova, I., Chu, E., Zeliadt, S., Vesselle, H., and Wu, D. Y. (2013) Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape, *Int. J. Cancer*, **132**, 1505-1515, doi: 10.1002/ijc.27810.
48. Song, Y., Zhao, Y., Deng, Z., Zhao, R., and Huang, Q. (2021) Stress-induced polyploid giant cancer cells: unique way of formation and non-negligible characteristics, *Front. Oncol.*, **11**, 724781, doi: 10.3389/fonc.2021.724781.
49. Niklander, S. E., Lambert, D. W., and Hunter, K. D. (2021) Senescent cells in cancer: wanted or unwanted citizens, *Cells*, **10**, 3315, doi: 10.3390/cells10123315.
50. Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol.*, **6**, 2853-2868, doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
51. Salminen, A., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012) Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP), *Cell Signal.*, **24**, 835-845, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.006.
52. Takasugi, M., Yoshida, Y., Hara, E., and Ohtani, N. (2022) The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.16381.
53. Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., and Evans, S. S. (2014) The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment, *Semin. Immunol.*, **26**, 38-47, doi: 10.1016/j.smim.2014.01.008.
54. Junaid, M., Lee, A., Kim, J., Park, T. J., and Lim, S. B. (2022) Transcriptional heterogeneity of cellular senescence in cancer, *Mol. Cells*, **45**, 610-619, doi: 10.14348/molcells.2022.0036.
55. Lau, L., and David, G. (2019) Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype, *Expert Opin. Ther. Targets*, **23**, 1041-1051, doi: 10.1080/14728222.2019.1565658.
56. Faget, D. V., Ren, Q., and Stewart, S. A. (2019) Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 439-453, doi: 10.1038/s41568-019-0156-2.
57. Yang, L., Fang, J., and Chen, J. (2017) Tumor cell senescence response produces aggressive variants, *Cell Death Discov.*, **3**, 17049, doi: 10.1038/cddiscovery.2017.49.
58. Bojko, A., Staniak, K., Czarnecka-Herok, J., Sunderland, P., Dudkowska, M., Sliwinska, M. A., Salmina, K., and Sikora, E. (2020) Improved autophagic flux in escapers from doxorubicin-induced senescence/polyploidy of breast cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6084, doi: 10.3390/ijms21176084.
59. Puig, P. E., Guilly, M. N., Bouchot, A., Droin, N., Cathelin, D., Bouyer, F., Favier, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., Solary, E., Martin, F., and Chauffert, B.

- (2008) Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy, *Cell Biol. Int.*, **32**, 1031-1043, doi: 10.1016/j.cellbi.2008.04.021.
60. Song, Z., Pan, Y., Ling, G., Wang, S., Huang, M., Jiang, X., and Ke, Y. (2017) Escape of U251 glioma cells from temozolomide-induced senescence was modulated by CDK1/survivin signaling, *Am. J. Transl. Res.*, **9**, 2163-2180.
 61. Luyties, O., and Taatjes, D. J. (2022) The Mediator kinase module: an interface between cell signaling and transcription, *Trends Biochem. Sci.*, **47**, 314-327, doi: 10.1016/j.tibs.2022.01.002.
 62. Richter, W. F., Nayak, S., Iwasa, J., and Taatjes, D. J. (2022) The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 732-749, doi: 10.1038/s41580-022-00498-3.
 63. Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L., Murray, G. F., Alotaibi, M. R., Kawale, A. S., Elsayed, Z., Henderson, S. C., Yakovlev, V., Elmore, L. W., Toor, A., Harada, H., Reed, J., Landry, J. W., and Gewirtz, D. A. (2019) Tumor cell escape from therapy-induced senescence, *Biochem. Pharmacol.*, **162**, 202-212, doi: 10.1016/j.bcp.2018.12.013.
 64. Pluquet, O., Abbadie, C., and Coqueret, O. (2019) Connecting cancer relapse with senescence, *Cancer Lett.*, **463**, 50-58, doi: 10.1016/j.canlet.2019.08.004.
 65. Elmore, L. W., Di, X., Dumur, C., Holt, S. E., and Gewirtz, D. A. (2005) Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2637-2643, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1462.
 66. Jonchere, B., Vetillard, A., Toutain, B., Lam, D., Bernard, A. C., Henry, C., De Carne Trecesson, S., Gamelin, E., Juin, P., Guette, C., and Coqueret, O. (2015) Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1, *Oncotarget*, **6**, 409-426, doi: 10.18632/oncotarget.2774.
 67. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S. Y., and Wu, D. Y. (2005) Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers, *Cancer Res.*, **65**, 2795-2803, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1270.
 68. Ashraf, H. M., Moser, J., and Spencer, S. L. (2019) Senescence evasion in chemotherapy: a sweet spot for p21, *Cell*, **178**, 267-269, doi: 10.1016/j.cell.2019.06.025.
 69. Roninson, I. B. (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment, *Cancer Res.*, **63**, 2705-2715.
 70. Hsu, C. H., Altschuler, S. J., and Wu, L. F. (2019) Patterns of early p21 dynamics determine proliferation-senescence cell fate after chemotherapy, *Cell*, **178**, 361-373.e312, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.041.
 71. Olszewska, A., Borkowska, A., Granica, M., Karolczak, J., Zglinicki, B., Kieda, C., and Was, H. (2021) Escape from cisplatin-induced senescence of hypoxic lung cancer cells can be overcome by hydroxychloroquine, *Front. Oncol.*, **11**, 738385, doi: 10.3389/fonc.2021.738385.
 72. Guillon, J., Petit, C., Moreau, M., Toutain, B., Henry, C., Roche, H., Bonichon-Lamichhane, N., Salmon, J. P., Lemonnier, J., Campone, M., Verrielle, V., Lelievre, E., Guette, C., and Coqueret, O. (2019) Regulation of senescence escape by TSP1 and CD47 following chemotherapy treatment, *Cell Death Dis.*, **10**, 199, doi: 10.1038/s41419-019-1406-7.
 73. Guillon, J., Coquelet, H., Leman, G., Toutain, B., Petit, C., Henry, C., Boissard, A., Guette, C., and Coqueret, O. (2021) tRNA biogenesis and specific aminoacyl-tRNA synthetases regulate senescence stability under the control of mTOR, *PLoS Genet.*, **17**, e1009953, doi: 10.1371/journal.pgen.1009953.
 74. De Carne Trecesson, S., Guillemin, Y., Belanger, A., Bernard, A. C., Preisser, L., Ravon, E., Gamelin, E., Juin, P., Barre, B., and Coqueret, O. (2011) Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins, *J. Biol. Chem.*, **286**, 12825-12838, doi: 10.1074/jbc.M110.186437.
 75. Yew, T. L., Chiu, F. Y., Tsai, C. C., Chen, H. L., Lee, W. P., Chen, Y. J., Chang, M. C., and Hung, S. C. (2011) Knockdown of p21(Cip1/Waf1) enhances proliferation, the expression of stemness markers, and osteogenic potential in human mesenchymal stem cells, *Aging Cell*, **10**, 349-361, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00676.x.
 76. Yosef, R., Pilpel, N., Papisov, N., Gal, H., Ovadya, Y., Vadai, E., Miller, S., Porat, Z., Bendor, S., and Krizhanovsky, V. (2017) p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling, *EMBO J.*, **36**, 2280-2295, doi: 10.15252/embj.201695553.
 77. Vetillard, A., Jonchere, B., Moreau, M., Toutain, B., Henry, C., Fontanel, S., Bernard, A. C., Campone, M., Guette, C., and Coqueret, O. (2015) Akt inhibition improves irinotecan treatment and prevents cell emergence by switching the senescence response to apoptosis, *Oncotarget*, **6**, 43342-43362, doi: 10.18632/oncotarget.6126.
 78. Martinez, L. A., Yang, J., Vazquez, E. S., Rodriguez-Vargas Mdel, C., Olive, M., Hsieh, J. T., Logothetis, C. J., and Navone, N. M. (2002) p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells, *Carcinogenesis*, **23**, 1289-1296, doi: 10.1093/carcin/23.8.1289.
 79. Zhang, Y., Gao, Y., Zhang, G., Huang, S., Dong, Z., Kong, C., Su, D., Du, J., Zhu, S., Liang, Q., Zhang, J., Lu, J., and Huang, B. (2011) DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells, *Int. J. Cancer*, **128**, 551-561, doi: 10.1002/ijc.25365.

80. Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., and Janicke, R. U. (2006) p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation, *Cancer Res.*, **66**, 11254-11262, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1569.
81. Kuang, Y., Kang, J., Li, H., Liu, B., Zhao, X., Li, L., Jin, X., and Li, Q. (2021) Multiple functions of p21 in cancer radiotherapy, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **147**, 987-1006, doi: 10.1007/s00432-021-03529-2.
82. Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M. A., and Eckschlager, T. (2015) Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: the role of not only HIF-1, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, **159**, 166-177, doi: 10.5507/bp.2015.025.
83. Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H., and Shu, Y. (2019) Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment, *Mol. Cancer*, **18**, 157, doi: 10.1186/s12943-019-1089-9.
84. White-Gilbertson, S., and Voelkel-Johnson, C. (2020) Giants and monsters: Unexpected characters in the story of cancer recurrence, *Adv. Cancer Res.*, **148**, 201-232, doi: 10.1016/bs.acr.2020.03.001.
85. Sabisz, M., and Skladanowski, A. (2009) Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: implications for drug resistance and *in vitro* drug screening models, *Cell Cycle*, **8**, 3208-3217, doi: 10.4161/cc.8.19.9758.
86. Sikora, E., Czarnecka-Herok, J., Bojko, A., and Sunderland, P. (2022) Therapy-induced polyploidization and senescence: Coincidence or interconnection? *Semin. Cancer Biol.*, **81**, 83-95, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.11.015.
87. Lin, K. C., Torga, G., Sun, Y., Axelrod, R., Pienta, K. J., Sturm, J. C., and Austin, R. H. (2019) The role of heterogeneous environment and docetaxel gradient in the emergence of polyploid, mesenchymal and resistant prostate cancer cells, *Clin. Exp. Metastasis*, **36**, 97-108, doi: 10.1007/s10585-019-09958-1.
88. Achuthan, S., Santhoshkumar, T. R., Prabhakar, J., Nair, S. A., and Pillai, M. R. (2011) Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **286**, 37813-37829, doi: 10.1074/jbc.M110.200675.
89. Niu, N., Zhang, J., Zhang, N., Mercado-Urbe, I., Tao, F., Han, Z., Pathak, S., Multani, A. S., Kuang, J., Yao, J., Bast, R. C., Sood, A. K., Hung, M. C., and Liu, J. (2016) Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle, *Oncogenesis*, **5**, e281, doi: 10.1038/oncsis.2016.75.
90. Niu, N., Mercado-Urbe, I., and Liu, J. (2017) Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells, *Oncogene*, **36**, 4887-4900, doi: 10.1038/onc.2017.72.
91. Salmina, K., Bojko, A., Inashkina, I., Staniak, K., Dudkowska, M., Podlesniy, P., Rumnieks, F., Vainshelbaum, N. M., Pjanova, D., Sikora, E., and Erenpreisa, J. (2020) "Mitotic slippage" and extranuclear DNA in cancer chemoresistance: A focus on telomeres, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2779, doi: 10.3390/ijms21082779.
92. Sikora, E., Mosieniak, G., and Sliwinska, M. A. (2016) Morphological and functional characteristic of senescent cancer cells, *Curr. Drug Targets*, **17**, 377-387, doi: 10.2174/1389450116666151019094724.
93. Was, H., Czarnecka, J., Kominek, A., Barszcz, K., Bernas, T., Piwocka, K., and Kaminska, B. (2018) Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features, *Cancer Biol. Ther.*, **19**, 63-75, doi: 10.1080/15384047.2017.1385675.
94. Diaz-Carballo, D., Saka, S., Klein, J., Rennkamp, T., Acikelli, A. H., Malak, S., Jastrow, H., Wennemuth, G., Tempfer, C., Schmitz, I., Tannapfel, A., and Strumberg, D. (2018) A distinct oncogenetic multi-nucleated cancer cell serves as a source of stemness and tumor heterogeneity, *Cancer Res.*, **78**, 2318-2331, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1861.
95. Was, H., Barszcz, K., Czarnecka, J., Kowalczyk, A., Bernas, T., Uzarowska, E., Koza, P., Klejman, A., Piwocka, K., Kaminska, B., and Sikora, E. (2017) Bafilomycin A1 triggers proliferative potential of senescent cancer cells *in vitro* and in NOD/SCID mice, *Oncotarget*, **8**, 9303-9322, doi: 10.18632/oncotarget.14066.
96. Chen, J., Wei, H., Cheng, J., Xie, B., Wang, B., Yi, J., Tian, B., Liu, Z., Wang, F., and Zhang, Z. (2018) Characteristics of doxorubicin-selected multidrug-resistant human leukemia HL-60 cells with tolerance to arsenic trioxide and contribution of leukemia stem cells, *Oncol. Lett.*, **15**, 1255-1262, doi: 10.3892/ol.2017.7353.
97. Zhou, H. M., Zhang, J. G., Zhang, X., and Li, Q. (2021) Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **6**, 62, doi: 10.1038/s41392-020-00430-1.
98. Yuan, R., Liu, Q., Segeren, H. A., Yuniati, L., Guardavaccaro, D., Lebbink, R. J., Westendorp, B., and de Bruin, A. (2019) Cyclin F-dependent degradation of E2F7 is critical for DNA repair and G2-phase progression, *EMBO J.*, **38**, e101430, doi: 10.15252/embj.2018101430.
99. Schulz, A., Meyer, F., Dubrovskaya, A., and Borgmann, K. (2019) Cancer stem cells and radioresistance: DNA repair and beyond, *Cancers (Basel)*, **11**, 862, doi: 10.3390/cancers11060862.
100. Gold, A., Eini, L., Nissim-Rafinia, M., Viner, R., Ezer, S., Erez, K., Aqaq, N., Hanania, R., Milyavsky, M., Meshorer, E., and Goldberg, M. (2019) Spironolactone inhibits the growth of cancer stem cells by impairing DNA damage response, *Oncogene*, **38**, 3103-3118, doi: 10.1038/s41388-018-0654-9.
101. Shen, Y. A., Wang, C. Y., Chuang, H. Y., Hwang, J. J., Chi, W. H., Shu, C. H., Ho, C. Y., Li, W. Y., and Chen, Y. J. (2016) CD44 and CD24 coordinate the reprogramming of nasopharyngeal carcinoma cells

- towards a cancer stem cell phenotype through STAT3 activation, *Oncotarget*, **7**, 58351-58366, doi: 10.18632/oncotarget.11113.
102. Ortiz-Montero, P., Liu-Bordes, W. Y., Londono-Vallejo, A., and Vernot, J. P. (2018) CD24 expression and stem-associated features define tumor cell heterogeneity and tumorigenic capacities in a model of carcinogenesis, *Cancer Manag. Res.*, **10**, 5767-5784, doi: 10.2147/CMAR.S176654.
 103. Navas, T., Kinders, R. J., Lawrence, S. M., Ferry-Galow, K. V., Borgel, S., Hollingshead, M. G., Srivastava, A. K., Alcoser, S. Y., Makhoul, H. R., Chuaqui, R., Wilsker, D. F., Konate, M. M., Miller, S. B., Voth, A. R., Chen, L., Vilimas, T., Subramanian, J., Rubinstein, L., Kummar, S., Chen, A. P., et al. (2020) Clinical evolution of epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas, *Cancer Res.*, **80**, 304-318, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3539.
 104. Pacifico, F., Mellone, S., D'Incalci, M., Stornaiuolo, M., Leonardi, A., and Crescenzi, E. (2022) Trabectedin suppresses escape from therapy-induced senescence in tumor cells by interfering with glutamine metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, **202**, 115159, doi: 10.1016/j.bcp.2022.115159.
 105. Wang, K., Cao, F., Fang, W., Hu, Y., Chen, Y., Ding, H., and Yu, G. (2013) Activation of SNAT1/SLC38A1 in human breast cancer: correlation with p-Akt overexpression, *BMC Cancer*, **13**, 343, doi: 10.1186/1471-2407-13-343.
 106. Wang, M., Liu, Y., Fang, W., Liu, K., Jiao, X., Wang, Z., Wang, J., and Zang, Y. S. (2017) Increased SNAT1 is a marker of human osteosarcoma and potential therapeutic target, *Oncotarget*, **8**, 78930-78939, doi: 10.18632/oncotarget.20693.
 107. Bohme-Schafer, I., Lorentz, S., and Bosserhoff, A. K. (2022) Role of amino acid transporter SNAT1/SLC38A1 in human melanoma, *Cancers (Basel)*, **14**, 2151, doi: 10.3390/cancers14092151.
 108. Shishkin, S. S., Eremina, L. S., Kovalev, L. I., and Kovaleva, M. A. (2013) AGR2, ERp57/GRP58, and some other human protein disulfide isomerases, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1415-1430, doi: 10.1134/S000629791313004X.
 109. Maarouf, A., Boissard, A., Henry, C., Leman, G., Coqueret, O., Guette, C., and Lelievre, E. (2022) Anterior gradient protein 2 is a marker of tumor aggressiveness in breast cancer and favors chemotherapy-induced senescence escape, *Int. J. Oncol.*, **60**, 5, doi: 10.3892/ijo.2021.5295.
 110. Hrstka, R., Brychtova, V., Fabian, P., Vojtesek, B., and Svoboda, M. (2013) AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients, *Dis. Markers*, **35**, 207-212, doi: 10.1155/2013/761537.
 111. Li, Z., Zhu, Q., Hu, L., Chen, H., Wu, Z., and Li, D. (2015) Anterior gradient 2 is a binding stabilizer of hypoxia inducible factor-1 α that enhances CoCl₂-induced doxorubicin resistance in breast cancer cells, *Cancer Sci.*, **106**, 1041-1049, doi: 10.1111/cas.12714.
 112. Bolesta, E., Pfannenstiel, L. W., Demelash, A., Lesniewski, M. L., Tobin, M., Schlanger, S. E., Nallar, S. C., Papadimitriou, J. C., Kalvakolanu, D. V., and Gastman, B. R. (2012) Inhibition of Mcl-1 promotes senescence in cancer cells: implications for preventing tumor growth and chemotherapy resistance, *Mol. Cell Biol.*, **32**, 1879-1892, doi: 10.1128/MCB.06214-11.
 113. Crescenzi, E., Palumbo, G., and Brady, H. J. (2003) Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells, *Biochem. J.*, **375**, 263-274, doi: 10.1042/BJ20030868.
 114. Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., and Yu, K. (2010) Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 15380-15392, doi: 10.1074/jbc.M109.071639.
 115. Kitada, K., Pu, F., and Toi, M. (2019) Occurrence of senescence-escaping cells in doxorubicin-induced senescence is enhanced by PD0332991, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in colon cancer HCT116 cells, *Oncol. Lett.*, **17**, 1153-1159, doi: 10.3892/ol.2018.9657.
 116. Wang, Q., Wu, P. C., Roberson, R. S., Luk, B. V., Ivanova, I., Chu, E., and Wu, D. Y. (2011) Survivin and escaping in therapy-induced cellular senescence, *Int. J. Cancer*, **128**, 1546-1558, doi: 10.1002/ijc.25482.
 117. Han, T. L., Sha, H., Ji, J., Li, Y. T., Wu, D. S., Lin, H., Hu, B., and Jiang, Z. X. (2021) Depletion of Survivin suppresses docetaxel-induced apoptosis in HeLa cells by facilitating mitotic slippage, *Sci. Rep.*, **11**, 2283, doi: 10.1038/s41598-021-81563-3.
 118. Zaffaroni, N., Pennati, M., and Daidone, M. G. (2005) Survivin as a target for new anticancer interventions, *J. Cell Mol. Med.*, **9**, 360-372, doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00361.x.
 119. Le Duff, M., Gouju, J., Jonchere, B., Guillon, J., Toutain, B., Boissard, A., Henry, C., Guette, C., Lelievre, E., and Coqueret, O. (2018) Regulation of senescence escape by the cdk4-EZH2-AP2M1 pathway in response to chemotherapy, *Cell Death Dis.*, **9**, 199, doi: 10.1038/s41419-017-0209-y.
 120. Iannetti, A., Ledoux, A. C., Tudhope, S. J., Sellier, H., Zhao, B., Mowla, S., Moore, A., Hummerich, H., Gewurz, B. E., Cockell, S. J., Jat, P. S., Willmore, E., and Perkins, N. D. (2014) Regulation of p53 and Rb links the alternative NF- κ B pathway to EZH2 expression and cell senescence, *PLoS Genet.*, **10**, e1004642, doi: 10.1371/journal.pgen.1004642.
 121. Erokhin, M., Chetverina, O., Gyroff, B., Tatarskiy, V. V., Mogila, V., Shtil, A. A., Roninson, I. B., Moreaux, J., Georgiev, P., Cavalli, G., and Chetverina, D. (2021) Clinical correlations of polycomb repressive complex 2 in different tumor types, *Cancers (Basel)*, **13**, 3155, doi: 10.3390/cancers13133155.
 122. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premisrirt, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., and Lowe, S. W. (2011)

- Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity, *Genes Dev.*, **25**, 2125-2136, doi: 10.1101/gad.17276711.
123. Salunkhe, S., Mishra, S. V., Nair, J., Shah, S., Gardi, N., Thorat, R., Sarkar, D., Rajendra, J., Kaur, E., and Dutt, S. (2021) Nuclear localization of p65 reverses therapy-induced senescence, *J. Cell Sci.*, **134**, jcs253203, doi: 10.1242/jcs.253203.
 124. Wang, C., Long, Q., Fu, Q., Xu, Q., Fu, D., Li, Y., Gao, L., Guo, J., Zhang, X., Lam, E. W., Campisi, J., and Sun, Y. (2022) Targeting epiregulin in the treatment-damaged tumor microenvironment restrains therapeutic resistance, *Oncogene*, **41**, 4941-4959, doi: 10.1038/s41388-022-02476-7.
 125. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J. M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 49-63, doi: 10.1038/nrm3722.
 126. Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H., and Elmore, S. W. (2008) ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor, *Cancer Res.*, **68**, 3421-3428, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
 127. Laberge, R. M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P. Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Nelson, P. S., et al. (2015) MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1049-1061, doi: 10.1038/ncb3195.
 128. Ovadya, Y., and Krizhanovsky, V. (2018) Strategies targeting cellular senescence, *J. Clin. Invest.*, **128**, 1247-1254, doi: 10.1172/JCI95149.
 129. Wyld, L., Bellantuono, I., Tchkonja, T., Morgan, J., Turner, O., Foss, F., George, J., Danson, S., and Kirkland, J. L. (2020) Senescence and cancer: a review of clinical implications of senescence and senotherapies, *Cancers (Basel)*, **12**, 2134, doi: 10.3390/cancers12082134.
 130. Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K. O., Giles, C. B., Wren, J. D., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., and Kirkland, J. L. (2016) Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors, *Aging Cell*, **15**, 428-435, doi: 10.1111/acer.12445.
 131. Grezella, C., Fernandez-Rebollo, E., Franzen, J., Ventura Ferreira, M. S., Beier, F., and Wagner, W. (2018) Effects of senolytic drugs on human mesenchymal stromal cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 108, doi: 10.1186/s13287-018-0857-6.
 132. Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., O'Hara, S. P., LaRusso, N. F., Miller, J. D., Roos, C. M., Verzosa, G. C., LeBrasseur, N. K., Wren, J. D., Farr, J. N., Khosla, S., Stout, M. B., et al. (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs, *Aging Cell*, **14**, 644-658, doi: 10.1111/acer.12344.
 133. Sharma, A. K., Roberts, R. L., Benson, R. D., Jr., Pierce, J. L., Yu, K., Hamrick, M. W., and McGee-Lawrence, M. E. (2020) The senolytic drug navitoclax (ABT-263) causes trabecular bone loss and impaired osteoprogenitor function in aged mice, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 354, doi: 10.3389/fcell.2020.00354.
 134. Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2017) New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463, *Aging (Albany NY)*, **9**, 955-963, doi: 10.18632/aging.101202.
 135. Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., Ling, Y. Y., Melos, K. I., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., McGuckian, C., Wade, E. A., Kato, J. I., Grassi, D., Wentworth, M., Burd, C. E., Arriaga, E. A., Ladiges, W. L., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., et al. (2018) Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan, *EBioMedicine*, **36**, 18-28, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.015.
 136. Li, J., Gong, X., Jiang, R., Lin, D., Zhou, T., Zhang, A., Li, H., Zhang, X., Wan, J., Kuang, G., and Li, H. (2018) Fisetin inhibited growth and metastasis of triple-negative breast cancer by reversing epithelial-to-mesenchymal transition via PTEN/Akt/GSK3beta signal pathway, *Front. Pharmacol.*, **9**, 772, doi: 10.3389/fphar.2018.00772.
 137. Youns, M., and Abdel Halim Hegazy, W. (2017) The natural flavonoid fisetin inhibits cellular proliferation of hepatic, colorectal, and pancreatic cancer cells through modulation of multiple signaling pathways, *PLoS One*, **12**, e0169335, doi: 10.1371/journal.pone.0169335.
 138. Khan, N., Jajeh, F., Eberhardt, E. L., Miller, D. D., Albrecht, D. M., Van Doorn, R., Hruby, M. D., Maresh, M. E., Clipson, L., Mukhtar, H., and Halberg, R. B. (2019) Fisetin and 5-fluorouracil: Effective combination for PIK3CA-mutant colorectal cancer, *Int. J. Cancer*, **145**, 3022-3032, doi: 10.1002/ijc.32367.
 139. Zhuo, W., Zhang, L., Zhu, Y., Zhu, B., and Chen, Z. (2015) Fisetin, a dietary bioflavonoid, reverses acquired Cisplatin-resistance of lung adenocarcinoma cells through MAPK/Survivin/Caspase pathway, *Am. J. Transl. Res.*, **7**, 2045-2052.
 140. Porter, D. C., Farmaki, E., Altiglia, S., Schools, G. P., West, D. K., Chen, M., Chang, B. D., Puzyrev, A. T., Lim, C. U., Rokow-Kittell, R., Friedhoff, L. T., Papavassiliou, A. G., Kalurupalle, S., Hurteau, G., Shi, J.,

- Baran, P. S., Gyorffy, B., Wentland, M. P., Broude, E. V., Kiaris, H., et al. (2012) Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13799–13804, doi: 10.1073/pnas.1206906109.
141. Sharko, A. C., Lim, C. U., McDermott, M. S. J., Hennes, C., Philavong, K. P., Aiken, T., Tatarskiy, V. V., Roninson, I. B., and Broude, E. V. (2021) The inhibition of CDK8/19 mediator kinases prevents the development of resistance to EGFR-targeting drugs, *Cells*, **10**, 144, doi: 10.3390/cells10010144.
142. Sanchez-Diaz, L., Espinosa-Sanchez, A., Blanco, J. R., and Carnero, A. (2022) Senotherapeutics in cancer and HIV, *Cells*, **11**, 1222, doi: 10.3390/cells11071222.
143. Serra, F., Lapidari, P., Quaquarelli, E., Tagliaferri, B., Sottotetti, F., and Palumbo, R. (2019) Palbociclib in metastatic breast cancer: current evidence and real-life data, *Drugs Context*, **8**, 212579, doi: 10.7573/dic.212579.
144. Galardi, F., De Luca, F., Biagioni, C., Migliaccio, I., Curigliano, G., Minisini, A. M., Bonechi, M., Moretti, E., Risi, E., McCartney, A., Benelli, M., Romagnoli, D., Cappadona, S., Gabellini, S., Guarducci, C., Conti, V., Biganzoli, L., Di Leo, A., and Malorni, L. (2021) Circulating tumor cells and palbociclib treatment in patients with ER-positive, HER2-negative advanced breast cancer: results from a translational sub-study of the TREnd trial, *Breast Cancer Res.*, **23**, 38, doi: 10.1186/s13058-021-01415-w.
145. Jost, T., Heinzerling, L., Fietkau, R., Hecht, M., and Distel, L. V. (2021) Palbociclib induces senescence in melanoma and breast cancer cells and leads to additive growth arrest in combination with irradiation, *Front. Oncol.*, **11**, 740002, doi: 10.3389/fonc.2021.740002.
146. Bi, H., Shang, J., Zou, X., Xu, J., and Han, Y. (2021) Palbociclib induces cell senescence and apoptosis of gastric cancer cells by inhibiting the Notch pathway, *Oncol. Lett.*, **22**, 603, doi: 10.3892/ol.2021.12864.
147. Rubinsztein, D. C., Codogno, P., and Levine, B. (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 709–730, doi: 10.1038/nrd3802.
148. Lee, H. O., Mustafa, A., Hudes, G. R., and Kruger, W. D. (2015) Hydroxychloroquine destabilizes phospho-S6 in human renal carcinoma cells, *PLoS One*, **10**, e0131464, doi: 10.1371/journal.pone.0131464.
149. Harnicek, D., Kampmann, E., Lauber, K., Hennel, R., Cardoso Martins, A. S., Guo, Y., Belka, C., Mortl, S., Gallmeier, E., Kanaar, R., Mansmann, U., Hucl, T., Lindner, L. H., Hiddemann, W., and Issels, R. D. (2016) Hyperthermia adds to trabectedin effectiveness and thermal enhancement is associated with BRCA2 degradation and impairment of DNA homologous recombination repair, *Int. J. Cancer*, **139**, 467–479, doi: 10.1002/ijc.30070.
150. Camorani, S., Cerchia, L., Fedele, M., Erba, E., D'Incalci, M., and Crescenzi, E. (2018) Trabectedin modulates the senescence-associated secretory phenotype and promotes cell death in senescent tumor cells by targeting NF-kappaB, *Oncotarget*, **9**, 19929–19944, doi: 10.18632/oncotarget.24961.

THERAPY INDUCED TUMOR CELL SENESCENCE: MECHANISMS AND WAYS TO OVERCOME

Review

M. A. Zamkova^{1,2*}, N. A. Persiyantseva^{1,2}, V. V. Tatarskiy¹, and A. A. Shtil^{2,3}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: zamkovam@gmail.com

² Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia

³ National Research Nuclear University MEPhI, 115409 Moscow, Russia

The plasticity of tumor cells due to the multiplicity of molecular regulation allows to evade the cytotoxic effects of chemo- and/or radiation therapy. Metabolic adaptation of survived cells is based on transcriptional reprogramming. Because of the similarities with the natural cell aging, specific features of survived tumor cells comprise the phenotype of therapy induced senescence. Most importantly, the senescent cells differ from the parental since they become less responsive to drugs and form the aggressive progeny. The importance of the problem is explained by general biological significance of transcriptional reprogramming as a mechanism of adaptation to stress, and by the emerging perspective of its pharmacological targeting. We analyze the mechanisms of regulation of therapy induced tumor cell senescence, as well as the new drug combinations to prevent this clinically unfavorable phenomenon.

Keywords: transformed cells, cytotoxicity, intracellular signals, therapy induced cell senescence, gene transcription, antitumor treatment

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА ОБОЛОЧКИ X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ И ВИРУСА МОЗАИКИ АЛЬТЕРНАНТЕРЫ НА СТРУКТУРУ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРИОНОВ

© 2023 А.Л. Ксенофонтов^{1*}, М.В. Петухов^{2,3}, В.В. Матвеев², Н.В. Федорова¹,
П.И. Семенюк¹, А.М. Арутюнян¹, Т.И. Манухова⁴, Е.А. Евтушенко⁴, Н.А. Никитин⁴,
О.В. Карпова⁴, Э.В. Штыкова²

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

² ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова,
119333 Москва, Россия

³ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.10.2022

После доработки 17.11.2022

Принята к публикации 19.11.2022

Аминокислотные последовательности белков оболочки (БО) таких потексвирусов, как X-вирус картофеля (ХВК) и вирус мозаики альтернантеры (ВМАльт), имеют около 40% идентичных аминокислотных остатков. Однако N-концевые домены БО этих вирионов отличаются как по длине, N-концевой домен БО ХВК длиннее на 28 остатков ($\Delta N = 28$), так и по аминокислотной последовательности. В настоящей работе определено влияние N-концевого домена БО на структуру и физико-химические свойства вирионов ХВК и ВМАльт. Было показано, что температура плавления препаратов ХВК выше на 10–12 °С, чем у препаратов ВМАльт, спектры кругового дихроизма этих вирусов значительно отличаются. Пространственное выравнивание имеющихся структур БО потексвирусов высокого разрешения показало, что величина RMSD C α -атомов была максимальна именно для N-концевых доменов двух сравниваемых моделей. Согласно компьютерному моделированию, ΔN -пептид N-домена БО ХВК полностью разупорядочен. По данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), структура БО в составе вирионов ХВК и ВМАльт отличается, в частности, БО ХВК имеет больший размер областей кристалличности, а значит и более упорядочен. С помощью МУРР были рассчитаны диаметры вирионов и параметры спирали в растворе. Выявлено влияние конформации и локализации N-концевого домена БО ХВК относительно поверхности вириона на его структуру. Предположительно, повышенная в сравнении с ВМАльт термостабильность вирионов ХВК обеспечивается удлиненными N-концевыми доменами ($\Delta N = 28$), которые контактируют между соседними субъединицами БО в вирионе ХВК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: потексвирусы, X-вирус картофеля, вирус мозаики альтернантеры, белок оболочки, N-концевой домен, круговой дихроизм, малоугловое рентгеновское рассеяние.

DOI: 10.31857/S0320972523010050, EDN: PBSOUZ

ВВЕДЕНИЕ

Многие из нитевидных вирусов растений являются опасными патогенами сельскохозяйственных культур [1]. Поэтому их исследова-

нию (структурному и функциональному) уделяется существенное внимание. С помощью непрямых методов структурного анализа продемонстрировано, что белки оболочки (БО) потекс- и потививирусов частично неупорядочены,

Принятые сокращения: АВК – А-вирус картофеля; БО – белок оболочки; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; ВТМ – вирус табачной мозаики; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; РНП – рибонуклеопротеид; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; ХВК – X-вирус картофеля.

* Адресат для корреспонденции.

вследствие чего их вирионы оказались значительно более лабильными, чем предполагалось ранее [2, 3]. Обнаружено, что БО некоторых вирусов растений имеют разупорядоченные *N*-концевые домены различной длины на поверхности вирионов. С помощью рентгеноструктурного анализа удалось получить часть структуры БО вируса мозаики папайи [4], по данным криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) получены фрагменты структур вируса мозаики бамбука, вируса мозаики пепино [5, 6] и вириона Х-вируса картофеля (ХВК) с разрешением 2,2 Å [7]. Оказалось, что центральные части БО всех вышеперечисленных потексвирусов имеют сходную структуру, образованы семью альфа-спиралями, расположенными в довольно сложной топологии, и структурно гомологичны БО потививирусов. Несмотря на сходство пространственных структур, БО потексвирусов характеризуются различными физико-химическими свойствами. Так, например, БО ХВК, выделенный из вирусных частиц, не способен к полимеризации и формированию вирусоподобных частиц при отсутствии РНК, в отличие от капсидных белков других потекс- [8–11] и потививирусов [12]. Вирионы ХВК имеют специфические оптические свойства, выявляемые спектроскопией кругового дихроизма (КД) в дальнем и ближнем ультрафиолете (УФ) [3, 13]. Кроме того, была обнаружена функционально-структурная перестройка вирионов ХВК, «ремоделирование», в ходе которой нетранслируемые вирионы переходят в метастабильное состояние трансляционной активации, в которой участвуют *N*-концевые домены БО [14].

Изучение структуры нитевидных вирусов растений классическими методами имеет ограничения в связи с длиной и гибкостью вирусных частиц. Вследствие этого выбор методов структурного анализа приобретает особое значение. Эффективным и информативным является метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), позволяющий проводить изучение структурных свойств биологических объектов в растворе при заданных температуре, рН, солевом составе и других параметрах среды. Следует отметить серьезный прогресс последних десятилетий в развитии МУРР: появились новые подходы анализа и интерпретации данных, были разработаны эффективные программы компьютерного моделирования структуры [15] для изучения строения биологических макромолекул в растворе [16]. Ранее с помощью этого метода нами был выполнен структурный анализ вирионов и реполимеров БО палочковидного вируса табачной мозаи-

ки (ВТМ). Мы показали, что профиль МУРР выявляет ряд особенностей структуры палочковидной вирусной частицы: форму, диаметр, шаг спирали или периодичность структуры вирионов и реполимеров ВТМ [17], и полученные данные хорошо согласовывались с известными характеристиками ВТМ. Методом МУРР были также исследованы особенности строения нитевидных вирионов А-вируса картофеля (АВК) [18].

В настоящей работе МУРР и несколько комплементарных физико-химических методов были использованы для сравнительного анализа структуры нитевидных вирионов потексвирусов ХВК и ВМАльт в растворе. Основной задачей данного исследования было определение влияния структуры *N*-концевых доменов на строение и физико-химические свойства вирионов ХВК и ВМАльт. С этой целью по данным МУРР и доступным структурам БО (PDB ID: 6R7G для ХВК и PDB ID: 7OG6 для ВМАльт) было проведено моделирование структуры вирусных частиц в растворе с учетом подвижных *N*-концевых доменов. При этом для БО ХВК структура была дополнена отсутствующим в атомной модели подвижным фрагментом *N*-концевого домена, состоящим из дополнительных 28 а.о. — ΔN -пептидом. Для этого были использованы гибридные методы моделирования и структурного анализа МУРР [15, 16]. Полученные результаты могут позволить объяснить отличия физико-химических характеристик и свойств БО в составе вирионов ХВК и ВМАльт.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ВМАльт и ХВК. Препараты вирусов из коллекции кафедры вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова — ВМАльт (штамм AltMV-Moscow University, GenBank accession No. FJ822136)) и ХВК (Русский штамм, GenBank accession No. AAA47171.1) — выделяли согласно протоколам, описанным ранее [8, 19].

Электрофоретический анализ белков в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез проводили в пластинах ПААГ с градиентом акриламида 8–20% и N, N'-метиленбисакриламида — 0,08–0,2% [20]. Для съемки окрашенных Coomassie G-250 ПААГ использовали гель-документирующую систему Chemi Doc XRS+ с программным обеспечением Image Lab Software («Bio-Rad», США).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Исследуемый препарат сорбировали на медных сетках, покрытых коллодиевой пленкой

с углеродным напылением, и контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа «JEM-1400» («JEOL», Япония) при напряжении 80 кВ с цифровой фотокамерой «Olympus Quemesa», используя программное обеспечение «Olympus Soft Imaging Solutions GmbH» («Olympus», Германия).

Измерение спектров кругового дихроизма.

Спектры КД измеряли в 5 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7,8) при 20 °С в 1–2-мм кюветах на дихрографе Chirascan («Applied Photophysics», Англия). Концентрация образцов составляла 50–100 мкг/мл. Спектры КД записывали на скорости 0,5–1,0 нм/с в дальнем диапазоне УФ-спектра (185–250 нм) с вычетом базовой линии. Измеренные спектры обрабатывали с использованием стандартного пакета программного обеспечения, поставляемого с прибором. Величины КД выражали в величинах молярной эллиптичности $[\Theta]$, как описано ранее [18]. Для термического анализа каждый препарат нагревали в кюветном отделении дихрографа от 40 до 85 °С со скоростью 1 °С в минуту. Регистрацию каждого нового спектра начинали после увеличения температуры на 3 °С.

Биоинформатический анализ первичной и третичной структуры БО потексвирусов. Выравнивание аминокислотных последовательностей БО выполнено с помощью программы Clustal Omega [21]. Количественную оценку сходства последовательностей проводили попарным выравниванием аминокислотной последовательности БО без 28 N-концевых а.о. БО ХВК. Пространственное выравнивание выполняли с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 3.7 (<http://www.genebee.msu.su/spdbv/>). В качестве матрицы использовали структуру БО ХВК в составе вириона, полученную методом крио-ЭМ [7]. Профиль RMSD по последовательности определяли для пар C_{α} -атомов согласно пространственному выравниванию. Для анализа уровня структурной организации БО использовали программу предсказания IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>), основанную на алгоритме оценки способности остатка образовывать выгодные парные контакты.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию проводился на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург) на станции P12 [22], которая оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений волновых векторов $0,07 < s < 7 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta)/\lambda$; 2θ – угол

рассеяния и $\lambda = 0,124 \text{ нм}$ – длина волны рассеяния. При моделировании четвертичной структуры вирионов использовались кривые МУРР до $s = 2,7 \text{ нм}^{-1}$, поскольку данные на более высоких углах соответствуют рассеянию от атомной структуры, которая не менялась в процессе моделирования. Кроме того, выбранная область является наиболее информативной вследствие меньшего уровня экспериментального шума. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния с целью контроля возможных радиационных повреждений. Также по 50 кривых рассеяния было получено для буферных растворов перед каждой серией экспериментов на образце и после. Первичная обработка данных, включающая усреднение 50 кривых рассеяния и вычет сигнала от буфера, а также определение структурных инвариантов проводились с помощью программы PRIMUS [23]. Дальнейшая обработка полученных данных проводилась с помощью программ специального пакета ATSAS [24].

Характеристики внутренней структуры упорядоченных или частично упорядоченных полимерных образцов вычислялись с помощью интерактивной программы PEAK [23] путем приближения гауссовых профилей к выбранным брэгговским пикам на кривых рассеяния. Средний размер кристаллитов (L) и степень разупорядоченности в системе $\Delta/\bar{d}$ вычислялись в соответствии с формулами (1) и (2) [25]:

$$L = \lambda/\beta_s \cdot \cos \theta, \quad (1)$$

$$\Delta/\bar{d} = \frac{1}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\beta_s \cdot \bar{d}}{\lambda}}, \quad (2)$$

где β_s – полуширина брэгговского пика (в радианах) при угле рассеяния 2θ , $\bar{d} = 2\pi/s_{\max}$ – характеристический размер упорядоченных областей, соответствующий положению брэгговского пика $s_{\max}$, а Δ – среднеквадратичное отклонение расстояния между двумя ближайшими периодическими мотивами структуры.

Для определения максимального размера частиц ($D_{\max}$) и построения функций распределения по расстояниям $p(r)$ использовалась программа GNOM [26]. Для получения полноразмерных моделей вирионов ВМАлт и ХВК использовалась комбинация программ CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [27], SUPPDB и MASSHA [28]. CHIMERA позволяет задать правило для разmultiplication атомной модели мономера с тем, чтобы сгенерировать спираль вириона и затем сохранить всю получившуюся структуру.

SUPPDB [29] находит матрицу трансформации одной субъединицы в другую для их оптимального наложения и может затем применить такую же трансформацию последовательно к фрагменту, состоящему из нескольких субъединиц, чтобы также получить целую спираль. MASSHA реализует метод молекулярной тектоники. Эта программа сочетает в себе интерактивный и автоматизированный поиск взаимной ориентации мономеров комплекса, оперируя ими как твердыми телами, и позволяет сохранять объекты PDB в их текущих позициях, что удобно для хранения результатов интерактивного или автоматизированного построения модели.

Для создания различных конформаций N -концевых фрагментов использовалась программа RANCH [30], которая создает набор независимых моделей со случайной конформацией участка структуры, отсутствующего в модели высокого разрешения, с учетом информации о полной аминокислотной последовательности белка и имеющейся структуре жестких доменов.

Сравнение экспериментальных данных и кривых МУРР, полученных от построенных моделей вирусов, осуществлялось программой CRY SOL [31]. Программа использует мультипольное разложение амплитуд рассеяния для расчета сферически усредненной картины рассеяния и учитывает гидратную оболочку. Экспериментальные данные МУРР (I_{exp}) прибли-

жаются путем оптимизации расчетной кривой рассеяния (I_{calc}), минимизируя расхождение χ^2 между ними (3):

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (3)$$

где N — число экспериментальных точек, c — шкалирующий множитель, σ — экспериментальные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химическая характеристика вирионов ХВК и ВМАлт. Как было показано ранее [9], электрофоретическая подвижность вирионов ВМАлт (рис. 1, а; дорожки 2, 3) в денатурирующих условиях соответствует теоретической молекулярной массе БО ВМАлт ($M_{\text{теор.}} = 22,2$ кДа, $M_{\text{экс.}} = 23$ кДа). В тех же условиях БО ХВК проявляет аномально низкую подвижность, соответствующую примерно 31 кДа (рис. 1, а; дорожка 1), в то время как его $M_{\text{теор.}}$ равна 25 кДа. Это явление согласуется с ранее опубликованными данными [32] и может быть объяснено наличием в структуре белка неупорядоченных гидрофильных сегментов и дополнительных химических групп, полученных в результате посттрансляционной модификации [2].

Содержание вторичной структуры БО вирионов ВМАлт и ХВК оценивали по спектрам КД в дальнем диапазоне УФ-спектра (200–255 нм).

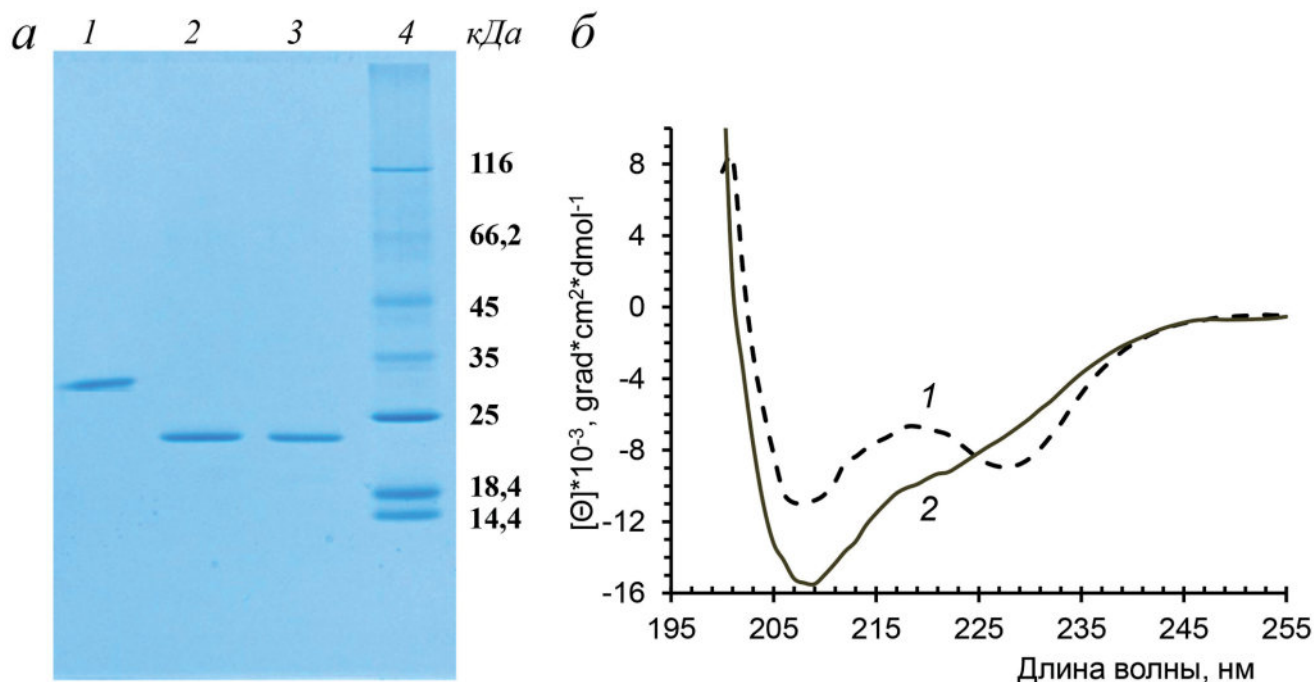


Рис. 1. Электрофоретический анализ вирионов (а). Дорожки: 1 – ХВК, 2 – ВМАлт, 3 – БО ВМАлт. Были использованы аликвоты по 1 мкг на полосу. Молекулярная масса указана рядом с контрольными белками (дорожка 4). б – Спектры кругового дихроизма вирионов ХВК (1) и ВМАлт (2)

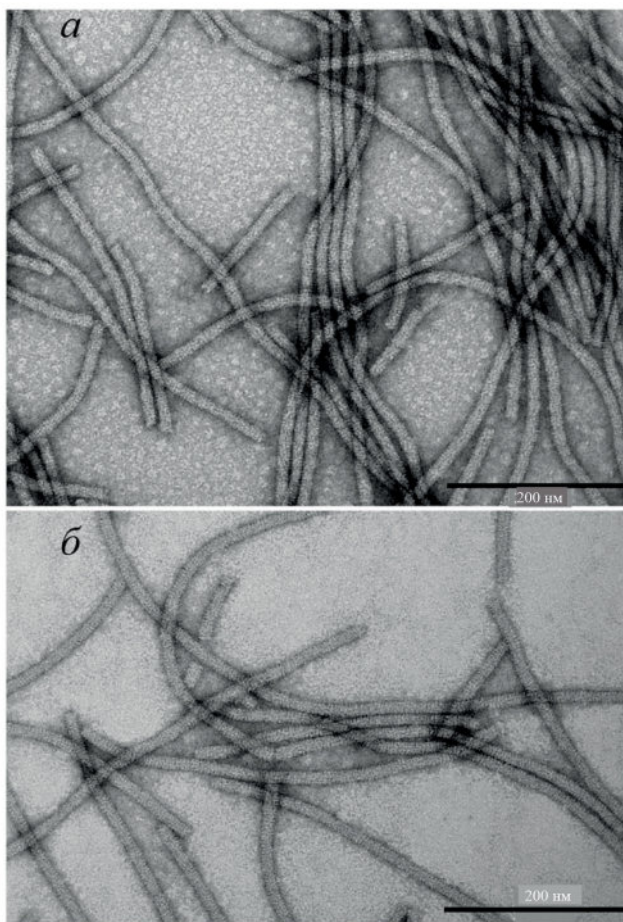


Рис. 2. Электронные микрофотографии вирионов ВМАльт (а) и ХВК (б). ПЭМ, контрастирование 2%-ным уранилацетатом. Масштаб – 200 нм

Спектр КД вирионов ВМАльт показал отрицательный максимум на 208 нм ($[\theta]_{\max} = -15\,400^\circ$) (рис. 1, б; кривая 2), характерный для альфа-спиральных белков [13]. Препараты вирионов ХВК имели необычные спектры КД (рис. 1, б; кривая 1) с малой эллиптичностью на 208 нм ($[\theta]_{\max} = -8900^\circ$) и выраженным отрицательным максимумом на 228 нм.

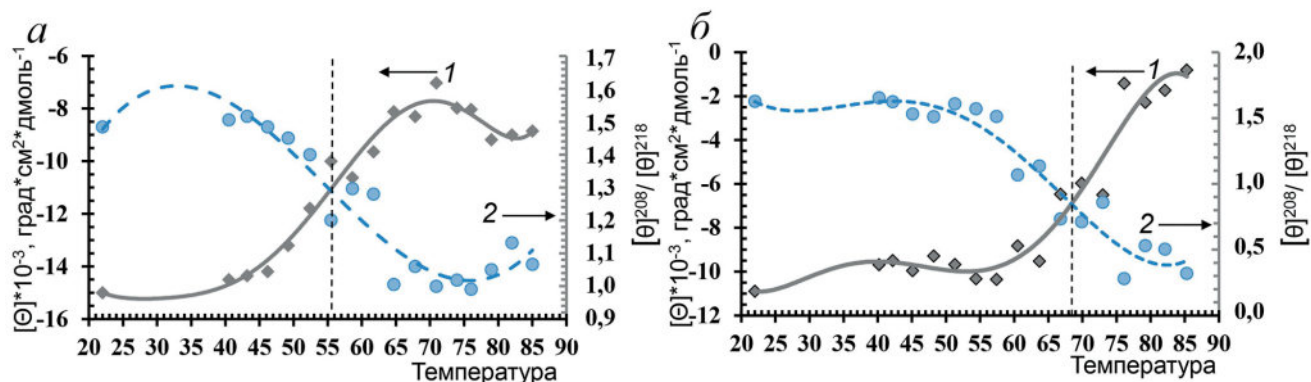


Рис. 3. Термическая денатурация препаратов ВМАльт (а) и ХВК (б) по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]^{208}$ при 208 нм (1) и величины отношения $[\theta]^{208}/[\theta]^{218}$ (2). Кривая аппроксимации рассчитывалась по уравнению полинома 4 степени, и величину $T_{\text{пл}}$ определяли в месте пересечения кривых (1) и (2)

Анализ данных ПЭМ показал (рис. 2, а и б), что вирионы ВМАльт и ХВК представляют собой сходные по морфологии, длинные и гибкие нитевидные частицы с диаметром $12,5 \pm 1,1$ нм и $13,6 \pm 1,4$ нм для вирионов ХВК и ВМАльт соответственно.

Анализ термостабильности вирионов по КД-спектрам. Степень термической денатурации также различалась для вирионов ВМАльт и ХВК (рис. 3, а и б). Методом сканирующей калориметрии ранее было показано, что плавление вирионов ХВК происходит при температуре ($T_{\text{пл}}$) $64\text{--}65^\circ\text{C}$ [2]. В настоящей работе при нагревании вирионов ВМАльт и ХВК были проанализированы температурные зависимости интенсивности отрицательных максимумов эллиптичности на 208 нм ($[\theta]^{208}$) (рис. 3, кривые 1 на обеих панелях) и величины отношения эллиптичностей $[\theta]^{208}/[\theta]^{218}$ (рис. 3, кривые 2 на обеих панелях), характеризующие изменения содержания α - и β -структур в белке.

Для вирионов ВМАльт и ХВК в диапазоне $50\text{--}75^\circ\text{C}$ наблюдали постепенный рост интенсивности $[\theta]^{208}$ до -8000 и -1500° соответственно. Такая разница может указывать на более крупные размеры образующихся частиц ХВК и/или повышенное содержание в них β -структуры. Плавление препаратов ВМАльт происходило при $\sim 56^\circ\text{C}$, т.е. на $10\text{--}12^\circ\text{C}$ ниже, чем препаратов ХВК ($T_{\text{пл}} \sim 68^\circ\text{C}$). Таким образом, вирионы ХВК оказались более термостабильными.

Сравнительный анализ структуры белков оболочки ВМАльт и ХВК. БО ХВК и ВМАльт имеют некоторое сходство аминокислотной последовательности, но различаются по длине [33]. Сравнение первичных структур БО ВМАльт и ХВК попарным выравниванием с помощью программы Clustal Omega (рис. 4, а) подтвердило сходство в последовательности (68% подобных и 42% идентичных из 207 а.о.). Основное отличие состоит в различной длине N-концевых

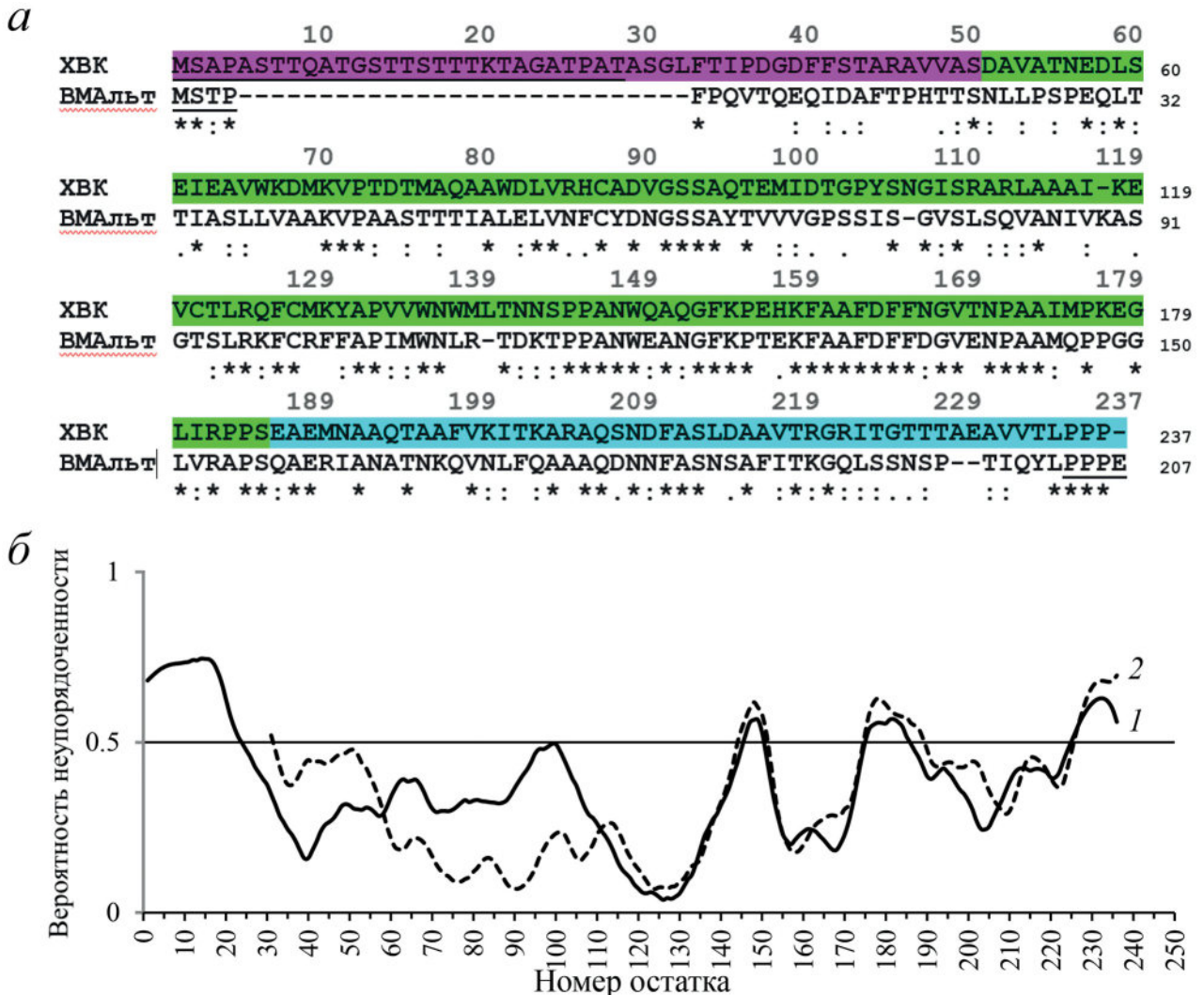


Рис. 4. Вывравнивание первичных структур БО ХВК и ВМАльт с помощью программы Clustal Omega (*a*). Отмечены (*) – идентичные остатки; (:) и (.) – консервативные и полуконсервативные замены; подчеркнуты последовательности, отсутствующие в PDB ID: 6R7G и 7OG6. *N*-концевой (1–50 а.о.), центральный (51–185 а.о.) и *C*-концевой (186–237 а.о.) домены выделены малиновым, зеленым и голубым соответственно [7]; *b* – предсказание упорядоченных/неупорядоченных структур с помощью веб-сервиса IUPred для БО ХВК (1) и ВМАльт (2). Участки со значением ординаты выше 0,5 на этом рисунке считались неупорядоченными

доменов: для БО ХВК *N*-концевой домен был длиннее на 28 а.о. (ΔN -пептид).

Биоинформатический анализ потексвирусов с помощью программы предсказания структуры IUPred (рис. 4, б), основанной на алгоритме оценки способности а.о. образовывать выгодные парные контакты, показал, что БО ХВК содержал полностью разупорядоченный *N*-концевой домен из 28 а.о. (ΔN -пептид *N*-домена) [3]. Короткие разупорядоченные участки (со значением ординаты выше 0,5) выявлялись в петлевых межспиральных (142–151 а.о.), междоменных (175–185 а.о.) участках и в *C*-концевой области (226–236 а.о.) БО обоих вирусов.

Недавно методом крио-ЭМ [7] была получена структура БО ХВК при отсутствии ΔN -участка полипептидной цепи в составе вириона.

на (PDB ID: 6R7G, а.о. 29–235). Поскольку структура БО в свободном состоянии и в составе вирионов отличаются [34], в рамках данной работы под структурой БО понимается структура белка только в составе вириона. Трехмерная структура БО ХВК включает три домена: *N*-концевой домен (I), 29–50 а.о.; центральный домен (II), 551–185 а.о.; и *C*-концевой домен (III), 186–237 а.о. (рис. 4, *a*). Домен I выступает из центрального домена и в структуре, полученной с помощью крио-ЭМ, охватывает домен II соседнего БО. Атомные координаты 1–28 а.о. (ΔN -пептид *N*-домена) не были определены предположительно из-за низкой электронной плотности и разупорядоченности.

Для БО ВМАльт на сегодняшний день определена структура (PDB ID: 7OG6, 5–203 а.о.)

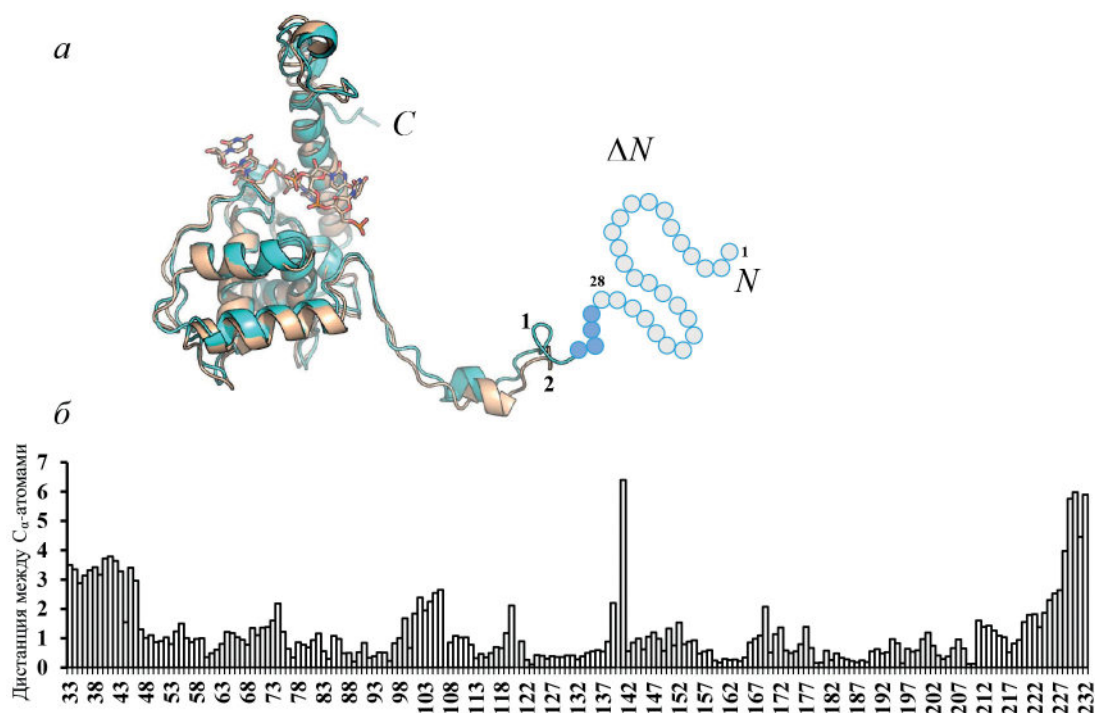


Рис. 5. Пространственное выравнивание структур мономеров БО ХВК (1) и БО РНП ВМАльт (2) с помощью программы Swiss-Pdb Viewer 3.7 (а), PDB ID: 6R7G и 7OG6 соответственно, указаны N- и C-концы. Рисунок создан в PyMol. б – Дистанция между C_{α} -атомами (Å) в соответствии с пространственным выравниванием. Нумерация остатков проведена по БО ХВК. Схематично показаны отсутствующие в структуре PDB ID: 6R7G остатки, не приведенные в выравнивании: а.о. 1–28 (ΔN -пептид N-домена БО ХВК – пустые кружки) и а.о. 29–32 (синие кружки)

в составе «псевдовиреонов» – гетерологичных рибонуклеопротеидов (РНП), для получения которых использовали вирусный вектор на основе ХВК, несущий ген БО ВМАльт [35].

Чтобы детально оценить пространственное структурное сходство БО ХВК и ВМАльт мы провели выравнивание третичных структур мономеров с помощью программы Swiss-Pdb Viewer 3.7 (рис. 5, а). Отклонение координат C_{α} -атомов двух сравниваемых моделей отражает величина RMSD. Средняя величина RMSD для центрального домена II и домена III были равны 1,3 и 4,1 Å соответственно, что подтверждало близкое сходство третичных структур этих доменов обоих вирусов. Однако для домена I (33–50 а.о.) эта величина равна 8,6 Å. Дистанции между C_{α} -атомами сравниваемых молекул БО ХВК и ВМАльт показаны на гистограмме (рис. 5, б). Основные отличия величин RMSD выявляются в 13 а.о. N-концевого фрагмента (33–46), C-концевых а.о. (225–232), а также в межспиральных районах центрального домена II (а.о. 101–106 и 139–141). Таким образом, несмотря на общее сходство в расположении спиралей, можно видеть значительные расхождения в топологии петлевых областей и наличии в структуре ХВК ΔN -пептида N-домена.

Структурный анализ вирионов ХВК и ВМАльт методом МУРР. Экспериментальные кривые МУРР вирионов ВМАльт и ХВК приведены

на рис. 6. Наличие брэгговского пика в районе 1,8–1,9 нм^{–1} на кривых МУРР для обоих вирионов свидетельствует о наличии в образцах упорядоченных, квазикристаллических областей. Наличие таких пиков мы наблюдали ранее для вирионов ВТМ и АВК и связывали их положение с периодичностью, т.е. шагом спирали вирионов [17, 18]. Эти величины для вирионов ВМАльт и ХВК оказались равны $3,37 \pm 0,01$ и $3,40 \pm 0,01$ соответственно (таблица). Из рис. 6 видно, что положение и форма брэгговских пиков практически совпадают, что говорит о схожести спиральных структур обоих вирионов. В целом, показанные на рис. 6 кривые имеют много общих черт, однако имеются и заметные различия: в области минимума на 0,64–0,67 нм^{–1}, в области широкого максимума в районе 0,7–1,2 нм^{–1} и в области центрального рассеяния < 0,5 нм^{–1}. Исходя из наблюдаемых различий – менее глубокий минимум, более размытый максимум в профиле МУРР для вирионов ВМАльт, можно предположить, что эти вирионы менее упорядочены и подвержены большему структурному полиморфизму. Анализ брэгговских пиков, проведенный с помощью программы PEAK, подтверждает это предположение (таблица). Для вирионов ВМАльт наблюдается заметно меньший размер областей кристалличности L и несколько большая степень разупорядочения $\Delta/\bar{d}$ в образце.

Структурные характеристики упорядоченных областей вирионов ВМАльт и ХВК

Образцы	$s_{\max}$, нм ⁻¹	$\bar{d}$, нм	L , нм	$\Delta/\bar{d}$
ВМАльт	$1,86 \pm 0,01$	$3,37 \pm 0,01$	110 ± 10	$0,06 \pm 0,01$
ХВК	$1,85 \pm 0,01$	$3,40 \pm 0,01$	140 ± 10	$0,05 \pm 0,01$

Для анализа структуры вирионов ВМАльт и ХВК в растворе были рассчитаны функции распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 6, б; вставка). Максимальные размеры $D_{\max}$ для вирионов ВМАльт и ХВК, которые мы можем наблюдать в растворе на доступном для МУРР угловом диапазоне, равны 190 и 180 нм, а диаметры спиралей из позиции пика на $p(r)$ вирионов оказались равны $12,7 \pm 0,1$ и $13,2 \pm 0,1$ нм соответственно. Это различие может объясняться более длинными N -концевыми доменами БО ХВК, которые поэтому занимают большую площадь на поверхности вириона, слегка увеличивая его диаметр по сравнению с короткими N -концевыми цепочками БО ВМАльт. Обращает на себя внимание существенное различие профилей функций распределения по расстояниям $p(r)$ для вирионов ВМАльт и ХВК. Форма функции $p(r)$ для вириона ХВК характерна для жесткой многогранной призмы или цилиндра, в то время как вирион ВМАльт имеет более гибкую и, следовательно, менее определенную форму, т.е. об-

ладает большим полиморфизмом в растворе. Следует подчеркнуть, что имеются в виду усредненные формы, так как оба вируса являются в той или иной степени гибкими и могут принимать в растворе различные формы, а функции распределения по расстояниям $p(r)$ являются прямым указанием на то, какие формы преобладают для каждого из образцов.

Анализ структуры вирионов в растворе был проведен сначала для ВМАльт, поскольку PDB-модель мономера БО в составе РНП является полной и практически не содержит отсутствующих фрагментов. Для моделирования строения этого вириона использовалась структурная модель БО с разрешением 3,3 Å (PDB ID: 7OG6, а.о. 5–203) [35].

Атомная модель мономера БО ВМАльт с атомными координатами а.о. 5–203 и атомными координатами РНК (PDB ID: 7OG6) была многократно воспроизведена с помощью программы CHIMERA вдоль винтовой оси, параметры которой соответствовали работе Thuenemann et al. [35]. Для того чтобы определить влияние длины спирали вириона на профиль кривых малоуглового рассеяния, было сгенерировано несколько спиралей разной длины, используя структуру мономера БО ВМАльт высокого разрешения. Затем рассеяние от полученных моделей сравнивали с экспериментальными данными МУРР. Таким образом, были построены модели различной длины, содержащие порядка

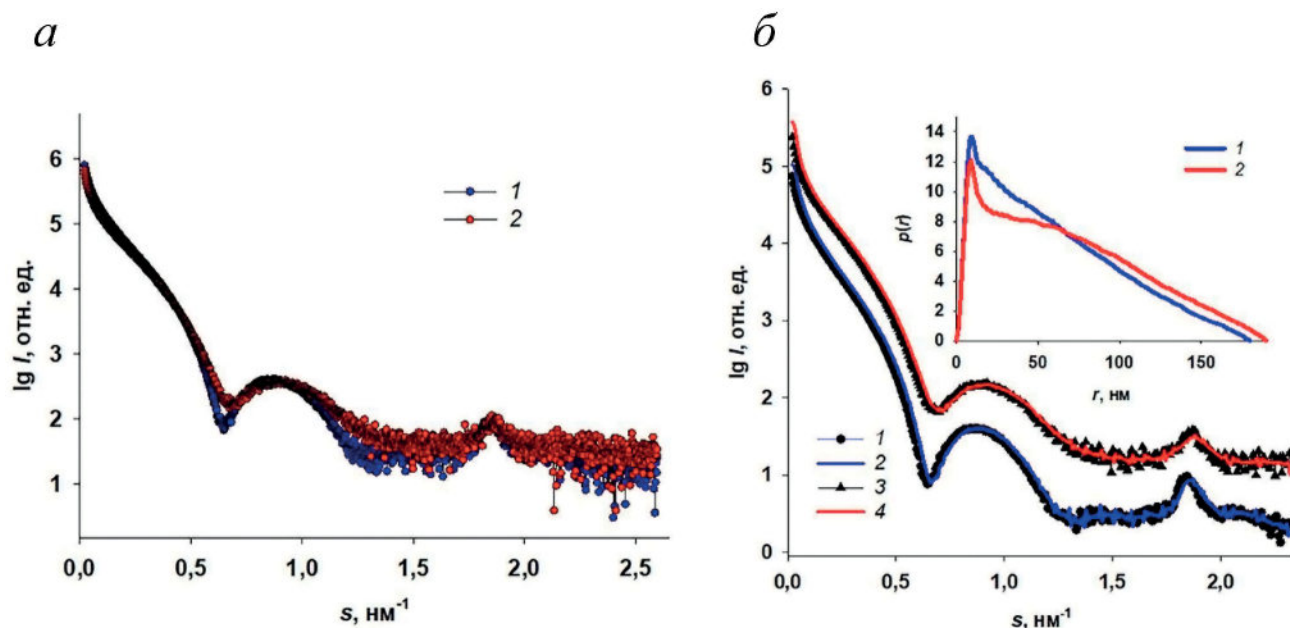


Рис. 6. Экспериментальные кривые МУРР (а) вирионов ХВК (1) и ВМАльт (2). б – Приближение к экспериментальным кривым ХВК (1) и ВМАльт (3) от модельных кривых, рассчитанных из функций распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (2) и ВМАльт (4). Экспериментальные и модельные кривые для лучшей визуализации разнесены по вертикали на один логарифмический порядок. Вставка: функции распределения по расстояниям $p(r)$ для ХВК (1) и ВМАльт (2)

300–350 субъединиц. Расчет соответствующих кривых рассеяния и их приближение экспериментальных данных проводилось программой CRY SOL.

Рассеяние от сгенерированных модельных вирионов различной длины практически не отличалось друг от друга. Зато сравнение профилей экспериментальной кривой рассеяния и типичной кривой от модели, содержащей 320 субъединиц БО (рис. 7, *а*; кривые 1 и 2), демонстрирует расхождение практически на всем диапазоне данных (за исключением самых малых углов $0,05 < s < 0,5 \text{ нм}^{-1}$, соответствующих грубой форме вириона) и, что очень важно, включает несовпадение положений брэгговских пиков, т.е. у полученных нами моделей вирионов другой характеристический размер $d = 2\pi/s_{\text{max}}$ упорядоченных областей. Поскольку в работе Thuenemann et al. [35] использовался РНП, а не вирионы ВМАльт, а также принимая во внимание высокую гомологию ВМАльт и ХВК и схожесть структур их субъединиц (рис. 5, *а*), было высказано предположение, что спиральная организация ВМАльт более близка к параметрам спирали ХВК.

Для проверки этой гипотезы мономер БО ВМАльт (PDB ID: 7OG6) был последовательно совмещен с 13 субъединицами БО ХВК (фрагмент спирали, содержащий 1,5 витка), присутствующими в структуре ХВК 6R7G, программой SUPPDB. Далее, данной программой была рассчитана матрица трансформации первого мономера в последний и применена ко всему фрагменту 28 раз для получения спирали, содержащей 336 субъединиц (порядка 40 витков). Такая модель, представленная мономером БО ВМАльт в спирали ХВК, дала значительно лучшее согласие экспериментальной и расчетной кривых рассеяния (рис. 7, *а*; кривые 1 и 3).

Наблюдаемое расхождение между экспериментальной и модельной кривыми отражает возможное отклонение параметров реальной структуры вириона ВМАльт в растворе в сравнении с его жесткой спиральной моделью на атомном уровне.

Для моделирования строения вириона ХВК использовалась модель части структуры ХВК (PDB ID: 6R7G) с разрешением 2,2 Å. Данный участок спирали состоит из 13 белковых субъединиц, включающих в себя атомные

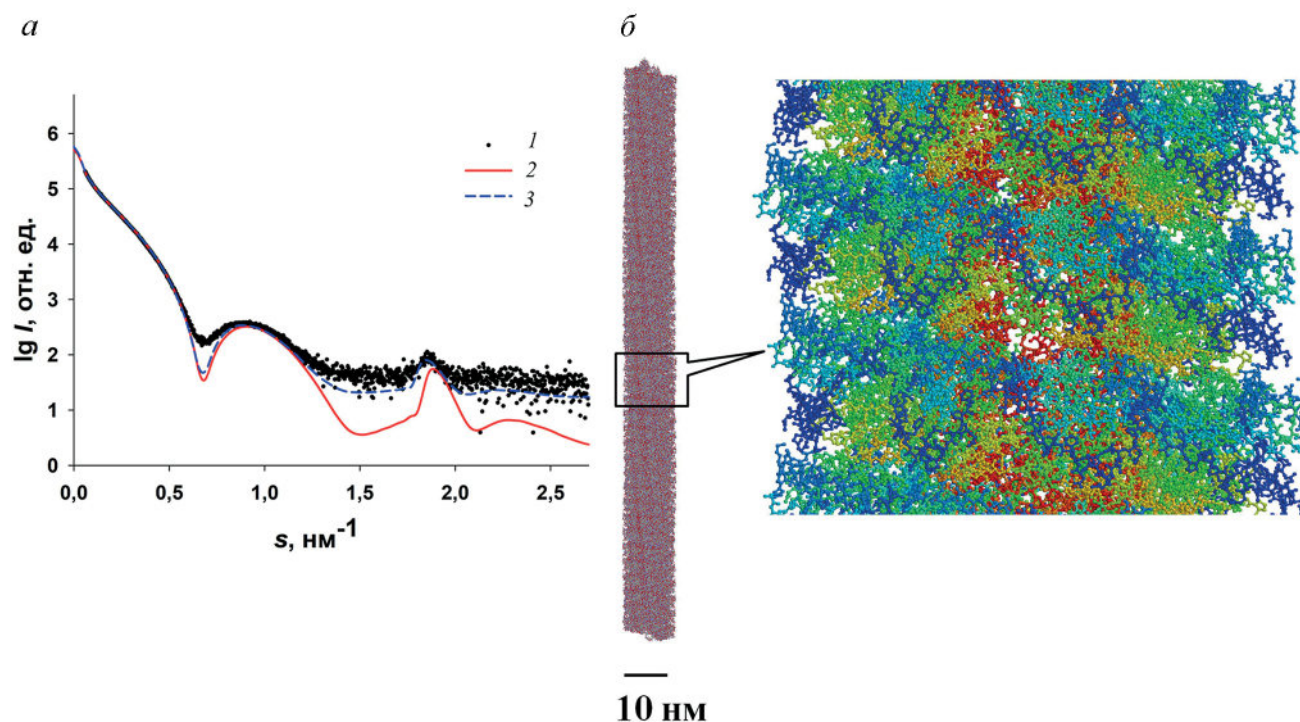


Рис. 7. Результаты моделирования строения вирионов ВМАльт с использованием структур высокого разрешения мономера БО ВМАльт в составе РНП и с применением параметров спирали ХВК (PDB ID: 7OG6 и 6R7G соответственно). *а* – Кривые МУРР: 1 – экспериментальные данные; 2 – теоретическое рассеяние от спиральной модели, согласно данным PDB ID: 7OG6 ($\chi^2 = 15,6$); 3 – теоретическое рассеяние от мономера ВМАльт, уложенного в спиральную модель, согласно данным PDB ID: 6R7G ($\chi^2 = 13,0$). *б* – Структурная модель вириона ВМАльт, построенного из мономера PDB ID: 7OG6 с применением параметров спирали ХВК. Окраска а.о.: 5–31 – синий; 32–58 – голубой; 59–137 – зеленый; 138–164 – желтый; 165–177 – оранжевый; 178–203 – красный. Увеличение на вставке: 10×

координаты аминокислот с 29 по 237 остаток, а также содержит РНК. Таким образом, исходно моделирование проводилось без учета ΔN -пептида белка. Аналогично моделированию ВМАльт, имеющийся фрагмент ХВК был также размножен вдоль винтовой оси с использованием SUPPDB для построения спиральной модели, содержащей 336 субъединиц (порядка 40 витков). Сравнение профилей экспериментальной и модельной кривых (рис 8, а; кривые 1 и 2) демонстрирует небольшие сдвиги в районе первого минимума ($s_{\min} = 0,6 \text{ нм}^{-1}$) и брэгговского пика с максимумом $s_{\text{exp}} = 1,84 \text{ нм}^{-1}$ ($d_{\text{exp}} = 3,41 \text{ нм}$). Предположительно, это связано с отсутствием 28 N -концевых остатков в модели вириона ХВК (рис. 8, б), что дает ограниченное приближение экспериментальной кривой, и для построения корректной модели необходимо дополнить исходный мономер этими аминокислотными остатками.

Структурное моделирование вирионов ХВК с ΔN -пептидами. Для выяснения вклада ΔN -пептидов N -домена в рассеяние вирионов ХВК в атомную модель исходного мономера добавляли случайную цепь из 28 виртуальных аминокислотных остатков с помощью программы RANCH. Затем с помощью программы SUPPDB структура мономера с ΔN -пептидом поочередно совмещалась с каждым из 13 мономеров атомной модели ХВК (PDB ID: 6R7G). Таким образом, после объединения таких мономеров был получен фрагмент спирали, содержащий, помимо атомной структуры, также ΔN -пептиды N -домена. Аналогично моделированию ВМАльт, матрица трансформации первого мономера в 13-й последовательно применялась к интактному фрагменту 28 раз. Полученная таким размножением гибридная модель спирали (содержащая как атомы, так и виртуальные остатки) состояла из 336 субъединиц, включая также и РНК, и соответствовала примерно

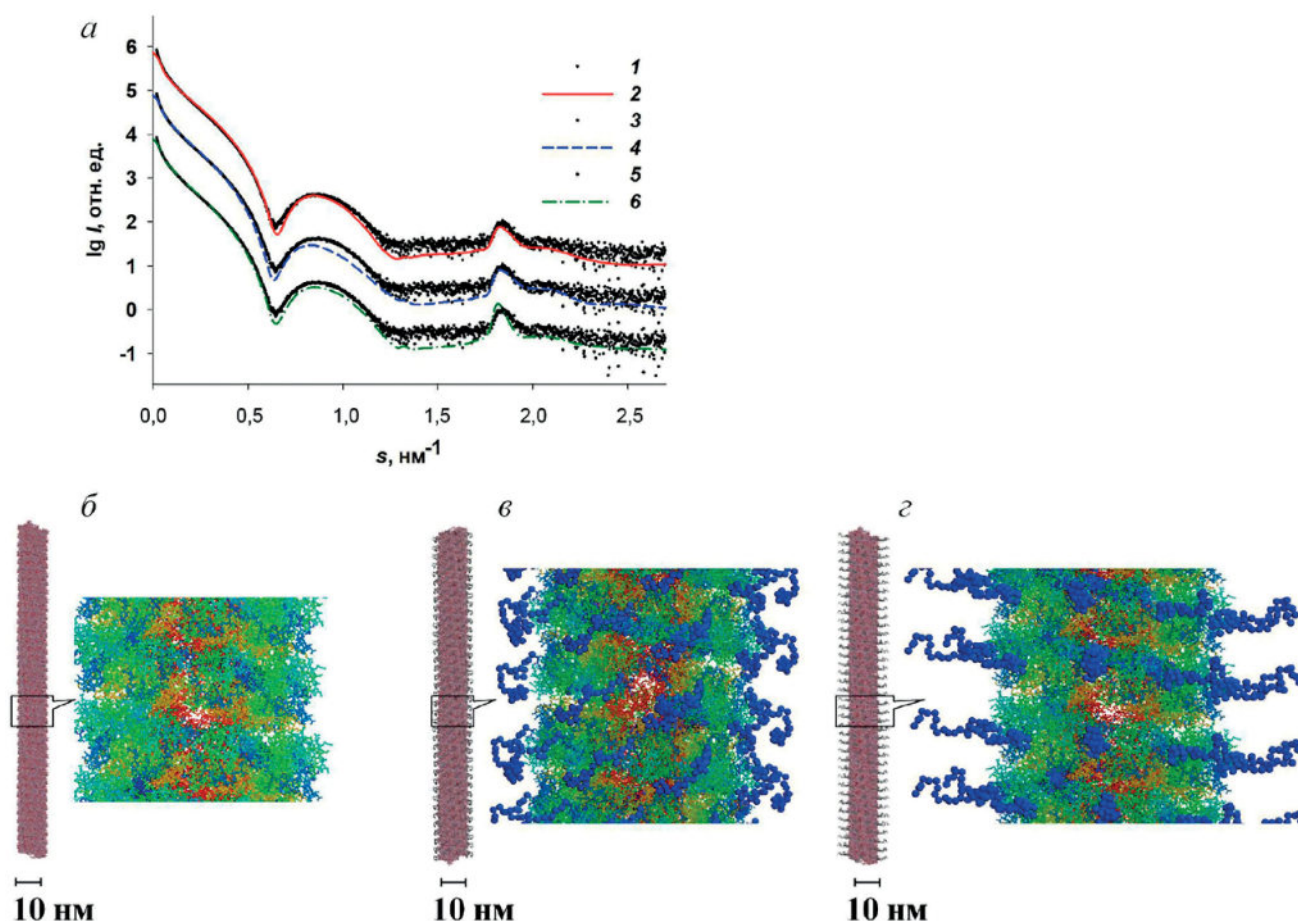


Рис. 8. Результаты приближения кривой МУРР от вириона ХВК. а – Экспериментальные данные рассеяния вириона ХВК (кривые 1, 3 и 5); рассеяние от исходной модели спирали ($\chi^2 = 70,2$) (кривая 2); приближение моделью ХВК ΔN -пептидами в сложенном состоянии ($\chi^2 = 59,7$) (кривая 4); приближение моделью ХВК с ΔN -пептидами в развернутом состоянии ($\chi^2 = 43,1$) (кривая 6). б – Исходная модель вириона; в – модель спирали ХВК с ΔN -пептидами в сложенном состоянии; з – модель спирали ХВК с ΔN -пептидами в развернутом состоянии. Окраска а.о.: 1–32 – синий; 33–64 – голубой; 65–158 – зеленый; 159–190 – желтый; 191–222 – оранжевый; 223–237 – красный. Увеличение на вставках: $10 \times$

40 виткам спирали. Рассеяние от такой модели затем сравнивалось с экспериментальными данными с помощью программы CRY SOL. С помощью таких процедур вначале была построена модель 1, в которой ΔN -пептиды в сложенном состоянии и контактируют с соседними субъединицами вириона (рис. 8, в). Такая модель дала приближение (рис. 8, а; кривые 3 и 4), которое оказалось ближе к экспериментальной кривой в области брэгговского пика, чем кривая без учета ΔN -участка. С помощью описанных выше процедур была также построена модель 2 с развернутыми ΔN -пептидами (рис. 8, з). Приближение такой модели (рис. 8, а; кривые 5 и 6) в целом лучше согласуется с экспериментальными данными, в том числе с точки зрения позиций первого минимума, однако дает немного более острый брэгговский пик. Таким образом, достичь идеального приближения экспериментальной кривой МУРР моделью с рассмотренными конформациями ΔN -участка не представилось возможным.

Остающиеся даже после добавления ΔN -пептидов небольшие отклонения модельных кривых от экспериментальных данных МУРР свидетельствуют о том, что отдельные субъединицы ХВК имеют разное строение гибких участков, т.е. в растворе могут одновременно сосуществовать вирионы с разными конформациями ΔN -пептидов, как сложенных, так и развернутых. В моделях с компактной конформацией ΔN -пептиды частично прилегают к поверхности вириона, что предполагает их взаимодействие с соседними субъединицами. Это, в свою очередь, может увеличивать стабильность вириона и приводить к повышению $T_{пл}$ вирионов ХВК. Отличия модельных и экспериментальных кривых связаны с отклонением жесткой идеальной формы модели от обладающих гибкостью и полиморфностью рассеивающих объектов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стабильность вирусных частиц почти полностью определяется межмолекулярными аксиальными и латеральными белок-белковыми взаимодействиями, а также РНК-белковыми взаимодействиями. Одним из показателей стабильности является устойчивость к термической обработке вирионов. Показано, что структурный переход нитевидных вирионов при повышении температуры происходит через образование ряда интермедиатов [36–38] и высвобождение денатурированного белка. Было обнаружено, что при нагревании некоторых фитовирусов в определенных условиях образуются структурно

модифицированные частицы сферической формы [36, 38, 39]. Было показано, что структурный переход вирионов ХВК [38] и ВМАльт [39] в сферические частицы происходит при различных условиях, что может быть связано с различием их физико-химических свойств, которые требуют дополнительных исследований.

Результаты термического анализа показали, что вирионы потексвирусов ХВК и ВМАльт по-разному реагировали на повышение температуры (рис. 3). Температура плавления препаратов ХВК была выше ВМАльт на 10–12 °С, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований [38, 39]. Причина такой разницы между двумя вирусами, относящимися к одному семейству и имеющими близкую морфологию, вероятно, заключается в структурных различиях БО в составе вирионов этих вирусов. БО потексвирусов ХВК и ВМАльт (рис. 4, а) имеют высокую гомологию в первичной структуре (68% подобных а.о.), малая величина RMSD показывала близкое сходство и третичных структур (рис. 5, б) для центральной и С-концевой частей их БО. При этом в белке ХВК мы показали наличие разупорядоченного ΔN -пептида из 28–30 а.о. в *N*-доме (рис. 4, б) в отличие от БО ВМАльт. Этот участок в БО ХВК имел большое число гидроксилсодержащих а.о. (14 Thr/Ser) и мало гидрофобных/алифатических остатков (1 Ile, 5 Ala), что могло быть причиной аномально медленной электрофоретической подвижности ХВК в геле. Подобный феномен мы описали ранее для белка потивируса АВК [2]. Наличие гидрофильных а.о. и остатков фукозы/галактозы в ΔN -пептиде БО ХВК [40] обеспечивает формирование упорядоченного слоя связанной воды, как показано ранее методом ИК-спектроскопии [40], и могло быть причиной аномальных КД-спектров вируса. Модели, полученные в результате анализа синхротронного МУРР, показали возможность того, что гибкие ΔN -концевые участки *N*-домена могут контактировать с соседними субъединицами белка и/или скреплять витки спиральной структуры и тем самым стабилизировать структуру вириона. Обнаружено, что вирионы ХВК имеют больший размер областей кристалличности *L* в сравнении с ВМАльт, а значит и более упорядочены.

Результаты наших предыдущих исследований позволили предположить, что *N*-концевая область БО ХВК играет важную роль в формировании спиральной структуры вириона. Удаление или изменение состава *N*-концевого пептида влияло на его активность в качестве трансляционного репрессора. Было показано, что БО подавляет трансляцию РНК в соста-

ве вирионов. При этом удаление *N*-концевого пептида не приводило к потере этой активности. Однако при фосфорилировании *N*-концевого пептида или замене в его составе фосфорилируемых (Thr/Ser) на нефосфорилируемые (Ala/Gly) аминокислоты БО ХВК терял способность подавлять трансляцию РНК ХВК в составе частиц, полученных при сборке с этими белками, что подтверждает выводы о том, что *N*-концевой пептид БО ХВК оказывает влияние на конформацию участков БО, которые вовлечены в белок-белковые и/или РНК-белковые взаимодействия в составе вириона [41].

Впервые структура низкого разрешения нитевидных потексвирусов ВМАлт и ХВК была получена в растворе методом МУРР. Рассчитаны диаметры ($12,7 \pm 0,1$ и $13,2 \pm 0,1$ нм соответственно). По данным крио-ЭМ, диаметр РНП ВМАлт равен 12,0 нм [35], вирионов ВМАлт — 13,5 нм [8], вирионов ХВК — около 13,0 нм [7]. Определен шаг спирали вирионов ВМАлт и ХВК ($3,37 \pm 0,01$ и $3,40 \pm 0,01$ соответственно), величины оказались близкими к данным крио-ЭМ ($3,57$ [8] и $3,52$ [7] соответственно). Результаты малоуглового рассеяния показали повышенную плотность упаковки белков в вирионах ХВК, которая, вероятно, обеспечивается стабилизирующими структуру вириона — ΔN -пептидами, контактирующими с соседними субъединицами, и определяет повышенную термостабильность вирионов ХВК в сравнении с ВМАлт.

Вклад авторов. А.Л. Ксенофонтов, Э.В. Штыкова — концепция и руководство работой; А.Л. Ксенофонтов, М.В. Петухов, В.В. Матвеев, Н.В. Федорова, А.М. Арутюнян, Т.И. Манухова, Е.А. Евтушенко — проведение экспериментов; М.В. Петухов, О.В. Карпова, П.И. Семенюк — обсуждение результатов исследования; А.Л. Ксенофонтов, М.В. Петухов, Э.В. Штыкова — написание текста; Н.А. Никитин, О.В. Карпова — редактирование текста статьи.

Благодарности. Эксперименты по выделению и характеристике вирусных частиц были проведены при поддержке междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» с использованием оборудования, приобретенного по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части проведения экспериментов МУРР.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stubbs, G., and Kendall, A. (2012) Helical viruses, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **726**, 631-658, doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_28.
2. Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., Rumvolt, R., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., and Dobrov, E. N. (2013) Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A, *PLoS One*, **8**, e67830, doi: 10.1371/journal.pone.0067830.
3. Semenyuk, P. I., Karpova, O. V., Ksenofontov, A. L., Kalinina, N. O., Dobrov, E. N., and Makarov, V. V. (2016) Structural properties of potexvirus coat proteins detected by optical methods, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1522-1530, doi: 10.1134/S0006297916120130.
4. Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagne, M. E., Bolduc, M., Leclerc, D., and Li, H. (2012) Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus, *J. Mol. Biol.*, **422**, 263-273, doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.032.
5. DiMaio, F., Chen, C. C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y. H., Lin, N. S., and Egelman, E. H. (2015) The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 642-644, doi: 10.1038/nsmb.3054.
6. Agirrezabal, X., Mendez-Lopez, E., Lasso, G., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M., and Valle, M. (2015) The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses, *eLife*, **4**, e11795, doi: 10.7554/eLife.11795.
7. Grinzato, A., Kandiah, E., Lico, C., Betti, C., Baschieri, S., and Zanotti, G. (2020) Atomic structure of potato virus X, the prototype of the Alphaflexiviridae family, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 564-569, doi: 10.1038/s41589-020-0502-4.
8. Donchenko, E. K., Pechnikova, E. V., Mishyna, M. Y., Manukhova, T. I., Sokolova, O. S., Nikitin, N. A., Atabekov, J. G., and Karpova, O. V. (2017) Structure and properties of virions and virus-like particles derived from the coat protein of Alternanthera mosaic virus, *PLoS One*, **12**, e0183824, doi: 10.1371/journal.pone.0183824.
9. Mukhamedzhanova, A. A., Smirnov, A. A., Arkhipenko, M. V., Ivanov, P. A., Chirkov, S. N., Rodio-

- nova, N. P., Karpova, O. V., and Atabekov, J. G. (2011) Characterization of Alternanthera mosaic virus and its Coat Protein, *Open Virol. J.*, **5**, 136-140, doi: 10.2174/1874357901105010136.
10. Hammond, J., Kim, Ik.-H., and Lim, H.-S. (2017) Alternanthera mosaic virus – an alternative ‘model’ potexvirus of broad relevance, *Kor. J. Agricult. Sci.*, **44**, 145-180, doi: 10.7744/kjoas.20170016.
11. Erickson, J. W., Bancroft, J. B., and Horne, R. W. (1976) The assembly of papaya mosaic virus protein, *Virology*, **72**, 514-517, doi: 10.1016/0042-6822(76)90180-x.
12. Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Prusov, A. N., Baratova, L. A., Paalme, V., Jarvekul, L., and Shtykova, E. V. (2018) Isolated Potato Virus A coat protein possesses unusual properties and forms different short virus-like particles, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36**, 1728-1738, doi: 10.1080/07391102.2017.1333457.
13. Homer, R. B., and Goodman, R. M. (1975) Circular dichroism and fluorescence studies on potato virus X and its structural components, *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 296-304, doi: 10.1016/0005-2787(75)90117-3.
14. Atabekov, J., Dobrov, E., Karpova, O., and Rodionova, N. (2007) Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution, *Mol. Plant Pathol.*, **8**, 667-675, doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00420.x.
15. Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., Mertens, H. D. T., Kikhney, A. G., Hajizadeh, N. R., Franklin, J. M., Jeffries, C. M., and Svergun, D. I. (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *J. Appl. Crystallogr.*, **50**, 1212-1225, doi: 10.1107/S1600576717007786.
16. Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Timmins, P. A., and May, R. P. (2013) *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, First Edn., Oxford University Press, Oxford.
17. Ksenofontov, A. L., Petoukhov, M. V., Prusov, A. N., Fedorova, N. V., and Shtykova, E. V. (2020) Characterization of tobacco mosaic virus virions and re-polymerized coat protein aggregates in solution by small-angle X-ray scattering, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 310-317, doi: 10.1134/S0006297920030062.
18. Shtykova, E. V., Petoukhov, M. V., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Skurat, E. V., Kordyukova, L. V., Moiseenko, A. V., and Ksenofontov, A. L. (2021) The structure of the potato virus a particles elucidated by small angle X-ray scattering and complementary techniques, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 230-240, doi: 10.1134/S0006297921020115.
19. Miroshnichenko, N. A., Karpova, O. V., Morozov, S., Rodionova, N. P., and Atabekov, J. G. (1988) Translation arrest of potato virus X RNA in Krebs-2 cell-free system: RNase H cleavage promoted by complementary oligodeoxynucleotides, *FEBS Lett.*, **234**, 65-68, doi: 10.1016/0014-5793(88)81304-8.
20. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
21. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, doi: 10.1038/msb.2011.75.
22. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., Jeffries, C. M., Franke, D., Mark, D., Zengerle, R., Cipriani, F., Fiedler, S., Roessle, M., and Svergun, D. I. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY), *J. Appl. Crystallogr.*, **48**, 431-443, doi: 10.1107/S160057671500254X.
23. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 1277-1282, doi: 10.1107/S0021889803012779.
24. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I., and Franke, D. (2021) ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **54**, 343-355, doi: 10.1107/S1600576720013412.
25. Вайнштейн Б. (1963) *Дифракция рентгеновских лучей на цепных молекулах*, АН СССР, Москва.
26. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495-503, doi: 10.1107/S0021889892001663.
27. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612, doi: 10.1002/jcc.20084.
28. Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2001) MASSHA – a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data, *J. Appl. Cryst.*, **34**, 527-532, doi: 10.1107/S0021889801006100.
29. Kozin, M. B., and Svergun, D. I. (2000) A software system for rigid-body modelling of solution scattering data, *J. Appl. Cryst.*, **33**, 775-777, doi: 10.1107/S0021889800001382.
30. Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M., and Svergun, D. I. (2007) Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5656-5664, doi: 10.1021/ja069124n.
31. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL – A program to evaluate x-ray solution

- scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.*, **28**, 768-773, doi: 10.1107/S0021889895007047.
32. Tozzini, A. C., Ek, B., Palva, E. T., and Hopp, H. E. (1994) Potato virus X coat protein: a glycoprotein, *Virology*, **202**, 651-658, doi: 10.1006/viro.1994.1386.
 33. Ivanov, P. A., Mukhamedzhanova, A. A., Smirnov, A. A., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., and Atabekov, J. G. (2011) The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting *Portulaca grandiflora* represents a new strain distinct from phlox isolates, *Virus Genes*, **42**, 268-271, doi: 10.1007/s11262-010-0556-6.
 34. Nemykh, M. A., Novikov, V. K., Arutiunian, A. M., Kalmykov, P. V., Drachev, V. A., and Dobrov, E. N. (2007) Comparative study of structural stability of potato virus X coat protein molecules in solution and in the virus particles [in Russian], *Mol. Biol.*, **41**, 697-705, doi: 10.1134/S0026893307040164.
 35. Thuenemann, E. C., Byrne, M. J., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Ferriol, I., Santoni, M., Steele, J. F. C., Ranson, N. A., Avesani, L., Lopez-Moya, J. J., and Lomonosoff, G. P. (2021) A replicating viral vector greatly enhances accumulation of helical virus-like particles in plants, *Viruses*, **13**, 885, doi: 10.3390/v13050885.
 36. Atabekov, J., Nikitin, N., Arkhipenko, M., Chirkov, S., and Karpova, O. (2011) Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles, *J. Gen. Virol.*, **92**, 453-456, doi: 10.1099/vir.0.024356-0.
 37. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvold, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekul, L., and Dobrov, E. N. (2016) Heating-induced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into beta-structure, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **34**, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
 38. Nikitin, N., Ksenofontov, A., Trifonova, E., Arkhipenko, M., Petrova, E., Kondakova, O., Kirpichnikov, M., Atabekov, J., Dobrov, E., and Karpova, O. (2016) Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions, *FEBS Lett.*, **590**, 1543-1551, doi: 10.1002/1873-3468.12184.
 39. Manukhova, T. I., Evtushenko, E. A., Ksenofontov, A. L., Arutyunyan, A. M., Kovalenko, A. O., Nikitin, N. A., and Karpova, O. V. (2021) Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles, *PLoS One*, **16**, e0255378, doi: 10.1371/journal.pone.0255378.
 40. Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Serebryakova, M. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., and Rodionova, N. P. (2004) N-Terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3136-3145, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04243.x.
 41. Karpova, O. V., Arkhipenko, M. V., Zaiakina, O. V., Nikitin, N. A., Kiseleva, O. I., Kozlovskii, S. V., Rodionova, N. P., and Atabekov, I. G. (2006) Translational regulation of potato virus X RNA-coat protein complexes: the key role of a coat protein N-terminal peptide [in Russian], *Mol. Biol.*, **40**, 703-710, doi: 10.1134/S0026893306040157.

INFLUENCE OF THE STRUCTURE OF THE COAT PROTEIN N-TERMINAL SEGMENT IN POTATO VIRUS X AND ALTERNANTHERA MOSAIC VIRUS ON THE STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF VIRIONS

**A. L. Ksenofontov^{1*}, M. V. Petoukhov^{2,3}, V. V. Matveev², N. V. Fedorova¹, P. I. Semenyuk¹,
A. M. Arutyunyan¹, T. I. Manukhova⁴, E. A. Evtushenko⁴, N. A. Nikitin⁴,
O. V. Karpova⁴, and E. V. Shtykova²**

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

² *Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics",
Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia*

³ *A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

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

The amino acid sequences of coat proteins (CPs) of potexviruses such as potato virus X (PVX) and alternanthera mosaic virus (AltMV) share about 40% sequence identity. However, the N-terminal CP domains of these virions differ both in length (the N-terminal CP domain of PVX is longer by 28 residues, $\Delta N = 28$), and in amino acid sequence. In this work, we determined the effect of the N-terminal CP domain

on the structure and physicochemical properties of the entire PVX and AltMV virions. It was shown that the melting point of PVX samples is 10-12°C higher than that of AltMV preparations; the circular dichroism spectra of these viruses also differ significantly. Spatial alignment of the existing high-resolution potexvirus CP structures showed that the RMSD value between C α -atoms was the largest for the N-terminal domains of the two compared models. From computer simulations the Δ N-terminal CP domain of PVX is completely disordered. According to synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) data, the structure of CP of PVX and AltMV virions differs, in particular, CP PVX has a larger size of crystallinity regions and, therefore, is more ordered. Using SAXS, virion diameters and helix parameters in solution are calculated. The influence of the conformation and localization of the N-terminal domain of PVX CP relative to the surface of the virion on its structure was revealed. Presumably, the increased thermal stability of PVX virions compared to AltMV is provided by the elongated N-terminal domains ($\Delta N = 28$), which ensures additional contact between the adjacent CP subunits in the PVX virion.

Keywords: potexviruses, potato X-virus, alternanthera mosaic viruses, coat protein, N-terminal domain, circular dichroism, small-angle X-ray scattering

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ НА ПРОЦЕССЫ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В РАЗЛИЧНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ РЕЖИМАХ

© 2023 В.В. Михайлова*, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, Б.И. Курганов

ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: mikhaylova.inbi@inbox.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 29.11.2022

Формирование и накопление белковых агрегатов отрицательно сказываются на внутриклеточных процессах в живой клетке и являются негативными факторами при производстве и хранении белковых препаратов. Химические шапероны способны предотвращать агрегацию белков, однако это их свойство не является универсальным и зависит от структуры белка-мишени и кинетики его агрегации. В настоящей работе изучено влияние бетаина (Bet) и лизина (Lys) на тест-системы, основанные на тепловой агрегации мышечной гликогенфосфорилазы *b* (ФБ) при 48 °С, УФ-облученной ФБ (УФ-ФБ) при 37 °С и апо-формы ФБ (апо-ФБ) при 37 °С, характеризующиеся порядком агрегации по белку (n), равным 0,5; 1 или 2 соответственно. Методами динамического светорассеяния, дифференциальной сканирующей калориметрии и аналитического ультрацентрифугирования показано, что Bet защищает ФБ и апо-ФБ от агрегации, однако ускоряет агрегацию УФ-ФБ. В то же время Lys препятствует агрегации УФ-ФБ и апо-ФБ, но увеличивает скорость формирования агрегатов ФБ. Обсуждаются механизмы действия химических шаперонов на третичную и четвертичную структуры и кинетику тепловой агрегации белков-мишеней. Сравнение влияния химических шаперонов на тест-системы с разными кинетическими режимами агрегации позволяет получить более полную информацию о механизме их действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: агрегация, кинетический режим, химический шаперон, гликогенфосфорилаза *b*.

DOI: 10.31857/S0320972523010062, EDN: PBWUAU

ВВЕДЕНИЕ

Потеря нативной структуры белка под влиянием повышенной температуры, изменения рН или ионной силы, УФ-облучения и других стрессовых воздействий может приводить к формированию аморфных или фибриллоподобных агрегатов [1, 2]. Накопление белковых агрегатов в живой клетке негативно влияет на внутриклеточные процессы и может провоцировать развитие таких заболеваний, как катаракта, сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания [3–5]. Неконтролируемая агрегация также является негативным фактором при производстве и хранении белковых препаратов.

В общем виде процесс агрегации белков включает в себя стадии разворачивания белко-

вой молекулы (intermediate state), нуклеации и роста агрегатов за счет присоединения развернутых молекул к сформировавшимся ядрам [6, 7]. Для олигомерных белков стадия денатурации также включает их диссоциацию на мономеры [8]. Кинетику агрегации модельного белка в заданных условиях будет определять самая медленная стадия процесса. Если рассматривать агрегацию как необратимую реакцию, в которой n неагрегированных молекул белка (P) переходят в агрегированное состояние, то скорость агрегации (v_{agg}) можно интерпретировать как:

$$v_{agg} = -d[P]/dt = nk[P]^n, \quad (1)$$

где $[P]$ — концентрация неагрегированного белка, t — время, n — порядок агрегации по белку

Принятые сокращения: апо-ФБ — апо-форма гликогенфосфорилазы *b*; ДЛС — динамическое лазерное светорассеяние; ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия; УФ-ФБ — УФ-облученная гликогенфосфорилаза *b*; ФБ — гликогенфосфорилаза *b*; АУС — аналитическое ультрацентрифугирование; Bet — бетаин; IS — ионная сила.

* Адресат для корреспонденции.

и k — константа скорости агрегации n -го порядка [7]. Предложенный подход позволяет делать выводы о кинетическом режиме агрегации белков [9–11], который может определять способность различных агентов воздействовать на этот процесс.

Осмолиты накапливаются в клетке в ответ на неблагоприятные внешние условия и играют важную роль в защите живых клеток от осмотического, теплового и других видов стресса. Многие из осмолитов способны функционировать как химические шапероны: защищать клеточные компоненты от денатурирующих стрессовых воздействий, повышать стабильность белковых молекул, сохранять их структуру и функции [12–15]. Механизмы действия осмолитов и их потенциальное использование в качестве терапевтических молекул в настоящее время активно изучаются [16].

Бетаин (N,N,N-триметилглицин, Bet) является одним из наиболее эффективных и широко распространенных осмолитов как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. В условиях стресса концентрация Bet в клетках может достигать значений 0,7–1,0 М [17]. Bet способен стабилизировать белки, ингибировать их агрегацию, активировать рефолдинг белков, а также стимулировать дезагрегацию амилоидных фибрилл [17–21]. С другой стороны, Bet может усиливать агрегацию/фибрилляцию полиглутамина или бычьего сывороточного альбумина [22, 23]. В некоторых тест-системах действие этого осмолита на агрегацию белка может варьироваться в зависимости от его концентрации или pH раствора [24, 25].

В качестве химических шаперонов способны выступать не только осмолиты. Известно, что L-лизин (Lys) может стабилизировать нативную структуру белков, повышать их растворимость, защищать их от аморфной агрегации и от инактивации [26–30]. Lys широко используется биотехнологами для хранения терапевтических белков [31]. Тем не менее существуют тест-системы, в которых Lys ускоряет агрегацию модельного белка или же его влияние на стабильность белковой молекулы и ее склонность к агрегации варьируется в зависимости от условий среды или концентрации аминокислоты [32–34].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния химических шаперонов Bet и Lys на тест-системы, характеризующиеся различными кинетическими режимами агрегации. Мышечная гликогенфосфоорилаза *b* (ФБ) представляет собой димерный белок с молекулярной массой 194,7 кДа [35]. Ее тепловая агрега-

ция при 48 °С лимитируется стадией обратимой диссоциации димера на быстро денатурирующие мономеры [36]. Порядок агрегации по белку (n) для данной тест-системы равен 0,5 [37]. УФ-Облучение ФБ (УФ-ФБ) или удаление пиридоксаль-5'-фосфата из активного центра фермента (апо-ФБ) приводит к изменению кинетического режима агрегации белка. Лимитирующей стадией тепловой агрегации УФ-ФБ при 37 °С является стадия структурной реорганизации молекулы белка; $n = 1$ [38]. Агрегация апо-ФБ при 37 °С лимитируется скоростью бимолекулярной реакции присоединения развернутых белковых молекул к образовавшимся ядрам; $n = 2$ [37]. Различие лимитирующих стадий тепловой агрегации этих белков может приводить к различию механизмов действия на них химических шаперонов.

Имеются данные, что тепловая агрегация ФБ при 48 °С ($n = 0,5$) тормозится в присутствии Bet, но ускоряется в присутствии Lys [39]. В настоящей работе был проведен подробный анализ влияния Bet и Lys на кинетику тепловой агрегации ФБ. Впервые было исследовано влияние данных шаперонов на агрегацию УФ-ФБ и апо-ФБ при 37 °С ($n = 1$ и $n = 2$ соответственно). Сравнение действия химических шаперонов на тест-системы с различной кинетикой агрегации позволило более детально охарактеризовать механизмы действия Bet и Lys.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы Hepes, гидрохлорид L-лизина («Sigma-Aldrich», США), бетаин («ICN Biomedicals Inc.», США), NaCl («Реахим», Россия), дитиотреитол (ДТТ; «Panreac», Испания). Воду для всех растворов готовили с использованием системы Easy-Pure II RF («Barnstead International», США). Все эксперименты проводились в 30 mM Hepes (pH 6,8) с постоянной ионной силой (I_S), равной 150 mM, создаваемой NaCl там, где это было необходимо.

Выделение и подготовка белков. ФБ из скелетных мышц кролика выделяли, хранили и подготавливали к эксперименту согласно методикам, описанным в работах Kurganov et al. [36] и Eronina et al. [40]. УФ-Облучение ФБ проводили с использованием Hg-Xe лампы L8252 («Hamamatsu Photonics», Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при 6 °С, как описано ранее [38]. Мощность падающего света составляла 10,4 мВт/см², время облучения составляло 15 мин, доза облучения составляла 9,4 Дж/см².

Выделение апо-ФБ проводили согласно методике, описанной в работе Shaltiel et al. [41]. Сульфат-аммонийный осадок, полученный после отделения пиридоксальфосфата (PLP), растворяли в 30 мМ буфере Hepes-NaOH (pH 6,8), содержащем 150 мМ NaCl и 5 мМ ДТТ (для опытов, проводимых методом ДСК (см. ниже), буфер не содержал ДТТ). Оставшийся PLP и сульфат аммония отделяли от апо-ФБ на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной тем же буфером. Нанопотометр NP80 («Implen», Германия) использовали для спектрофотометрического определения концентрации белков при 280 нм (коэффициент поглощения $A_{\text{см}}^{1\%} = 13,2$).

Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС).

Метод ДЛС применялся для изучения кинетики тепловой агрегации ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С в отсутствие и в присутствии химических шаперонов. Кривые светорассеяния регистрировали с использованием корреляционного спектрометра Photocor Complex («PhotoCor Instruments Inc.», США), как описано в работах Eronina et al. [39, 40]. Буфер или растворы химических шаперонов в буфере инкубировали в ячейке в течение 5 мин при 48 °С для опытов с ФБ или при 37 °С — для опытов с УФ-ФБ или апо-ФБ перед добавлением белка-мишени до конечной концентрации 0,3 мг/мл. Все эксперименты были повторены не менее трех раз.

Полидисперсный анализ корреляционных функций флуктуаций интенсивности рассеянного света, полученных методом ДЛС, проводили с использованием программного обеспечения DynaLS («Alango», Израиль), как описано ранее [38]. Полученное значение коэффициента диффузии частиц (D) применялось для расчета размеров гидродинамических радиусов R_h белковых молекул и их агрегатов в растворе с использованием уравнения Стокса—Эйнштейна:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_h, \quad (2)$$

где k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, а η — динамическая вязкость растворителя. Коэффициенты преломления и значения динамической вязкости, необходимые для определения R_h , представлены в табл. П1 и П2 в Приложении.

Анализ кинетических кривых агрегации.

В отсутствие и в присутствии химических шаперонов кинетические кривые тепловой агрегации белков-мишеней можно описать уравнением [42]:

$$I - I_0 = v_0(t - t^*) - B(t - t^*)^2, \quad (t > t^*), \quad (3)$$

где I — интенсивность светорассеяния, t — время, I_0 — начальная интенсивность светорассеяния в момент $t = 0$, t^* — длительность стадии нуклеации, определяемая отрезком на оси абсцисс, отсекаемым теоретической кривой, рассчитанной из этого уравнения, v_0 — начальная скорость процесса агрегации на стадии роста агрегатов и B — константа. Уравнение (3) применимо только для описания части кинетической кривой выше точки перегиба.

Размеры стартовых агрегатов ($R_{h,0}$), детектируемых в растворе в начальный момент увеличения интенсивности светорассеяния, определяли на основании зависимости $(I - I_0)$ от R_h , как описано ранее [43]. Размер агрегатов, детектируемых после завершения стадии нуклеации (R_h^*), определяли на основании зависимости $R_h(t)$ в момент времени $t = t^*$.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Исследования влияния химических шаперонов на тепловое разворачивание ФБ и апо-ФБ проводились с использованием дифференциального сканирующего калориметра MicroCal VP-Capillary DSC («Malvern Instruments», США) при скорости нагрева 1 °С/мин. Концентрация белка составляла 1 мг/мл. В опытах с химическими шаперонами в контрольную и экспериментальную ячейки добавляли одну и ту же концентрацию шаперона. Корректировку калориметрических сканов, оценку термостабильности белка и расчет калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}) проводили, как описано ранее [44].

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC).

Эксперименты по скоростной седиментации проводились в аналитической ультрацентрифуге модели Е («Beckman», США), оснащенной абсорбционной оптикой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером онлайн. В экспериментах использовали ротор с шестью отверстиями (An-G Ti) и 12-мм двухсекторные ячейки. Перед опытом ротор предварительно грели в термостате при 48 °С в течение ночи. Профили седиментации образцов регистрировали путем измерения оптической плотности при 280 нм. Все ячейки сканировались одновременно с интервалом в 2,5 мин. Распределения дифференциальных коэффициентов седиментации [$c(s)$ vs s] были определены при 48 °С и приведены к стандартным условиям (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °С) с помощью программы SEDFIT [45]. Скорость ротора во всех опытах составляла 48 000 об./мин. Значения плотности и динамической вязкости растворов, используемых в опытах AUC, представлены в таблицах П1 и П2 в Приложении.

Анализ данных. Программное обеспечение Origin («OriginLab Corporation», США) версии 8.0 и выше было использовано для анализа полученных данных. Для характеристики соответствия экспериментальных данных теоретическим уравнениям использовался коэффициент детерминации R^2 . Все представленные в работе данные характеризовались значениями $R^2 \geq 0,98$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние Bet на кинетику тепловой агрегации модельных белков. Влияние химического шаперона Bet на агрегацию ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С изучалось методом ДЛС. На рис. 1 представлены зависимости интенсивности светорассеяния ($I-I_0$) и размеров гидродинамических радиусов агрегатов (R_h)

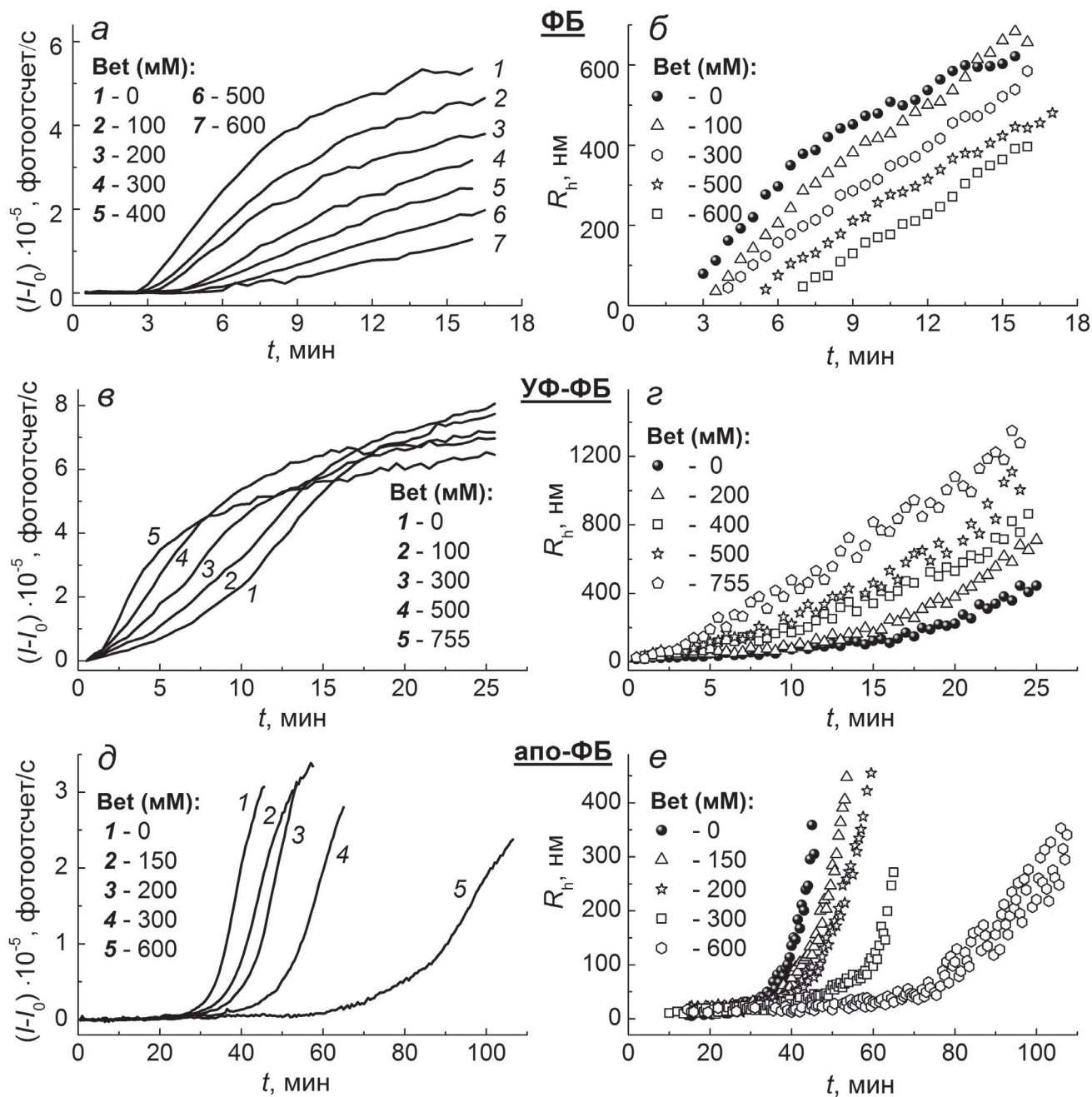


Рис. 1. Влияние Bet на кинетику агрегации модельных белков. Зависимости $(I-I_0)$ (а, в и д) и R_h (б, г и е) от t для ФБ при 48 °С (а и б), УФ-ФБ при 37 °С (в и г) и апо-ФБ при 37 °С (д и е) в присутствии Bet. Концентрации шаперона указаны на панелях; концентрация белка во всех экспериментах составляла 0,3 мг/мл. Исследования проводили в 30 мМ Перес (рН 6,8) при постоянной ионной силе (IS) 150 мМ, создаваемой NaCl. Для наглядности на рис. 1 приведены данные не для всех изученных концентраций Bet

Таблица 1. Изменения основных параметров, характеризующих кинетику агрегации ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С, при повышении концентрации Bet

Основные параметры агрегации	Тест-система и диапазон концентраций Bet		
	ФБ при 48 °С ($n = 0,5$); [Bet]: 0–600 мМ	УФ-ФБ при 37 °С ($n = 1$); [Bet]: 0–755 мМ	апо-ФБ при 37 °С ($n = 2$); [Bet]: 0–600 мМ
Длительность стадии нуклеации, t^* , мин	возрастает с $3,02 \pm 0,04$ до $6,06 \pm 0,18$	снижается с $7,14 \pm 0,11$ до $1,22 \pm 0,07$	возрастает с $33,02 \pm 0,11$ до $73,70 \pm 0,75$
Начальная скорость роста агрегатов, $v_0 \cdot 10^{-4}$, мин $^{-1}$	снижается с $8,90 \pm 0,14$ до $1,40 \pm 0,09$	возрастает с $8,44 \pm 0,23$ до $12,00 \pm 0,33$	снижается с $3,38 \pm 0,10$ до $0,66 \pm 0,05$
Размер стартовых агрегатов, $R_{h,0}$, нм	снижается с $60,1 \pm 2,8$ до $19,8 \pm 2,7$	изменяется с $20,0 \pm 1,0$ до $26,3 \pm 2,1$	снижается с $16,4 \pm 0,9$ до $11,4 \pm 1,2$
Размер ядер, R_h^* , нм	снижается с $70,3 \pm 3,1$ до $28,8 \pm 1,7$	возрастает с $44,4 \pm 1,1$ до $63,7 \pm 1,3$ (100 мМ Bet); далее снижается до $35,4 \pm 1,2$	возрастает с $40,2 \pm 1,5$ до $67,4 \pm 2,7$

Примечание. Концентрация белка составляла 0,3 мг/мл (30 мМ Herpes (pH 6,8); $IS = 150$ мМ).

от времени (t) для белков-мишеней в присутствии различных концентраций Bet. Согласно полученным данным, рост концентрации Bet в диапазоне 0–600 мМ сопровождается увеличением продолжительности лаг-периода на кинетических кривых агрегации ФБ и апо-ФБ и снижением значений $I-I_0$ и R_h (рис. 1, а, б, д и е). Это указывает на то, что Bet защищает данные белки от тепловой агрегации. Прямо противоположное влияние Bet оказывает на УФ-ФБ, и рост концентрации Bet до 755 мМ стимулирует формирование агрегатов (рис. 1, в и г).

При анализе влияния шаперонов на кинетику агрегации модельных белков важно понимать, по какому пути идет агрегация этих белков в отсутствие добавок. Подобные исследования были проведены в наших предыдущих работах [37, 38]. На схеме представлены основные стадии процесса агрегации ФБ, УФ-ФБ и апо-ФБ в выбранных условиях; скорость-лимитирующая стадия для каждой тест-системы выделена серым цветом. Следует отметить, что все предлагаемые механизмы агрегации основаны на предположении, что рост белковых агрегатов происходит за счет присоединения развернутых белковых молекул к сформировавшимся ядрам, а концентрация ядер по завершении стадии нуклеации пропорциональна исходной концентрации белка [46].

Количественная оценка влияния Bet на длительность стадии нуклеации (t^*) и на начальную скорость роста агрегатов на стадии

роста агрегатов (v_0) модельных белков была получена с использованием уравнения (3). Также были оценены размеры стартовых агрегатов ($R_{h,0}$) и ядер (R_h^*) (см. раздел «Материалы и методы»). Таблица 1 демонстрирует изменения значений этих параметров с ростом концентрации Bet для каждой тест-системы. Полный набор полученных данных для ФБ, УФ-ФБ и апо-ФБ в присутствии различных концентраций Bet представлен в табл. ПЗ–П5 в Приложении.

Влияние Bet на термостабильность модельных белков. Денатурация белка является одной из ключевых стадий процесса его агрегации (схема). Для оценки влияния Bet на тепловое разворачивание модельных белков использовался метод ДСК. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения для ФБ (1 мг/мл) и апо-ФБ (1 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 100 мМ или 600 мМ Bet представлены на рис. 2. Получить аналогичные данные для УФ-ФБ не представляется возможным, поскольку нативная третичная структура белка практически утрачивается в процессе УФ-облучения [38].

Температура максимума ($T_{\max}$) профиля ДСК для ФБ соответствует значению 57,8 °С (рис. 2, а; сплошная кривая). Добавление 100 или 600 мМ Bet повышает термостабильность ФБ и сдвигает кривую в сторону более высоких температур до $T_{\max} = 58,3$ °С или 59,9 °С соответственно (рис. 2, а; штриховая и штрихпунктирная кривые). Основные калориметрические параметры,

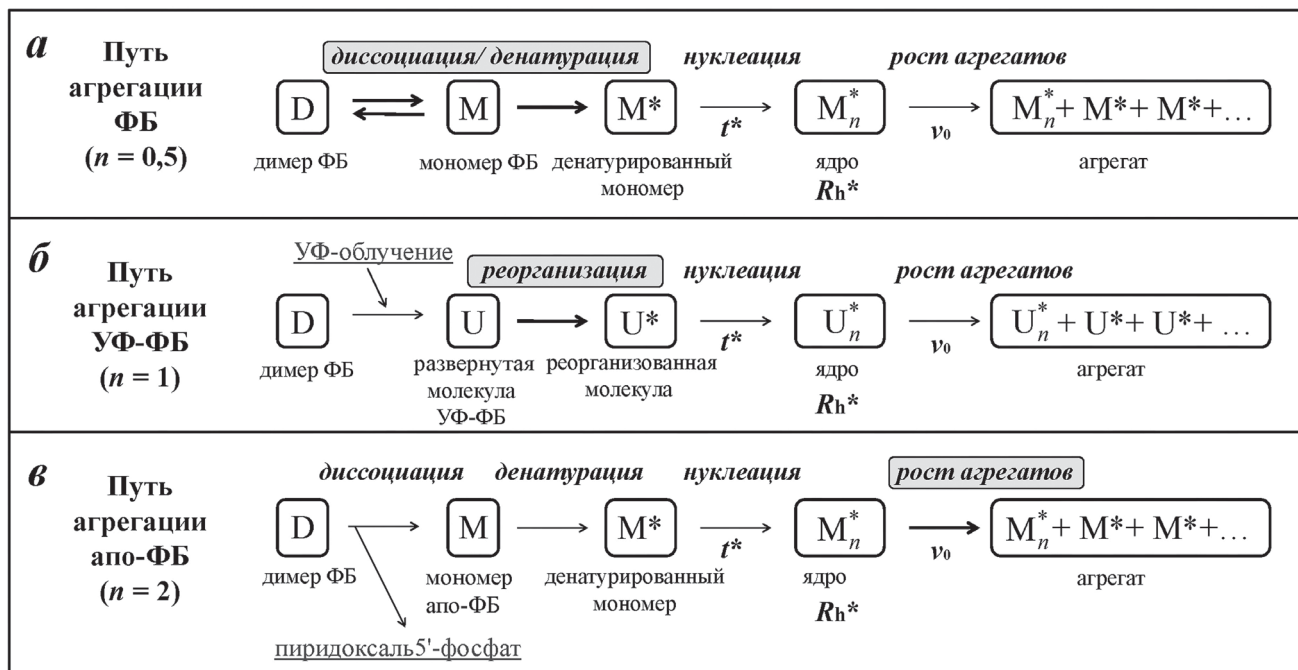


Схема. Механизмы тепловой агрегации ФБ при 48 °С (а), УФ-ФБ при 37 °С (б) и апо-ФБ при 37 °С (в). Для каждой тест-системы обозначены скорость-лимитирующая стадия (выделены серым цветом и жирными стрелками на схеме) и основные параметры, характеризующие стадию нуклеации (t^* , R_h^*) и стадию роста агрегатов (ν_0)

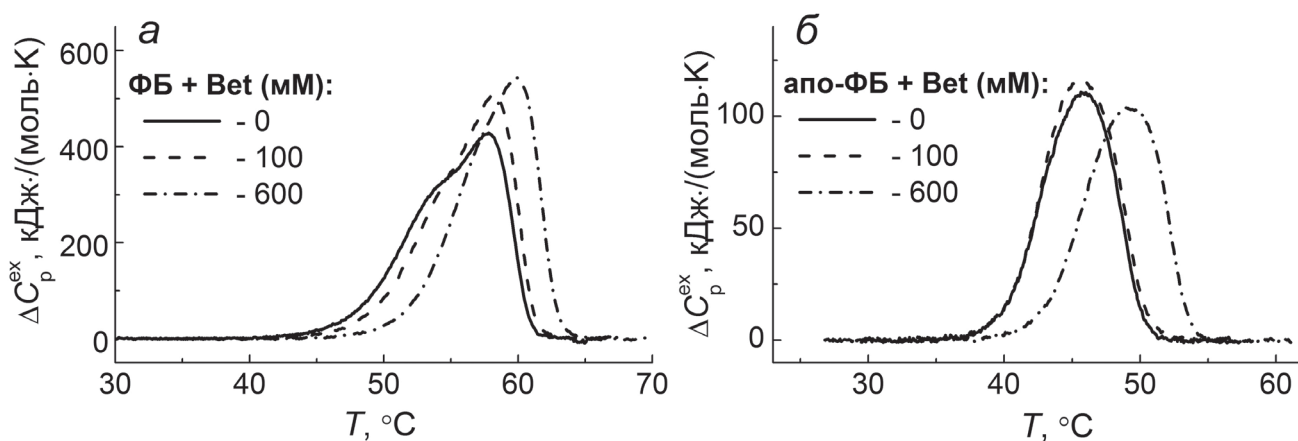


Рис. 2. Влияние Bet на термостабильность ФБ и апо-ФБ. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения (ΔC_p^{ex}), полученные для ФБ (1 мг/мл, панель а) и апо-ФБ (1 мг/мл, панель б) в отсутствие и в присутствии 100 или 600 мМ Bet

характеризующие профили ДСК, представлены в табл. 2. Согласно табл. 2, калориметрическая энтальпия (ΔH_{cal}) теплового перехода ФБ, определяемая как площадь под кривой ДСК, незначительно увеличивается при добавлении шаперона, а сам переход становится более кооперативным, о чем свидетельствует уменьшение ширины пика. Это указывает на конформационные изменения, происходящие в молекуле ФБ под влиянием Bet.

Тепловая денатурация молекулы апо-ФБ (рис. 2, б; табл. 2) в отсутствие добавок характеризуется значениями $T_{\text{max}} = 45,9$ °С и $\Delta H_{\text{cal}} = 725$ кДж·моль⁻¹. Присутствие Bet прак-

тически не влияет на энтальпию, ширину и форму пика, а положение T_{max} смещается в сторону более высоких температур до 49,2 °С только при высоких (600 мМ) концентрациях шаперона. Это означает, что Bet может повышать термостабильность апо-ФБ, однако не инициирует значительных структурных перестроек в молекуле белка.

Механизм действия Bet на агрегацию ФБ при 48 °С. Согласно схеме, первым этапом процесса тепловой агрегации ФБ является стадия денатурации белковой молекулы. Эта стадия неразрывно связана с обратимой диссоциацией нативного димера ФБ на мономеры ($D \leftrightarrow M$).

Таблица 2. Основные калориметрические параметры тепловых переходов ФБ и апо-ФБ в присутствии химических шаперонов

Белок	Шаперон	$T_{\max}$, °C	ΔH_{cal} , кДж·моль ⁻¹	Ширина пика, °C
ФБ (1 мг/мл)	нет	57,8 ± 0,1	3470 ± 210	7,97 ± 0,09
	100 мМ Bet	58,3 ± 0,1	3620 ± 230	6,85 ± 0,07
	600 мМ Bet	59,9 ± 0,1	3700 ± 245	6,45 ± 0,09
	100 мМ Lys	53,9 ± 0,1	3750 ± 260	8,93 ± 0,11
апо-ФБ (1 мг/мл)	нет	45,9 ± 0,1	725 ± 45	6,30 ± 0,07
	100 мМ Bet	45,7 ± 0,1	775 ± 47	6,44 ± 0,09
	600 мМ Bet	49,2 ± 0,1	730 ± 45	6,74 ± 0,08
	100 мМ Lys	46,1 ± 0,1	783 ± 50	6,38 ± 0,07

Примечание. В таблице приведены средние значения полученных данных ± стандартное отклонение.

Поскольку химические шапероны могут оказывать значительное влияние на этот процесс, олигомерное состояние ФБ в отсутствие и в присутствии Bet было исследовано методом AUC. Полученные данные седиментации представлены на рис. 3.

Распределение $c(s)$ для ФБ показывает два пика с коэффициентами седиментации ($s_{20,w}$) 5,3 и 10 S, которые соответствуют мономерной и димерной формам белка. Сравнение этого распределения с таковыми для смесей ФБ в присутствии Bet (100, 300 и 500 мМ; рис. 3) показало, что доля мономера ФБ (5,3 S) уменьшалась с ростом концентрации шаперона. При этом появляются новые пики с $s_{20,w}$, равные

6,2; 7,1 и 8,3 S, которые могут соответствовать частично развернутым димерам с разной конформацией. Небольшое плечо $s_{20,w} = 10$ S на распределении $c(s)$ в присутствии 500 мМ Bet указывает на то, что небольшая часть димера может находиться в нативной форме.

Таким образом, данные AUC указывают на смещение равновесия $D \leftrightarrow M$ в сторону димерной формы ФБ под влиянием Bet, что коррелирует с полученными ранее данными [40]. Способность осмолитов стабилизировать нативную структуру белков широко обсуждается в недавнем обзоре Sharma et al. [47]. Следует отметить, что краудинг, возникающий из-за присутствия высоких концентраций шаперонов,

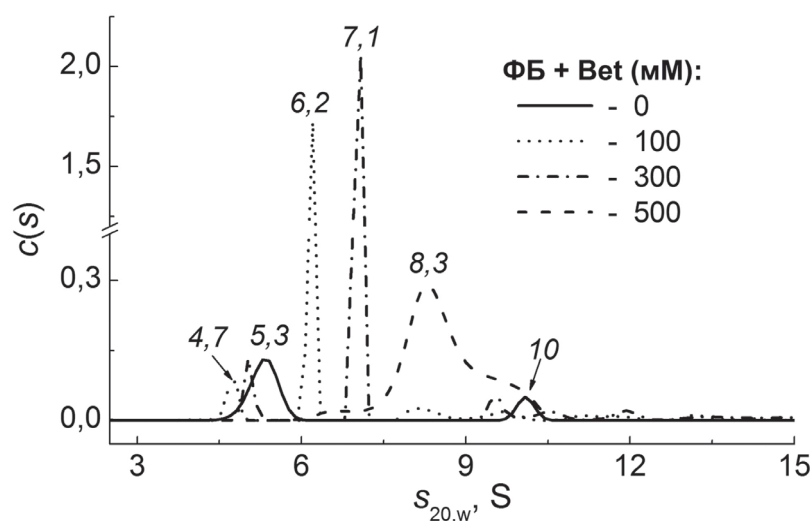


Рис. 3. Влияние Bet на олигомерное состояние ФБ. Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации, $c(s)$, для ФБ (0,37 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 100, 300 или 500 мМ Bet. Значения коэффициента седиментации выделены курсивом. Распределения $c(s)$ были получены при 48 °C и приведены к стандартным условиям. Общее время при 48 °C составило 80 мин

также может препятствовать диссоциации ФБ и стабилизировать димерную форму белка на этой стадии.

Димер ФБ денатурирует медленнее, чем его мономер [36], что объясняет повышение термостабильности белка в присутствии Bet (данные ДСК). Стабилизация третичной и четвертичной структуры молекулы ФБ с ростом концентрации Bet приводит к снижению скорости его разворачивания под действием температуры. Согласно данным ДЛС (табл. 1), снижение параметра v_0 свидетельствует о замедлении процесса слипания развернутых белковых молекул. Длительность стадии нуклеации возрастает (параметр t^*), а значительное уменьшение размеров $R_{h,0}$ и R_h^* может означать, что в образовании стартовых агрегатов и ядер участвует меньшее количество развернутых белковых молекул или что конформация этих молекул более компактна.

Можно заключить, что защитный эффект Bet при тепловой агрегации ФБ при 48 °C обусловлен в первую очередь ингибированием лимитирующей для данной тест-системы стадии диссоциации/денатурации ФБ ($n = 0,5$; схема, а). Вследствие этого количество развернутых молекул белка в растворе нарастает медленно, что приводит к снижению скоростей формирования ядер и роста агрегатов.

Механизмы действия Bet при тепловой агрегации апо-ФБ и УФ-ФБ. В отличие от нативной ФБ, апо-ФБ является мономерным термолабильным белком, поскольку удаление пиридоксаль-5'-фосфата из активного центра фермента приводит к его диссоциации [48, 49]. При 37 °C стадия денатурации апо-ФБ протекает быстро, а скорость-лимитирующей становится стадия роста агрегатов ($n = 2$; схема, в) [37]. Данные ДЛС (рис. 1, д) показывают, что Bet в концентрации 600 мМ замедляет агрегацию белка-мишени, увеличивая значение t^* и снижая v_0 (табл. 1). Это может быть связано со способностью осмолитов повышать термостабильность белков и защищать их от разворачивания в денатурирующих условиях [47], как это было показано для ФБ. Однако данные ДСК показывают, что Bet в концентрации 100 мМ практически не влияет на тепловое разворачивание апо-ФБ (рис. 2, б; табл. 2). Повышение термостабильности белка при высокой концентрации шаперона (рис. 2, б; штрихпунктирная кривая) может быть связано с эффектом краудинга, который стабилизирует более компактную конформацию и препятствует разворачиванию белка. В рамках предложенного механизма (схема, в) полученные результаты можно объяснить тем, что Bet неэффективно

ингибирует относительно быструю стадию разворачивания апо-ФБ, однако он значительно замедляет стадию роста агрегатов. Стабилизирующее воздействие осмолитов на структуру белков во время стресса обсуждается во многих работах [13, 14, 17, 47]. Однако исследования группы Pielak указывают на необходимость учитывать влияние осмолитов не только на стабильность белков, но и на белок-белковые взаимодействия, такие как ассоциация/агрегация и формирование комплексов [50]. Это коррелирует с полученными нами данными по защитному действию Bet при агрегации апо-ФБ. Сравнение эффекта Bet на ФБ и апо-ФБ показывает, что данный шаперон может стабилизировать как нативное состояние белка, так и снижать скорость слипания белковых молекул друг с другом.

В то же время Bet стимулирует агрегацию УФ-ФБ при 37 °C (рис. 1, в и г). Известно, что УФ-излучение повреждает конформационные замки димеров ФБ, что приводит к диссоциации и разворачиванию белковой молекулы и утрате ее нативной структуры [38]. Это сопровождается изменением гидрофобности поверхности белка и образованием относительно устойчивых первичных кластеров размером ~10 нм [38, 51]. В результате процесс агрегации УФ-ФБ не включает стадию денатурации (схема, б). Стадиям нуклеации и роста агрегатов предшествует медленная стадия структурной реорганизации молекул УФ-ФБ, и порядок агрегации по отношению к белку становится равным единице ($n = 1$) [38].

Недавние исследования показали, что метиламины способны образовывать комплексы с гидрофобными участками на поверхности белка [52, 53]. На поверхности УФ-облученной молекулы ФБ такие участки могут образовываться за счет экспонирования колец ароматических аминокислот, с которыми Bet преимущественно связывается, нежели исключается с поверхности [54]. Можно предположить, что взаимодействие Bet с УФ-ФБ ускоряет структурную перестройку молекулы белка (скорость-лимитирующая стадия на схеме, б). Конформация молекул/кластеров изменяется и становится менее компактной, о чем свидетельствует увеличение гидродинамических радиусов $R_{h,0}$ и R_h^* в присутствии 100 мМ Bet (табл. 1; табл. П4 в Приложении). Снижение значений R_h^* при дальнейшем увеличении концентрации Bet может быть обусловлено эффектом краудинга, который, с одной стороны, стимулирует формирование более компактной структуры белка, а с другой — ускоряет стадию агрегации. Увеличение значения v_0 (табл. 1)

Таблица 3. Изменение основных параметров, характеризующих кинетику агрегации ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С при повышении концентрации Lys

Основные параметры агрегации	Тест-система и диапазон концентраций Lys		
	ФБ при 48 °С ($n = 0,5$); [Lys]: 0–125 мМ	УФ-ФБ при 37 °С ($n = 1$); [Lys]: 0–120	апо-ФБ при 37 °С ($n = 2$); [Lys]: 0–124 мМ
Длительность стадии нуклеации, t^* , мин	возрастает с $3,02 \pm 0,04$ до $3,55 \pm 0,05$	возрастает с $7,14 \pm 0,11$ до $12,46 \pm 0,36$	возрастает с $33,02 \pm 0,11$ до $48,71 \pm 0,32$
Начальная скорость роста агрегатов, $v_0 \cdot 10^{-4}$, мин $^{-1}$	возрастает с $8,90 \pm 0,14$ до $10,17 \pm 0,18$	снижается с $8,44 \pm 0,23$ до $4,96 \pm 0,40$	снижается с $3,38 \pm 0,10$ до $0,98 \pm 0,14$
Размер стартовых агрегатов, $R_{h,0}$, нм	возрастает с $60,1 \pm 2,8$ до $78,2 \pm 1,9$	снижается с $20,0 \pm 1,0$ до $13,9 \pm 0,8$	снижается с $16,4 \pm 0,9$ до $4,2 \pm 0,6$
Размер ядер, R_h^* , нм	возрастает с $70,3 \pm 3,1$ до $112,5 \pm 1,7$	снижается с $44,4 \pm 1,1$ до $37,5 \pm 1,6$	не изменяется, $\langle R_h^* \rangle = 40,9 \pm 1,0$

Примечание. Концентрация белка составляла 0,3 мг/мл (30 мМ Herpes (pH 6,8); $IS = 150$ мМ).

указывает на то, что Vet-индуцированное изменение конформации молекул УФ-ФБ стимулирует их слипание с ядрами. Ранее было показано, что добавление Vet к ФБ на стадии роста агрегатов ускоряет процесс агрегации белка [39]. Данные настоящей работы указывают на способность Vet взаимодействовать с поверхностью развернутого белка и усиливать его агрегацию.

Ускорение тепловой агрегации ФБ под влиянием Lys. Представляло интерес сравнить механизмы действия Vet на агрегацию модельных белков с действием другого шаперона. Согласно данным ДЛС (рис. П1 в Приложении), Lys стимулирует агрегацию ФБ при 48 °С, но значительно тормозит агрегацию УФ-ФБ и апо-ФБ при 37 °С. Изменения параметров, характеризующих кинетику агрегации белков при

повышении концентрации Lys, представлены в табл. 3 и табл. П6–П8 в Приложении.

Исследования стабильности ФБ методом ДСК (рис. 4, а; табл. 2) показали, что в присутствии 100 мМ Lys значение $T_{\max}$ смещается на 3,9 °С в сторону более низких температур. Это сопровождалось существенным изменением формы профиля ДСК и уменьшением кооперативности теплового перехода. По-видимому, Lys вызывает значительные конформационные перестройки в молекуле ФБ, что приводит к снижению ее термостабильности, и процесс разворачивания белка под влиянием температуры заметно ускоряется.

Важную информацию может дать оценка влияния Lys на олигомерное состояние ФБ. Данные АУС (рис. 4, б), полученные при нагревании белка в течение 100 мин при 48 °С,

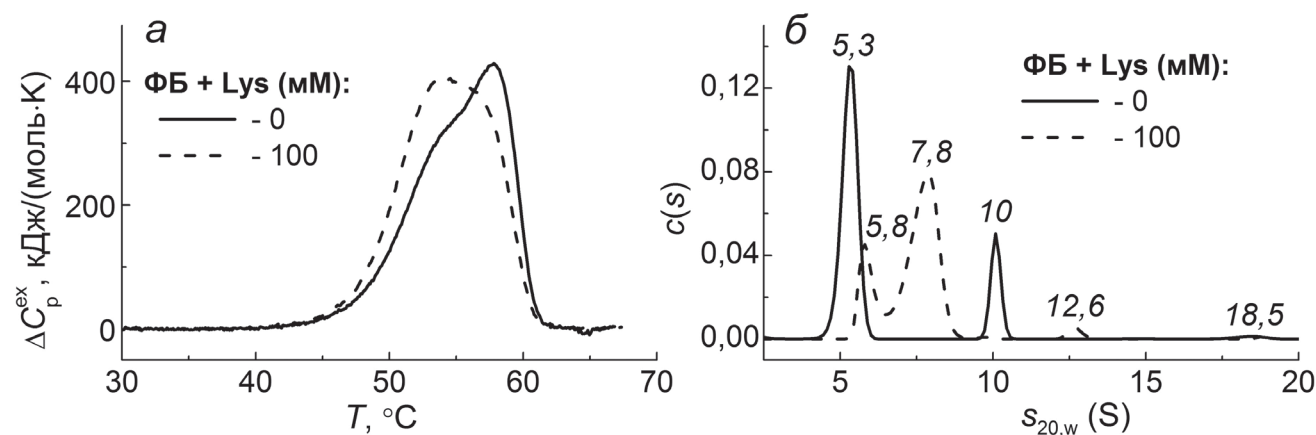


Рис. 4. Влияние Lys на термостабильность и олигомерное состояние ФБ. а – Зависимости избыточного теплопоглощения (ΔC_p^{ex}) от температуры для ФБ (1 мг/мл); б – распределения $c(s)$ для ФБ (0,38 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 100 мМ Lys. Значения коэффициентов седиментации показаны курсивом. Распределения $c(s)$ были получены при 48 °С и скорректированы до стандартных условий; общее время при 48 °С составило 100 мин

показывают, что распределение $s(s)$ для ФБ в присутствии 100 мМ Lys (штриховая кривая) имеет два основных пика с $s_{20,w}$, равными 5,8 и 7,8 S, что может соответствовать смесям комплексов Lys с денатурированными мономерными и димерными формами белка различной конформации. Кроме того, в растворе присутствуют мелкие агрегаты 12,6 S. Оценка доли агрегированной ФБ (γ_{agg}), осаждающейся при ускорении ротора в экспериментах AUC, указывает на тенденцию к увеличению значения γ_{agg} в присутствии Lys. Зарегистрировано, что через 100 мин при 48 °C величина γ_{agg} для ФБ изменяется от 69 до 73% в отсутствие и в присутствии 100 мМ Lys соответственно. При увеличении общего времени нагрева до 3,5 ч (данные AUC не представлены) значение γ_{agg} изменялось от 82% (для ФБ) до 92% в присутствии 25 мМ Lys. Коэффициент седиментации оставшегося в растворе неагрегированного белка составлял 3,5 S, что может соответствовать развернутой асимметричной мономерной форме. При увеличении концентрации Lys до 50 мМ в этих условиях весь белок преципитировал.

Можно заключить, что индуцированные Lys конформационные изменения в молекуле ФБ в процессе ее нагрева приводят к существенной дестабилизации как третичной, так и четвертичной структуры белка (данные ДСК и AUC). За счет смещения равновесия $D \leftrightarrow M$ в сторону мономерной формы и снижения термостабильности белка стадия диссоциации/денатурации ФБ ускоряется (схема, а). Незначительное замедление стадии нуклеации, вероятно, связано с формированием более крупных агрегатов в присутствии Lys, о чем свидетельствует рост значений $R_{h,0}$, R_h^* (ДЛС, табл. 3) и γ_{agg} (AUC).

Здесь интересно сравнить механизмы действия Lys и другой аминокислоты, аргинина (Arg), который часто влияет на белки сходным с Lys образом [26–30]. Arg ускоряет тепловую агрегацию ФБ, однако не вызывает значительных конформационных изменений в молекуле белка, не влияет на размеры $R_{h,0}$ и R_h^* и уменьшает t^* [44]. Сходный с Lys эффект Arg на агрегацию ФБ также обусловлен сдвигом равновесия $D \leftrightarrow M$ вправо. Однако Arg дестабилизирует преимущественно четвертичную структуру молекулы ФБ, обладая способностью разрушать конформационные замки и стимулировать диссоциацию олигомерного белка [44]. Дальнейшее ускорение стадии роста агрегатов характерно для обоих агентов, хотя увеличение параметра v_0 с ростом концентрации Lys не очень значимо (табл. 3).

Защитное действие Lys на тепловую агрегацию УФ-ФБ и апо-ФБ. В случае УФ-ФБ и апо-ФБ при 37 °C Lys действует как химический шаперон, тормозя их тепловую агрегацию. В обоих случаях взаимодействие модельных белков с Lys характеризуется увеличением длительности стадии нуклеации и снижением скорости роста агрегатов (табл. 3; параметры t^* , v_0). Однако механизмы защиты от агрегации для двух белков, демонстрируемые Lys, различны из-за различий в путях агрегации самих белков (схема, б и в).

Согласно схеме и данным табл. 3, защитное действие Lys при тепловой агрегации УФ-ФБ обусловлено ингибированием процесса структурной реорганизации белковых молекул/кластеров УФ-ФБ, что приводит к снижению скорости их слипания. Уменьшение размеров $R_{h,0}$ и R_h^* (табл. 3; табл. П7 в Приложении) может свидетельствовать о более компактной конформации/конфигурации белковой молекулы в присутствии Lys.

Интерпретация полученных данных для апо-ФБ при 37 °C иная. Согласно данным ДСК (табл. 2; рис. П2 в Приложении), основные калориметрические параметры, характеризующие плавление апо-ФБ в отсутствие и в присутствии 100 мМ Lys, практически не изменяются. Это означает, что основное защитное действие как Lys, так и Bet на тепловую агрегацию апо-ФБ направлено на снижение скорости слипания белковых молекул без существенного влияния на процесс их разворачивания.

Однако анализ размеров $R_{h,0}$ и R_h^* , детектируемых в присутствии Bet или Lys (табл. 1 и 3), указывает на различия во влиянии этих шаперонов на комплексообразование и белок-белковые взаимодействия. Увеличение концентрации Lys от 0 до 124 мМ сопровождается снижением значений $R_{h,0}$ в ~4 раза, что может быть следствием уменьшения количества молекул апо-ФБ, образующих стартовые агрегаты, или их более компактной конформацией. Это приводит к более длительному формированию ядер, размер которых остается постоянным независимо от концентрации Lys (табл. 3). Интересно отметить, что одинаковые размеры R_h^* получены для ФБ [44] и апо-ФБ (неопубликованные данные) и в присутствии различных концентраций Arg при $IS = 150$ мМ. Возможно, это обусловлено влиянием электростатического взаимодействия зарядов аминокислот с поверхностью формирующихся стартовых агрегатов и ядер. Нейтрально заряженный Bet незначительно снижает значение $R_{h,0}$, но стимулирует рост ядер R_h^* . Скорость присоединения

белковых молекул к сформировавшимся ядрам (параметр v_0) также снижается заметнее в присутствии Lys, чем Bet (табл. 3; табл. П5 и П8 в Приложении). Подобная эффективность Lys может быть связана с тем, что сродство этого шаперона к апо-ФБ в 3 раза выше, чем у Bet (данные не представлены).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были проанализированы и описаны различные механизмы действия химических шаперонов Bet и Lys на модельные белки, характеризующиеся различной кинетикой агрегации (ФБ при 48 °C, $n = 0,5$; УФ-ФБ при 37 °C, $n = 1$; апо-ФБ при 37 °C, $n = 2$). Были сформулированы следующие выводы. 1) Механизм действия химических шаперонов на комплекс белок–мишень зависит от структуры и кинетического режима агрегации белка. 2) Сходный эффект на агрегацию белков может быть результатом разных механизмов действия шаперонов. 3) Сравнение действия химического шаперона на тест-системах с различной кинетикой агрегации дает более полную информацию о возможностях применения данного шаперона. Характеристика механизмов функционирования шаперонов, приведенная в данной работе, расширяет наши представления о влиянии химических шаперонов на разные стадии общего процесса агрегации белков и может быть полезна другим исследователям.

Вклад авторов. Б.И. Курганов — концепция и руководство работой; В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева — проведение

экспериментов и анализ полученных данных; В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, Б.И. Курганов — обсуждение результатов исследования; В.В. Михайлова — написание текста; В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10055 для В.В.М., Т.Б.Е., Н.А.Ч., Б.И.К.) и Министерства науки и высшего образования РФ (для В.В.М., Т.Б.Е., Н.А.Ч.).

Благодарности. Эта статья посвящена памяти нашего научного руководителя, профессора Бориса Ивановича Курганова (1938–2021 гг.). Свою жизнь Б.И. Курганов посвятил изучению структуры и функций аллостерических ферментов, а также процессов их денатурации и агрегации. Основной сферой его интересов в последние годы было изучение кинетики агрегации белков и влияния на нее химических и белковых шаперонов. Б.И. Кургановым были разработаны подходы по установлению механизмов агрегации белков в различных тест-системах и методы количественной оценки и сравнения антиагрегационной активности шаперонов различной природы. Работы, выполненные под руководством Б.И. Курганова, свидетельствуют об успешном применении предложенных методов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, W., and Roberts, C. J. (2018) Protein aggregation — mechanisms, detection, and control, *Int. J. Pharm.*, **550**, 251–268, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.043.
2. Siddiqi, M. K., Alam, P., Chaturvedi, S. K., Shahein, Y. E., and Khan, R. H. (2017) Mechanisms of protein aggregation and inhibition, *Front. Biosci.*, **9**, 1–20, doi: 10.2741/e781.
3. Hartl, F. U. (2017) Protein misfolding diseases, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 21–26, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044518.
4. Harding, J. J. (1998) Cataract, Alzheimer's disease, and other conformational diseases, *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **9**, 10–13, doi: 10.1097/00055735-199802000-00003.
5. Stefani, M., and Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution, *J. Mol. Med. (Berl)*, **81**, 678–699, doi: 10.1007/s00109-003-0464-5.
6. Wang, W., Nema, S., and Teagarden, D. (2010) Protein aggregation-pathways and influencing factors, *Int. J. Pharm.*, **390**, 89–99, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.025.
7. Kurganov, B. I. (2002) Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 409–422, doi: 10.1023/a:1015277805345.

8. Chebotareva, N. A., Roman, S. G., and Kurganov, B. I. (2016) Dissociative mechanism for irreversible thermal denaturation of oligomeric proteins, *Biophys. Rev.*, **8**, 397-407, doi: 10.1007/s12551-016-0220-z.
9. Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Roman, S. G., Mikhaylova, V. V., Kleymenov, S. Y., and Kurganov, B. I. (2019) Kinetic regime of Ca^{2+} and Mg^{2+} -induced aggregation of phosphorylase kinase at 40°C, *Int. J. Biol. Macromol.*, **138**, 181-187, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.240.
10. Borzova, V. A., Markossian, K. A., Kara, D. A., and Kurganov, B. I. (2015) Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **80**, 130-138, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.040.
11. Kurganov, B. I. (2018) Kinetic regime of aggregation of UV-irradiated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 1182-1186, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.166.
12. Kinne, R. K. (1993) The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals, *J. Exp. Zool.*, **265**, 346-355, doi: 10.1002/jez.1402650403.
13. Yancey, P. H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *J. Exp. Biol.*, **208**, 2819-2830, doi: 10.1242/jeb.01730.
14. Bolen, D. W. (2001) Protein stabilization by naturally occurring osmolytes, *Methods Mol. Biol.*, **168**, 17-36, doi: 10.1385/1-59259-193-0:017.
15. Kumar, R. (2009) Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability, *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 1-6, doi: 10.1016/j.abb.2009.09.007.
16. Khan, S. H., Ahmad, N., Ahmad, F., and Kumar, R. (2010) Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention, *IUBMB Life*, **62**, 891-895, doi: 10.1002/iub.406.
17. Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A., and Richarme, G. (1999) Thermoprotection by glycine betaine and choline, *Microbiology (Reading)*, **145**, 2543-2548, doi: 10.1099/00221287-145-9-2543.
18. Mortazavi, M., Shokrgozar, M. A., Sardari, S., Azadmanesh, K., Mahdian, R., et al. (2018) Physicochemical screening for chemical stabilizer of erythropoietin to prevent its aggregation, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **48**, 121-127, doi: 10.1080/10826068.2017.1405270.
19. Venkatraman, A., Murugan, E., Lin, S. J., Peh, G. S. L., Rajamani, L., and Mehta, J. S. (2020) Effect of osmolytes on in-vitro aggregation properties of peptides derived from TGFβ1p, *Sci. Rep.*, **10**, 4011, doi: 10.1038/s41598-020-60944-0.
20. Bhojane, P. P., Joshi, S., Sahoo, S. J., and Rathore, A. S. (2021) Unexplored excipients in biotherapeutic formulations: natural osmolytes as potential stabilizers against thermally induced aggregation of IgG1 biotherapeutics, *AAPS PharmSciTech.*, **23**, 26, doi: 10.1208/s12249-021-02183-8.
21. Dar, M. A., Wahiduzzaman, Islam, A., Hassan, M. I., and Ahmad, F. (2018) Counteraction of the deleterious effects of urea on structure and stability of mammalian kidney proteins by osmolytes, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 1659-1667, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.021.
22. Saha, I., Singh, V., Burra, G., and Thakur, A. K. (2018) Osmolytes modulate polyglutamine aggregation in a sequence dependent manner, *J. Pept. Sci.*, **24**, e3115, doi: 10.1002/psc.3115.
23. Dasgupta, M., and Kishore, N. (2017) Selective inhibition of aggregation/fibrillation of bovine serum albumin by osmolytes: mechanistic and energetics insights, *PLoS One*, **12**, e0172208, doi: 10.1371/journal.pone.0172208.
24. Natalello, A., Liu, J., Ami, D., Doglia, S. M., and de Marco, A. (2009) The osmolyte betaine promotes protein misfolding and disruption of protein aggregates, *Proteins*, **75**, 509-517, doi: 10.1002/prot.22266.
25. Singh, L. R., Dar, T. A., Rahman, S., Jamal, S., and Ahmad, F. (2009) Glycine betaine may have opposite effects on protein stability at high and low pH values, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 929-935, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.005.
26. Sabbaghian, M., Ebrahim-Habibi, A., Hosseinkhani, S., Ghasemi, A., and Nemat-Gorgani, M. (2011) Prevention of thermal aggregation of an allosteric protein by small molecules: some mechanistic insights, *Int. J. Biol. Macromol.*, **49**, 806-813, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.016.
27. Li, S., Zheng, Y., Xu, P., Zhu, X., and Zhou, C. (2018) L-Lysine and L-arginine inhibit myosin aggregation and interact with acidic amino acid residues of myosin: The role in increasing myosin solubility, *Food Chem.*, **242**, 22-28, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.033.
28. Saadati-Eskandari, N., Navidpour, L., Yaghmaei, P., and Ebrahim-Habibi, A. (2019) Amino acids as additives against amorphous aggregation: *in vitro* and *in silico* study on human lysozyme, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **189**, 305-317, doi: 10.1007/s12010-019-03010-4.
29. Haghighi-Poodeh, S., Kurganov, B., Navidpour, L., Yaghmaei, P., and Ebrahim-Habibi, A. (2020) Characterization of arginine preventive effect on heat-induced aggregation of insulin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **145**, 1039-1048, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.196.
30. Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M. (2002) Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation, *J. Biochem.*, **132**, 591-595, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003261.
31. Arakawa, T., Dix, D. B., and Chang, B. S. (2003) The effects of protein stabilizers on aggregation induced by multiple-stresses, *Yakugaku Zasshi.*, **123**, 957-961, doi: 10.1248/yakushi.123.957.
32. Rishi, V., Anjum, F., Ahmad, F., and Pfeil, W. (1998) Role of non-compatible osmolytes in the stabilization

- of proteins during heat stress, *Biochem. J.*, **329**, 137-143, doi: 10.1042/bj3290137.
33. Wang, X., Feng, T., Wang, X., Zhang, X., and Xi, S. (2021) Gelation and microstructural properties of fish myofibrillar protein gels with the incorporation of L-lysine and L-arginine at low ionic strength, *J. Sci. Food Agric.*, **101**, 5469-5477, doi: 10.1002/jsfa.11195.
34. Smirnova, E., Safenkova, I., Stein-Margolina, B., Shubin, V., and Gurvits, B. (2013) L-arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates, *Amino Acids*, **45**, 845-855, doi: 10.1007/s00726-013-1528-7.
35. Barford, D., and Johnson, L. N. (1989) The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature*, **340**, 609-616, doi: 10.1038/340609a0.
36. Kurganov, B. I., Kornilaev, B. A., Chebotareva, N. A., Malikov, V. P., Orlov, V. N., et al. (2000) Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **39**, 13144-13152, doi: 10.1021/bi000975w.
37. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., and Kurganov, B. I. (2016) Kinetic regime of thermal aggregation of holo- and apoglycogen phosphorylases *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **92**, 1252-1257, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.038.
38. Mikhaylova, V. V., Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Shubin, V. V., and Kurganov, B. I. (2017) A thermal after-effect of UV irradiation of muscle glycogen phosphorylase *b*, *PLoS One*, **12**, e0189125, doi: 10.1371/journal.pone.0189125.
39. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Pivovarova, A. V., and Kurganov, B. I. (2022) Combined action of chemical chaperones on stability, aggregation and oligomeric state of muscle glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **203**, 406-416, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.106.
40. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Tugaeva, K. V., and Kurganov, B. I. (2022) Effect of betaine and arginine on interaction of alphaB-crystallin with glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3816, doi: 10.3390/ijms23073816.
41. Shaltiel, S., Hedrick, J. L., and Fischer, E. H. (1966) On the role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. II. Resolution of rabbit muscle phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **5**, 2108-2116, doi: 10.1021/bi00870a044.
42. Mikhaylova, V. V., Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kalacheva, D. I., and Kurganov, B. I. (2020) Effect of arginine on chaperone-like activity of HspB6 and monomeric 14-3-3 ζ , *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2039, doi: 10.3390/ijms21062039.
43. Khanova, H. A., Markossian, K. A., Kurganov, B. I., Samoilov, A. M., Kleymenov, S. Y., et al. (2005) Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of betaL-crystallin by alpha-crystallin, *Biochemistry*, **44**, 15480-15487, doi: 10.1021/bi051175u.
44. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kleymenov, S. Y., and Kurganov, B. I. (2020) Effect of arginine on stability and aggregation of muscle glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **165**, 365-374, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.101.
45. Brown, P. H., and Schuck, P. (2006) Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, *Biophys. J.*, **90**, 4651-4661, doi: 10.1529/biophysj.106.081372.
46. Kurganov, B. I. (2002) Estimation of the activity of molecular chaperones in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Usp. Biol. Khim.*, **42**, 89-138.
47. Sharma, G. S., Krishna, S., Dar, T. A., Khan, K. A., and Singh, L. R. (2021) Protecting thermodynamic stability of protein: the basic paradigm against stress and unfolded protein response by osmolytes, *Int. J. Biol. Macromol.*, **177**, 229-240, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.102.
48. Hedrick, J. L., Shaltiel, S., and Fischer, E. H. (1966) On the role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. 3. Physicochemical properties and reconstitution of apophosphorylase *b*, *Biochemistry*, **5**, 2117-2125, doi: 10.1021/bi00870a045.
49. Gunar, V. I., Sugrobova, N. P., Chebotareva, N. A., Stepanova, S. V., Poznanskaya, A. A., Kurganov, B. I. in Fukui, T., Kagamiyama, H., Soda, K., and Wada, H. (Eds) (1990) *Enzymes Dependent on Pyridoxal Phosphate and Other Carbonyl Compounds as Cofactors*, Pergamon Press, Oxford, pp. 417-419.
50. Rydeen, A. E., Brustad, E. M., and Pielak, G. J. (2018) Osmolytes and protein-protein interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 7441-7444, doi: 10.1021/jacs.8b03903.
51. Roman, S. G., Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Kleymenov, S. Y., Makeeva, V. F., et al. (2011) Does the crowded cell-like environment reduce the chaperone-like activity of alpha-crystallin? *Biochemistry*, **50**, 10607-10623, doi: 10.1021/bi201030y.
52. Su, Z., Mahmoudinobar, F., and Dias C. L. (2017) Effects of trimethylamine-N-oxide on the conformation of peptides and its implications for proteins, *Phys. Rev. Lett.*, **119**, 108102, doi: 10.1103/PhysRevLett.119.108102.
53. Mukherjee, M., and Mondal, J. (2020), Unifying the contrasting mechanisms of protein-stabilizing osmolytes, *J. Phys. Chem. B.*, **124**, 6565-6574, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c04757.
54. Felitsky, D. J., Cannon, J. G., Capp, M. W., Hong, J., Van Wynsberghe, A. W., et al. (2004) The exclusion of glycine betaine from anionic biopolymer surface: why glycine betaine is an effective osmoprotectant but also a compatible solute, *Biochemistry*, **43**, 14732-14743, doi: 10.1021/bi049115w.

EFFECT OF CHEMICAL CHAPERONES ON PROCESSES OF PROTEIN AGGREGATION PROCEEDING IN DIFFERENT KINETIC REGIMES

V. V. Mikhaylova*, T. B. Eronina, N. A. Chebotareva, and **B. I. Kurganov**

*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: mikhaylova.inbi@inbox.ru*

The formation and accumulation of protein aggregates adversely affect intracellular processes in a living cell and are a negative factor in the production and storage of protein preparations. Chemical chaperones can prevent protein aggregation, but this property is not universal and depends on the structure of the target protein and the kinetics of its aggregation. In this work, we studied the effect of betaine (Bet) and lysine (Lys) on test systems based on thermal aggregation of muscle glycogen phosphorylase *b* (Phb) at 48°C, UV-irradiated Phb (UV-Phb) at 37°C and apo-form of Phb (apo-Phb) at 37°C and characterized by the order of aggregation with respect to the protein (*n*) equal to 0.5, 1 or 2, respectively. Dynamic light scattering, differential scanning calorimetry, and analytical ultracentrifugation have shown that Bet protects Phb and apo-Phb from aggregation, but accelerates the aggregation of UV-Phb. At the same time, Lys prevents UV-Phb and apo-Phb aggregation, but increases the rate of Phb aggregate formation. The mechanisms of chemical chaperone action on the tertiary and quaternary structures and the kinetics of thermal aggregation of the target proteins are discussed. Comparison of the effect of chemical chaperones on test systems with different kinetic regimes of aggregation provides more complete information about the mechanism of their action.

Keywords: aggregation, kinetic regime, chemical chaperone, glycogen phosphorylase *b*

ИНГИБИТОРЫ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *Trypanosoma cruzi* НА ОСНОВЕ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ

© 2023 А.А. Чудин¹, И.Д. Злотников¹, С.С. Крылов², В.В. Семенов², Е.В. Кудряшова^{1*}

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

² Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.11.2022

После доработки 20.12.2022

Принята к публикации 20.12.2022

Ингибирование путей биосинтеза соединений, жизненно необходимых *Trypanosoma cruzi*, рассматривается исследователями как один из возможных механизмов действия потенциальных лекарств против болезни Шагаса. В качестве одного из таких механизмов нами рассматривается ингибирование галактонолактонооксидазы из *T. cruzi* (TcGAL), катализирующей финальную стадию синтеза витамина С – антиоксиданта, который *T. cruzi* не способна усваивать извне и должна синтезировать сама. В данной работе впервые найден класс эффективных ингибиторов TcGAL – растительные аллилбензолы. Обнаружено, что природные аллилполиалкоксисбензолы (АПАБ) – апиол, диллапиол и др. являются эффективными ингибиторами TcGAL с $IC_{50} = 20–130$ мкМ; установлен неконкурентный механизм действия апиола. Найдено, что конъюгирование АПАБ с трифенилфосфонием, обеспечивающим селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии, позволяет повысить эффективность и/или максимальный процент ингибирования по сравнению с немодифицированными АПАБ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: галактонолактонооксидаза, болезнь Шагаса, ингибиторы, апиол, аллилполиалкоксисбензолы, трифенилфосфиновые производные, диллапиол, миристицин, эвгенол, эстрагол.

DOI: 10.31857/S0320972523010074, EDN: PCFZWJ

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Шагаса – заболевание, вызываемое простейшим организмом-паразитом *Trypanosoma cruzi*. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 6–7 млн человек во всем мире инфицированы *T. cruzi* и ещё 75 млн человек находятся в зоне риска. В настоящее время заболевание лечится всего двумя препаратами: бензнидазолом и нифуртимоксом, которые действуют как пролекарства, активируясь внутри организма паразита митохондриальной NADH-зависимой нитроредуктазой I-типа. В основе действия обоих препаратов лежит восстановление их нитрогруппы до аминогруппы с образованием различных промежуточных свободных радикалов и электрофильных метаболитов. Однако у данных лекарств есть ряд серьёзных недо-

статков, в том числе эффективность только на острой или ранней фазе инфекции, побочные эффекты в течение курса приёма и развивающаяся устойчивость паразита к используемым препаратам [1].

Одним из перспективных направлений поиска лекарств против болезни Шагаса являются исследования, посвящённые ингибированию биосинтеза соединений, жизненно необходимых *T. cruzi*. Например, Lepesheva et al. [2] рассматривают стерол-14 α -деметилазу, участвующую в биосинтезе стеролов (необходимы для нормального функционирования мембран), как потенциальную мишень для терапии болезни Шагаса. Так, использование противогрибковых азолов, которые блокируют биосинтез стеролов, оказалось очень успешным против одноклеточных паразитов: позаконазол, препарат класса триазолов, в настоящее время

Принятые сокращения: АОТ – ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты; АПАБ – аллилполиалкоксисбензолы; АТМБ – аллилтетраметоксисбензол; ПАВ – поверхностно-активные вещества; ТФФ – трифенилфосфоний; TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*.

* Адресат для корреспонденции.

вступает в фазу II клинических испытаний для лечения болезни Шагаса.

В рамках данной работы мы рассматриваем ингибирование биосинтеза другого жизненно важного для *T. cruzi* соединения – витамина С, антиоксиданта, который трипаносома не может усваивать извне и должна синтезировать самостоятельно [3]. В качестве потенциальной мишени для разработки лекарства нами была выбрана галактонолактонооксидаза из *T. cruzi* (TcGAL), катализирующая финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона. Ввиду отсутствия галактонолактонооксидазы в организме человека соответствующий ингибитор может рассматриваться как потенциально селективное лекарство против болезни Шагаса. Недавно был обнаружен антипаразитарный эффект природного алколоида, ликорина, против *T. cruzi* [4], однако молекулярная мишень и механизм действия не установлен. Нами продемонстрировано, что ликорин оказывает ингибирующий эффект на TcGAL [5], однако эффективность ингибирования TcGAL ликорином на 2 порядка ниже в сравнении с таковой в отношении самой *T. cruzi*, что говорит о низкой доступности фермента для ликорина в организме. Либо ликорин действует на другую мишень в *T. cruzi*, либо на фермент действует не сам ликорин, а его метаболиты.

Другим перспективным классом соединений в качестве предполагаемых ингибиторов TcGAL являются халконы, содержащие общий бензодиоксольный фрагмент. Показано, что ряд соединений группы халконов из гречишника *Polygonum salicifolium* проявляют антитрипаносомную активность [6] и потенциально применимы для лечения целого ряда трипаносомных инфекций. В настоящей работе рассматривается группа халконов, некоторые представители которой, например, 2',4'-дигидрокси-6'-метоксихалконы, подавляют рост *T. cruzi* в концентрации 20 мкМ и менее [7].

В качестве перспективной группы соединений в представленной работе рассматриваются природные аллилполиалкоксобензолы (АПАБ), компоненты экстрактов растительного сырья (например, *Anethum graveolens* L. и *Petroselinum sativum* Hoffm.), обладающие разнообразной биологической активностью, в том числе противовоспалительной, противомикробной и др. [8, 9]. В частности, диллапиол (основной компонент экстракта листьев *Piper aduncum*) обладает антилейшманийной активностью с $IC_{50} = 60$ мкМ [10]. Можно предположить, что диллапиол и, возможно, другие АПАБ будут проявлять антитрипаносомную активность.

Следует также учитывать, что антитрипаносомный эффект потенциальных ингибиторов *T. cruzi* может быть усилен посредством модификации АПАБ, в частности, их конъюгирования с трифенилфосфонием (ТФФ), обеспечивающим селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии за счёт внутреннего отрицательного трансмембранного потенциала [8]. Известно, что аккумуляция конъюгатов ряда соединений с ТФФ в митохондриях позволяет усилить их антибактериальную активность, что, в частности, показано в отношении *Bacillus subtilis* [11].

Таким образом, целью данной работы является изучение влияния АПАБ на активность галактонолактонооксидазы из *T. cruzi* для разработки новых лекарств против болезни Шагаса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. D-арабиноно-1,4-лактон, 2,6-дихлорфенолиндифенол, натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ), компоненты буферных растворов, n-октан и ацетонитрил («Sigma-Aldrich», США); феназинметасульфат («Merck», Германия); ликорин («Aladdin», Китай); эвгенол («Acros Organics», Бельгия). Халконы были любезно предоставлены сотрудниками ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, Россия).

Рекомбинантная экспрессия TcGAL. Рекомбинантную экспрессию галактонолактонооксидазы (EC 1.3.3.12) из *T. cruzi* (TcGAL) в *Escherichia coli* проводили согласно методике, описанной ранее [3]. Вкратце, для продукции фермента клетки *E. coli* BL21 (DE3), несущие плазмиду pBAD-TcGAL (любезно предоставлена проф. W.J.H. van Berkel (Вагенингенский университет, Нидерланды)), выращивали в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина до достижения $A_{600} \sim 0,6$. Экспрессию TcGAL индуцировали добавлением 0,02% L-арабинозы, и продолжали инкубацию в течение 16 ч при 28 °C.

Рефолдинг телец включения TcGAL. Рефолдинг TcGAL проводили согласно методике, описанной ранее [3]. Нерастворимый материал, собранный после лизиса клеток, промывали 6%-ным Triton X-100, содержащим 60 мМ ЭДТА и 1,5 М NaCl (pH 7,0), и растворяли в 6 М гуанидин хлориде. Затем денатурант удаляли диализом против 10 мМ фосфата натрия (pH = 8,0). После диализа суспензию агрегированного белка вводили в систему обращённых мицелл вода-АОТ-октан, степень гидратации $W_0 = 30$ достигали добавлением

10 мМ фосфата натрия (pH 8,8). Окисленный и восстановленный растворы глутатиона (100 мМ GSSG и 300 мМ GSH) в 10 мМ фосфате натрия (pH 8,8) смешивали, и аликвоту 10 мкл добавляли к 1 мл мицеллярного раствора фермента в 0,4 М АОТ. Рефолдинг фермента инициировали добавлением аликвоты (10 мкл) раствора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к концентрации фермента). Конечная концентрация белка в мицеллах составляла 1–2 мг/мл.

Экстракция и очистка апиола и диллапиола. Выделение и очистку растительных апиола и диллапиола проводили согласно методике, описанной Tsyanov et al. [8]. Вкратце, экстракцию семян петрушки и укропа жидким CO₂ осуществляла компания ООО «Караван» (Краснодар, Россия). Апиол, диллапиол и миристицин чистотой 98–99% получены высокоэффективной перегонкой CO₂-экстрактов на опытно-промышленной установке в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, Россия).

Синтез конъюгатов с трифенилфосфонием и пропильтрифенилфосфония. Конъюгаты апиола, диллапиола и аллилтетраметоксibenзола с трифенилфосфонием, а также пропильтрифенилфосфоний (пропил–ТФФ) были получены согласно методике, описанной Tsyanov et al. [8].

Определение параметров ингибирования TcGAL для исследуемых органических соединений. Для спектрофотометрического измерения активности фермента использовали методику с применением системы обращённых мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ), предложенную в работе Chudin et al [5]. Вкратце, использовали комбинацию 120 мкМ феназинметосульфата в ацетонитриле в качестве электроноакцептора и 120 мкМ водный раствор 2,6-дихлорфенолиндифенола в качестве красителя, обесцвечивающегося при образовании аскорбата при длине волны 550 нм. Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Ultrospec-2100 pro («Amersham biosciences», США). В качестве среды использовали систему обращённых мицелл 0,1 М АОТ. Концентрации TcGAL и D-арабиноно-1,4-лактона поддерживали постоянными (34 нМ и 1 мМ соответственно). Концентрацию раствора субстрата D-арабиноно-1,4-лактона перед измерением активности уточняли с помощью КД-спектрометра Jasco J-815 («JASCO», Япония). Во всех опытах по измерению активности TcGAL (эффекта ингибирования) использовали вышеописанную методику с приведёнными условиями и концентрациями, если не указано иного. Запасные растворы ингибиторов готовили в

75%-ном этаноле, кроме ликорина, который растворяли в дистиллированной воде. Для построения графиков и статистической обработки данных с использованием *t*-критерия Стьюдента применяли программу SigmaPlot 11.1. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

ИК-спектроскопия Фурье. ИК-спектры в режиме нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали с помощью прибора Bruker Tensor 27, оснащённым детектором МСТ, охлаждаемым жидким азотом («Bruker», Германия). Образцы помещали в термостатируемую ячейку BioATR-II с элементом ZnSe ATR («Bruker»). ИК-спектры регистрировали в диапазоне 900–3000 см⁻¹ со спектральным разрешением 1 см⁻¹. Для каждого спектра накапливалось 50 сканов со скоростью 20 кГц и усреднялось. Спектральные данные обрабатывались с использованием программной системы Bruker Opus 8.2.28 («Bruker»), которая включает коррекцию базовой линии и атмосферную компенсацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Применение системы обращённых мицелл для изучения ингибирования TcGAL. Изучение ингибирования TcGAL до недавнего времени представлялось невозможным, поскольку TcGAL – митохондриальный мембранный фермент, образующий тельца включения и не сворачивающийся в водной среде. Впервые провести сворачивание и измерить активность TcGAL удалось с помощью предложенного нами метода, основанного на применении систем обращённых мицелл (модели биомембран) [3]. Ингибиторный анализ TcGAL впервые был осуществлён в нашей работе [5] на примере ликорина – природного алкалоида, который подавляет рост микроорганизма *T. cruzi*, однако молекулярная мишень, на которую действует ликорин, неизвестна [4]. В работе Chudin et al. [5] нами была разработана методика проведения ингибиторного анализа для TcGAL и обнаружен ингибирующий эффект ликорина, а в настоящей работе мы применили разработанный подход для анализа ряда соединений других классов – потенциальных ингибиторов TcGAL. Следует подчеркнуть, что обращённые мицеллы являются релевантными моделями митохондриальных мембран. Известно, что мембраны митохондрий часто содержат небислойные липидные структуры, которые представляют

собой ассоциаты молекул липидов, построенные по типу обращённых мицелл, заключённых между монослоями двухслойной мембраны. С участием такого рода небислойных липидных структур осуществляются слияние и компартментализация мембран, экзоцитоз, трансмембранный перенос и др. [12].

Ключевым параметром системы обращённых мицелл являются размеры их внутренней полости, которые можно регулировать, варьируя степень гидратации W_0 , определяемую мольным соотношением воды и ПАВ [12]. Максимальная активность ферментов в мицеллярных системах наблюдается при степени гидратации W_0 , когда размер внутренней полости мицеллы соответствует геометрическим параметрам сольбилизируемого фермента. В случае олигомерных ферментов на зависимостях каталитической активности от W_0 наблюдаются несколько оптимумов (колоколообразный вид), которые соответствуют функционированию отдельных олигомерных форм фермента, обладающих каталитической активностью [13].

Профиль зависимости активности TcGAL от степени гидратации мицелл, как и других олигомерных ферментов, также имеет колоколообразный вид и характеризуется двумя оптимумами при степенях гидратации $W_0 = 21$ – 22 и $W_0 = 27$ – 29 (рис. 1, а). Каталитические параметры TcGAL в оптимумах активности представлены на рис. 1, б. Полученные данные согласуются с полученными ранее в работе Kudryashova et al. [3], где было установлено, что оптимумы активности в указанных интервалах степеней гидратации W_0 соответствуют функционированию мономерной и димерной форм фермента.

Эффективность ингибирования TcGAL ликорином в случае мономерной и димерной

форм фермента практически не отличается [5], поэтому изучение влияния действия потенциальных ингибиторов в данной работе проводилось при степени гидратации $W_0 = 22$, соответствующей мономерной форме TcGAL, которая обладает наибольшей активностью.

Влияние аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) на активность TcGAL. В данной работе изучено влияние АПАБ на активность TcGAL, а именно: апиола, диллапиола, миристицина, аллилтетраметоксibenзола (АТМБ), эвгенола, эстрагола, аллилбензола, различающихся количеством и положением метоксигрупп и наличием метилendioкси-группы, а также их конъюгатов с ТФФ (табл. 1).

Следует отметить, что ингибирующий эффект АПАБ начинает проявляться уже при концентрациях порядка 20–50 мкМ, что на порядок ниже, чем для ликорина (300 мкМ) (рис. 2 и табл. 1).

При сравнении диллапиола, апиола, миристицина и АТМБ, различающихся числом и положением метоксигрупп (табл. 1), корреляции между количеством метоксигрупп и активностью ингибитора не выявлено. Наибольший ингибирующий эффект среди АПАБ оказывает диллапиол. Апиол и сходный с ним по положению боковых «метоксигрупп» АТМБ оказывают сравнимое ингибирующее действие (значения IC_{50} составляют 50 мкМ и 65 мкМ соответственно), что свидетельствует о необязательном наличии метилendioкси-группы для подавления активности TcGAL. Миристицин, содержащий три метокси-заместителя в бензольном кольце, характеризуется значительно более высоким значением IC_{50} по сравнению с тетразамещёнными АПАБ. Полученные данные указывают на то, что на ингибирование влияет аллильный фрагмент

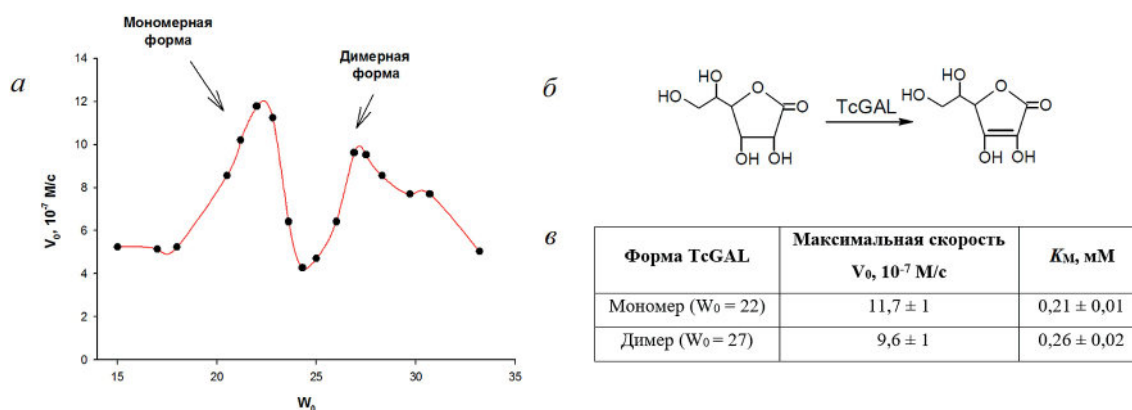


Рис. 1. Характеристики TcGAL в системе обращённых мицелл АОТ. а – Каталитический профиль активности TcGAL в системе мицелл АОТ (зависимость максимальной скорости V_0 от степени гидратации W_0); б – реакция, катализируемая TcGAL; в – каталитические параметры TcGAL для мономерной и димерной форм. Параметры имеют максимальную погрешность 15%

Таблица 1. Ингибирование TcGAL исследуемыми соединениями

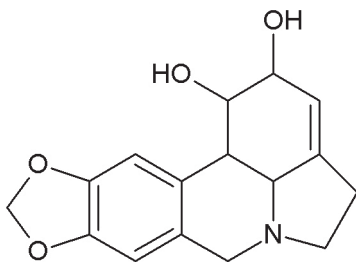
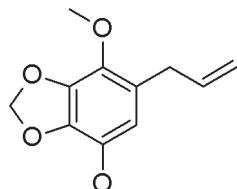
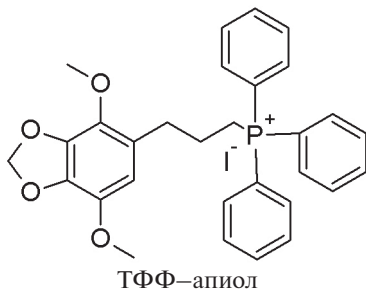
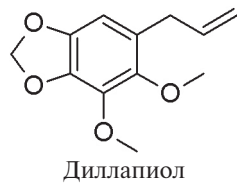
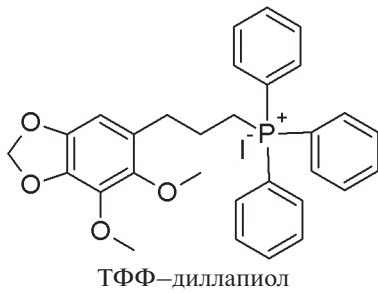
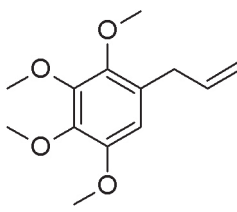
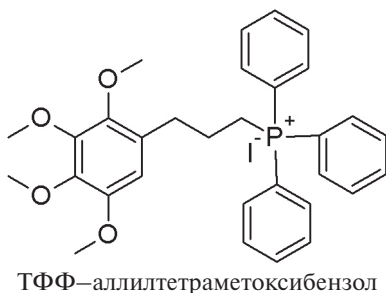
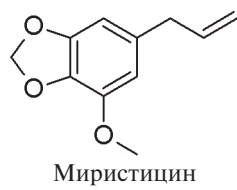
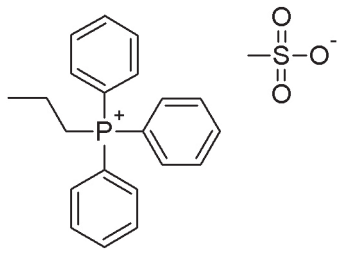
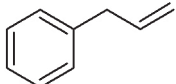
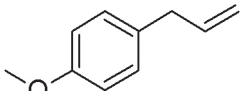
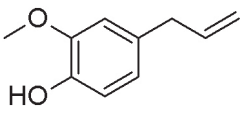
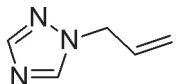
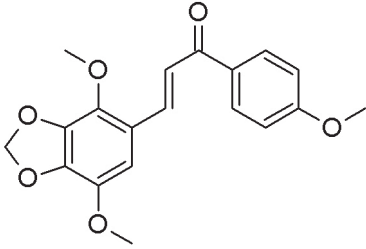
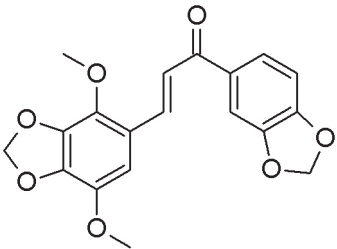
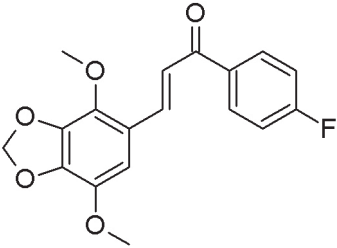
Соединение		Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ	
 Ликорин		450	
Аллилполиалкоксибензолы			
Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ	Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ
 Апиол	50	 ТФФ–апиол	95
 Диллапиол	20	 ТФФ–диллапиол	35
 Аллилтетраметоксибензол	65	 ТФФ–аллилтетраметоксибензол	40
 Миристицин	130	 Пропил–ТФФ	275

Таблица 1. (продолжение)

Аллилбензол и его аналоги	
Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ
 Аллилбензол	60
 Эстрагол	20
 Эвгенол	10
 1-аллил-1,2,4-триазол	75
Халконы	
Соединение	Ингибирование TcGAL
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-метоксихалкон	макс. ингибирование ≈ 25% (при 500 мкМ)
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4',5'-метилендиоксихалкон	макс. ингибирование ≈ 16% (при 500 мкМ)
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-фторхалкон	нет ингибирования

и донорно-акцепторные и стерические факторы заместителя в аллилбензоле.

Следует отметить, что $IC_{50} = 20$ мкМ, найденное для диллапиола в отношении TcGAL, сопоставимо с IC_{50} данного соединения в отношении *Leishmania brasiliensis* (относящейся к трипаносоматидам) (60 мкМ, согласно Parise-Filho et al. [10]). С учётом распределения ингибитора в самих клетках и большей доступности ингибитора для фермента в экспериментах *in vitro* более низкое значение IC_{50} диллапиола в отношении самого фермента представляется логичным. Полученные данные указывают на то, что TcGAL, вероятно, является ферментом-мишенью, на который действует данный ингибитор в организме трипаносоматид.

Согласно литературным данным [8], конъюгирование трифенилфосфония с биологически активными молекулами обеспечивает селективную доставку последних в митохондрии, поэтому конъюгирование ТФФ с апиолом и диллапиолом — ингибиторами митохондриального мембранного фермента TcGAL — могло бы усилить ингибирующий эффект. Оказалось, что максимальный процент ингибирования TcGAL ТФФ-конъюгатами апиола и диллапиола на 10–15% выше, чем немодифицированными молекулами (рис. 2, а). Конъюгирование АТМБ с ТФФ приводит и к заметному снижению IC_{50} . Интересно, что сам пропилен-ТФФ (контрольный образец) также оказывает ингибирующий эффект в отношении TcGAL с $IC_{50} = 275$ мкМ (табл. 1 и рис. 2, б), то есть в гораздо более высокой концентрации, чем АПАБ (IC_{50} порядка 50–70 мкМ). Предположительно, ТФФ в основном влияет на распределение ингибитора в мицеллярной системе и его пространственную ориентацию на поверхности раздела фаз, где располагается TcGAL. Положительный заряд ТФФ может способствовать

концентрированию конъюгатов на отрицательно заряженной поверхности раздела фаз, образованной молекулами АОТ.

Распределение ингибиторов АПАБ и их ТФФ-конъюгатов, а также пространственная ориентация функциональных групп в системе обращённых мицелл. Для выяснения расположения и пространственной ориентации функциональных групп изучаемых ингибиторов в мицеллах использован метод ИК-спектроскопии Фурье. На рис. 3 представлены ИК-спектры диллапиола, АТМБ, пропилен-ТФФ и ТФФ-диллапиола в системе обращённых мицелл АОТ и в контрольных системах «водная фаза» (вода-этанол) и «органическая фаза» (октан). В табл. 2 указаны положения характеристических пиков функциональных групп и их преимущественное микроокружение.

В мицеллярной системе микроокружение метилendioкси-группы и метоксигрупп диллапиола (рис. 3, а), а также тетраметоксibenзольного фрагмента АТМБ (рис. 3, б) в большей степени соответствует водной фазе, следовательно, в системе обращённых мицелл АОТ данные соединения направлены во внутреннюю полость мицелл. Аллильный радикал данных ингибиторов закорен на поверхности раздела фаз, окружён гидрофобными цепями мицелл, согласно изменениям в полосе при 1645 см^{-1} , характерной для колебаний $C=C$ аллильной группы. Пропилен-ТФФ (рис. 3, в; контрольное соединение) в мицеллах распределён между водной и органической фазой. ТФФ-диллапиол (рис. 3, г): микроокружение молекулы в мицеллярной системе соответствует в большей степени водной фазе (табл. 2), что обуславливает высокую степень загрузки ТФФ-диллапиол внутрь мицелл и их относительно высокую подвижность, вероятно, поэтому ТФФ-диллапиол не превосходит по ингибирующей способности

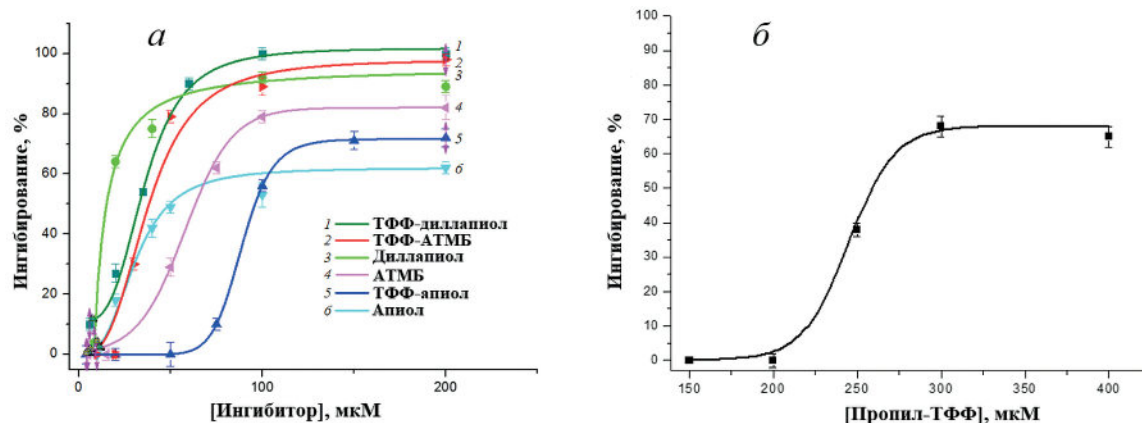


Рис. 2. Ингибирующий эффект TcGAL соединениями класса АПАБ. а — Сравнение ингибирующего эффекта диллапиола, ТФФ-диллапиола, аллилтетраметоксibenзола, ТФФ-аллилтетраметоксibenзола, апиола и ТФФ-апиола; б — зависимость ингибирующего эффекта от концентрации пропилен-ТФФ

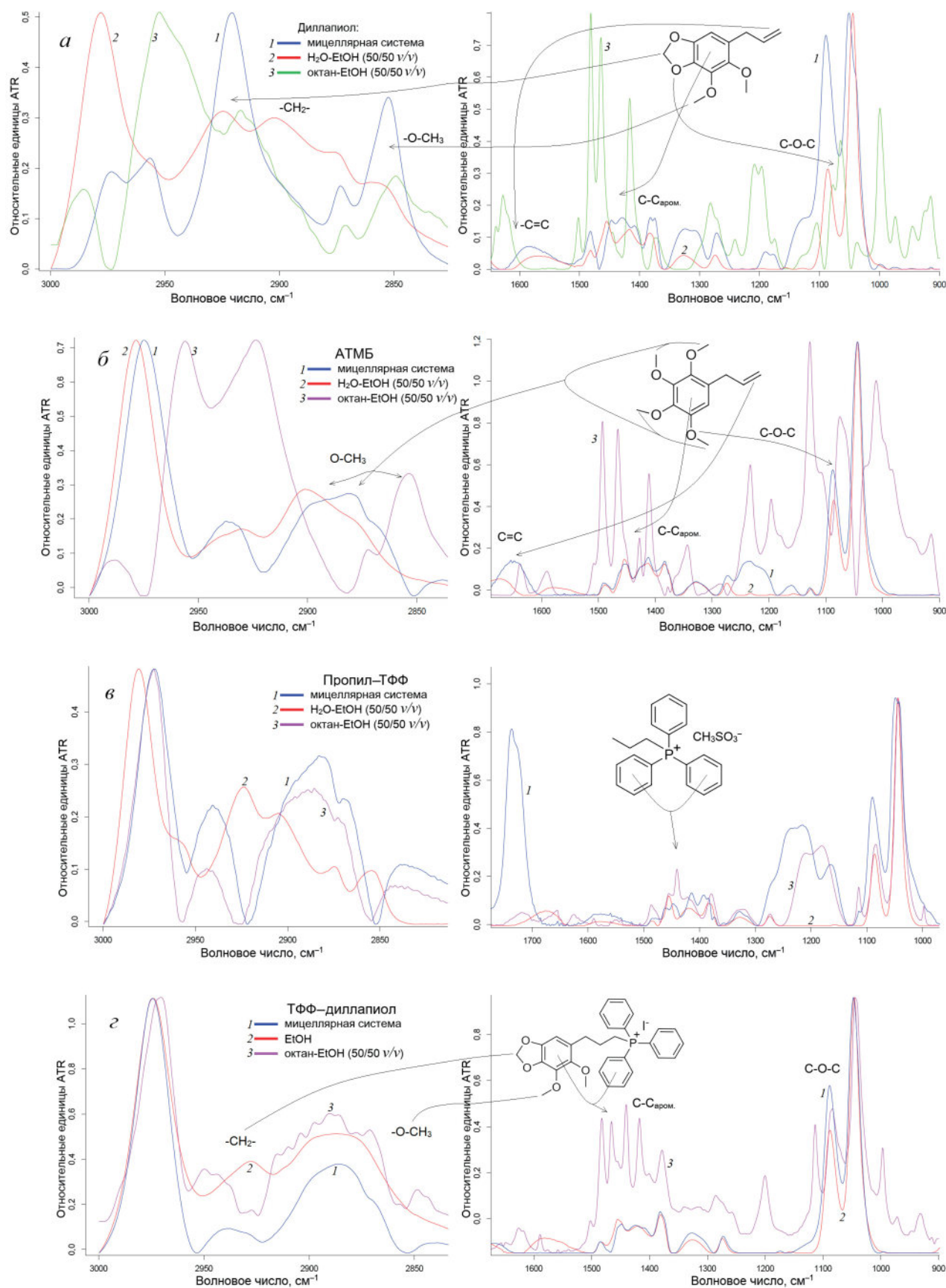
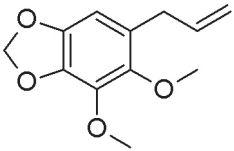
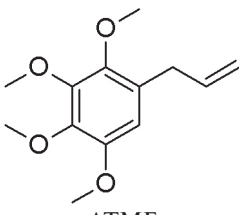
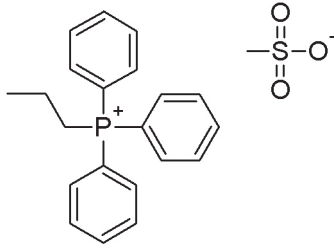
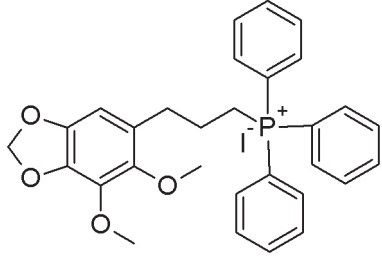
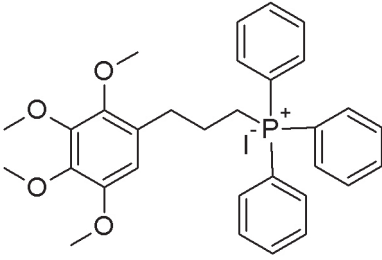


Рис. 3. ИК-спектры Фурье в режиме НПВО в мицеллах, водно-этанольном, октан-этанольном окружении: диллапиола (а); аллитетраметоксбензола (б), пропил-ТФФ (в), ТФФ-диллапиол (г). ИК-спектры нормированы на интенсивность мажорного пика. Т = 22 °С. Система обращённых мицелл: 0,1 М АОТ в октано (W₀ = 22)

Таблица. 2. Положения характеристических пиков в ИК-спектрах диллапиола, аллилтетраметоксibenзола, пропил-ТФФ, ТФФ-диллапиола, ТФФ-аллилтетраметоксibenзола; соответствие функциональных групп и их микроокружения в мицеллах АОТ

Соединение	Функциональная группа	Положение характеристического пика в ИК-спектре, см ⁻¹			Вывод о расположении функциональной группы и молекулы
		октан-этанол 50/50 (v/v)	вода-этанол 50/50 (v/v)	мицеллы АОТ	
 Диллапиол	O—CH ₂ —O	2917	2924	2921	метилendioкси-группа в большей степени ориентирована внутрь мицелл и гидрофильное окружение
	=C—O—C	1065	1045	1051	
	—O—CH ₃	2848,5	2858	2853	ароматическое ядро расположено на поверхности раздела фаз
	C—C ароматические	1464	1448	1454	
 АТМБ	Ph—CH ₂ —CH=CH ₂	2956	2930	2937	расположение преимущественно внутри мицелл АОТ; ароматические группы частично внутри мицелл и частично между гидрофобными СН ₂ -цепями ПАВ
	—O—CH ₃	2924	2901	2880—2900	
	C—C ароматические	1492 и 1466	1488,5 и 1449—1456	1491—1488 и 1454	
 Пропил-ТФФ	C—C ароматические	1421	1414—1420	1413	молекула расположена в основном на поверхности раздела фаз между гидрофобными цепями ПАВ
		1440 и 1455	1455	1448 и 1458—1462	
 ТФФ-диллапиол	O—CH ₂ —O	2937—2952	2927—2932 (2928)	2927—2947	молекулы на поверхности раздела фаз и внутри мицелл; метилendioкси-группа ориентирована внутрь мицелл, а положительно заряженный ТФФ электростатически взаимодействует с сульфогруппами АОТ
	=C—O—C	1082—1087	1086 (1088)	1088	
	—O—CH ₃	2848	—	2840	
	Ph—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —PPh ₃	2970	2981 (2974)	2981	
	C—C ароматические	1502	1485	1485	
		1455 и 1465	1448—1457	1448	
 ТФФ-аллилтетраметоксibenзол	=C—O—C	1086	1089 (1088)	1069 и 1113	тетраметоксibenзольный фрагмент на поверхности раздела фаз; ТФФ-радикал на поверхности раздела фаз и частично в октане
	—O—CH ₃	2855	2900 (2880—2900)	2855 и 2873	
	Ph—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —PPh ₃	2993 и 2957	2980 (2974)	2990 и 2957	
	C—C ароматические	1467	1482—1488	1467 и 1495	

сам диллапиол (но максимальный процент ингибирования у ТФФ–диллапиола повышен за счёт более выгодного распределения вещества в мицеллах). Положение пиков ТФФ–АТМБ в мицеллярной системе (табл. 2) свидетельствует о том, что окружение тетраметоксибензола — преимущественно гидрофильное, а ТФФ-фрагмент расположен на поверхности раздела фаз, что обуславливает заякоривание в мицеллярной матрице и пространственную ориентацию ТФФ–АТМБ в сравнении с АТМБ. Усиление ингибирующего действия АТМБ после конъюгирования с ТФФ может быть обусловлено локализацией мембранного фермента TcGAL на поверхности раздела фаз. В случае исходного диллапиола эффект заякоривания в мицеллярной матрице не выражен.

Влияние аллилбензола и его аналогов на активность TcGAL. Поскольку АПАБ и ликорин, содержащие общий бензодиоксольный фрагмент, но отличающиеся остальной частью (в молекуле ликорина вместо аллильного радикала присутствует жёсткий объёмный блок (табл. 1)), проявляют разный по силе ингибирующий эффект в отношении TcGAL, целесообразно изучить роль аллильной группы в обеспечении ингибирующего действия АПАБ на этот фермент. В связи с этим мы исследовали влияние аллилбензола и его аналогов, не содержащих метилendioкси-группы, на активность TcGAL (рис. 4).

Найдено, что значение IC_{50} для аллилбензола сравнимо с таковым для апиола (60 и 50 мкМ соответственно), это говорит о важной роли аллильной группы в ингибировании TcGAL даже при отсутствии метилendioкси-группы. Значения IC_{50} для 1-аллил-1,2,4-триазола и апиола также сопоставимы (75 мкМ и 50 мкМ соот-

ветственно), что тоже подтверждает значимую роль именно аллильной части молекулы в ингибировании TcGAL.

Наиболее эффективными ингибиторами TcGAL в ряду алиллбензола оказались эстрагол и эвгенол ($IC_{50} = 20$ и 10 мкМ соответственно). Сравнение IC_{50} аналогов алиллбензола и представителей алиллполиалкоксибензолов позволяет предположить важную роль аллильного фрагмента для ингибирования TcGAL даже при отсутствии метилendioкси-группы.

Определение механизма ингибирования TcGAL апиолом. Поскольку алиллполиалкоксибензолы оказались более эффективными ингибиторами TcGAL по сравнению с ликорином, представляется целесообразным изучение механизма действия данных соединений и сопоставление с таковым для ликорина, для которого нами был установлен смешанный тип ингибирования в отношении гомологичного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) [5]. Рассчитаны каталитические параметры исследуемых систем при разных концентрациях апиола: константа Михаэлиса $K_M = 0,14$ мМ по D-арабиноно-1,4-лактону, константа ингибирования $K'_I = 0,043$ мМ и значения k_{cat} (приведены на рис. 5). Из полученных данных следует, что при увеличении концентрации ингибитора константа Михаэлиса остаётся неизменной, в то время как значение k_{cat} снижается, что соответствует неконкурентному типу ингибирования.

Таким образом, установлен неконкурентный механизм ингибирования TcGAL апиолом с константой ингибирования $K'_I = 0,043$ мМ (рис. 5), что хорошо соотносится с параметром $IC_{50} = 50$ мкМ (табл. 1).

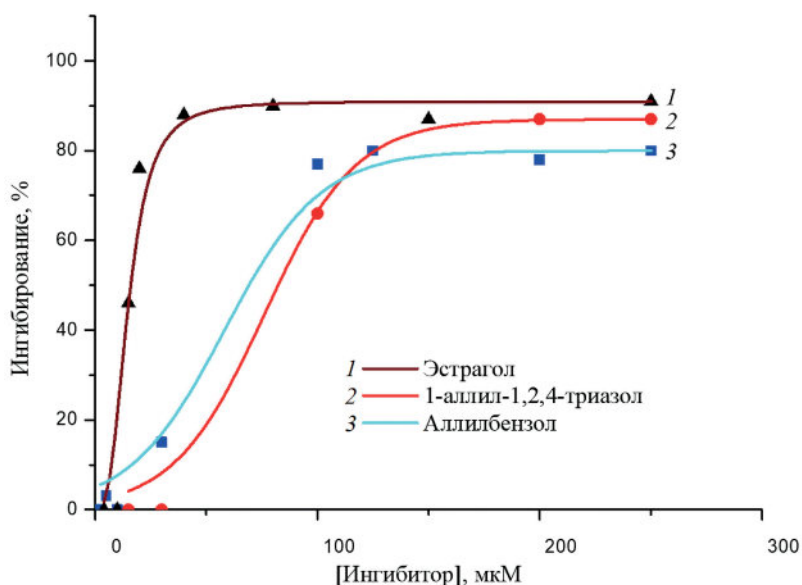


Рис. 4. Сравнение ингибирующих эффектов аллилбензола, 1-аллил-1,2,4-триазола и эстрагола.

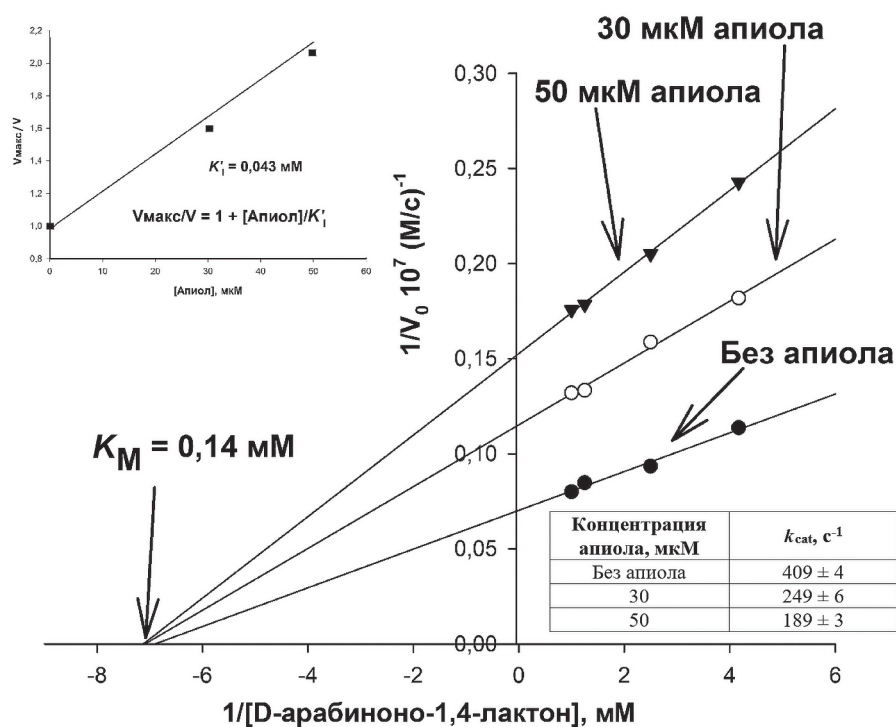


Рис. 5. Определение механизма ингибирования TcGAL апиолом в координатах Лайнуивера–Берка. Концентрации апиола: 0, 30 и 50 мкМ. Концентрации D-арабиноно-1,4-лактона 0,25–1 мМ ($T = 25^\circ\text{C}$). Параметры имеют максимальную погрешность не более 15%

Влияние халконов на активность TcGAL.

Представляется важным также более детальное изучение роли метилендиокси-группы в ингибировании этого фермента при отсутствии аллильной группы. С этой целью исследовали действие на TcGAL ряда халконов, содержащих метилендиокси-группу как с метоксигруппами, так и без них (см. табл. 1).

Поскольку многие халконы подавляют рост *T. cruzi* в достаточно низкой концентрации (порядка 20 мкМ) [7], мы предположили, что такие соединения в сопоставимой концентрации также будут способны ингибировать TcGAL.

Однако влияние исследованных халконов на TcGAL оказалось довольно слабым — максимальный эффект составил не более 25% в концентрации 500 мкМ для 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-метоксихалкона (табл. 1). Таким образом, можно предположить, что при отсутствии аллильного радикала метилендиокси-группа вносит слабый вклад в ингибирование TcGAL. Отметим, однако, что исследованные халконы отличаются от аллилполиалкоксибензолов «довеском» в виде ещё одного замещённого бензольного кольца, что может мешать взаимодействию с TcGAL. Вероятно, угнетение роста трипаносомы халконами может происходить по другому механизму (мишень неизвестна), не через ингибирование TcGAL.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые найден класс ингибиторов галактонолактонооксидазы TcGAL из *T. cruzi*, которая катализирует финальную стадию синтеза витамина С в трипаносомах и рассматривается как потенциальная мишень для разработки лекарств против трипаносомных инфекций.

Обнаружено, что АПАБ (апиол, диллапиол) и аллилбензолы (эвгенол, эстрагол) эффективно ингибируют TcGAL в диапазоне концентраций 20–50 мкМ. По литературным данным, диллапиол в сопоставимой концентрации 60 мкМ угнетает рост *L. brasiliensis* [10], что может свидетельствовать об ингибировании TcGAL как о ключевом механизме противопаразитарного действия диллапиола в отношении трипаносоматид. Также интересно отметить, что, согласно Morais et al. [14], близкий изомер эвгенола — изоэвгенол — обладает сопоставимым $\text{IC}_{50} = 51 \text{ мкМ}$ в отношении самой *T. cruzi*. Таким образом, есть основания предполагать, что TcGAL представляет собой молекулярную мишень, возможно, не единственную, на которую действуют соединения класса АПАБ. Ранее было известно, что ряд соединений данного класса обладают противопаразитарным эффектом, но данные об их механизме действия и клеточной мишени отсутствовали. Полученные данные указывают

на важную роль аллилбензольного фрагмента в ингибировании TcGAL. В то же время метилendioкси-группа, общая для ликорина, АПАБ и ряда халконов, не является необходимой для воздействия на этот фермент.

Интересно, что бензодиоксольный фрагмент является единственным общим структурным компонентом для целого ряда алкалоидов, включая ликорин, проявляющих антитрипаносомную активность с IC_{50} в диапазоне 0,5–200 мкМ, но в основном их противопаразитарное действие наблюдается либо при концентрациях около 60 мкМ, как у кринина, либо при 1 мкМ, как у ликорина [4]. При этом IC_{50} ликорина (450 мкМ) в отношении TcGAL значительно выше. Эти данные указывают на возможное участие бензодиоксольного фрагмента (или метилendioкси-группы) в угнетении роста *T. cruzi*, но конкретная мишень (фермент) не установлена.

Дальнейшая оптимизация обнаруженных в данной работе ингибиторов TcGAL может послужить основой для создания лекарств против болезни Шагаса. Полученные результаты также могут быть использованы для поиска

эффективных способов лечения грибковых инфекций за счёт ингибирования гомологичных ферментов.

Вклад авторов. Е.В. Кудряшова — концепция и руководство работой; В.В. Семенов, С.С. Крылов — обсуждение стратегии исследования серии ингибиторов; А.А. Чудин — проведение экспериментов; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин, В.В. Семенов, С.С. Крылов — обсуждение результатов исследования; А.А. Чудин — написание текста; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин, В.В. Семенов — редактирование текста статьи; И.Д. Злотников — измерения и анализ ИК-спектров.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- García-Huertas, P., and Cardona-Castro, N. (2021) Advances in the treatment of Chagas disease: promising new drugs, plants and targets, *Biomed. Pharmacother.*, **142**, 112020, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112020.
- Lepesheva, G. I., Villalta, F., and Waterman, M. R. (2011) Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol-14 α -demethylase (CYP51), **75**, 65–87, doi: 10.1016/b978-0-12-385863-4.00004-6.
- Kudryashova, E. V., Leferink, N. G. H., Slot, I. G. M., and van Berkel, W. J. H. (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C, *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 545–552, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.03.001.
- Martínez-Peinado, N., Cortes-Serra, N., Torras-Claveria, L., Pinazo, M.-J., Gascon, J., Bastida, J., and Alonso-Padilla, J. (2020) Amaryllidaceae alkaloids with anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *Parasites Vectors*, **13**, doi: 10.1186/s13071-020-04171-6.
- Chudin, A. A., and Kudryashova, E. V. (2022) Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL, using a reversed micellar system, *Analytica*, **3**, 36–53, doi: 10.3390/analytica3010004.
- Zheoat, A. M., Alenezi, S., Elmahallawy, E. K., Ungogo, M. A., Alghamdi, A. H., Watson, D. G., Igoli, J. O., Gray, A. I., de Koning, H. P., and Ferro, V. A. (2021) Antitrypanosomal and antileishmanial activity of chalcones and flavanones from *Polygonum salicifolium*, *Pathogens*, **10**, 175, doi: 10.3390/pathogens10020175.
- Aponte, J. C., Verástegui, M., Málaga, E., Zimic, M., Quiliano, M., Vaisberg, A. J., Gilman, R. H., and Hammond, G. B. (2008) Synthesis, cytotoxicity, and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new chalcones, *J. Med. Chem.*, **51**, 6230–6234, doi: 10.1021/jm800812k.
- Tsyganov, D. V., Samet, A. V., Silyanova, E. A., Ushkarov, V. I., Varakutin, A. E., Chernysheva, N. B., Chuprov-Netochin, R. N., Khomutov, A. A., Volkova, A. S., Leonov, S. V., Semenova, M. N., and Semenov, V. V. (2022) Synthesis and antiproliferative activity of triphenylphosphonium derivatives of natural allyl-polyalkoxybenzenes, *ACS Omega*, **7**, 3369–3383, doi: 10.1021/acsomega.1c05515.
- Zlotnikov, I. D., Belogurova, N. G., Krylov, S. S., Semenova, M. N., Semenov, V. V., and Kudryashova, E. V. (2022) Plant alkylbenzenes and terpenoids in the form of cyclodextrin inclusion complexes as antibacterial agents and levofloxacin synergists, *Pharmaceuticals*, **15**, 861, doi: 10.3390/ph15070861.
- Parise-Filho, R., Pasqualoto, K. F. M., Magri, F. M. M., Ferreira, A. K., da Silva, B. A. V. G., Damião, M. C. F. C. B., Tavares, M. T., Azevedo, R. A., Auada, A. V. V., Polli, M. C., and Brandt, C. A. (2012) Dillapiole as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic activity and

- preliminary SAR studies of dillapiol analogues, *Arch. Pharm.*, **345**, 934-944, doi: 10.1002/ardp.201200212.
11. Laubasarova, I. R., Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Rokitskaya, T. I., Silachev, D. N., Danilina, T. I., Plotnikov, E. Y., Denisov, S. S., Kirsanov, R. S., Korshunova, G. A., Kotova, E. A., Zorov, D. B., and Antonenko, Y. N. (2020) Linking 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) to triphenylphosphonium yields mitochondria-targeted protonophore and antibacterial agent, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1578-1590, doi: 10.1134/S000629792012010X.
 12. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. (1984) Микрогетерогенная среда для химических (ферментативных) реакций на основе коллоидного раствора воды в органическом растворителе, *Усп. Хим.*, **53**, 545-565.
 13. Klyachko, N. L., Shchedrina, V. A., Efimov, A. V., Kazakov, S. V., Gazaryan, I. G., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2005) pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16106-16114, doi: 10.1074/jbc.M414285200.
 14. Morais, T. R., Conserva, G., Varela, M. T., Costa-Silva, T. A., Thevenard, F., Ponci, V., Fortuna, A., Falcão, A. C., Tempone, A. G., Fernandes, J., and Lago, J. (2020) Improving the drug-likeness of inspiring natural products – evaluation of the antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* through semi-synthetic and simplified analogues of licar-in A, *Sci. Rep.*, **10**, 5467, doi: 10.1038/s41598-020-62352-w.

INHIBITORS OF GALACTONOLACTONE OXIDASE FROM *Trypanosoma cruzi* BASED ON ALLYLPOLYALKOXYBENZENES

A. A. Chudin¹, I. D. Zlotnikov¹, S.S. Krylov², V. V. Semenov², and E. V. Kudryashova^{1*}

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

² N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

Inhibition of the biosynthetic pathways of compounds essential for *T. cruzi* is considered by researchers as one of the possible mechanisms of action of potential drugs against Chagas disease. As one of these mechanisms, we consider inhibition of galactonolactone oxidase from *T. cruzi* (TcGAL), which catalyzes the final step in the synthesis of vitamin C, an antioxidant that *T. cruzi* is unable to assimilate from outside and must synthesize itself. In this work, for the first time, a class of effective inhibitors of TcGAL was found – allylbenzenes from plant sources. A non-competitive mechanism of action of apiol has been established and it has been found that natural allylpolyalkoxybenzenes (APAB) – apiol, dillapiol, etc. are effective inhibitors of TcGAL with IC₅₀ = 20-130 μM. It was found that the conjugation of APAB with triphenylphosphonium, which ensures the selective delivery of biologically active substances to mitochondria, makes it possible to increase the efficiency and/or the maximum percentage of inhibition compared to unmodified APAB.

Keywords: galactonolactone oxidase, Chagas disease, inhibitors, apiol, allylpolyalkoxybenzenes, triphenylphosphine derivatives, dillapiol, myristicin, eugenol, estragole

МЕЛАТОНИН МОЖЕТ УСИЛИВАТЬ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛЕЙКЕМИИ

© 2023 А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Р.С. Фадеев, Я.В. Ломовская,
М.И. Кобякова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина*

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

Поступила в редакцию 18.11.2022

После доработки 21.12.2022

Принята к публикации 22.12.2022

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин, МЕЛ), секретируемый шишковидной железой, играет важную роль в регуляции различных функций в организме человека. Существуют доказательства, что МЕЛ оказывает противоопухолевое действие при различных видах рака. Мы изучили комбинированный эффект МЕЛ и препаратов из разных фармакологических групп, таких как цитарабин (ЦИТ) и навитоклакс (АВТ-737), на состояние опухолевого пула клеток острого миелоидного лейкоза на клеточной модели MV4-11. Совместное действие МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 способствовало снижению пролиферативной активности лейкозных клеток, снижению мембранного потенциала митохондрий, увеличению продукции активных форм кислорода и цитозольного Ca^{2+} . Мы показали, что МЕЛ вместе с ЦИТ или АВТ-737 увеличивает экспрессию гомологичного белка С/ЕВР и маркера аутофагии LC3A/B и снижает экспрессию протеин-дисульфидизомеразы и белка, связывающего иммуноглобулины, и, следовательно, может модулировать стресс эндоплазматического ретикулума и инициировать аутофагию. Полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение о том, что МЕЛ может иметь преимущества при лечении рака и рассматриваться как добавка к лекарственным средствам, используемым в терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мелатонин, цитарабин, навитоклакс, аутофагия, пролиферация, ЭПР-стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523010086, **EDN:** PCOUWC

ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы считаются одним из самых распространенных видов опухолевых заболеваний у детей. Однако пик заболеваемости приходится на возраст от 40 до 46 лет, и более 90% всех больных лейкемией являются взрослыми пациентами [1]. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой прогрессирующее гематологическое злокачественное новообразование, характеризующееся повышенной продукцией бластных клеток в костном мозге и периферической крови [2]. Это заболевание наиболее распространено среди взрослого населения, составляя около 90% случаев. Средний возраст при постановке диагноза – 65–70 лет [3]. В основе лечения

этого заболевания лежит применение химиотерапевтических ДНК-тропных препаратов, таких как цитарабин, доксорубин, этопозид и других. Цитарабин (1-β-D-арабинофуранозилцитозин, цитозинарабинозид, Ara-C, ЦИТ) является пролекарством и используется в качестве основной терапии ОМЛ уже более 40 лет [4]. Однако, помимо противоопухолевой активности, ЦИТ также обладает токсическим побочным действием. АВТ-737 представляет собой таргетный препарат, который воздействует на белки семейства Bcl-2, тем самым предотвращая их связывание с активаторами апоптоза (Bid, Bim, Puma) или сенситизаторами (Bad, Noxa). Исследования показали, что АВТ-737 обладает сильной противоопухолевой активностью в отношении широкого спектра

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; МЕЛ – мелатонин; МИ – митотический индекс; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ЦИТ – цитарабин; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ВР – белок, связывающий иммуноглобулины; СНОР – моноклональный гомологичный белок С/ЕВР; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; PDI – протеин-дисульфидизомераза; ΔΨm – изменение мембранного потенциала.

* Адресат для корреспонденции.

раковых клеток, таких как миелома [5] и лимфома [6], и нескольких типов солидных опухолевых клеток, таких как глиобластома [7] и рак легких [8]. Несмотря на достигнутый прогресс в лечении ОМЛ, который значительно улучшил выживаемость у молодых пациентов, прогноз для пожилых остается неблагоприятным [9, 10].

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин, МЕЛ) — индоламин, который вырабатывается не только шишковидной железой, но и другими органами, такими как костный мозг, сетчатка и кожа. Мелатонин участвует в регуляции циркадного ритма, тем самым связывая биохимические и физиологические потребности организма [11, 12]. Ряд исследований показал, что МЕЛ действует как иммунорегулятор и мощный антиоксидант, способный предотвращать гибель клеток в условиях окислительного стресса [13, 14]. Кроме того, было показано, что МЕЛ обладает противоопухолевой активностью при различных типах неопластических заболеваний, таких как рак кожи [15], глиома [16], рак желудочно-кишечного тракта [17], лейкемия [18, 19], рак молочной железы [20]. Одним из важных органоидов клетки является эндоплазматический ретикулум (ЭПР), который поддерживает гомеостаз Ca^{2+} , синтез липидов и является местом синтеза и фолдинга белков [21]. Zhou et al. [22] показали, что МЕЛ подавлял ЭПР-стресс, индуцированный высоким уровнем глюкозы, путем модулирования пути PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP в клетках остеобластов MC3T3-E1. Кроме того, комбинированное действие МЕЛ с индуктором ЭПР-стресса туникамицином повышало чувствительность опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 за счет ингибирования COX-2 и увеличения экспрессии CHOP (моноклональный гомологичный белок C/EBP) [23]. Moreira et al. [24] наблюдали, что МЕЛ был способен активировать ЭПР-стресс, характеризующийся повышенной экспрессией активирующего фактора транскрипции 6 (ATF6), CHOP и белка, связывающего иммуноглобулины (BIP) при индуцированной диэтилнитрозамином гепатоцеллюлярной карциноме у крыс, а также способствовал апоптозу за счет увеличения активности каспаз-3, -8 и -9, увеличения соотношения Bax/Bcl-2, расщепления протеинкиназы R-подобной киназы эндоплазматического ретикулума (PERK) и увеличения цитохрома c, p53 и белков Fas-L. Протеин-дисульфидизомераза (PDI) представляет собой белок с дисульфидизомеразной и оксидантной активностями для образования дисульфидных связей, способствует увеличению образования активных форм кислорода (АФК)

в клетках и участвует в поддержании Ca^{2+} -гомеостаза [25, 26].

Ранее мы показали, что МЕЛ совместно со сниженными концентрациями препаратов из различных фармакологических групп, а именно трансретиноевой кислотой (АТРА), цитарабином и АВТ-737, снижал пролиферацию клеток HL-60 (модель промиелоцитарной лейкемии), тем самым снижая пролиферативную активность и митотический индекс. Более того, мы наблюдали, что МЕЛ с исследуемыми препаратами подавлял экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 [27–29] и вызывал активацию ЭПР-стресса, модулируя путь PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP, тем самым увеличивая чувствительность клеток HL-60 к действию пониженной концентрации АВТ-737 [28]. Yoritatsu et al. [30] показали, что ЭПР-стресс инициирует аутофагию, которая проявляется как динамический процесс самопереваривания поврежденных органелл и неправильно свернутых белков в клетках.

Острый миеломоноцитарный лейкоз (клеточная модель MV4-11) представляет собой форму острого миелоидного лейкоза, которая включает пролиферацию миелобластов и монобластов, несущих транслокацию t(4;11), и внутреннюю тандемную дупликацию (ITD). Клетки, несущие ITD, обладают множественной лекарственной устойчивостью [31]. MV4-11 используется в качестве модели для изучения лекарственной устойчивости [32], а также чувствительности к классическим противоопухолевым препаратам (ЦИТ и др.) [33]. Показано, что МЕЛ может значительно повышать чувствительность клеток к химиопрепаратам и усиливать цитотоксичность, индуцированную ингибитором тирозинкиназы FLT3, сорафенибом. Важно отметить, что комбинированное действие МЕЛ и сорафениба продемонстрировало высокую синергетическую терапевтическую активность в отношении ксенотрансплантатов MV4-11 и мышиной модели лейкемии FLT3/ITD [34].

В настоящей работе мы исследовали влияние МЕЛ совместно с ЦИТ или АВТ-737 на пролиферативную активность, изменение мембранного потенциала, содержание цитозольного Ca^{2+} , продукцию АФК, а также изменения экспрессии маркеров ЭПР-стресса и аутофагии в клетках MV4-11. В этом исследовании мы использовали клеточную линию MV4-11 в качестве экспериментальной модели для изучения влияния МЕЛ на цитотоксические эффекты ЦИТ и АВТ-737. Исследование на клетках MV4-11 дополнит исследование, проведенное на клетках HL-60, и обобщит влияние противоопухолевого действия МЕЛ на клетки острого миелоидного лейкоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток линии MV4-11.

Клетки MV4-11 (CRL-9591) были приобретены у «ATCC» США. Клетки культивировали в среде RPMI/12 («Sigma-Aldrich», США), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина («Sigma-Aldrich») в условиях CO₂-инкубатора («Binder», Германия) при 37 °C, влажности 95% и 5% CO₂. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 9–12 повторях, получая среднее значение. Усредненные значения по четырем экспериментам использовали для определения достоверности. В качестве контролей использовали клетки, не подвергавшиеся дополнительной обработке.

Тест на выживаемость (цитотоксический тест).

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. В работе использовали следующие реактивы: МЕЛ и резазурин («Sigma-Aldrich»); ЦИТ («Pfizer», США); АВТ-737 («Thermo Fisher Scientific», США). Клетки (с плотностью 5×10^3 клеток на лунку) высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали МЕЛ (1 мкМ–10 мМ), ЦИТ (1 нМ–10 мкМ) и АВТ-737 (1 нМ–10 мкМ) в указанных дозах. Через 24 ч после добавления исследуемых веществ в каждую лунку добавляли резазурин в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 4 ч в условиях CO₂-инкубатора. Флуоресцентный анализ проводили на устройстве для считывания микропланшетов Infinite F200 («Tecan», Швейцария) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны испускания 595 нм. Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки).

Анализ митотического индекса. Для определения митотической активности клетки предварительно инкубировали с исследуемыми веществами в течение 24 ч. Затем клетки центрифугировали в течение 4 мин со скоростью 250 g, промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) и фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки отмывали от этанола в PBS, ресуспендировали в PBS, и затем клетки окрашивали бисбензими́дом H33342 («Sigma-Aldrich»). Митотические клетки подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 («Leica», Германия). Анализ значения митотического индекса (МИ) определяли по стандартной методике [25–27].

Анализ пролиферативной активности. Пролиферативную активность и гибель клеток

определяли с использованием красителя трипанового синего («Sigma-Aldrich») в культуральной среде. Культивируемые клетки центрифугировали в течение 4 мин при 250 g, а затем промывали раствором PBS. Для оценки количества и жизнеспособности клеток использовали 0,4%-ный раствор трипанового синего. Опыты проводили не менее, чем в десяти повторях.

Анализ продукции АФК. Продукцию АФК анализировали с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA, «Sigma-Aldrich») (Ex – 485 нм/Em – 530 нм). Для анализа продукции АФК клеточную суспензию (10⁶ клеток/мл) центрифугировали при 250 g, ресуспендировали в PBS и добавляли 10 мкМ DCFH-DA, после чего клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 10 мин. H₂O₂ (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. Изменение окислительной активности проводили на проточном цитометре BD Accuri C6 («Biosciences», США).

Анализ изменения митохондриального мембранного потенциала. Для анализа митохондриального потенциала 10⁶ клеток/мл ресуспендировали в PBS и инкубировали с DiOC6(3) («Sigma-Aldrich») в концентрации 10 нМ в условиях CO₂-инкубатора в течение 30 мин (Ex – 482 нм/Em – 501 нм). В качестве положительного контроля использовали сапонин (0,5%). Изменение мембранного потенциала измеряли на проточном цитометре BD Accuri C6.

Анализ цитозольного Ca²⁺. Изменение содержания цитозольного Ca²⁺ проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-4 AM («Sigma-Aldrich») (Ex – 494 нм/Em – 516 нм). Для оценки изменения содержания цитозольного Ca²⁺ клеточную суспензию (10⁶ клеток/мл) отмывали и ресуспендировали в PBS, после чего к суспензии добавляли Fluo-4 AM (2 мкМ) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. После окрашивания клетки дважды промывали и ресуспендировали в PBS, затем проводили измерения с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Вестерн-блот-анализ. К клеткам добавляли выбранные количества МЕЛ (1 мМ), ЦИТ (0,4 мкМ и 1 мкМ) и АВТ-737 (20 нМ и 80 нМ). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным PBS и центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок солибилизировали в лизирующем буфере («Bio-Rad», США) с добавлением ингибиторов протеиназ/фосфатаз («Abscam», Великобритания). После инкубации в течение

2 ч при 4 °С и постоянном перемешивании образцы центрифугировали при 13 000 *g* в течение 10 мин. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда в супернатантах [35]. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов Лэммли («Bio-Rad») и нагревали при 95 °С в течение 5 мин. Полученные лизаты разделяли на белки с помощью 12,5%-ного SDS-PAGE. Затем белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью вестерн-блоттинга («Bio-Rad»). Мембрану блокировали в растворе Roti-block («Carl Roth GmbH + Co.», Германия) при комнатной температуре в течение одного часа. Затем мембрану промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Моноклональный гомологичный белок С/ЕВР (СНОР), антитела LC3A/B (I, II), поликлональные антитела к протеин-дисульфидизомеразе (PDI), белок, связывающий иммуноглобулины (BIP), а также антитела против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), используемые для нормализации белка, были получены от «Cell Signaling», США. Белковые полосы инициировали с использованием ECL («Bio-Rad») при помощи гель-документирующей системы ChemiDoc Touch Imaging System («Bio-Rad»).

Статистический анализ. Для статистического анализа мы использовали однофакторный дисперсионный анализ и соответствующий апостериорный анализ (Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование влияния различных концентраций МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на выживаемость клеток MV4-11. Сначала мы исследовали цитотоксический эффект МЕЛ (рис. 1, *а*) и химиотерапевтических препаратов, таких как АВТ-737

(рис. 1, *б*) и ЦИТ (рис. 1, *в*) в клетках MV4-11. Для этого клетки культивировали в течение 24 ч с различными концентрациями МЕЛ (от 1 мкМ до 10 мМ), АВТ-737 (от 1 нМ до 10 мкМ) и ЦИТ (от 1 нМ до 10 мкМ). Мы оценили влияние АВТ-737 (20 нМ и 80 нМ), ЦИТ (0,4 мкМ и 1 мкМ) и МЕЛ (1 мМ) на жизнеспособность клеток MV4-11. Потому как токсичность химиотерапевтических препаратов остается проблемой при лечении ОМЛ, мы использовали низкие концентрации ЦИТ и АВТ-737 с МЕЛ.

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на пролиферативную активность клеток MV4-11. На следующем этапе оценивали влияние изучаемых веществ на пролиферативную активность и гибель клеток. Эффект МЕЛ 1 мМ, АВТ-737 (20 нМ и 80 нМ), ЦИТ (0,4 мкМ и 1 мкМ) и комбинированный эффект МЕЛ 1 мМ с АВТ-737 (20 нМ) и ЦИТ (0,4 мкМ) были исследованы в клетках MV4-11 (рис. 2).

Мы наблюдали, что АВТ-737 (80 нМ) и ЦИТ (1 мкМ) снижали число жизнеспособных клеток MV4-11 на 20% по сравнению с контролем (рис. 2, *а* и *б*; столбцы 2 по сравнению с 1). Количество погибших клеток увеличилось в 4,3 раза в присутствии АВТ-737 (80 нМ) и в 4,5 раза — в присутствии ЦИТ (1 мкМ) по сравнению с контролем (рис. 2, *а* и *б*; столбцы 2 по сравнению с 1). В присутствии сниженных концентраций АВТ-737 (20 нМ) и ЦИТ (0,4 мкМ) количество живых (столбцы 3 по сравнению с 1) и количество мертвых клеток (столбцы 3 по сравнению с 1) значительно не отличалось от контроля. Добавление МЕЛ (1 мМ) к клеткам MV4-11 приводило к снижению количества жизнеспособных клеток на 30% по сравнению с контрольными значениями (столбцы 4 по сравнению с 1). Однако комбинированное действие МЕЛ со сниженными концентрациями АВТ-737 (20 нМ) уменьшало количество живых клеток примерно в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 2, *а*; столбец 5

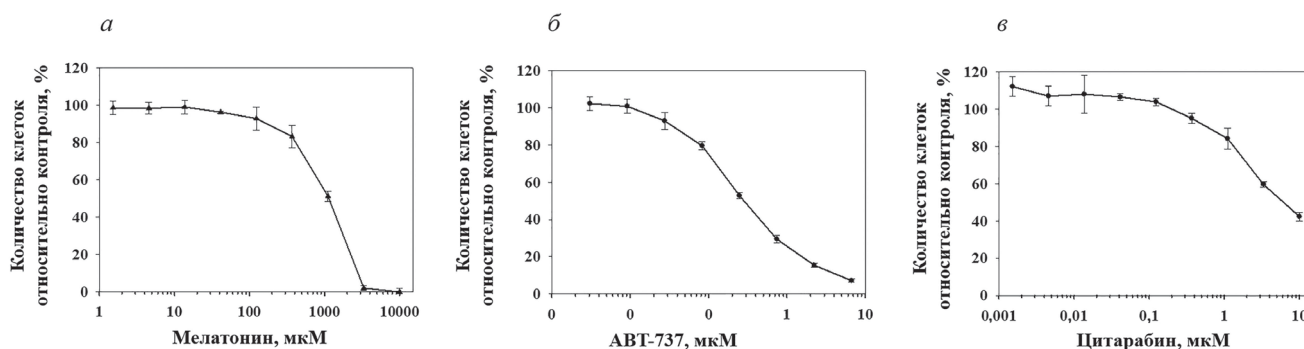
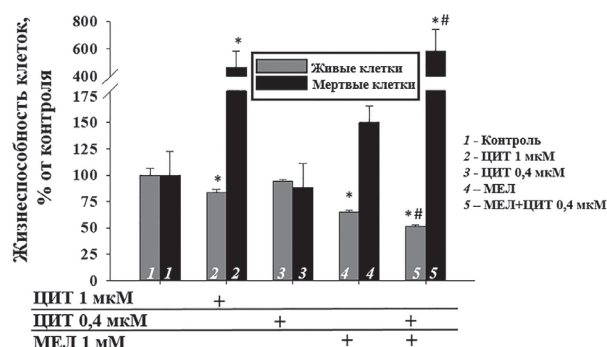
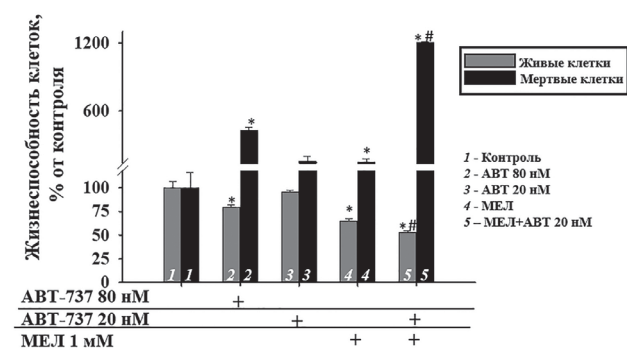


Рис. 1. Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ в клетках MV4-11. Клетки, инкубированные в культуральной среде, высевали в 96-луночный планшет при плотности 5×10^3 клеток на лунку и обрабатывали указанными концентрациями МЕЛ (*а*), АВТ-737 (*б*) и ЦИТ (*в*) в течение 24 ч. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) из десяти независимых экспериментов

а

б



в

г

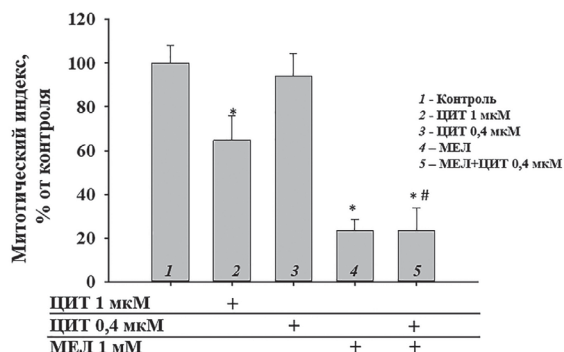
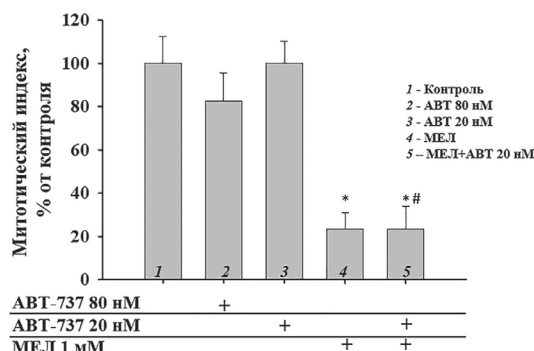


Рис. 2. Влияние МЕЛ, ЦИТ и АВТ-737 на жизнеспособность (а) и пролиферативную активность (б) клеток MV4-11. в – Изменение митотического индекса в присутствии МЕЛ и АВТ-737 в клетках MV4-11; г – изменение митотического индекса в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести независимых экспериментов. * $p < 0,05$ – достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления только АВТ-737 или ЦИТ (столбец 3)

по сравнению с 1) и на 50% – относительно АВТ-737 (20 нМ) (рис. 2, а; столбец 5 по сравнению с 3). При комбинированном действии МЕЛ с АВТ-737 количество погибших клеток MV4-11 увеличилось в 12 раз по сравнению с контролем (рис. 2, а; столбцы 5 по сравнению с 1) и в 10 раз – по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 2, а; столбец 5 по сравнению с 3). Совместное действие МЕЛ со сниженной концентрацией ЦИТ (0,4 мкМ) приводило к снижению количества живых клеток относительно контроля в 2 раза (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 1) и на 50% – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 3). Число погибших клеток в этих условиях увеличивалось в 6 раз по сравнению с контролем (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 1) и в 6 раз – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 3).

Известно, что митотический индекс используется для анализа статуса пролиферации клеточной популяции. Мы проверили влияние исследуемых препаратов на изменение митотической активности в клетках MV4-11. Рис. 2, в и г отражает изменение МИ в клетках ОМЛ в присутствии исследуемых веществ.

АВТ-737 (80 нМ) не изменял МИ, в то время как ЦИТ (1 мкМ) снижал значение МИ на 40% по сравнению с контролем (рис. 2, г; столбец 2 по сравнению с 1). Сниженные концентрации АВТ-737 и ЦИТ не изменили МИ (рис. 2, в и г; столбцы 3 по сравнению с 1). Обработка MV4-11 МЕЛ (1 мМ) уменьшала значение МИ в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 2, в и г; столбец 4 по сравнению с 1). Комбинированное действие МЕЛ со сниженными концентрациями АВТ-737 и ЦИТ уменьшало МИ на 80% по сравнению с контролем (рис. 2, в и г; столбец 5 против 1) и на 80% – по сравнению с АВТ-737 и ЦИТ (рис. 2, в и г; столбец 5 по сравнению с 3). Полученные результаты позволяют предположить, что МЕЛ усиливает цитотоксический эффект АВТ-737 и ЦИТ в клетках MV4-11.

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение мембранного потенциала, продукции АФК и содержание цитозольного Ca^{2+} в клетках MV4-11. Известно, что окислительный стресс или перегрузка Ca^{2+} изменяют проницаемость внутренней митохондриальной мембраны. Падение мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), увеличение продукции АФК и выход Ca^{2+} в цитозоль приводят

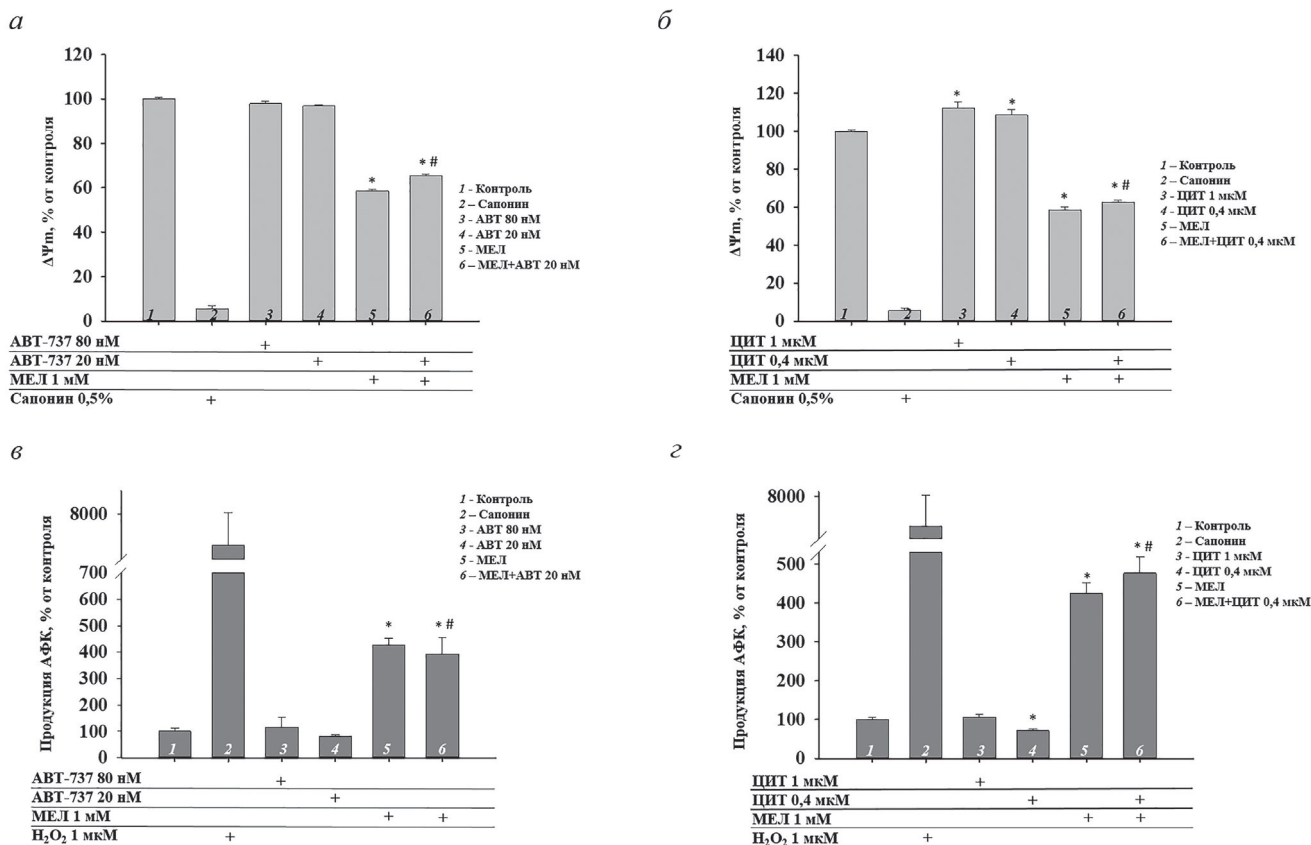


Рис. 3. Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) и продукцию АФК в клетках MV4-11. *а* – Изменение $\Delta\Psi_m$ в присутствии МЕЛ и АВТ-737; *б* – изменение $\Delta\Psi_m$ в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Контроль представлял собой необработанные клетки. В качестве положительного контроля использовали сапонин (0,5%); *в* – изменение продукции АФК в присутствии МЕЛ и АВТ-737; *г* – изменение продукции АФК в присутствии МЕЛ и ЦИТ. H₂O₂ (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ – достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления только АВТ-737 или ЦИТ (столбец 4)

к изменению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны [36]. Поэтому было исследовано изменение $\Delta\Psi_m$, продукции АФК (рис. 3) и цитозольного Ca²⁺ (рис. 4) в клетках MV4-11 в наших экспериментальных условиях.

АВТ-737 не влиял на изменение $\Delta\Psi_m$ по сравнению с контролем (рис. 3, *а*, столбцы 3 и 4 по сравнению с 1). Обработка клеток ЦИТ (1 и 0,4 мкМ) приводила к увеличению $\Delta\Psi_m$ на 15% по сравнению с контролем (рис. 3, *б*; столбцы 3 и 4 по сравнению с 1), тогда как МЕЛ снижал $\Delta\Psi_m$ на 40% по сравнению с контрольными условиями (рис. 3, *а* и *б*; столбец 5 по сравнению с 1). В условиях совместного действия МЕЛ с АВТ-737 наблюдали снижение $\Delta\Psi_m$ на 40% (рис. 3, *а*; столбец 6 по сравнению с 1) и на 40% – по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 3, *а*; столбец 6 по сравнению с 4). Добавление МЕЛ с ЦИТ приводило к снижению $\Delta\Psi_m$ на 40% по сравнению с контролем (рис. 3, *б*; столбец 6 по сравнению с 1) и на 55% – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 3, *б*; столбец 6 по сравнению с 4).

В присутствии ЦИТ (0,4 мкМ) продукция АФК снижалась на 20% в клетках MV4-11 (рис. 3, *г*; столбец 4 и 1). МЕЛ увеличил продукцию АФК в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 3, *в* и *г*; столбец 5 по сравнению с 1). При совместном действии МЕЛ с АВТ-737 (20 нМ) продукция АФК увеличивалась в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 3, *в*; столбец 6 по сравнению с 1) и по сравнению с АВТ-737 (рис. 3, *в*; столбец 6 по сравнению с 4). Добавление ЦИТ с МЕЛ к клеткам приводило к увеличению продукции АФК в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 3, *г*; столбец 6 по сравнению с 1) и в 7 раз – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 3, *г*; столбец 6 по сравнению с 4).

На следующем этапе исследования мы проанализировали изменение содержания цитозольного Ca²⁺ в клетках MV4-11 в наших экспериментальных условиях (рис. 4).

АВТ-737 (80 нМ) и ЦИТ (1 мкМ) повышали содержание цитозольного Ca²⁺ на 40 и 60% соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, *а* и *б*; столбец 2 по сравнению с 1).

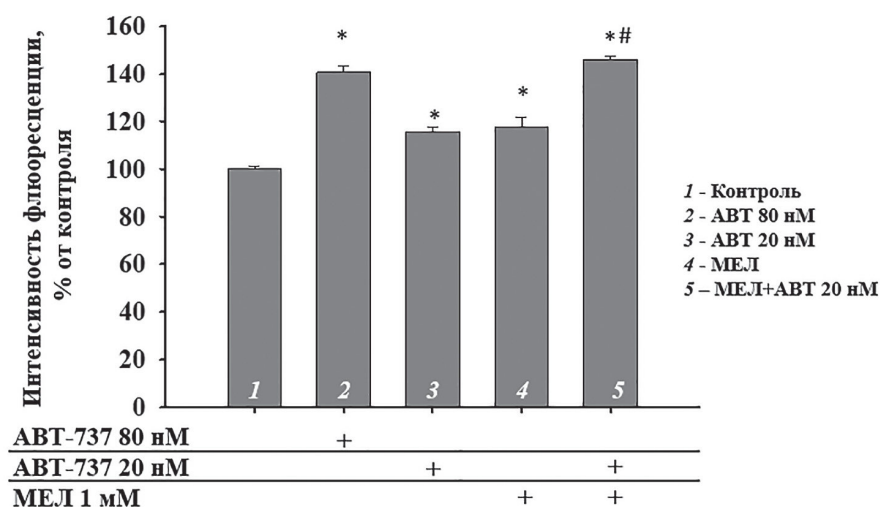
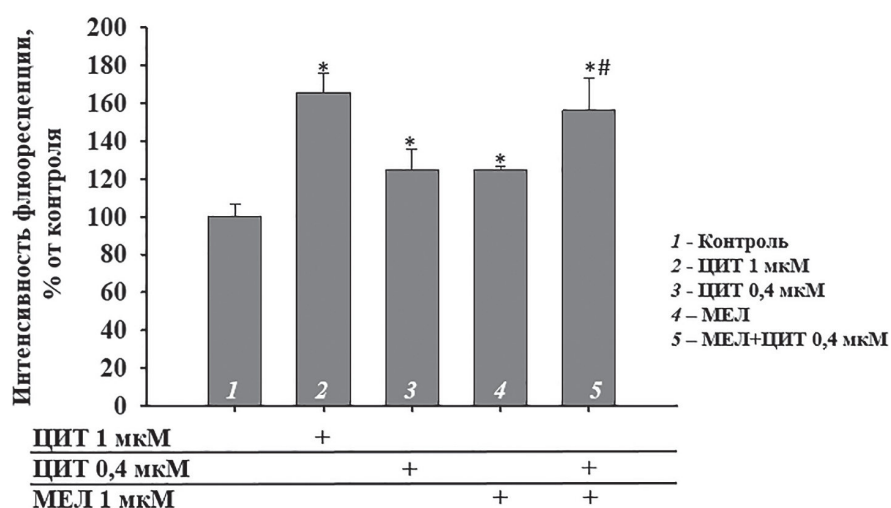
a*б*

Рис. 4. Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение цитозольного содержания Ca^{2+} в клетках MV4-11. *a* — Изменение цитозольного Ca^{2+} в присутствии МЕЛ и АВТ-737; *б* — изменение цитозольного Ca^{2+} в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Контроль представлял собой необработанные клетки. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ — достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ — достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления только АВТ-737 или ЦИТ (столбец 3)

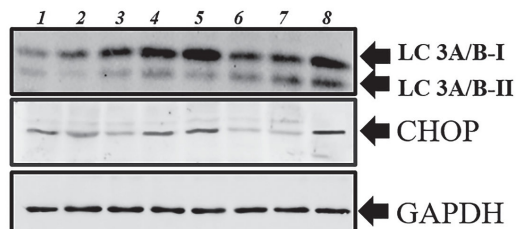
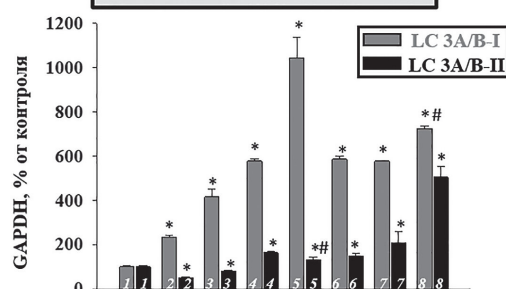
В присутствии АВТ-737 (20 нМ) содержание цитозольного Ca^{2+} увеличивалось на 10% (рис. 4, *a*; столбец 3 по сравнению с 1), а в присутствии ЦИТ (0,4 мкМ) — на 20% по сравнению с контролем (рис. 4, *б*; столбец 3 по сравнению с 1). Добавление МЕЛ повышало уровень цитозольного Ca^{2+} на 20% по сравнению с контролем (рис. 4, *a*; столбец 4 по сравнению с 1). Когда к клеткам добавляли МЕЛ с АВТ-737 или ЦИТ, содержание цитозольного Ca^{2+} увеличилось на 40% относительно контроля (рис. 4, *a* и *б*; столбец 5 по сравнению с 1), на 30% — по сравнению с АВТ-737 (рис. 4, *a*; столбец 5 по сравнению с 3)

и на 40% — по сравнению с одним ЦИТ (рис. 4, *б*; столбец 5 по сравнению с 3).

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение содержания белков LC3A/B (I, II) и СНОР в клетках MV4-11. Ранее было показано, что в клетках HepG2 и клетках карциномы падение $\Delta\Psi\text{m}$ коррелировало с разобщением окислительного фосфорилирования и стимуляцией аутофагии [37]. Кроме того, СНОР связан с апоптозом, модулируя про- и антиапоптотические белки и участвуя в освобождении Ca^{2+} [38]. Кроме того, считается, что МЕЛ модулирует апоптоз и аутофагию в раковых клетках [39]. Поэтому

a

ЦИТ 1 мкМ	+						
ЦИТ 0,4 мкМ		+		+			
МЕЛ			+	+			+
АВТ 80 нМ					+		
АВТ 20 нМ						+	+

*б*

1 - Контроль
 2 - ЦИТ 1 мкМ
 3 - ЦИТ 0,4 мкМ
 4 - МЕЛ
 5 - МЕЛ+ЦИТ 0,4 мкМ
 6 - АВТ 80 нМ
 7 - АВТ 20 нМ
 8 - МЕЛ+АВТ 20 нМ

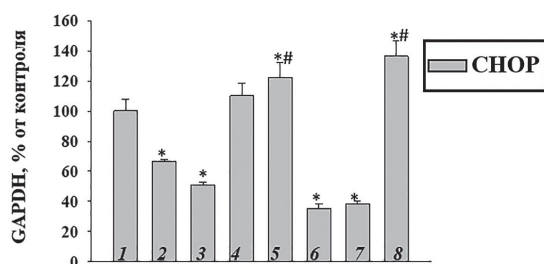
в

Рис. 5. Влияние МЕЛ, ЦИТ и АВТ-737 на изменение уровня LC3A/B и CHOP в MV4-11. *a* – Вестерн-блот маркера аутофагии LC3A/B и CHOP; диаграммы LC3A/B (*б*) и CHOP (*в*), количественно отражающие изменения содержания белков, нормированных на GAPDH, в % от контроля. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из трех отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ – достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления ЦИТ (столбец 3) или только АВТ-737 (столбец 7)

на следующем этапе мы исследовали изменение уровней LC3A/B (I, II) и CHOP в клетках MV4-11 в наших экспериментальных условиях (рис. 5). Антитела к GAPDH использовали для нормализации белка.

На рис. 5, *a* показан вестерн-блот, окрашенный антителами LC3A/B (I, II) и CHOP. На диаграммах (рис. 5, *б* и *в*) представлены количественные изменения содержания белков, полученные с помощью компьютерной денситометрии. Мы наблюдали, что добавление ЦИТ (1 мкМ и 0,4 мкМ) увеличивало содержание LC3A/B-I в 2,4 и 4 раза соответственно (рис. 5, *б*; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1) и снижало уровень LC3A/B-II на 50 и 25% соответственно по сравнению с контролем (рис. 5, *б*; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1). В этих условиях содержание CHOP снижалось на 35 и 50% соответственно по сравнению с контролем

(рис. 5, *в*; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1). Добавление АВТ-737 (80 нМ) повышало уровни LC3A/B-I и LC3A/B-II в 6 раз и на 45% соответственно (рис. 5, *б*; столбец 6 по сравнению с 1) и снижало экспрессию CHOP на 65% по сравнению с контролем (рис. 5, *в*; столбец 6 по сравнению с 1). АВТ-737 (20 нМ) повышал содержание LC3A/B-I и LC3A/B-II в 6 и 2 раза, но снижал содержание CHOP на 65% (рис. 5, *в*; столбец 7 по сравнению с 1). МЕЛ повышал содержание LC3A/B-I в 5,8 раза и LC3A/B-II – на 60% (рис. 5, *б*; столбец 4 по сравнению с 1). Добавление МЕЛ не изменяло уровень CHOP, однако МЕЛ в сочетании с ЦИТ (0,4 мкМ) увеличивал содержание LC3A/B-I в 11 раз, LC3A/B-II – на 30%, а CHOP – на 20% по сравнению с контролем (рис. 5, *б* и *в*; столбец 5 по сравнению с 1). В условиях совместного действия МЕЛ с ЦИТ уровень LC3A/B-I увеличивался

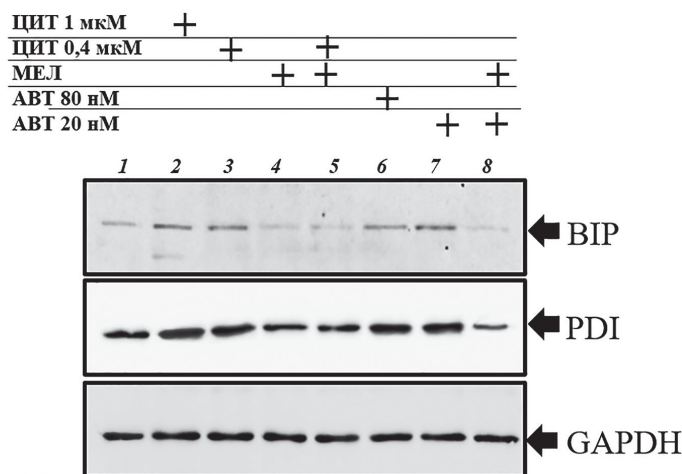
в 3 раза по сравнению с одним ЦИТ (рис. 5, б; столбец 5 по сравнению с 3), LC3A/B-II — на 40% (рис. 5, б; столбец 5 по сравнению с 3), а СНОР — на 70% (рис. 5, в; столбец 5 по сравнению с 3). При добавлении МЕЛ с АВТ-737 (20 нМ) к клеткам MV4-11 содержание LC3A/B-I увеличивалось в 7 раз, LC3A/B-II — в 5 раз, а СНОР — на 40% по сравнению с контролем (рис. 5, б и в; столбец 8 по сравнению с 1). Содержание LC3A/B-I увеличивалось на 28%, LC3A/B-II — в 2 раза и СНОР — в 3,5 раза по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 5, б и в; столбцы 8 по сравнению с 7).

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение содержания белков PDI и VIP в клетках MV4-11. Известно, что ЭПР участвует во многих клеточных функциях, таких как кальциевый гомеостаз, синтез белков или фосфолипидов [40], а также способен регулировать активацию различных транскрипционных каскадов, внутриклеточный транспорт, митохондриальный биогенез, аутофагию и апоптоз [41]. Более того, для поддержания гомеостаза Ca^{2+} необходимы PDI и VIP [26].

Мы исследовали изменения экспрессии PDI и VIP в наших экспериментальных условиях (рис. 6).

В клетках MV4-11 результаты вестерн-блоттинга (рис. 6, а) показали, что в присутствии ЦИТ (1 и 0,4 мкМ) содержание VIP повышалось на 35 и 50% (рис. 6, б; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1), а PDI — на 80 и 57% соответственно (рис. 6, б; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1). Добавление АВТ-737 (80 нМ) не изменяло содержание VIP (рис. 6, б; столбец 6 по сравнению с 1), тогда как добавление АВТ-737 (20 нМ) приводило к увеличению уровня VIP на 50% по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбец 7 по сравнению с 1). В присутствии АВТ-737 (80 и 20 нМ) уровень PDI повышался на 60 и 50% соответственно по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбцы 6 и 7 по сравнению с 1). МЕЛ снижал содержание VIP на 40%, а PDI — на 20% по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбец 4 по сравнению с 1). Совместное действие ЦИТ с МЕЛ снижало содержание VIP на 40% и PDI — на 10% относительно контроля (рис. 6, б; столбец 5 по сравнению с 1).

а



б

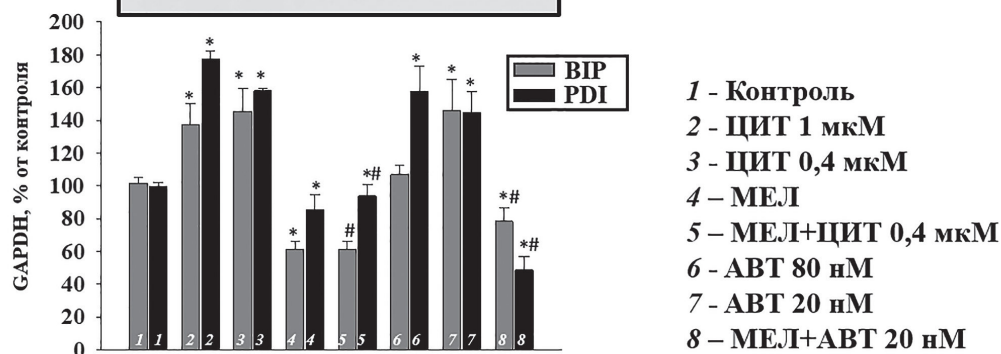


Рис. 6. Совместное влияние МЕЛ, ЦИТ и АВТ-737 на уровень маркеров ЭПР-стресса. а — Вестерн-блот PDI и VIP в клетках MV4-11; б — диаграммы, количественно отражающие изменения содержания белков, нормированных на GAPDH, в % от контроля. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из трех отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ — достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ — значимое различие по сравнению со значением, полученным после добавления только ЦИТ (столбец 3) или АВТ-737 (столбец 7)

В присутствии ЦИТ и МЕЛ уровень VIP снижался на 90%, а PDI — на 60% по сравнению с одним ЦИТ (рис. 6, б; столбец 5 по сравнению с 3). Комбинированное действие АВТ-737 с МЕЛ снижало уровень VIP на 20%, а PDI — на 50% по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбец 8 по сравнению с 1). В этих условиях уровень VIP снижался на 45%, а уровень PDI — в 3 раза по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 6, б; столбец 8 по сравнению с 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что острый лейкоз считается одним из агрессивных видов опухолей. Поэтому исследования в этой области должны быть направлены на изучение и применение новых подходов для лечения этого вида рака. МЕЛ — гормон, вырабатываемый шишковидной железой, имеет структуру индоламина, и его предшественником является триптофан [42, 43]. Показано, что МЕЛ влияет на различные виды рака, в частности на рак молочной железы, колоректальный рак, опухоли кроветворной ткани и др. [44–46]. Противоопухолевые свойства МЕЛ предполагают его использование в качестве потенциального агента в новых терапевтических стратегиях при лечении рака. МЕЛ, который оказывает защитное действие на различные физиологические реакции в нормальных клетках костного мозга, также может быть эффективен при лечении лейкемии [47, 48]. Многочисленные исследования противоопухолевой активности МЕЛ в отношении лейкемии оценили полезные свойства МЕЛ при лечении лейкемии. Известно, что МЕЛ используется в качестве адъюванта при лечении рака не только за счет усиления терапевтического эффекта, но и за счет уменьшения побочных эффектов химиотерапии или облучения [49]. Таким образом, целью нашего исследования было изучение сочетанного действия МЕЛ с препаратами разных фармакологических групп, применяемых при лечении ОМЛ на клеточной модели MV4-11.

Недавно мы показали, что совместное действие МЕЛ с АТРА, ЦИТ или АВТ-737 снижали жизнеспособность и усиливали цитотоксический эффект этих препаратов в клетках промиелоцитарной лейкемии HL-60 [27–29, 50]. В настоящем исследовании мы наблюдали аналогичный эффект МЕЛ и комбинированное действие МЕЛ с ЦИТ и АВТ-737 в клетках ОМЛ клеточной модели MV4-11. Совместное действие МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 в концентрациях ниже тех, которые используют-

ся в медицинской практике, снижало пролиферацию и митотический индекс и усиливало цитотоксический эффект ЦИТ и АВТ-737.

Известно, что изменение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны происходит после открытия неспецифической поры митохондрий (mitochondrial permeability transition pore, мРТР) и рассматривается как начальная стадия апоптоза. Открытие мРТР сопровождается падением $\Delta\Psi_m$, деполяризацией митохондриальной мембраны, выходом Ca^{2+} из матрикса, набуханием митохондрий, увеличением продукции АФК, выходом цитохрома *c* из межмембранного пространства в цитозоль [29, 46, 47]. Более того, при транзиторной церебральной ишемии в культуре нейронов полосатого тела мыши, действуя как нейропротектор при церебральной ишемии, МЕЛ проявляет антиапоптотический эффект [51], а в раковых клетках МЕЛ действует как проапоптотический агент [52]. Недавно мы показали, что МЕЛ вместе с АВТ-737 (0,2 мкМ) ускорял открытие мРТР, при этом способность митохондрий удерживать Ca^{2+} в клетках HL-60 снижалась [28]. Важным свойством МЕЛ является его проапоптотический эффект, который может иметь особое значение при лечении рака [53]. В наших исследованиях мы обнаружили, что МЕЛ и совместное действие МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 снижали $\Delta\Psi_m$ и повышали уровень цитозольного Ca^{2+} в исследуемых клетках, тем самым проявляя проапоптотические свойства МЕЛ. Увеличение цитозольного Ca^{2+} и снижение $\Delta\Psi_m$ коррелируют с изменениями продукции АФК [54]. АФК, в свою очередь, тесно связаны с различными патологическими состояниями, в том числе онкологическими. Известно, что раковые клетки обычно генерируют большое количество АФК [55, 56]. Считается, что МЕЛ действует как антиоксидант в некоторых репродуктивных органах и может напрямую удалять различные свободные радикалы [57, 58]. С другой стороны, МЕЛ также может проявлять прооксидантные свойства, что связано с цитотоксическим эффектом в раковых клетках [59]. Увеличение продукции АФК в присутствии МЕЛ и МЕЛ в сочетании с ЦИТ и АВТ-737 в исследуемых клетках можно объяснить усилением их цитотоксичности.

Известно, что СНОР способен регулировать гены, кодирующие белки, участвующие в пролиферации, дифференцировке и экспрессии белков [60]. Имеются данные о том, что за счет модуляции про- и антиапоптотических белков и участия в освобождении Ca^{2+} , СНОР участвует в апоптозе [39].

В то же время ЭПР-стресс индуцирует СНОР, опосредуя апоптоз [61]. СНОР экспрессируется в небольших количествах, но при стрессе его экспрессия увеличивается [62]. В наших недавних исследованиях мы заметили, что МЕЛ, а также МЕЛ, добавленный к клеткам совместно с АВТ-737, снижал емкость Ca^{2+} и $\Delta\Psi_m$, и это коррелировало с увеличением экспрессии СНОР в клетках промиелоцитарной лейкемии [28]. В настоящем исследовании добавление МЕЛ и МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 к клеткам ОМЛ приводило к снижению $\Delta\Psi_m$, увеличению продукции цитозольного Ca^{2+} и АФК и к увеличению содержания СНОР. Более того, недавние исследования показали, что СНОР способствует транскрипции генов аутофагии и является прямым регулятором многочисленных генов, участвующих в процессе аутофагии [63, 64]. В нашем исследовании наблюдалось увеличение содержания маркеров аутофагии, таких как LC3A/B (I, II).

Считается, что окислительный стресс является индуктором ЭПР-стресса и аутофагии [65, 66]. В свою очередь, ЭПР-стресс может запускать аутофагию — многоступенчатый процесс самодеградаций клеточных компонентов [67, 68]. ЭПР-стресс имеет особое значение, поскольку ЭПР отвечает за фолдинг и транспорт белков, синтез липидов и поддержание гомеостаза Ca^{2+} в клетке. МЕЛ способен действовать в сочетании с ЭПР-стрессом, способствуя апоптозу раковых клеток [69]. Недавно мы наблюдали, что МЕЛ увеличивает экспрессию СНОР и снижает уровень VIP в клетках промиелоцитарной лейкемии [28], что может дополнительно способствовать апоптозу при канцерогенезе. VIP и PDI необходимы для поддержания гомеостаза Ca^{2+} [26]. Во многих видах рака содержание VIP повышается, и считается, что увеличение содержания VIP может защитить раковые клетки от стресс-индуцированного апоптоза [70]. PDI способен образовывать дисульфидные связи, включая сворачивание и изомеризацию белков, и увеличивать АФК в клетках [25]. PDI активно участвует в пролиферации, выживании и метастазировании некоторых типов раковых клеток [71]. Во многих раковых клетках, синтезирующих больше белков, чем в нормальных клетках, наблюдается повышенная экспрессия PDI [71]. Снижение $\Delta\Psi_m$, увеличение содержания цитозольного Ca^{2+} и продукции АФК коррелировало со снижением содержания VIP и PDI при обработке клеток MV4-11 МЕЛ с АВТ-737 или ЦИТ. Эти результаты предполагают усиление цитотоксического действия АВТ-737 и ЦИТ под действием МЕЛ в клетках MV4-11.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день все больше исследований доказывают, что МЕЛ способен воздействовать на клеточные и молекулярные мишени в лейкозных клетках, демонстрируя широкий спектр полезных эффектов индоламина при лейкемии. Важным направлением в лечении лейкемии является использование новых подходов для предотвращения развития опухоли. В настоящем исследовании мы проверили влияние совместного действия МЕЛ с препаратами из разных фармакологических групп, в частности ЦИТ и АВТ-737, на развитие острого миелоидного лейкоза на клеточной модели MV4-11. Мы заметили, что в этих условиях происходило увеличение продукции цитозольного Ca^{2+} и АФК и снижение мембранного потенциала. В этой модели клеток лейкемии уровень СНОР и LC3A/B увеличивался, а содержание VIP и PDI снижалось. Полученные результаты позволяют предположить, что МЕЛ может быть использован в качестве средства, усиливающего цитотоксическое действие препаратов, применяемых при лечении лейкозов. Обобщая результаты недавних и текущих исследований (влияние совместного действия МЕЛ с препаратами из разных фармакологических групп на клетки промиелоцитарной лейкемии и острого миелоидного лейкоза), можно предположить наличие предпосылок для применения МЕЛ в лечении лейкемии.

Вклад авторов. О.В. Крестинина, Р.С. Фадеев — концепция и руководство работой; А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Я.В. Ломовская, М.И. Кобякова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова — проведение экспериментов; А.И. Ломовский, О.В. Крестинина — обсуждение результатов исследования; А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Р.Р. Крестинин — написание текста; О.В. Крестинина — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-315-90014) и государственного задания (№№ 075-01027-22-00 и 075-01025-23-00).

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shafabakhsh, R., Mirzaei, H., and Asemi, Z. (2020) Melatonin: a promising agent targeting leukemia, *J. Cell Biochem.*, **121**, 2730-2738, doi: 10.1002/jcb.29495.
- De Kouchkovsky, I., and Abdul-Hay, M. (2016) Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update, *Blood Cancer J.*, **6**, e441, doi: 10.1038/bcj.2016.50.
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., and Zeidan, A. M. (2019) Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges, *Blood Rev.*, **36**, 70-87, doi: 10.1016/j.blre.2019.04.005.
- Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1051-1062, doi: 10.1056/NEJM199909303411407.
- Kline, M. P., Rajkumar, S. V., Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L., Lust, J. A., Greipp, P. R., and Kumar, S. (2007) ABT-737, an inhibitor of bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells, *Leukemia*, **21**, 1549-1560, doi: 10.1038/sj.leu.2404719.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J. R., Certo, M., Love, T. M., Novina, C. D., and Letai, A. (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires bcl2 to sequester prodeath bim, explaining sensitivity to bcl2 antagonist abt-737, *J. Clin. Invest.*, **117**, 112-121, doi: 10.1172/JCI28281.
- Tagscherer, K. E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Bock, B. C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O. D., Herold-Mende, C., et al. (2008) Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of bcl-2 family proteins, *Oncogene*, **27**, 6646-6656, doi: 10.1038/onc.2008.259.
- Tahir, S. K., Yang, X., Anderson, M. G., Morgan-Lappe, S. E., Sarthy, A. V., Chen, J., Warner, R. B., Ng, S. C., Fesik, S. W., Elmore, S. W., et al. (2007) Influence of bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737, *Cancer Res.*, **67**, 1176-1183, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2203.
- Meyers, J., Yu, Y., Kaye, J. A., and Davis, K. L. (2013) Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: An analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs, *Appl. Health Econ. Health Policy*, **11**, 275-286, doi: 10.1007/s40258-013-0032-2.
- Shah, A., Andersson, T. M., Rachet, B., Bjorkholm, M., and Lambert, P. C. (2013) Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: A population-based study, *Br. J. Haematol.*, **162**, 509-516, doi: 10.1111/bjh.12425.
- Stehle, J. H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebesteny, T., and Maronde, E. (2011) A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases, *J. Pineal Res.*, **51**, 17-43, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x.
- Macchi, M. M., and Bruce, J. N. (2004) Human pineal physiology and functional significance of melatonin, *Front. Neuroendocrinol.*, **25**, 177-195, doi: 10.1016/j.yfrne.2004.08.001.
- Zhang, H. M., and Zhang, Y. (2014) Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions, *J. Pineal Res.*, **57**, 131-146, doi: 10.1111/jpi.12162.
- Galano, A., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2011) Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination, *J. Pineal Res.*, **51**, 1-16, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x.
- Pourhanifeh, M. H., Mahdavinia, M., Reiter, R. J., and Asemi, Z. (2019) Potential use of melatonin in skin cancer treatment: a review of current biological evidence, *J. Cell Physiol.*, **234**, 12142-12148, doi: 10.1002/jcp.28129.
- Anderson, G. (2020) The effects of melatonin on signaling pathways and molecules involved in glioma: Melatonin and glioblastoma: pathophysiology and treatment, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **34**, 189-191, doi: 10.1111/fcp.12538.
- Pourhanifeh, M. H., Mehrzadi, S., Kamali, M., and Hosseinzadeh, A. (2020) Melatonin and gastrointestinal cancers: Current evidence based on underlying signaling pathways, *Eur. J. Pharmacol.*, **886**, 173471, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173471.
- Sanchez-Hidalgo, M., Lee, M., de la Lastra, C. A., Guerrero, J. M., and Packham, G. (2012) Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines, *J. Pineal Res.*, **53**, 366-373, doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01006.x.
- Buyukavci, M., Ozdemir, O., Buck, S., Stout, M., Ravindranath, Y., and Savasan, S. (2006) Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: Relation with its pro-oxidant effect, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **20**, 73-79, doi: 10.1111/j.1472-8206.2005.00389.x.
- Ram, P. T., Dai, J., Yuan, L., Dong, C., Kiefer, T. L., Lai, L., and Hill, S. M. (2002) Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer, *Cancer Lett.*, **179**, 141-150, doi: 10.1016/S0304-3835(01)00873-4.
- Braakman, I., and Bulleid, N. J. (2011) Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 71-99, doi: 10.1146/annurev-biochem-062209-093836.
- Zhou, R., Ma, Y., Tao, Z., Qiu, S., Gong, Z., Tao, L., and Zhu, Y. (2020) Melatonin inhibits glucose-induced apoptosis in osteoblastic cell line through perk-eif2alpha-atf4 pathway, *Front. Pharmacol.*, **11**, 602307, doi: 10.3389/fphar.2020.602307.

23. Zha, L., Fan, L., Sun, G., Wang, H., Ma, T., Zhong, F., and Wei, W. (2012) Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *J. Pineal Res.*, **52**, 322-331, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00946.x.
24. Moreira, A. J., Ordonez, R., Cerski, C. T., Picada, J. N., Garcia-Palomo, A., Marroni, N. P., Mauriz, J. L., and Gonzalez-Gallego, J. (2015) Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis, *PLoS One*, **10**, e0144517, doi: 10.1371/journal.pone.0144517.
25. Ali Khan, H., and Mutus, B. (2014) Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles, *Front. Chem.*, **2**, 70, doi: 10.3389/fchem.2014.00070.
26. Borges, J. C., and Ramos, C. H. (2005) Protein folding assisted by chaperones, *Protein Pept. Lett.*, **12**, 257-261, doi: 10.2174/0929866053587165.
27. Krestinina, O., Fadeev, R., Lomovsky, A., Baburina, Y., Kobayakova, M., and Akatov, V. (2018) Melatonin can strengthen the effect of retinoic acid in hl-60 cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2873, doi: 10.3390/ijms19102873.
28. Lomovsky, A., Baburina, Y., Odinkova, I., Kobayakova, M., Evstratova, Y., Sotnikova, L., Krestinin, R., and Krestinina, O. (2020) Melatonin can modulate the effect of navitoclax (ABT-737) in HL-60 cells, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 1143, doi: 10.3390/antiox9111143.
29. Lomovsky, A. I., Baburina, Y. L., Kobayakova, M. I., Fadeev, R. S., Akatov, V. S., and Krestinina, O. V. (2020) Melatonin strengthens a chemotherapeutic effect of cytarabin in HL-60 cells, *Biol. Membr.*, **37**, 103-109, doi: 10.1134/S1990747819060072.
30. Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30299-30304, doi: 10.1074/jbc.M607007200.
31. Quentmeier, H., Reinhardt, J., Zaborski, M., and Drexler, H. G. (2003) Flt3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines, *Leukemia*, **17**, 120-124, doi: 10.1038/sj.leu.2402740.
32. Alkhatabi, H. A., Zohny, S. F., Shait Mohammed, M. R., Choudhry, H., Rehan, M., Ahmad, A., Ahmed, F., and Khan, M. I. (2022) Venetoclax-resistant mv4-11 leukemic cells activate pi3k/akt pathway for metabolic reprogramming and redox adaptation for survival, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 461, doi: 10.3390/antiox11030461.
33. Elmeliegy, M., Den Haese, J., Talati, C., Wetzler, M., and Jusko, W. J. (2020) Towards better combination regimens of cytarabine and flt3 inhibitors in acute myeloid leukemia, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **86**, 325-337, doi: 10.1007/s00280-020-04114-z.
34. Gonzalez, A., Alonso-Gonzalez, C., Gonzalez-Gonzalez, A., Menendez-Menendez, J., Cos, S., and Martinez-Campa, C. (2021) Melatonin as an adjuvant to antiangiogenic cancer treatments, *Cancers (Basel)*, **13**, 3263, doi: 10.3390/cancers13133263.
35. Kruger, N. J. (1994) The Bradford method for protein quantitation, *Methods Mol. Biol.*, **32**, 9-15, doi: 10.1385/0-89603-268-X:9.
36. Bonora, M., and Pinton, P. (2014) The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death, *Front. Oncol.*, **4**, 302, doi: 10.3389/fonc.2014.00302.
37. Lyamzaev, K. G., Tokarchuk, A. V., Panteleeva, A. A., Mulikidjanian, 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.
38. Turpin, J., El-Safadi, D., Lebeau, G., Frumence, E., Despres, P., Viranaicken, W., and Krejbich-Trotot, P. (2021) Chop pro-apoptotic transcriptional program in response to er stress is hacked by zika virus, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3750, doi: 10.3390/ijms22073750.
39. Fernandez, A., Ordonez, R., Reiter, R. J., Gonzalez-Gallego, J., and Mauriz, J. L. (2015) Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis, *J. Pineal Res.*, **59**, 292-307, doi: 10.1111/jpi.12264.
40. Kato, H., and Nishitoh, H. (2015) Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer, *Front. Oncol.*, **5**, 93, doi: 10.3389/fonc.2015.00093.
41. Berridge, M. J. (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle, *Cell Calcium*, **32**, 235-249, doi: 10.1016/S0143416002001823.
42. Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., Mirzaei, H., Teymoordash, S. N., and Asemi, Z. (2019) Melatonin: a new inhibitor agent for cervical cancer treatment, *J. Cell Physiol.*, **234**, 21670-21682, doi: 10.1002/jcp.28865.
43. Reiter, R. J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocr. Rev.*, **12**, 151-180, doi: 10.1210/edrv-12-2-151.
44. Schernhammer, E. S., and Hankinson, S. E. (2005) Urinary melatonin levels and breast cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.*, **97**, 1084-1087, doi: 10.1093/jnci/dji190.
45. Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D. X., Leon, J., Manchester, L., and Reiter, R. J. (2005) Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism, *Prostate*, **63**, 29-43, doi: 10.1002/pros.20155.
46. Grin, W., and Grunberger, W. (1998) A significant correlation between melatonin deficiency and endometrial cancer, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **45**, 62-65, doi: 10.1159/000009926.
47. Zhelev, Z., Ivanova, D., Bakalova, R., Aoki, I., and Higashi, T. (2017) Synergistic cytotoxicity of melatonin and new-generation anticancer drugs against leukemia lymphocytes but not normal lymphocytes, *Anticancer Res.*, **37**, 149-159, doi: 10.21873/anticancer.11300.
48. Tian, T., Li, J., Li, Y., Lu, Y. X., Tang, Y. L., Wang, H., Zheng, F., Shi, D., Long, Q., Chen, M., et al. (2019)

- Melatonin enhances sorafenib-induced cytotoxicity in flt3-itsd acute myeloid leukemia cells by redox modification, *Theranostics*, **9**, 3768-3779, doi: 10.7150/thno.34327.
49. Sanchez-Barcelo, E. J., Mediavilla, M. D., Alonso-Gonzalez, C., and Reiter, R. J. (2012) Melatonin uses in oncology: Breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **21**, 819-831, doi: 10.1517/13543784.2012.681045.
50. Baburina, Y., Lomovsky, A., and Krestinina, O. (2021) Melatonin as a potential multitherapeutic agent, *J. Pers. Med.*, **11**, 274, doi: 10.3390/jpm11040274.
51. Andrabi, S. A., Sayeed, I., Siemen, D., Wolf, G., and Horn, T. F. (2004) Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin, *FASEB J.*, **18**, 869-871, doi: 10.1096/fj.03-1031fje.
52. Rodriguez, C., Martin, V., Herrera, F., Garcia-Santos, G., Rodriguez-Blanco, J., Casado-Zapico, S., Sanchez-Sanchez, A. M., Suarez, S., Puente-Moncada, N., Anitua, M. J., et al. (2013) Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6597-6613, doi: 10.3390/ijms14046597.
53. Reiter, R. J., Tan, D. X., and Galano, A. (2014) Melatonin: exceeding expectations, *Physiology (Bethesda)*, **29**, 325-333, doi: 10.1152/physiol.00011.2014.
54. Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.*, **94**, 909-950, doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
55. Szatrowski, T. P., and Nathan, C. F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells, *Cancer Res.*, **51**, 794-798.
56. Schumacker, P. T. (2006) Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword, *Cancer Cell*, **10**, 175-176, doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.015.
57. Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., and Qin, L. (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J. Pineal Res.*, **61**, 253-278, doi: 10.1111/jpi.12360.
58. Tamura, H., Jozaki, M., Tanabe, M., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Shinagawa, M., Tamura, I., Maekawa, R., Sato, S., Taketani, T., et al. (2020) Importance of melatonin in assisted reproductive technology and ovarian aging, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1135, doi: 10.3390/ijms21031135.
59. Sanchez-Sanchez, A. M., Martin, V., Garcia-Santos, G., Rodriguez-Blanco, J., Casado-Zapico, S., Suarez-Garnacho, S., Antolin, I., and Rodriguez, C. (2011) Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells, *Free Radic. Res.*, **45**, 1333-1341, doi: 10.3109/10715762.2011.623700.
60. Ubeda, M., Wang, X. Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J. F., and Ron, D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor chop to a novel DNA control element, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1479-1489, doi: 10.1128/MCB.16.4.1479.
61. Nishitoh, H. (2012) CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response, *J. Biochem.*, **151**, 217-219, doi: 10.1093/jb/mvr143.
62. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., and Ron, D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum, *Genes Dev.*, **12**, 982-995, doi: 10.1101/gad.12.7.982.
63. B'Chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013) The eif2alpha/atf4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7683-7699, doi: 10.1093/nar/gkt563.
64. Rouschop, K. M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujic, H., Landuyt, W., Voncken, J. W., et al. (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes map1lc3b and atg5, *J. Clin. Invest.*, **120**, 127-141, doi: 10.1172/JCI40027.
65. Azad, M. B., Chen, Y., and Gibson, S. B. (2009) Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 777-790, doi: 10.1089/ars.2008.2270.
66. Gorlach, A., Klappa, P., and Kietzmann, T. (2006) The endoplasmic reticulum: Folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1391-1418, doi: 10.1089/ars.2006.8.1391.
67. Huber, T. B., Walz, G., and Kuehn, E. W. (2011) Mtor and rapamycin in the kidney: Signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression, *Kidney Int.*, **79**, 502-511, doi: 10.1038/ki.2010.457.
68. Cybulsky, A. V. (2013) The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease, *Kidney Int.*, **84**, 25-33, doi: 10.1038/ki.2012.390.
69. Chovancova, B., Hudecova, S., Lencesova, L., Babula, P., Rezuchova, I., Penesova, A., Grman, M., Moravcik, R., Zeman, M., and Krizanov, O. (2017) Melatonin-induced changes in cytosolic calcium might be responsible for apoptosis induction in tumour cells, *Cell Physiol. Biochem.*, **44**, 763-777, doi: 10.1159/000485290.
70. Kosakowska-Cholody, T., Lin, J., Srideshikan, S. M., Scheffer, L., Tarasova, N. I., and Acharya, J. K. (2014) Hkh40a downregulates grp78/bip expression in cancer cells, *Cell Death Dis.*, **5**, e1240, doi: 10.1038/cddis.2014.203.
71. Lee, E., and Lee, D. H. (2017) Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer, *BMB Rep.*, **50**, 401-410, doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.8.107.

MELATONIN CAN ENHANCE THE EFFECT OF DRUGS USED IN THE TREATMENT OF LEUKEMIA

**A. I. Lomovskiy, Yu. L. Baburina, R. S. Fadeev, Y. V. Lomovskaya,
M. I. Kobyakova, R. R. Krestinin, L. D. Sotnikova, and O. V. Krestinina***

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

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, MEL), secreted by the pineal gland, plays an important role in the regulation of the different functions in human. However, there are the facts that MEL has an antitumor effect in various types of cancer. We have studied the combined effect of MEL and targeted drugs such as cytarabine (CYT) and navitoclax (ABT-737) on the development of acute myeloid leukemia in the MV4-11 cell model. The combined action of MEL with CYT or ABT-737 contributed to a decrease in the proliferative activity of leukemia cells, a drop in the membrane potential of mitochondria, and an increase in the production of reactive oxygen species and cytosolic Ca^{2+} . We have shown that MEL, together with CYT or ABT-737, increases expression of homologous C/EBP protein and autophagy marker LC3A/B and decreases protein disulfide isomerase and immunoglobulin-binding protein levels, and consequently modulate endoplasmic stress. reticulum and initiate autophagy. The obtained data support the earlier suggestion that MEL may have potential benefits in cancer treatment and may be considered as an additive to drugs used in therapy.

Keywords: melatonin; cytarabine; navitoclax; autophagy; proliferation, ER stress

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ Pho3p И Bgl2p, НА УРОВЕНЬ ПОЛИФОСФАТОВ, АДАПТАЦИЮ К СТРЕССУ И ЗАКРЕПЛЕНИЕ ЭТИХ БЕЛКОВ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2023 Т.С. Калебина^{1*}, Е.В. Кулаковская², В.В. Рекстина¹, Л.В. Трилисенко²,
Р.Х. Зиганшин³, Н.В. Мармий⁴, Д.С. Есипов⁵, Т.В. Кулаковская²

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

² ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290 Пушкино, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁴ «НИИ Митохондриологии МГУ», 119992 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биоорганической химии, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.07.2022

После доработки 07.11.2022

Принята к публикации 20.12.2022

Неорганические полифосфаты (полиР), согласно косвенным литературным данным, участвуют в регуляторных процессах в молекулярном комплексе клеточной стенки (КС) дрожжей. Целью работы было выявление взаимосвязи между полиР, кислой фосфатазой Pho3p и мажорным белком КС, глюканозилтрансглюкозилазой Bgl2p — основным глюканре моделирующим ферментом с амилоидными свойствами. Установлено, что клетки мутантного штамма с делецией гена *PHO3* содержат больше высокополимерных щелочерастворимых полиР, а также более устойчивы к щелочи и ионам марганца по сравнению со штаммом дикого типа. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что Pho3p ответственна за гидролиз высокополимерных полиР на поверхности клеток дрожжей, а эти полиР являются одним из факторов устойчивости к стрессам. Штамм с делецией гена *BGL2* схож со штаммом *Δpho3* по содержанию высокомолекулярных щелочерастворимых полиР и устойчивости к щелочи и марганцу. Сравнительный анализ белков КС продемонстрировал корреляцию между экстрагируемостью кислой фосфатазы и Bgl2p, а также выявил изменение способа закрепления Bgl2p в КС штамма, лишённого Pho3p. Предположено, что Bgl2p и Pho3p способны образовывать метаболон или его части, который объединяет биогенез основного структурного полимера КС — глюкана и катаболизм важнейшего регуляторного полимера — полифосфатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дрожжи, клеточная стенка, полифосфаты, кислая фосфатаза, глюканозилтрансглюкозилаза, Pho3p, Bgl2p, стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523010098, EDN: PCQVXC

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная стенка (КС) дрожжей является зоной непосредственного контакта клеток дрожжей с окружающей средой и играет важную роль в адаптации этих микроорганизмов к различным источникам углерода, в развитии и старении, в реакции на стресс [1–4], в регуля-

ции морфогенеза [5] и адгезии [6]. Структурной основой КС является мегаглюкоконъюгат (мГК), покрывающий клетку дрожжей. Более чем наполовину мГК состоит из мало-разветвленных молекул высокополимерного β-1,3-глюкана и разветвленного β-1,6-глюкана, на молекулах которых закреплены функционально важные белки. За формирование

Принятые сокращения: КС — клеточная стенка; полиР — неорганические высокомолекулярные полифосфаты.

* Адресат для корреспонденции.

глюкановой сети и её постоянную перестройку в процессе роста и деления клеток ответственны белки КС, в частности — те из них, которые закреплены без формирования ковалентной связи с глюканом, среди которых можно выделить мажорный глюканре моделирующий фермент — глюканозилтрансгликозилазу Bgl2p [7–9], и кислую фосфатазу Pho3p [10, 11]. Основными молекулами, входящими в состав мГК и образующими КС дрожжей, являются полисахариды и белки, однако важным компонентом КС являются также и высокомолекулярные полиР [12–16]. Существует корреляция между накоплением фракции полиР4 и полисахаридов КС у *Saccharomyces cerevisiae* [17–20].

Функции полиР КС связаны со способностью этих отрицательно заряженных полимеров взаимодействовать с полисахаридами и белками данного клеточного компартмента. ПолиР играют важную роль в структурной организации КС [21]. ПолиР отвечают за поддержание отрицательного заряда на клеточной поверхности грибов [15, 16]. Предложена гипотетическая схема регуляции активности Bgl2p с участием полиР [11].

Суммируя, функции полиР в клеточной оболочке можно охарактеризовать как регуляторные и защитные, поскольку эти полимеры участвуют в регуляции активности ферментов, а также в поддержании отрицательного заряда на поверхности и нейтрализации токсичных для клеток веществ путём образования с ними комплексов.

Кислые фосфатазы у *S. cerevisiae* участвуют в системе гомеостаза фосфатов [22–25]. Два соседних гена *YBR092C* и *YBR093C* кодируют конститутивный фермент Pho3p и репрессируемый фермент Pho5p соответственно (<https://www.yeastgenome.org>). Оба фермента локализованы в клеточной оболочке [22, 26, 27]. Pho5p синтезируется при фосфатном голодании и обладает активностью нуклеозид-трифосфатазы и нуклеозид-трифосфатпирофосфатазы [22, 28]. Очищенная Pho5p показала одинаковую активность с *p*-нитрофенилфосфатом, АТФ, ADP, глицерофосфатом и глюкозо-6-фосфатом, в то время как к гидролизу полиР она способна не была [29]. Известно, что Pho3p гидролизует тиаминфосфаты в периплазматическом пространстве, увеличивая поглощение тиамина [26, 27]. Данные об активности Pho3p с полиР отсутствуют.

Bgl2p, один из основных глюканре моделирующих белков КС дрожжей со свойствами амилоида, устойчив к обработке детергентами и протеиназами, после выделения из КС способен образовывать фибриллы [7, 8]. Условия формирования этим белком фибрилл на кле-

точной поверхности дрожжей практически не изучены. На основании предварительных экспериментов [30] и данных, полученных при изучении влияния делеции гена кислой фосфатазы Pho3p на активность Bgl2p [11], нами было предположено, что оба фермента, входящих в состав пула белков, экстрагируемых из КС с помощью Tris [31], могут функционировать во взаимной корреляции, возможно, как метаболон или его часть, оказывая взаимное влияние на закрепление и функциональную активность. В настоящее время такие данные в литературе практически не представлены, в то же время они имеют очень большое значение для понимания регуляции биогенеза КС дрожжей. Важную роль в процессе их взаимодействия могут играть регуляторные молекулы — полифосфаты. Данная работа посвящена проверке высказанного предположения и продолжению исследований структурной и функциональной взаимосвязи двух ключевых ферментов КС дрожжей, обеспечивающих биогенез важнейших полимеров, входящих в состав этой органеллы: регуляторного — полифосфатов и структурного — глюкана.

Целью настоящего исследования явился анализ содержания полиР и адаптивных особенностей дрожжей с делецией генов *PHO3* и *BGL2*, кодирующих кислую фосфатазу и глюканозилтрансгликозилазу КС *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей и условия их выращивания. Дрожжи *S. cerevisiae* BY4742 Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0* («Invitrogen», США), далее «родительский штамм» или «WT», и его производные: «*Abgl2*» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 bgl2::URA3* и «*Δpho3*» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 pho3::LEU2*, а также соответствующие контрольные штаммы со вставкой генов аналогичных ауксотрофностей: «WT+URA3» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0::URA3* и «WT+LEU2» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0::LEU2* — были получены как описано ниже в данной работе. Указанные штаммы поддерживали на твёрдых средах YNB и YPD [32] и для получения экспериментальных результатов выращивали на жидкой среде YPD при 28 °C и аэрации 200 об./мин до поздней логарифмической стадии.

Конструкция штаммов. Штаммы *S. cerevisiae* *Abgl2*, *Δpho3*, WT+URA3 и WT+LEU2 были получены на основе штамма BY4742 в результате гомологичной рекомбинации после трансформации с помощью ацетата лития, одноцепочечной ДНК и полиэтиленгликоля [33, 34].

Последовательность нуклеотидов праймеров, использованных в данной работе

№	Последовательность нуклеотидов
1	5'-GTTTTTTTTCAATATAAGTTTATTGAGATAGACAACCTAACCA AAAAGAAAAACGGTCAAAGAGCTTTTCAATTCATCTTTTTT-3'
2	5'-TATTCCTCACCTAAACAGAAAGGAAAAAGCCATTCTTGTTTAA AGAGTATTTTTAAAGCGTCGGGTAATAACTGATATAATTAAAT-3'
3	5'-TTTTCACTTCAAGTGACAATTTGAAATACTCCTTGGACT GTGACTTTTCATGAGCTTTTCAATTCATCTTTTTTTTTT-3'
4	5'-TTTGCTGGATGGAAGTCAATTATGCCTTGATTATCATAAAAAATACTA CAGTAAAGAAAGGGCCATTCCAAATTACCTAAATTCGATGACTGGAAATT-3'
5	5'-AAAGAAGATCAGAATCGATGGGTATTTATTTATATTTGC AATATTATTTATTTATACAATTTAAGCAAGGATTTTCTTAA-3'
6	5'-ATACTACTCACTACAACGATACCCTATTTAAACAATA AATTGTATAAATAAATAAAAAATTCGATGACTGGAAATT-3'

Ауксотрофный маркер *URA3* был амплифицирован с использованием пар праймеров «1 и 2» и «2 и 3» с плазмиды pJJ244 для получения штаммов *Δbgl2* и WT+*URA3* соответственно (таблица). Ауксотрофный маркер *LEU2* был амплифицирован с использованием пар праймеров «4 и 5» и «5 и 6» с плазмиды pJJ282 для получения штаммов *Δpho3* и WT+*LEU2* соответственно (таблица). Трансформанты были отобраны на твёрдых селективных средах YNB без урацила для штаммов *Δbgl2* и WT+*URA3* и без лейцина для штаммов *Δpho3* и WT+*LEU2* соответственно [32].

Экстракция полифосфатов. Клетки дрожжей, выращенные как описано выше, собирали центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин, дважды промывали дистиллированной водой и замораживали при -20°C . Из полученной биомассы последовательной обработкой растворами кислот, солей и щелочей выделяли 4 фракции полифосфатов согласно ранее описанному методу [35]: кислоторастворимую (полиР1), солерастворимую (полиР2), две щёлочерастворимые (полиР3 и полиР4). Кислоторастворимую фракцию (полиР1) получали обработкой пробы хлорной кислотой в течение 15 мин при 0°C и постоянном перемешивании (на 1 г пробы добавляли 1 мл 1 М HClO_4 и 9 мл 0,5 М HClO_4). После экстракции суспензию центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Экстракцию повторяли дважды и полученные супернатанты объединяли. Для удаления нуклеотидов, которые содержатся в данной фракции, к супернатанту добавляли 0,1 г активированного угля Норит («Sigma-Aldrich») на 1 мл экстракта и инкубировали на холоде в течение 30 мин.

Для выделения солерастворимой фракции (полиР2) к осадку, полученному после экстрак-

ции кислоторастворимой фракции, добавляли 2 г NaClO_4 и 0,5 мл 1 М HClO_4 (из расчёта на 1 г пробы) и инкубировали на холоде при перемешивании в течение 15 мин, затем добавляли 10 мл холодной дистиллированной воды и снова выдерживали на холоде в течение 15 мин при перемешивании. Полученную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g. Экстракцию повторяли дважды и полученные супернатанты объединяли.

Затем получали фракцию полиР3 (растворимую в слабой щёлочи) экстракцией раствором NaOH , имеющим pH 9–10, при 0°C дважды по 15 мин при перемешивании. Полученную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g. Экстракцию повторяли дважды и полученные супернатанты объединяли.

Щёлочерастворимую фракцию (полиР4) экстрагировали 0,05 М NaOH при 0°C 2 раза по 15 мин, центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g и полученные супернатанты объединяли.

Количество полиР в полученных экстрактах определяли по содержанию образовавшегося при гидролизе ортофосфата (P_i), как описано ранее [29].

Получаемые фракции различаются по среднему количеству фосфатных остатков: полиР1 – 15, полиР2 – 25, полиР3 – 60–70, полиР4 – свыше 100 фосфатных остатков [36].

Анализ чувствительности дрожжей к стрессовым факторам. Влияние $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и KOH на рост дрожжей определяли путём посева образцов клеток (стандартизированных по плотности культуры) в стерильный 96-луночный иммунопланшет с крышкой, ячейки которого содержали среду YPD и аликвоты стерильных растворов $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или KOH .

Через 24 ч культивирования плотность культур измеряли на планшетном фотометре (МЗ «Сапфир», Россия) при длине волны 595 нм. Влияние марганца на рост определяли после 96 ч культивирования штаммов в жидкой среде YPD с добавлением 1,75 мМ MnSO_4 путём подсчёта клеток в камере Горяева.

Выделение и частичная депротеинизация КС. Клетки дрожжей, выращенные до поздней логарифмической фазы, разрушали и полученные КС депротеинизировали с использованием 1% SDS (*m/V*), как описано ранее [31]. Оптическую плотность КС в суспензии определяли с помощью спектрофотометра Cary Eclipse («Varian Inc.», США) при длине волны 540 нм.

Получение белковых экстрактов из КС. Экстракты из КС в 0,1 М Tris («Amresco», США), pH 9,8, и в 6 М гуанидингидрохлориде («Appli-Chem», Германия), pH 5,6, получали, как описано ранее [31] с модификациями.

Электрофорез белков и вестерн-блот анализ. Экстракты из КС анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в ПААГ [37]. Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Protran (0,45 мкм, «Sigma-Aldrich», США). Bgl2p выявляли с использованием антител [31] с помощью системы ECL («Thermo Fisher Scientific», США) [38].

Подготовка проб для LC-MS/MS-анализа. К экстрактам из КС добавляли 0,1 М Tris-HCl, pH 8,5, с 1%-ным дезоксихолатом (*m/V*) и 10 мМ дитиотреитолом до конечной концентрации. Затем кипятили в течение 10 мин и остужали при комнатной температуре. Экстракты хранили при 4 °С. Дальнейшая подготовка проб, жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ были проведены, как описано ранее [39].

Метод определения 8-оксо-гуанозина. Клетки дрожжей, выращенные до поздней логарифмической фазы, собирали центрифугированием в течение 5 мин при 1650 g, дважды промывали буфером TE (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0), после чего проводили выделение нуклеиновых кислот, как описано ранее [40], с некоторыми модификациями. Полученные осадки нуклеиновых кислот перерастворяли в 200 мкл дистиллированной воды, добавляли 20 мкл 10-кратного 300 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4,6, с 2,8 М NaCl и 10 мМ ZnSO_4 и инкубировали с нуклеазой S1 («Sigma-Aldrich», 2 ед. акт.) в течение 2 ч при 37 °С для гидролиза РНК. К инкубационной смеси добавляли 50 мкл 5-кратного буфера: 200 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl, 40 мМ MgCl_2 , pH 9,5, и щелочную фосфатазу («Thermo Fisher Scientific»,

2 ед. акт.), инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Полученные гидролизаты РНК прогревали в течение 2 мин при 90 °С с последующим отделением супернатанта для хроматографического анализа путём центрифугирования при 12 000 g.

ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Полученные образцы анализировали с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ (колонка Phenomenex Luna C18(2), 250*4,6 мм) с использованием спектрофотометрической (260 нм) и амперометрической (0,4 В) детекции. Раствор А: 0,1 М ацетат аммония. Раствор Б: ацетонитрил. Изократическое элюирование. 4%-ный раствор ацетонитрила (*v/v*) в 0,1 М ацетате аммония. Скорость потока 1 мл/мин.

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К началу нашей работы в литературе отсутствовали убедительные данные, свидетельствующие в пользу того, что, с одной стороны, кислая фосфатаза Pho3p способна гидролизовать высокополимерные полифосфаты, а с другой стороны, что эти полимеры локализованы на поверхности клетки дрожжей, т.е. именно там, где, по многочисленным данным, локализован этот фермент. Для верификации этих положений нами был получен штамм с делетированным геном *PHO3* и проведён сравнительный анализ содержания различных фракций полифосфатов в данном и в родительском штаммах дрожжей (рис. 1), который показал, что содержание фосфата (Pi) и трёх фракций полиР, различающихся длиной цепи (полиР1–3), в клетках обоих штаммов практически не изменилось, в то время как содержание высокополимерных щёлочерастворимых полиР4 увеличилось у штамма, лишённого кислой фосфатазы, почти в два раза. Исследователи давно указывали на то, что полиР4 с высокой степенью вероятности могут быть отнесены к полимерам, локализованным в КС [41]. Возрастание содержания этой фракции полифосфатов в штамме с отсутствием фермента, осуществляющего их гидролиз, убедительно свидетельствует в пользу правильности предположения И.С. Кулаева о локализации полиР4 в КС.

Отметим, что фракция полиР4 характеризуется несколькими особенностями по сравнению с другими фракциями полиР: это высокомолекулярные полиР со средней длиной цепи

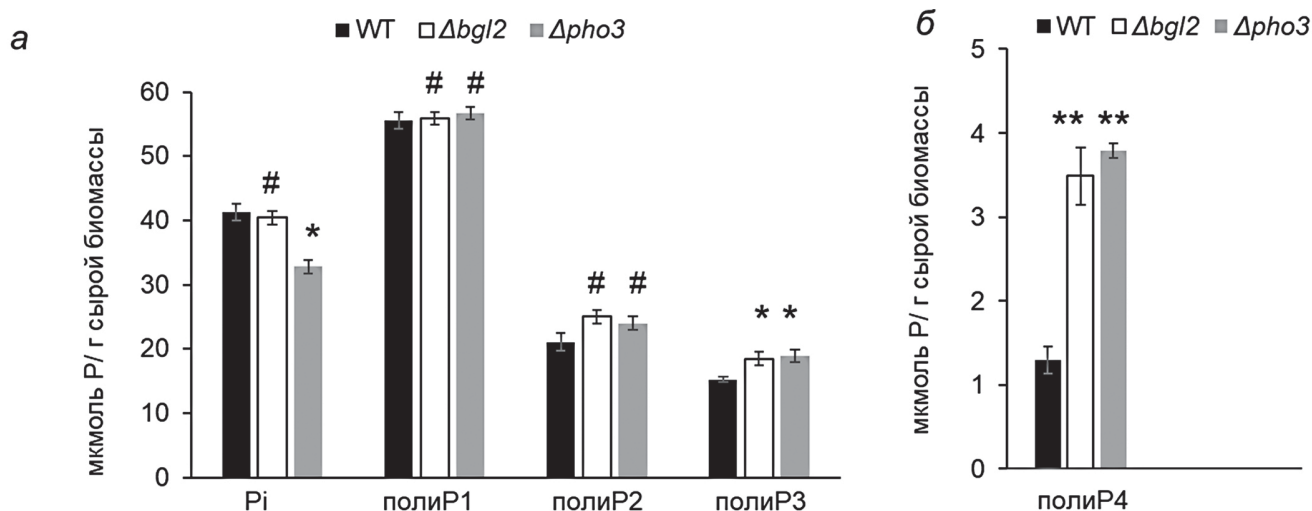


Рис. 1. Содержание различных фракций неорганических полифосфатов в клетках дрожжей *S. cerevisiae* родительского штамма WT и штаммов $\Delta bgl2$ и $\Delta pho3$. *а* – Содержание Pi, полифосфатов фракций полиP1, полиP2 и полиP3 (см. материалы и методы). *б* – Содержание фракции полиP4, согласно литературным данным, ассоциированной с КС. Представлены средние значения из трёх опытов. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, # разница статистически незначима

около 100 фосфатных остатков, эти полиР не проявляют, в отличие от других фракций, эффекта гиперкомпенсации, т.е. многократного возрастания после фосфорного голодания, эта фракция также в наименьшей степени тратится при фосфорном голодании по сравнению с другими фракциями [36]. Гипотеза о том, что полиР4 локализованы в КС, связана с тем, что есть корреляция между накоплением фракции полиР4 и полисахаридов КС у *S. cerevisiae* [17–20], а также между уровнем этой фракции и отрицательным зарядом на клеточной поверхности дрожжей [15, 16]. К сожалению, современные методы получения чистых препаратов КС дрожжей приводят к разрушению и вымыванию из препаратов содержащихся в стенке полифосфатов. Поэтому пока не удалось напрямую определить содержание и длину цепи полиР в препаратах КС. Наличие полиР в стенках хорошо фиксируется у многих видов дрожжей посредством специальной окраски DAPI, который, в отличие от ДНК, даёт с полиР оранжевую или зелёную окраску [21, 42, 43].

Итак, как и ожидалось, отсутствие Pho3p привело к увеличению содержания фракции полиР4, что свидетельствует в пользу участия этого фермента в контроле содержания полиР в КС.

Интересно отметить, что увеличение количества полифосфатов полиР4 наблюдается не только в случае штамма с делецией гена кислой фосфатазы, но и у штамма с делецией гена глюканозилтрансглюкозилазы Bgl2 (рис. 1) при сохранении уровня анализируемых соединений в контрольных штаммах WT, WT+URA3 и WT+LEU2, что свидетельствует о возможном

взаимодействии и взаимовлиянии этих ферментов друг на друга, иными словами, позволяет предположить, что они образуют метаболон или его часть. Данные экспериментов по определению содержания этих ферментов в КС дрожжей отчасти подтверждают сказанное.

Как уже указывалось ранее, Bgl2p и Pho3p являются белками КС дрожжей. В наших экспериментах оба белка были достоверно определены в изолированных КС родительского штамма дрожжей методом LC-MS/MS-анализа во фракции белков, не закреплённых ковалентно на полисахаридах КС, экстрагируемых 0,1 М Tris в щелочных условиях. В штамме с делецией гена, кодирующего Bgl2p, этот белок отсутствует, равно как и Pho3p отсутствует в штамме с делетированным геном *PHO3*.

Следует отметить, что число пептидов, определяемых в экстрагируемых белках LC-MS/MS-анализом, в различных экспериментах несколько отличается, даже если при экстракции использованы одинаковые количества КС. При этом анализ числа пептидов экстрагируемых ферментов Bgl2p и Pho3p из КС родительского штамма, проведённый в серии экспериментов, свидетельствует о наличии пропорциональной зависимости экстрагируемости кислой фосфатазы от количества экстрагируемого Bgl2p (рис. 2). Другие белки, например, глюканремоделирующие ферменты КС, не демонстрируют такой закономерности (данные не приведены).

Следует отметить, что нами обнаружена и обратная ситуация: мы наблюдали влияние отсутствия кислой фосфатазы и, как следствие, увеличения количества полифосфатов в КС этих

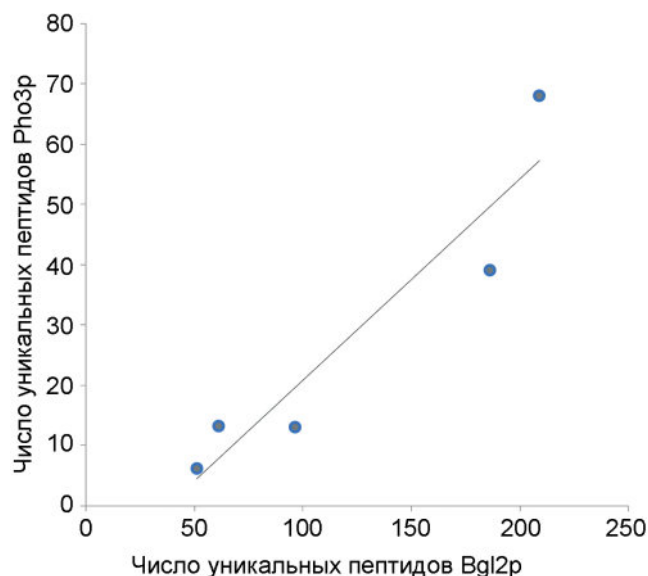


Рис. 2. Корреляционная зависимость числа определяемых в 5 независимых экспериментах пептидов Bgl2p и Pho3p в экстракте в 0,1 М Tris из КС дрожжей *S. cerevisiae* родительского штамма с помощью LC-MS/MS-анализа. Линия на графике отражает корреляцию, коэффициент корреляции – 0,94, $p < 0,01$

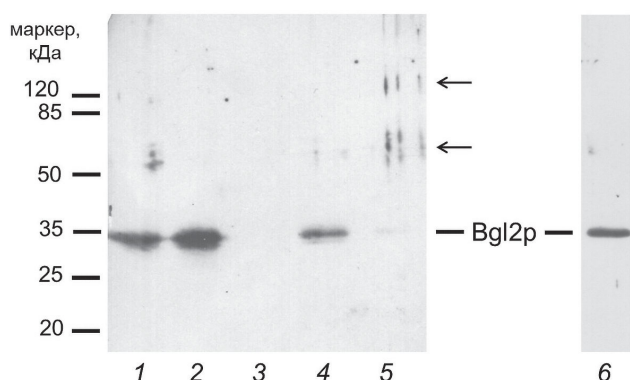


Рис. 3. Вестерн-блот анализ экстрактов из КС дрожжей *S. cerevisiae*: в буфер Лэммли – родительский штамм (дорожка 1), *Δpho3* (дорожка 2); в 6 М гуанидингидрохлорид, 2 ч экстракции – *Δpho3* (дорожка 3), родительского штамма (дорожка 4) и 4 ч экстракции – *Δpho3* (дорожка 5), родительский штамм (дорожка 6). Стрелками указаны олигомеры Bgl2p. Окрашивание антителами к Bgl2p

дрожжей на закрепление Bgl2p. Из рис. 3 видно, что фракция гуанидингидрохлорид-экстрагируемого из КС пула мономера Bgl2p практически полностью отсутствует в КС *Δpho3* при использовании условий экстракции, применяемых нами в экспериментах, позволивших выявить данный пул ранее [31], но появляются димерные и, возможно, тетрамерные формы молекул этого белка, экстракция которых наблюдается при увеличении длительности обработки КС таким же экстрагентом – нейтральным 6 М гуанидингидрохлоридом. Обнаруженный факт хорошо

согласуется с выявленными нами ранее амилоидными свойствами белка Bgl2p.

Поскольку полиР являются важным фактором устойчивости клеток дрожжей к различным видам стресса, в первую очередь к щелочному стрессу и стрессу, вызванному токсической концентрацией тяжёлых металлов [42, 44], мы сравнили устойчивость клеток всех трёх штаммов к кадмию, щёлочи и марганцу. Оказалось, что оба мутанта более устойчивы к щёлочи и марганцу, чем родительский штамм, хотя разницы в устойчивости к кадмию не отмечено (рис. 4). Итак, штамм *Δbgl2* похож на штамм *Δpho3* не только по уровню полиР4, но и по увеличению устойчивости к стрессовым воздействиям, для которой полиР КС являются важным фактором.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что делеции генов, кодирующих белки Bgl2p и Pho3p, снижают чувствительность дрожжей к некоторым стрессовым воздействиям. По-видимому, увеличенное количество полиР в случаях воздействия ионов тяжёлых металлов позволяет клеткам сорбировать некоторое количество этих ионов на клеточной поверхности, а в случае воздействия щёлочи полиР-стенки могут экранировать клетки от отрицательно заряженных гидроксил-ионов. Поскольку полиР в КС участвуют в нескольких клеточных функциях, возникает вопрос о регуляции уровня полиР в этом компартменте. Мембрана эндоплазматического ретикулюма формирует транспортные везикулы, несущие в КС белки и предшественники полисахаридов, в этой мембране присутствует VTC-комплекс, синтезирующий полиР [45]. Это позволяет предполагать, что такие транспортные везикулы могут доставлять в КС также полиР.

Следует отметить, что, несмотря на схожесть ответа дрожжей на изучаемые делеции генов *BGL2* и *PHO3* (увеличение в их КС количества полифосфатов), мы предполагали, что указанное сходство тем не менее является следствием различных процессов, идущих в метаболических путях штаммов с изучаемыми делециями, в том числе – наличия или отсутствия окислительного стресса, вызванного у дрожжей повышением содержания полифосфатов в КС.

Свидетельством верности нашего предположения могло бы явиться различное содержание 8-оксогуанозина – продукта окислительного повреждения гуанинового основания в препаратах РНК, полученных из родительского штамма и мутантных штаммов с делециями. Исследователи сравнительно давно и устойчиво используют данное соединение как маркер,

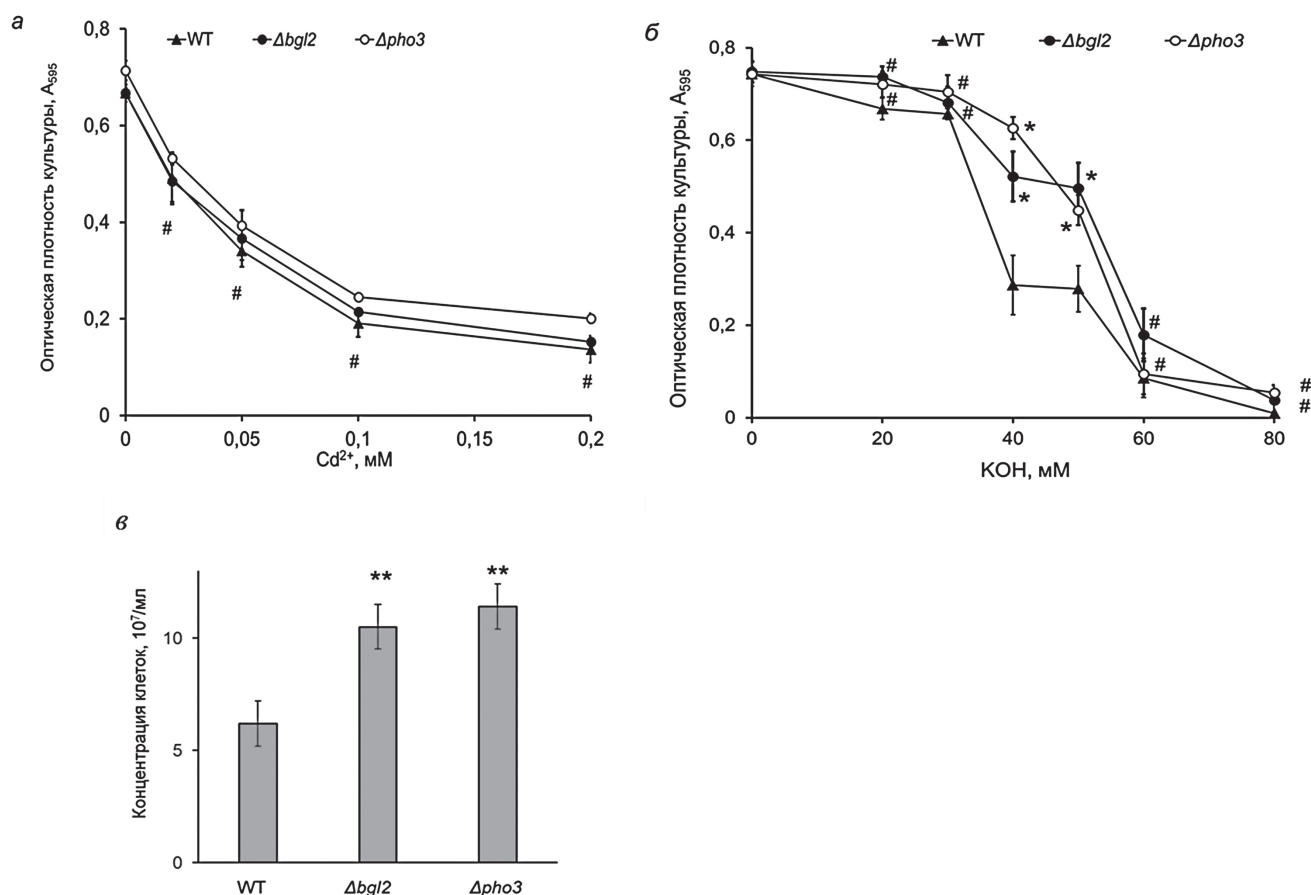


Рис. 4. Сравнение чувствительности штаммов дрожжей *S. cerevisiae* родительского штамма WT и штаммов $\Delta bgl2$ и $\Delta pho3$ к стрессовым условиям: в присутствии различных концентраций Cd^{2+} (а), KOH (б) и Mn^{2+} в концентрации 1,75 мМ (в). Представлены средние значения из 4 опытов. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, # — разница статистически незначима

определяющий уровень развития окислительного стресса у различных организмов, в том числе у высших эукариот и человека [46–48]. Работы такого направления на клетках дрожжей практически неизвестны, однако есть основания предполагать, что и у низших эукариот указанная закономерность присутствует.

Появление 8-оксогуанина в составе РНК может привести к дефектам синтеза белка, например, снижению скорости синтеза белка и продукции агрегированных или укороченных пептидов [49, 50], что у высших эукариот имеет важные последствия при старении, нейродегенеративных заболеваниях [51] и атеросклерозе [52].

Учитывая сказанное, нам представлялось необходимым определить содержание 8-оксогуанина в составе РНК изучаемых штаммов, чтобы выявить реакцию дрожжей на повышенное содержание полифосфатов в их КС.

Согласно нашим результатам, уровень 8-оксогуанозина по отношению к неокисленному гуанозину (нмоль/нмоль $\cdot 10^6$) в РНК в штамме $\Delta pho3$ не отличается от родительского штам-

ма и штамма $\Delta bgl2$ и составляет $238,5 \pm 70,26$, $178,11 \pm 70,4$ и $194,69 \pm 46,54$ соответственно.

8-оксогуанин образуется при воздействии активных форм кислорода (гидроксил-радикала [53], супероксид-анион радикала [54] и т.п.) и органических перекисей (окисленных липидов) [55] на гуанин в составе РНК. Активные формы кислорода появляются в клетке в качестве побочных продуктов электрон-транспортных цепей митохондрий и работы пероксидаз, в результате реакций перекиси водорода с катионами тяжёлых металлов [56], а также под действием некоторых факторов внешней среды, таких как ионизирующее излучение. В свою очередь, работа специфических ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и т.п.), а также низкомолекулярных антиоксидантов снижает содержание активных форм кислорода в клетке [57].

Наши результаты можно расценивать как свидетельство об отсутствии окислительного стресса у дрожжей, у которых содержание полифосфатов в КС значительно превышает норму, или же о высокоэффективной работе

указанных выше ферментных систем и/или антиоксидантов. В дальнейшем мы продолжим исследование роли 8-оксогуанозина в ответе клеток дрожжей на стресс различного происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные продемонстрировали влияние изучаемых делеций на уровень высокомолекулярных щёлочерастворимых полифосфатов (полиР4) в клетках дрожжей. Мы полагаем, что наблюдаемое нами увеличение содержания полиР4 у штамма с делецией *PHO3* служит важным свидетельством в пользу гипотезы о локализации этих полиР именно в клеточной оболочке, которая является зоной локализации белков Pho3p и Bgl2p. В свою очередь, уровень полифосфатов может влиять на устойчивость дрожжей к различного рода воздействиям на их клетки соединений, вызывающих стресс.

Ранее было показано, что делеция гена кислой фосфатазы приводит к изменению прочности КС [58]. Авторы данного исследования предположили, что Pho3p является структурным белком. Однако небольшое содержание Pho3p в КС, показанное в настоящем исследовании, позволяет говорить, скорее, о регуляторной, нежели структурной роли кислой фосфатазы. В настоящем исследовании показано, что кислая фосфатаза Pho3p с очевидностью может влиять на содержание полифосфатов, гидролизую их молекулы с большей или меньшей интенсивностью. Кроме того, ранее было продемонстрировано, что полифосфаты значительно увеличивают ферментативную активность Bgl2p *in vitro* [11, 59].

Глюканозилтрансгликозилаза Bgl2p, являясь мажорным белком КС и обладая амилоидными свойствами [7, 8], может служить «посадочной площадкой» для кислой фосфатазы и, таким образом, участвовать в её закреплении и функционировании в КС. Ранее нами были

получены данные, свидетельствующие о возможном наличии таких белковых посадочных площадок в КС дрожжей [60]. Также в литературе есть данные о закреплении в КС с участием Bgl2p фермента трегалазы [61]. В свою очередь, в отсутствие кислой фосфатазы наблюдается изменение способа закрепления Bgl2p в КС. Полученные результаты в совокупности позволяют с высокой степенью вероятности предполагать, что в КС дрожжей Bgl2p и Pho3p способны образовывать метаболон или его часть, который объединяет биогенез основного структурного полимера КС — глюкана и важнейшего регуляторного полимера — полифосфатов, поскольку незначительное количество фермента кислой фосфатазы посредством накопления в КС её субстрата (полифосфатов) влияет на активность Bgl2p и, таким образом, на свойства КС.

Наличие такой взаимосвязи было предположено И.С. Кулаевым с соавт. [17–20], в нашей работе данное предположение получило развитие.

Вклад авторов. Т.С. Калебина и Т.В. Кулаковская — концепция и руководство работой; Е.В. Кулаковская, В.В. Рекстина, Л.В. Трилисенко, Р.Х. Зиганшин, Н.В. Мармий — проведение экспериментов; Т.С. Калебина, Е.В. Кулаковская, В.В. Рекстина, Д.С. Есипов, Р.Х. Зиганшин, Л.В. Трилисенко, Н.В. Мармий, Т.В. Кулаковская — обсуждение результатов исследования; Т.С. Калебина — написание текста; Т.С. Калебина, В.В. Рекстина, Д.С. Есипов, Т.В. Кулаковская — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-01144 А. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300088-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было исследований с использованием в качестве объектов людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., and Arroyo, J. (2017) The CWI Pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast, *J. Fungi (Basel)*, **4**, 1, doi: 10.3390/jof4010001.
2. Huang, C., Zhao, F., Lin, Y., Zheng, S., Liang, S., and Han, S. (2018) RNA-Seq analysis of global transcriptomic changes suggests a roles for the MAPK pathway and carbon metabolism in cell wall maintenance in a *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **500**, 603–608, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.113.
3. Liu, L., and Levin, D. E. (2018) Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1, *Mol. Biol. Cell*, **29**, 2898–2909, doi: 10.1091/mbc.E18-07-0441.
4. Molon, M., Woznicka, O., and Zebrowski, J. (2018) Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast,

- Biogerontology*, **19**, 67-79, doi: 10.1007/s10522-017-9740-6.
5. Davì, V., Chevalier, L., Guo, H., Tanimoto, H., Barrett, K., Couturier, E., Boudaoud, A., and Minc, N. (2019) Systematic mapping of cell wall mechanics in the regulation of cell morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 13833-13838, doi: 10.1073/pnas.1820455116.
6. Willaert, R. G. (2018) Adhesins of yeasts: protein structure and interactions, *J. Fungi (Basel)*, **4**, 119, doi: 10.3390/jof4040119.
7. Kalebina, T. S., Plotnikova, T. A., Gorkovskii, A. A., Selyakh, I. O., Galzitskaya, O. V., Bezsonov, E. E., Gellissen, G., and Kulaev, I. S. (2008) Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences, *Prion*, **2**, 91-96, doi: 10.4161/pri.2.2.6645.
8. Bezsonov, E. E., Groenning, M., Galzitskaya, O. V., Gorkovskii, A. A., Semisotnov, G. V., Selyakh, I. O., Ziganshin, R. H., Rekstina, V. V., Kudryashova, I. B., Kuznetsov, S. A., Kulaev, I. S., and Kalebina, T. S. (2013) Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation, *Prion*, **7**, 175-184, doi: 10.4161/pri.22992.
9. Mouyna, I., Hartl, L., and Latgé, J. P. (2013) β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*, *Front. Microbiol.*, **4**, 81, doi: 10.3389/fmicb.2013.00081.
10. Блинникова Е. И., Мирющенко Ф. Л., Шабалин Ю. А., Егоров С. Н. (2002) Везикулярный транспорт внеклеточных кислых фосфатаз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Биохимия*, **67**, 580-586.
11. Калебина Т. С., Егоров С. Н., Арбатский Н. П., Безсонов Е. Е., Горковский А. А., Кулаев И. С. (2008) О роли высокомолекулярных полифосфатов в активации глюкантрансферазы Bgl2p из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Докл. Акад. Наук*, **420**, 695-699.
12. Weimberg, R., and Orton, W. L. (1964) Evidence for an exocellular site for the acid phosphatase of *Saccharomyces mellis*, *J. Bacteriol.*, **88**, 1743-1754, doi: 10.1128/jb.88.6.1743-1754.1964.
13. Кулаев И. С., Крашенинников И. А., Кокурина И. А. (1966) О локализации неорганических полифосфатов и нуклеотидов у *Neurospora crassa*, *Биохимия*, **31**, 850-858.
14. Tijssen, J. P. F., Beekes, H. W., and Van Steveninck, J. (1982) Localization of polyphosphate in *Saccharomyces fragilis*, as revealed by 4'6-diamidino-2-phenylindole fluorescence, *Biochem. Biophys. Acta*, **721**, 394-398, doi: 10.1016/0167-4889(82)90094-5.
15. Вагабов В. М., Чемоданова О. В., Кулаев И. С. (1990) Влияние неорганических полифосфатов на величину отрицательного заряда клеточной оболочки дрожжей, *Докл. АН СССР*, **313**, 989-992.
16. Ivanov, A. J., Vagabov, V. M., Fomchenkov, V. M., and Kulaev, I. S. (1996) Study of the influence of polyphosphates of cell envelope on the sensitivity of yeast *Saccharomyces carlsbergensis* to the cytyl-3-methylammonium bromide, *Microbiologia*, **65**, 611-616.
17. Кулаев И. С., Вагабов В. М., Циоменко А. Б. (1972) О корреляции накопления полисахаридов клеточной стенки и некоторых фракций высокомолекулярных полифосфатов у дрожжей, *Докл. АН СССР*, **204**, 734-736.
18. Циоменко А. Б., Аугустин И., Вагабов В. М., Кулаев И. С. (1974) О взаимосвязи обмена неорганических полифосфатов и маннана у дрожжей, *Докл. АН СССР*, **215**, 478-480.
19. Шабалин Ю. А., Вагабов В. М., Кулаев И. С. (1979) О механизме сопряжения биосинтеза высокомолекулярных полифосфатов и маннана у дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, *Докл. АН СССР*, **249**, 243-246.
20. Шабалин Ю. А., Вагабов В. М., Кулаев И. С. (1985) Долихилдифосфатманноза: интермедиат биосинтеза гликопротеинов у дрожжей? *Докл. АН СССР*, **283**, 720-723.
21. Zvonarev, A. N., Crowley, D. E., Ryazanova, L. P., Lichko, L. P., Rusakova, T. G., Kulakovskaya, T. V., and Dmitriev, V. V. (2017) Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates, *FEMS Yeast Res.*, **17**, fox026, doi: 10.1093/femsyr/fox026.
22. Oshima, Y. (1997) The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gen. Genet. Syst.*, **72**, 323-334, doi: 10.1266/ggs.72.323.
23. Secco, D., Wang, C., Shou, H., and Whelan, J. (2012) Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins, *FEBS Lett.*, **586**, 289-295, doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.036.
24. Yadav, K. K., Singh, N., and Rajasekharan, R. (2016) Responses to phosphate deprivation in yeast cells, *Curr. Genet.*, **62**, 301-307, doi: 10.1007/s00294-015-0544-4.
25. Eskes, E., Deprez, M. A., Wilms, T., and Winderickx, J. (2018) pH homeostasis in yeast; the phosphate perspective, *Curr. Genet.*, **64**, 155-161, doi: 10.1007/s00294-017-0743-2.
26. Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H., and Iwashima, A. (1989) A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by *PHO3* in yeast, *FEMS Microbiol. Lett.*, **51**, 55-59, doi: 10.1016/0378-1097(89)90077-3.
27. Nosaka, K. (1990) High affinity of acid phosphatase encoded by *PHO3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* for thiamin phosphates, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1037**, 147-154, doi: 10.1016/0167-4838(90)90160-h.
28. Kennedy, E. J., Pillus, L., and Ghosh, G. (2005) Pho5p and newly identified nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases regulate extracellular nucleotide phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell*, **4**, 1892-1901, doi: 10.1128/EC.4.11.1892-1901.2005.

29. Andreeva, N., Ledova, L., Ryasanova, L., Kulakovskaya, T., and Eldarov, M. (2019) The acid phosphatase Pho5 of *Saccharomyces cerevisiae* is not involved in polyphosphate breakdown, *Folia Microbiol. (Praha)*, **64**, 867-873, doi: 10.1007/s12223-019-00702-6.
30. Рекстина В. В., Безсонов Е. Е. (2012) Влияние неорганических полифосфатов на конформацию пептида АК187-196 глюкантрасферазы Bgl2p – амилоида клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae*. «Ломоносов-2012»: МАКС Пресс, Москва, с. 191.
31. Rekstina, V. V., Sabirzyanova, T. A., Sabirzyanov, F. A., Adzhubei, A. A., Tkachev, Y. V., Kudryashova, I. B., Snalina, N. E., Bykova, A. A., Alessenko, A. V., Ziganshin, R. H., Kuznetsov, S. A., and Kalebina, T. S. (2020) The post-translational modifications, localization, and mode of attachment of non-covalently bound glucanotransglycosylases of yeast cell wall as a key to understanding their functioning, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8304, doi: 10.3390/ijms21218304.
32. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast, *Methods Enzymol.*, **350**, 3-41, doi: 10.1016/s0076-687950954-x.
33. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure, *Yeast*, **11**, 355-360, doi: 10.1002/yea.320110408.
34. Gietz, R. D., and Schiestl, R. H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, *Nat. Protoc.*, **2**, 31-34, doi: 10.1038/nprot.2007.13.
35. Вагабов В. М., Трилисено Л. В., Кулаев И. С. (2000) Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей, *Биохимия*, **65**, 414-420.
36. Vagabov, V. M., Trilisenko, L. V., Kulakovskaya, T. V., and Kulaev, I. S. (2008) Effect of a carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **8**, 877-882, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00420.x.
37. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
38. Mruk, D. D., and Cheng, C. Y. (2011) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting, *Spermatogenesis*, **1**, 121-122, doi: 10.4161/spmg.1.2.16606.
39. Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods*, **3**, 319-324, doi: 10.1038/nmeth.2834.
40. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York.
41. Kulaev, I. S. (1979) *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, 1st Edn, Wiley.
42. Andreeva, N., Ryasanova, L., Dmitriev, V., Kulakovskaya, T., and Kulaev, I. (2013) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to toxic manganese concentration triggers changes in inorganic polyphosphates, *FEMS Yeast Res.*, **13**, 463-470, doi: 10.1111/1567-1364.12049.
43. Andreeva, N., Ryasanova, L., Dmitriev, V., Kulakovskaya, T., and Kulaev, I. (2014) Cytoplasmic inorganic polyphosphate participates in the heavy metal tolerance of *Cryptococcus humicola*, *Folia Microbiol. (Praha)*, **59**, 381-389, doi: 10.1007/s12223-014-0310-x.
44. Trilisenko, L. V., Kulakovskaya, E. V., and Kulakovskaya, T. V. (2017) The cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* depends on inorganic polyphosphate, *J. Basic Microbiol.*, **57**, 982-986, doi: 10.1002/jobm.201700257.
45. Gerasimaitė, R., and Mayer, A. (2016) Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles, *Biochem. Soc. Trans.*, **44**, 234-239, doi: 10.1042/BST20150213.
46. Mundt, J. M., Hah, S. S., Sumbad, R. A., Schramm, V., and Henderson, P. T. (2008) Incorporation of extracellular 8-oxodG into DNA and RNA requires purine nucleoside phosphorylase in MCF-7 cells, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 228-236, doi: 10.1093/nar/gkm1032.
47. Doi, K., and Uetsuka, K. (2011) Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 5213-5237, doi: 10.3390/ijms12085213.
48. Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., and Reshi, M. S. (2022) Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives, *Cells*, **11**, 552, doi: 10.3390/cells11030552.
49. Shan, X., Chang, Y., and Lin, C. G. (2007) Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression, *FASEB J.*, **21**, 2753-2764, doi: 10.1096/fj.07-8200com.
50. Tanaka, M., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (2007) Oxidized messenger RNA induces translation errors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 66-71, doi: 10.1073/pnas.0609737104.
51. Nunomura, A., Honda, K., Takeda, A., Hirai, K., Zhu, X., Smith, M. A., and Perry, G. (2006) Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2006**, 82323, doi: 10.1155/JBB/2006/82323.
52. Martinet, W., de Meyer, G. R. Y., Herman, A. G., and Kockx, M. M. (2004) Reactive oxygen species induce RNA damage in human atherosclerosis, *Eur. J. Clin. Invest.*, **34**, 323-327, doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01343.x.
53. Liu, M., Gong, X., Alluri, R. K., Wu, J., Sablo, T., and Li, Z. (2012) Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli*, *Biol. Chem.*, **393**, 123-132, doi: 10.1515/hsz-2011-0247.
54. Nakatsu, Y., and Sekiguchi, M. (2006) *Oxidative Damage to Nucleotide: Consequences and Preventive Mechanisms*, in *Oxidative Stress, Disease and Cancer*

- (Singh, K. K., ed.) Imperial College Press, London, pp. 221-252.
55. Kanazawa, K., Sakamoto, M., Kanazawa, K., Ishigaki, Y., Aihara, Y., Hashimoto, T., and Mizuno, M. (2016) Lipid peroxides as endogenous oxidants forming 8-oxo-guanosine and lipid soluble antioxidants as suppressing agents, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **59**, 16-24, doi: 10.3164/jcbn.15-122.
 56. Estevez, M., Valesyan, S., Jora, M., Limbach, P. A., and Addepalli, B. (2021) Oxidative damage to RNA is altered by the presence of interacting proteins or modified nucleosides, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 697149, doi: 10.3389/fmolb.2021.697149.
 57. Jones, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **295**, C849-868, doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008.
 58. Егоров С. Н., Семенова И. Н., Максимов В. Н. (2000) Взаимное влияние инвертазы и кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на их секрецию в среду культивирования, *Микробиология (Москва)*, **69**, 34-37.
 59. Горковский А.А. (2009) *Выявление и частичная характеристика белков клеточной стенки дрожжей Saccharomyces cerevisiae, обладающих свойствами амилоидов*. Дис. канд. биол. наук. ИБФМ, Пушкино.
 60. Kalebina, T. S., Laurinavichiute, D. K., Packeiser, A. N., Morenkov, O. S., Ter-Avanesyan, M. D., and Kulaev, I. S. (2002) Correct GPI-anchor synthesis is required for the incorporation of endoglucanase/glucanoyltransferase Bgl2p into the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 81-85, doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11163.x.
 61. Basu, A., Chaudhuri, P., Malakar, D., and Ghosh, A. K. (2007) Co-purification of glucanase with acid trehalase-invertase aggregate in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 299-304, doi: 10.1007/s10529-007-9535-y.

THE EFFECT OF DELETIONS OF GENES ENCODING Pho3p AND Bgl2p ON THE POLYPHOSPHATE LEVEL, STRESS ADAPTATION AND ATTACHMENT OF THESE PROTEINS IN *Saccharomyces cerevisiae* CELL WALL

T. S. Kalebina^{1*}, E. V. Kulakovskaya², V. V. Rekstina¹, L. V. Trilisenko², R. H. Ziganshin³,
N. V. Marmiy⁴, D. S. Esipov⁵, and T. V. Kulakovskaya²

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Molecular Biology, 119234 Moscow, Russia; e-mail: kalebina@gmail.com

² Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290 Pushchino, Russia

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

⁴ Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Bioorganic Chemistry, 119234 Moscow, Russia

Inorganic polyphosphates (polyP), according to literature data, are involved in the regulatory processes of molecular complex of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall (CW). The aim of the work was to reveal relationship between polyP, acid phosphatase Pho3p, and the major CW protein, glucanoyl transglycosylase Bgl2p, which is the main glucan-remodelling enzyme with amyloid properties. It has been shown that the yeast cells with deletion of the *PHO3* gene contain more high molecular alkali-soluble polyP and are also more resistant to exposure to alkali and manganese ions compared to the wild type strain. This suggests that Pho3p is responsible for hydrolysis of the high molecular polyP on the surface of yeast cells, and these polyP belong to the stress resistance factors. The *S. cerevisiae* strain with deletion of the *BGL2* gene is similar to the Δ *pho3* strain both in the level of high molecular alkali-soluble polyP and in the increased resistance to alkali and manganese. Comparative analysis of the CW proteins demonstrated correlation between the extractability of the acid phosphatase and Bgl2p, and also revealed a change in the mode of Bgl2p attachment to the CW of the strain lacking Pho3p. It has been suggested that Bgl2p and Pho3p are able to form a metabolon or its parts that connects biogenesis of the main structural polymer of the CW, glucan, and catabolism of an important regulatory polymer, polyphosphates.

Keywords: yeast, cell wall, polyphosphates, acid phosphatase, glucanoyltransglycosylase, Pho3p, Bgl2p, stress

ВЛИЯНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *Yersinia pseudotuberculosis* НА ТКАНИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

© 2023 О.Ю. Портнягина^{1*}, Д.Н. Ивашкевич², И.В. Дюйзен²,
Л.С. Шевченко¹, О.Д. Новикова¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова,
690021 Владивосток, Россия

² Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН им. А.В. Жирмунского,
690041 Владивосток, Россия; электронная почта: odd64@mail.ru

Поступила в редакцию 03.08.2022

После доработки 25.11.2022

Принята к публикации 20.12.2022

Обнаружено, что при однократной иммунизации мышей OmpF и OmpC поринами *Yersinia pseudotuberculosis* на фоне нарастающего титра специфических антител в глубоких слоях коры головного мозга развиваются патологические изменения, характеризующиеся дистрофическими изменениями клеток. В нейронах при этом наблюдается повышенный уровень экспрессии каспазы 3, что свидетельствует об индукции проапоптотических сигнальных путей. Полученные результаты указывают на потенциальную способность неспецифических порообразующих белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий инициировать развитие дегенеративных изменений клеток головного мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Yersinia pseudotuberculosis*, OmpF, OmpC порины, нейродегенерация, каспаза 3, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972523010104, EDN: PCTBZM

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательная бактерия *Yersinia pseudotuberculosis* (сем. Yersiniaceae) является энтеропатогеном для человека, вызывает острые желудочно-кишечные расстройства, такие как энтероколит и мезентериальный лимфаденит. В случае повторной bacteriemии у больных псевдотуберкулезом могут развиваться так называемые вторично-очаговые формы заболевания, которые характеризуются офтальмологическими симптомами, такими как эписклерит, склерит, хориоретинит, симптомами поражения периферической нервной системы, а также возникновением реактивного артрита и коллагенозов [1, 2]. Есть данные, что в 9–25% случаях при наличии генетической предрасположенности или различных факторов риска патологический процесс проявляется не только как инфекционный синдром, но и приобретает черты системного заболевания. В таких

случаях у больных иерсиниозом или псевдотуберкулезом формируются различные аутоиммунные расстройства, такие как синдромы Рейтера и Шегрена – Гужеро, болезни Крона, Грейвса – Базедова, а также хронические заболевания соединительной ткани, гломерулонефрит, аутоиммунный гепатит, гемолитическая анемия, воспаление сердечных оболочек, тромбоцитопения и другие патологии. Некоторые авторы рассматривают подобные заболевания как закономерные последствия иерсиниозов [1–5]. В 40% случаях у переболевших иерсиниозами отмечаются поражения нервной системы в виде серозного или гнойного менингита, менингоэнцефалита, невралгий и болей в пояснично-крестцовом отделе позвоночника [6–8]. Описан случай развития острой энцефалопатии у пациента с серологически подтвержденным псевдотуберкулезом [9].

Предполагается, что подобные осложнения связаны с нарушением функции Т- и

Принятые сокращения: ЛПС – липополисахарид; НМ – наружная мембрана; РВ – полимиксин В.

* Адресат для корреспонденции.

антигенпрезентирующих клеток в поражённом органе. Антигены *Y. pseudotuberculosis* могут вызывать неспецифическую активацию Т-клеток за счёт прямого взаимодействия с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II и с вариабельной областью Т-клеточного рецептора, а эта поликлональная активация, в свою очередь, приводит к гиперпродукции провоспалительных цитокинов [9, 10], которые способствуют развитию нейровоспаления [11].

В настоящее время существует достаточное количество различных патогенетических признаков, свидетельствующих о том, что хронические бактериальные и вирусные инфекции являются возможными факторами риска развития нейродегенеративных заболеваний [12, 13]. Однако молекулярный механизм взаимодействия бактериальных патогенов с нейронами мало изучен. Тем не менее уже сейчас ясно, что проникновение бактериальных антигенов в ткань мозга и последующая нейровоспалительная реакция в долгосрочной перспективе могут инициировать нейродегенеративные расстройства [14]. Иммунный ответ и активация воспалительного процесса в ходе развития инфекции в организме-хозяине также могут вызывать повреждение и последующую гибель нейронов.

Известно, что развитию нейродегенерации способствует бактериальный эндотоксин, липополисахарид (ЛПС) [15], который является одним из основных факторов патогенности грамотрицательных бактерий. Однако, помимо ЛПС, к факторам патогенности можно отнести и порообразующие белки (порины), которые доминируют в количественном отношении среди белков наружной мембраны (НМ) бактерий [16–19]. В ходе инфекционного процесса порины высвобождаются из НМ в результате бактериолиза и могут интегрироваться, например, во внутреннюю мембрану митохондрий, что приводит к нарушению потенциала митохондриальной мембраны, высвобождению цитохрома *c* и индукции апоптоза [20]. Так, на примере неспецифического OmpC порина *E. coli* было показано, что пориновые белки вызывают развитие Са-зависимой апоптотической гибели клеток и наряду с ЛПС участвуют в развитии нейровоспалительного процесса, приводящего к нейродегенеративным изменениям в тканях головного мозга [21].

Известно, что при иммунизации поринами формируется высокий уровень долгоживущих циркулирующих антител, более того, специфические антипориновые антитела обнаруживаются в сыворотках крови экспериментальных животных (мышей, кроликов, крыс, обезьян)

вне зависимости от формы вводимого антигена, т.е. при иммунизации целыми клетками, фрагментами клеточной стенки бактерий, изолированными белками [22–24]. В связи с этим считается, что порины НМ различных бактерий могут быть использованы в качестве эффективных компонентов вакцинных препаратов для защиты человека и животных от заболеваний, вызываемых микроорганизмами родов *Neisseria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Chlamydia* [25–31]. Однако исследование нейротоксического потенциала поринов патогенных для человека грамотрицательных бактерий находится в настоящее время на начальном этапе и в связи с этим представляется весьма актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Для получения препаратов поринов использовали бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, Ib серовар). Культуры выращивали в жидкой питательной среде LB при температуре 4 °C в течение 5 суток и при температуре 37 °C в течение 30 ч для получения OmpF и OmpC белков соответственно.

Выделение OmpF и OmpC поринов. Выделение и очистку белков из бактериальных клеток проводили, как описано в работе Новиковой и соавт. [32]. В результате были получены электрофоретически чистые препараты белков в нативной тримерной форме. Содержание ЛПС в образцах белков, определённое с помощью набора *Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test* («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя, составило <3%. Полученные образцы тримеров белков использовали для иммунизации мышей.

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c (самки в возрасте от 4 до 8 недель, массой 20 ± 2 г), разделённых на три группы по 15 голов, однократно иммунизировали внутрибрюшинно: (1) тримером OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* (100 мкг/мышь), (2) тримером OmpC порина *Y. pseudotuberculosis* (100 мкг/мышь), (3) Tris-HCl буфером (0,03 М, pH 7,6) (100 мкл).

Забор биологического материала. Забор крови и тканей головного мозга у 5 мышей из каждой группы осуществляли через 90, 180 и 280 дней после начала эксперимента. Мышей наркотизировали введением 10 мкл смеси ксилазина («Interchemie», Эстония) и телазола («Zoetis Manufacturing», Испания). По достижении глубокого уровня хирургического наркоза животное

фиксируют на препаровочном столике, вскрывают грудную клетку и отбирают кровь из полости сердца. Перфузию 10%-ным (v/v) формалином в физиологическом растворе производили через систему кровообращения. Затем вскрывали черепную коробку, извлекали головной мозг, отделяли кору и фиксировали в формалине. Перед извлечением головного мозга для приготовления гомогенатов перфузию не проводили.

Экстракция белков из тканей головного мозга. *Экстракция 1%-ным Triton X-100.* Навеску тканей головного мозга гомогенизировали тefлоновым пестиком в TBS-буфере (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4), содержащем 0,1 mM PMSF и 1%-ный (v/v) Triton X-100. Затем гомогенат обрабатывали ультразвуком в течение 20 с при 44 Гц с помощью дезинтегратора (УЗДН-2Т, Россия). Полученную суспензию центрифугировали при 15 000 g в течение 20 мин, получали осадок 1 и супернатант 1. К супернатанту 1 добавляли ацетон (1 : 9, v/v) и выдерживали в течение ночи при -20 °C для осаждения растворимых в Triton X-100 белков. Полученный осадок отделяли центрифугированием при 5000 об./мин в течение 30 мин, дважды промывали водой, нерастворимые в воде белки далее растворяли в буфере (0,03 M Tris-HCl, pH 7,6), содержащем 0,25% Ds-Na (v/v), и использовали для анализа.

Экстракция 1%-ным Ds-Na. Осадок 1 обрабатывали 1%-ным (v/v) раствором Ds-Na в TBS-буфере в течение 45 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Полученный экстракт центрифугировали при 15 000 g в течение 25 мин, получали осадок 2 и супернатант 2. К супернатанту 2 добавляли ацетон (1 : 9, v/v) и выдерживали в течение ночи при -20 °C для осаждения растворимых в Ds-Na белков. Полученный осадок отделяли центрифугированием при 5000 об./мин в течение 30 мин, дважды промывали водой, нерастворимые в воде белки далее растворяли в буфере (0,03 M Tris-HCl, pH 7,6), содержащем 0,25% Ds-Na (v/v), и использовали для анализа.

Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм с помощью спектрофотометра μ Quant («BioTek Instruments, Inc.», США).

Иммуноферментный анализ. Образцы белков, извлекаемые из тканей головного мозга с помощью 1%-ного Triton X-100 и 1%-ного Ds-Na, использовали в качестве антигенов для проведения ИФА. Концентрация белка, наносимого на планшеты в качестве антигена, составила 5 мкг/мл. ИФА проводили по стандартной методике. Планшеты инкубировали

в течение ночи при 4 °C. Для обнаружения антигенов использовали антисыворотки мышей (в разведении 1 : 200, v/v), полученных после трёхкратной иммунизации OmpF и OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis*, как описано в статье Новиковой и соавт. [32]. В качестве антител к иммуноглобулинам мыши использовали коммерческие конъюгаты с пероксидазой хрена («Invitrogen», США). Результаты учитывали на спектрофотометре μ Quant («BioTek Instruments, Inc.») при 492 нм, в качестве хромогена использовали 0,04%-ный (m/v) раствор *o*-фенилендиамина. Антисыворотки, полученные после однократной иммунизации мышей, также анализировали в ИФА с гомологичными антигенами. Уровень антител выражали в отрицательных lg ($-lg$).

Иммуногистохимическое и гистологическое исследование. Ткани коры головного мозга фиксировали в течение 24 ч при 4 °C в 10%-ном (v/v) забуференном формалине, 3–4 раза промывали фосфатным буфером (0,1 M, pH 7,2), заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм.

Для выявления каспазы 3, TNF- α , IL-2 и IL-6 был использован иммунопероксидазный метод с применением первичных антител соответственно к CASP3 (PAA626Mu01, «Cloud-Clone Corp.», США), TNF- α (PAA133Mu01, «Cloud-Clone Corp.»), IL-2 (PAA043Mu01, «Cloud-Clone Corp.») и IL-6 (PAA079Mu01, «Cloud-Clone Corp.») в разведении 1 : 200, v/v. Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (PI-2000, «Vector Laboratories», США), в разведении 1 : 200, v/v, использовали в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Парафиновые срезы коры головного мозга после депарафинирования инкубировали в 3%-ной (v/v) перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы. Промывали 3 раза фосфатным буфером (0,1 M, pH 7,2) и инкубировали в течение 60 мин в 2%-ном (m/v) растворе БСА (SC-2323, «Santa Cruz Biotechnology», США), содержащем 0,25%-ный (v/v) Triton X-100. Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере при 4 °C в течение 24 ч. После трёхкратной отмывки срезы инкубировали со вторичными антителами в течение 60 мин и трижды отмывали фосфатным буфером. Для визуализации иммунопероксидазной реакции использовали хромоген NovaRed («Vector Laboratories»), через 5–10 мин срезы промывали фосфатным буфером, обезвоживали и заключали в бальзам.

Для выявления исследуемых поринов в коре головного мозга использовали антисыворотки мышей, трёхкратно иммунизированных

OmpF и OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis*, полученными как описано в статье Новиковой и соавт. [32], а также сыворотки интактных особей в качестве контроля. После инкубации срезов в блокирующем буфере в течение 1 ч при 37 °C проводили трёхкратную отмывку фосфатным буфером, затем срезы инкубировали 1 ч со вторичными антителами, меченными Alexa Fluor 594 (A11037, «Life Technologies», США) и Alexa Fluor 488 (A11029, «Life Technologies»). Гистологические препараты отмывали трижды фосфатным буфером, затем инкубировали 10 мин с красителем DAPI (D021490, «Life Technologies»), заключали под покровное стекло с использованием глицерина, стекла хранили в холодильнике при температуре 4 °C.

Для гистологического окрашивания депарфинированные срезы помещали на 5 мин в раствор гематоксилина Карацци («Bio-Vitrum», Россия), промывали проточной водой, обезвоживали, просветляли и заключали в баллаз.

Количественная обработка данных. Морфометрическую, иммуногистохимическую оценку и подсчёт клеток проводили с использованием пакета программ ImageJ 1.41 («NIH», США). Удельную плотность нейронов определяли как (количество нейронов)/(площадь подсчёта), затем стандартизировали по контрольному значению. Количество Casp3⁺-нейронов/мм³ рассчитывали по формуле: $d = (10^9 \times n) / (S \times 7)$, где d — плотность клеток; 10^9 — коэффициент пересчёта мкм² в мм²; n — количество иммунопозитивных клеток; S — площадь области интереса (мкм²); 7 — толщина среза (мкм).

Статистическая обработка данных. Оценку достоверности различий данных проводили с использованием метода Two-way ANOVA (Bonferroni post test). Все данные были проверены на нормальность распределений с использованием теста Колмогорова—Смирнова. Данные выражали как среднее $\pm$ SEM, $p < 0,05$ было принято как статистически значимое. Все статистические тесты выполнялись с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 4.00 («GraphPad Software», США). Корреляцию между снижением удельной плотности нейронов и увеличением числа Casp3⁺-нейронов оценивали по средним значениям в динамике с применением критерия Спирмена. Силу корреляции определяли с помощью шкалы Чеддока. Статистический анализ различий взаимодействия антигенов с антителами проводили с использованием t -критерия Стьюдента. Данные выражали как среднее $\pm$ SD, $p < 0,05$ было принято как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами исследования в настоящей работе стали неспецифические OmpF и OmpC порины *Y. pseudotuberculosis*, которые наряду с ЛПС относятся к основным (в количественном отношении) антигенам НМ псевдотуберкулёзного микроба. Ранее было показано, что при естественном течении заболевания в сыворотках крови пациентов антитела к поринам в диагностических титрах определяются, начиная с первой недели от начала проявления клинических симптомов заболевания, и могут сохраняться на протяжении нескольких месяцев и даже лет [22]. При искусственной иммунизации индивидуальными белками у животных формируется пул специфических антипоринных антител с высокими титрами. Показано, что порины иерсиний относятся к антигенам, для которых применимо понятие «молекулярная мимикрия», вследствие чего длительно циркулирующие в организме антитела к этим белкам способны вызвать, например, развитие аутоиммунного поражения щитовидной железы с развитием тиреотоксикоза [33]. Накопление специфических антител в организме, так же как провоспалительных цитокинов, может спровоцировать нейровоспалительный процесс и стать причиной деструкции нервной ткани при различных нейродегенеративных заболеваниях [11, 34].

В ходе проведённого эксперимента мышей через 90, 180 и 280 дней после иммунизации OmpF/OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis* подвергали эвтаназии, извлекали мозг и проводили гистологический анализ срезов коры, сделанных в области поясной извилины (молекулярной пластинки — слоя 1 и наружной зернистой пластинки — слоя 2). На парафиновых срезах (5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином, проводили подсчёт плотности распределения нейронов в поверхностных и глубоких слоях серого вещества, оценивали степень и глубину повреждения нервных клеток по характеру изменения ядра и цитоплазмы (пикноз, вакуолизация).

Основной тенденцией общеморфологических изменений, регистрируемых в мозге экспериментальных животных, стало значительное сокращение плотности распределения нервных клеток (рис. 1, а, б).

Через 90 дней после начала эксперимента появились признаки дистрофических изменений в нейронах (рис. 1, в). Они сопровождались частичной вакуолизацией цитоплазмы, растворением и распылением тигроида, набуханием

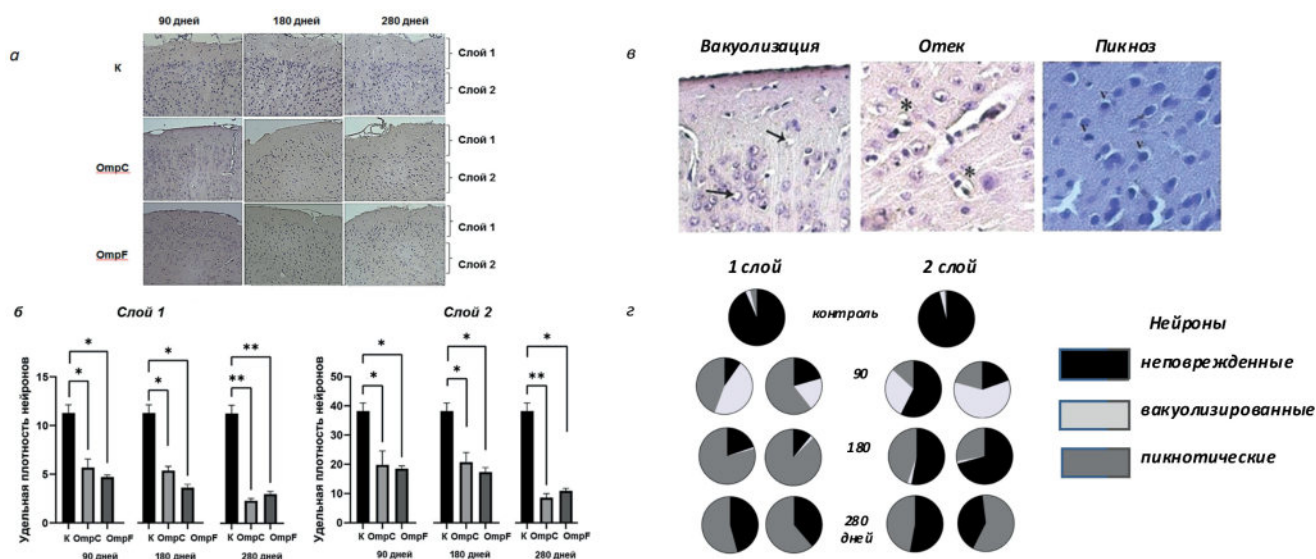


Рис. 1. Гистологический анализ срезов коры головного мозга иммунизированных мышей, сделанных в области поясной извилины (молекулярной пластинки — слой 1 и наружной зернистой пластинки — слой 2). Оценка удельной плотности клеток (а, б). Морфологические изменения структур коры головного мозга иммунизированных мышей (в, г), выраженные как изменения соотношения нейронов в клетках молекулярной пластинки (слой 1) и наружной зернистой пластинки (слой 2). На фотографиях (в) указаны клетки с признаками вакуолизации (↑), отека (*), пикнотические (V), на рисунке (г) приведены данные для ОмпF порина (слева) и ОмпС порина (справа). * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$, ** достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$

и формированием перичеллюлярного отёка. В случае иммунизации как ОмпF, так и ОмпС поринами менее 25% нейронов в тканях молекулярной пластинки (слой 1) остались неповреждёнными (рис. 1, г). В наружной зернистой пластинке (слой 2) при введении ОмпF порина остались неповреждёнными порядка 60% нейронов, насчитывалось также примерно 10% вакуолизированных нейронов. В 30% пикнотических клеток наблюдались признаки деструкции органоидов. В случае иммунизации ОмпС порином неповреждёнными остались около 20% клеток, насчитывалось такое же количество пикнотических нейронов, а в большей части нейронов наблюдалась вакуолизация цитоплазмы. Описанные морфологические изменения были зафиксированы на фоне резкого (примерно в 2 раза) сокращения удельной плотности нейронов.

Через 180 дней от начала наблюдения плотность распределения нейронов уменьшалась более чем в 4 раза, и наблюдались глубокие морфологические изменения, которые были выражены неодинаково в поверхностных и более глубоких слоях коры. Так, независимо от вида введённого белка, в клетках молекулярной пластинки значительно, до 80–85%, возрастало количество пикнотических нейронов с признаками необратимых изменений (сморщивание, уплотнение цитоплазмы нейрона, развитие гиперхроматоза). В клетках зернистой пластинки количество пикнотических нейронов также увеличивалось, но при этом от 50 до 70% кле-

ток не демонстрировали явных признаков дистрофического повреждения (рис. 1, г).

Через 280 дней в нейронах молекулярной пластинки были зафиксированы ультраструктурные признаки компенсаторно-репаративных процессов, количество пикнотических клеток уменьшалось, а количество клеток с признаками относительного морфологического благополучия увеличивалось. Напротив, в нейронах наружной зернистой пластинки количество пикнотических нейронов продолжало увеличиваться, а неповреждённых — уменьшаться (рис. 1, г). В случае ОмпС порина изменения были более заметными по сравнению с ОмпF.

В результате проведённых иммунохимических исследований было показано, что накопление морфологических изменений в клетках коры головного мозга развивалось на фоне сформировавшегося пула специфических антител в сыворотках крови иммунизированных мышей. Через 90 дней после однократной иммунизации мышей ОмпF порином *Y. pseudotuberculosis* у животных наблюдался достаточно высокий уровень IgG-антител (титр 10^3), который вплоть до окончания эксперимента (280 дней) не только не снижался, но и имел тенденцию к нарастанию. Динамика антителообразования в случае иммунизации животных ОмпС порином имела иной характер. Через 90 дней количество специфических антител в сыворотках крови мышей достигало того же уровня, что и у мышей, иммунизированных ОмпF порином. Через 180 дней титр

антисыворотки снижался до $-lg 2,6$, а в конце срока наблюдения (280 дней) опять повышался до $-lg 3,2$.

Ранее в статье Rajan et al. [21] были приведены данные о том, что в тканях головного мозга людей с диагностированной болезнью Крейцфельда–Якоба и мышей, иммунизированных OmpC порином из НМ *E. coli*, с помощью специфических антител выявляется присутствие белкового антигена. В нашем эксперименте анализ экстрактов коры головного мозга мышей показал, что в образцах тканей, полученных через 90 дней после иммунизации, присутствуют антигены, взаимодействующие с антисыворотками к OmpF/OmpC поринам, полученными как описано в работе Новиковой и соавт. [32] (рис. 2, а, б).

Через 180 дней антигены, взаимодействующие в ИФА с антисывороткой к OmpC порину, были обнаружены в количестве примерно вдвое меньше по сравнению с 90-дневными экстрактами. А в экстрактах тканей мозга мышей после иммунизации OmpF порином через 180 дней количество определённого антигена было статистически неотличимо от контроля.

В экстрактах тканей головного мозга, взятого у мышей через 280 дней, антигены, связывающиеся со специфическими антителами

к поринам, методом ИФА обнаружены не были. Однако при иммуногистохимическом исследовании, проведённом с использованием специфических поликлональных антител к поринам и вторичных антител к IgG мыши, меченных Alexa Fluor, в препаратах тканей головного мозга, полученных при иммунизации как OmpC, так и OmpF белками, были обнаружены слабые сигналы зелёной флуоресценции, свидетельствующие о присутствии незначительного количества этих антигенов в исследуемых образцах (рис. 2, б, г).

Интересно отметить различную эффективность последовательной экстракции белков неионным (Triton X-100) и анионным (Ds-Na) детергентами. В случае OmpF порина, наибольшее его количество экстрагировалось из тканей 1%-ным Ds-Na, а в случае OmpC белка — 1%-ным Triton X-100. Вероятно, такой результат обусловлен различной способностью исследуемых поринов взаимодействовать с мембранной нейтронов. Механизм инкорпорации PorA и PorB поринов в мембраны эукариотических клеток с образованием ионных каналов описан для поринов НМ из различных видов нейссерий [35, 36]. Так, например, установлено, что PorB из *Neisseria gonorrhoeae*, встраиваясь в мембраны эпителиальных клеток, не только формирует функционирующие каналы, но и вызывает

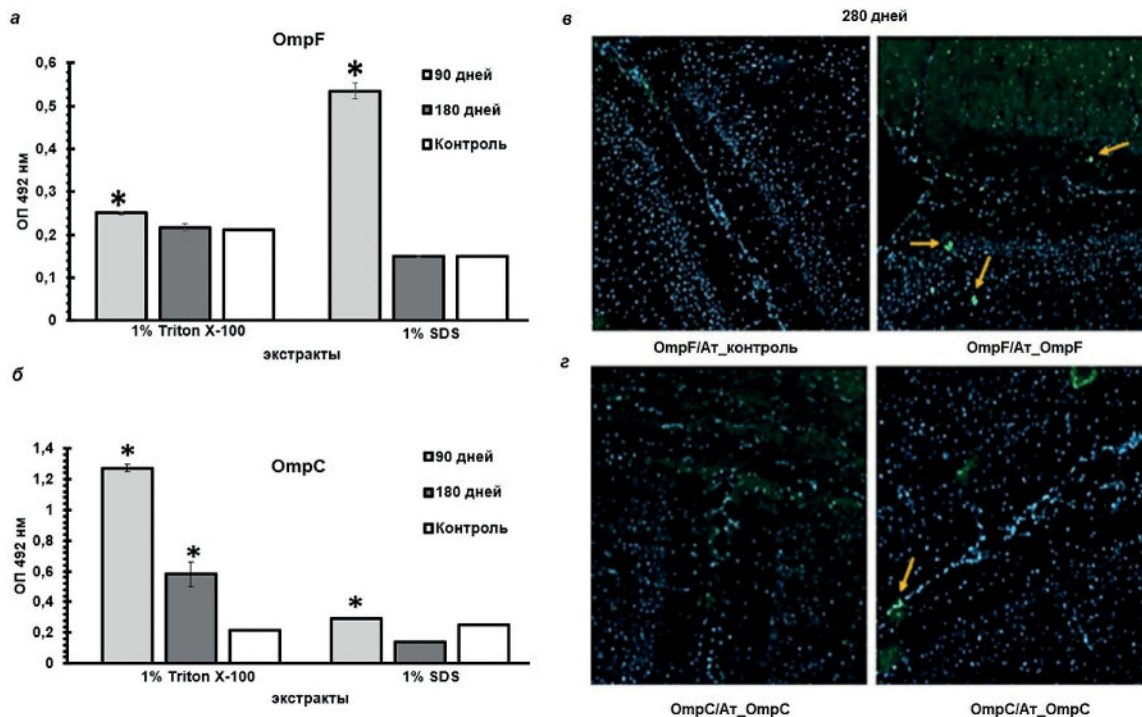


Рис. 2. Иммунодетекция антигенов. Иммуноферментный анализ взаимодействия (а, б) экстрактов тканей коры головного мозга, полученных через 90, 180, 280 дней от мышей, иммунизированных однократно OmpF и OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis* (100 мкг/мышь), с антисыворотками к гомологичным белкам (разведение 1 : 200). Концентрация белка на планшете 5 мкг/мл. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$. Иммуногистохимическое выявление поринов (в, г) (указано стрелками) в тканях коры головного мозга мышей через 280 дней после введения антигенов. Взаимодействие гистологических препаратов с неиммунной (OmpF/At_контроль, OmpC/At_контроль) и специфической (OmpF/At_OmpF, OmpC/At_OmpC) сыворотками

их Са-зависимый апоптоз. При нейродистрофических процессах высокий уровень апоптоза также может приводить к выраженному снижению численности жизнеспособных клеток. За развитие апоптоза отвечают внутриклеточные ферменты семейства цистеин-содержащих протеаз, среди которых ведущей эффекторной каспазой является каспаза 3. При болезнях Альцгеймера и Паркинсона в коре головного мозга пациентов, умерших от этих заболеваний, обнаруживается высокий уровень экспрессии каспазы 3 [37, 38]. Повышенный уровень мРНК каспазы 3 также определялся в тканях головного мозга мышей, иммунизированных препаратами OmpC порина *E. coli* [21]. По мнению авторов, этот факт свидетельствует о том, что бактериальный порин способствует развитию патологического состояния нейронов вследствие повреждения мембран и развития апоптоза.

Цитологические изменения, которые мы наблюдали в клетках коры головного мозга иммунизированных мышей, по ряду признаков (пикноз, гиперхроматоз) можно было отнести к апоптотическим. Для того чтобы выявить готовность нейронов мышей к апоптозу, был проведён гистохимический анализ с использованием специфических поликлональных антител к каспазе 3 (PAA626Mu01, «Cloud-Clone Corp.»).

Как видно из данных, приведённых на рис. 3, однократная иммунизация животных исследуемыми бактериальными поринами вызвала значительное увеличение экспрессии каспазы 3 в клетках молекулярной пластинки (слой 1) и наружной зернистой пластинки (слой 2) коры. В клетках наружной зернистой пластинки эффект от введения препаратов белков был более выражен, количество нейро-

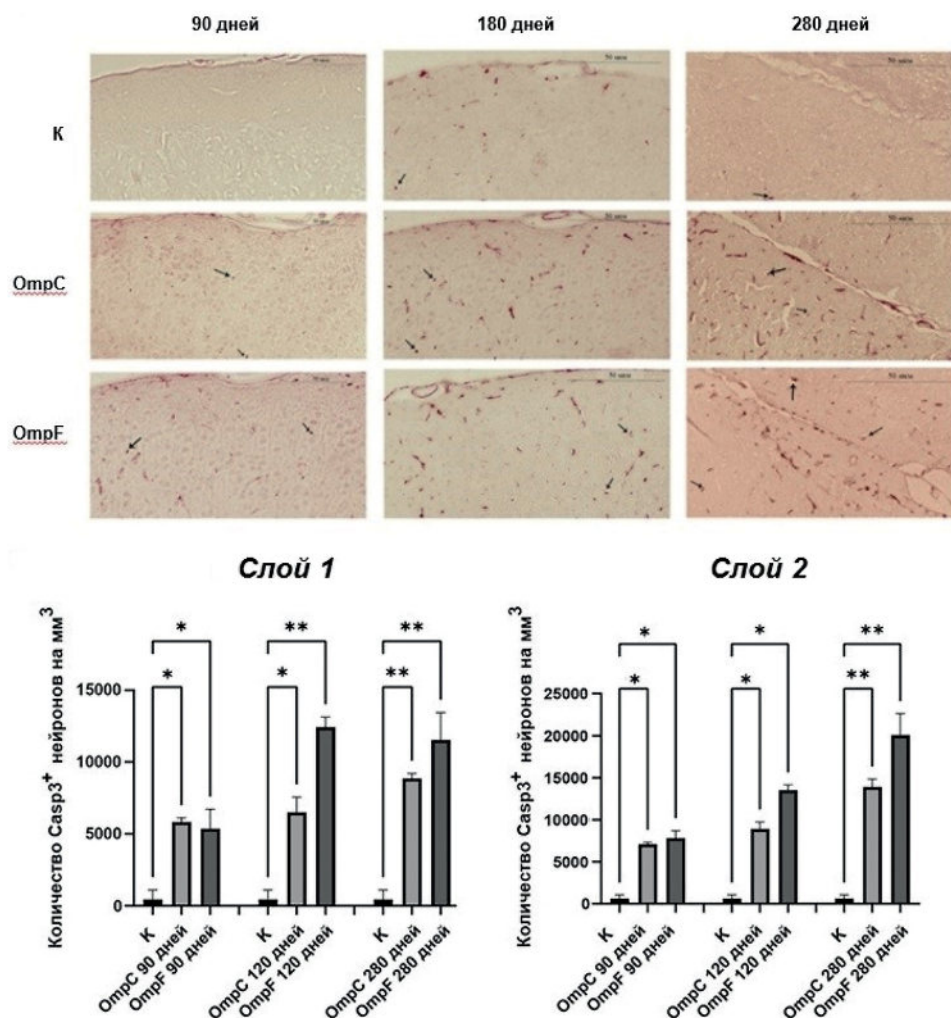


Рис. 3. Экспрессия каспазы 3 (Casp3) в клетках молекулярной пластинки (слой 1) и наружной зернистой пластинки (слой 2) коры головного мозга мышей, иммунизированных OmpF/OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis*. Слой 1, коэффициент корреляции Спирмена для OmpC — 1,000, для OmpF — 0,500; сила связи по шкале Чеддока для OmpC функциональная, для OmpF заметная. Слой 2, коэффициент корреляции Спирмена для OmpC — 0,500, для OmpF — 1,000; сила связи по шкале Чеддока для OmpC заметная, для OmpF функциональная. Стрелками указаны Casp3⁺-нейроны. К — контроль. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$, ** достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$

нов, продуцирующих каспазу 3, нарастало до конца эксперимента, что особенно заметно в случае OmpF порина. В клетках молекулярной пластинки динамика накопления Casp3⁺-нейронов имела аналогичный характер, хотя количество их было меньше по сравнению с клетками слоя 2 (рис. 3).

Известно, что патогенные иерсинии обладают целым набором разнообразных по механизму действия факторов вирулентности, которые нарушают защитные реакции врождённого и адаптивного иммунитета, способствуя распространению бактерий в теплокровном организме. Основным активатором клеток иммунной системы традиционно считается эндотоксин (ЛПС). Так, известно, что ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, Ib серовар) при однократном введении вызывает накопление провоспалительных цитокинов, TNF-α и IL-6, в сыворотке крови мышей в течение суток после иммунизации [39]. Однако для некоторых бактерий показано, что кроме ЛПС, индукторами синтеза цитокинов могут быть порообразующие белки [40, 41], а в некоторых случаях порины могут снижать интенсивность провоспалительных реакций, индуцированных ЛПС *in vitro* в клетках различных линий [42].

На заключительном этапе эксперимента мы провели иммуногистохимический анализ препаратов головного мозга иммунизированных мышей для выявления IL-2, IL-6 и TNF-α. Мы считаем, что в тканях, полученных через 90, 180 и 280 дней после иммунизации поринами, эти медиаторы воспаления не были обнаружены, поскольку различия между контрольными и опытными образцами были статистически недостоверными.

Однако ранее на примере провоспалительных IL-12 и TNF-α в эксперименте *in vivo* мы охарактеризовали цитокиновый ответ при однократном введении OmpF и OmpC поринов НМ *Y. pseudotuberculosis* в дозе 100 мкг на мыш. В эксперименте использовали препараты изолированных поринов (содержащих менее 3% ЛПС) и поринов, предварительно обработанных полимиксином В (РВ), который инактивирует ЛПС, вызывая необратимое изменение структуры эндотоксина за счёт избирательного связывания с его липидной частью [43]. Использование РВ позволило выявить собственную цитокинстимулирующую активность поринов псевдотуберкулёзного микроба [43]. Было показано, что как изолированные, так и обработанные РВ порины псевдотуберкулёзного микроба практически в одинаковой степени ингибируют синтез TNF-α в течение 24 ч. Следовательно, наряду с другими мембранными

белками иерсиний, такими как Yop-белки [44], неспецифические порины можно отнести к числу факторов вирулентности, подавляющих синтез TNF-α. С другой стороны, было установлено, что оба порина, так же как ЛПС, стимулируют синтез провоспалительного цитокина IL-12. Незначительно отличалась только динамика изменения уровня этого медиатора воспаления в течение суток для изолированных и обработанных РВ белков. Если в присутствии примеси ЛПС максимальный уровень IL-12 наблюдался уже через 2 ч после начала эксперимента, немного снижаясь впоследствии, то в случае поринов, обработанных РВ, количество IL-12 постепенно увеличивалось в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, можно сказать, что порины, так же как ЛПС из *Y. pseudotuberculosis*, вызывают синтез некоторых провоспалительных цитокинов только в острой фазе развития инфекционного процесса. На более поздних этапах развития иммунной реакции организма механизм воздействия бактериальных белков на клетки не обязательно связан с синтезом медиаторов воспаления, а может быть обусловлен способностью поринов нарушать целостность мембран эукариотических клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что при однократной иммунизации мышей неспецифические порины *Y. pseudotuberculosis* могут вызывать частично обратимую дегенерацию клеток в поверхностных слоях коры головного мозга. Дистрофические изменения, которые наблюдаются в тканях головного мозга после иммунизации животных поринами, сильнее выражены в нейронах молекулярной пластинки. В случае OmpF порина эти изменения имеют более ранние сроки инициации по сравнению с таковыми, индуцированными введением OmpC. Характерно наличие признаков репаративного процесса, за счёт которого к концу эксперимента частично восстанавливается количество неповреждённых клеток. Установлено, что увеличение уровня экспрессии каспазы 3 в нейронах иммунизированных животных коррелирует с уменьшением значения показателя удельной плотности клеток. В связи с этим можно говорить о том, что изменения показателя готовности клеток к апоптозу происходят на фоне структурной реорганизации тканей даже при наличии признаков компенсаторно-восстановительной реакции со стороны нейронов.

В настоящее время существует мнение, что любая хроническая персистирующая инфекция может запускать в макроорганизме каскад реакций, результатом которых могут стать в том числе различные нейродегенеративные процессы [45]. Так, недавние исследования Matheoud et al. [46] показали, что экспериментальная инфекция, вызываемая *Citrobacter rodentium*, запускает в организме животных процессы аутоиммунного характера, которые в конечном итоге приводят к образованию специфических для митохондрий цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в тканях головного мозга. Помимо этого, у инфицированных мышей наблюдается резкое снижение плотности дофаминергических нейронов и развиваются двигательные нарушения, исчезающие после лечения L-ДОФА. Эти результаты подтверждают предположение о том, что кишечная инфекция может способствовать развитию болезни Паркинсона.

Данные, полученные в нашей работе на мышинной модели, свидетельствуют о том, что неспецифические порообразующие белки грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis*, действуя как триггерные факторы, также могут активировать программу апоптотической гибели нервных клеток. Кроме того, на поздних этапах развития иммунной реакции организма механизм воздействия бактериальных белков на клетки, вероятно, обусловлен спо-

собностью поринов встраиваться в мембраны эукариотических клеток, стимулируя развитие апоптоза. Вследствие этого высокая антигенная нагрузка при хроническом течении псевдотуберкулёза у людей, реализуемая в том числе за счёт поринов НМ, может стать одной из причин развития нейровоспаления и дегенеративных изменений в тканях головного мозга.

Вклад авторов. О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова — концепция и руководство работой; Д.Н. Ивашкевич, И.В. Дюйзен, Л.С. Шевченко, О.Ю. Портнягина — проведение экспериментов; О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова, Д.Н. Ивашкевич, И.В. Дюйзен — обсуждение результатов исследования; О.Ю. Портнягина — написание текста; О.Д. Новикова — редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты с животными были проведены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, использующихся для научных целей», и одобрены этическим комитетом ТИБОХ ДВО РАН им. Г.Б. Елякова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1990) Yersinia infections, *Ned. Tijdschr. Geneeskde*, **140**, 128-130.
2. Сидельникова С. М., Ющенко Г. В., Асеева Э. И. (2000) Иерсиниозы как терапевтическая проблема, *Тер. Архив*, **11**, 27-30.
3. Somova, L. M., Antonenko, F. F., Timchenko, N. F., and Lyapun, I. N. (2020). Far Eastern Scarlet-Like Fever is a special clinical and epidemic manifestation of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in Russia, *Pathogens*, **9**, 436, doi: 10.3390/pathogens9060436.
4. Granfors, K., Merilahti-Palo, R., Luukkainen, R., Möttönen, T., Lahesmaa, R., et al. (1998) Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis, *Arthrit. Rheum.*, **41**, 855-862, doi: 10.1002/1529-0131(199805)41:5<855::AID-ART12>3.0.CO;2-J.
5. Бениова С. Н. (2006) Возможные направления коррекции неблагоприятного течения псевдотуберкулёза у детей, *Тихоокеанский Мед. Журн.*, **4**, 61-63.
6. Каманцев В. Н., Скрипченко Н. В., Тихомирова О. В., Бехтерева М. К. (2003) Поражения периферической нервной системы при иерсиниозной инфекции у детей, *Российский Мед. Журн.*, **2**, 27-29.
7. Sotaniemi, K. A. (1983) Neurologic complications associated with yersiniosis, *Neurology*, **33**, 95-97, doi: 10.1212/WNL.33.1.95.
8. Pulvirenti, D., Aikaterini, T., and Neri, S. (2007) Septicemia, hepatic abscess, and encephalitis due to *Yersinia enterocolitica*, *J. Clin. Gastroenterol.*, **41**, 333-334, doi: 10.1097/01.mcg.0000248011.93267.c5.
9. Kaito, H., Kamei, K., Ogura, M., Kikuchi, E., Hoshino, H., Nakagawa, S., et al. (2012) Acute encephalopathy and tubulointerstitial nephritis associated with *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pediatr. Int.*, **54**, 926-928, doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03615.x.
10. Нижегородова Д. Б., Левковская А. Н., Зафранская М. М. (2018) Иммунологические механизмы нейровоспаления и нейродегенерации, *Иммунопатол. Аллергол. Инфектол.*, 2018, **4**, 27-42, doi: 10.14427/jipai.2018.4.27.
11. Chitnis, T., and Weiner, H. L. (2017) CNS inflammation and neurodegeneration, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3577-3587, doi: 10.1172/JCI90609.

12. De Chiara, G., Marcocci, M. E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., et al. (2012) Infectious agents and neurodegeneration, *Mol. Neurobiol.*, **46**, 614-638, doi: 10.1007/s12035-012-8320-7.
13. Patrick, K., Bell, S., Weindel, C., and Watson, R. (2019) Exploring the "Multiple-Hit hypothesis" of neurodegenerative disease: bacterial infection comes up to bat, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **9**, 2235-2988, doi: 10.3389/fcimb.2019.00138.
14. Farnen, K., Tofiño-Vian, M., and Iovino, F. (2021) Neuronal damage and neuroinflammation, a bridge between bacterial meningitis and neurodegenerative diseases, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 680858, doi: 10.3389/fncel.2021.680858.
15. Brown, G., (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration, *J. Neuroinflamm.*, **16**, 180, doi: 10.1186/s12974-019-1564-7.
16. Achouak, W., Heulin, T., and Pagès, J.-M. (2001) Multiple facets of bacterial porins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **199**, 1-7, doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x.
17. Bernardini, M., Sanna, M., Fontaine, A., and Sansonetti, P. (1993) OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.*, **61**, 3625-3635, doi: 10.1128/iai.61.9.3625-3635.1993.
18. Massari, P., Ram, S., Macleod, H., and Wetzler, L. (2003) The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity, *Trends Microbiol.*, **11**, 87-93, doi: 10.1016/S0966-842X(02)00037-9.
19. Hejair, H. M. A., Zhu, Y., Ma, J., Zhang, Y., Pan, Z., et al. (2017) Functional role of OmpF and OmpC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*, *Microb. Pathog.*, **107**, 29-37, doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.033.
20. Gupta, S., Prasad, G., and Mukhopadhyaya, A. (2015) *Vibrio cholerae* porin OmpU induces caspase-independent programmed cell death upon translocation to the host cell mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **290**, 31051-31068, doi: 10.1074/jbc.M115.670182.
21. Rajan, J. S., Santiago, Ch., Singaravel, R., and Ignacimuth, S. (2016) Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid, *Biotechnol. Lett.*, **38**, 689-700, doi: 10.1007/s10529-015-2025-8.
22. Вострикова О. П., Новикова О. Д., Дробков В. И., Дармов И. В., Маракулин И. В., Соловьева Т. Ф. (2000) Иммунный ответ к основному порообразующему белку наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* у людей и экспериментальных животных, *ВИНИТИ*, 795-800.
23. Hedstrom, R., Pavlovskis, O., and Galloway, R. (1984) Antibody response of infected mice to outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.*, **41**, 49-53, doi: 10.1128/iai.43.1.49-53.1984.
24. Kuusi, M., Nunninen, M., Saxon, H., Valtoneri, M., and Makela, P. H. (1979) Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice, *Infect. Immun.*, **25**, 857-862, doi: 10.1128/iai.25.3.857-862.1979.
25. Дармов И. В., Маракулин И. В., Погорельский И. П., Новикова О. Д., Портнягина О. Ю., Соловьева Т. Ф. (1999) Профилактика экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции с помощью иммунизации порином из *Yersinia pseudotuberculosis*, *Бюл. Эксп. Биол. Мед.*, **127**, 221-223.
26. Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Вострикова О. П., Соловьева Т. Ф. (1999) Динамика иммунного ответа к порину из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, *Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.*, **128**, 437-440.
27. Супотницкий М. В. (1997) Эффективное патентование средств специфической профилактики инфекционных заболеваний, *Биотехнология*, **9-10**, 56-79.
28. Cartwright, K., Morris, P., Rumke, H., Fox, R., Borrow, R., et al. (1999) Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins, *Vaccine*, **17**, 2612-2619, doi: 10.1016/S0264-410X(99)00044-4.
29. Hassett, D., and Whitton, J. (1996) DNA immunization, *Trends Microbiol.*, **4**, 307-312, doi: 10.1016/0966-842X(96)10048-2.
30. Lu, Y.-S., Gerrity, L., Afendis, S., Walkins, L., and Pakes, S. (1988) Distribution of a monoclonal antibody-recognized protective protein immunogen on the outer membranes of *Pasteurella multocida* rabbit isolates, *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1326-1330, doi: 10.1128/jcm.26.7.1326-1330.1988.
31. Lutwiche, P., Exner, M., Hancock, R., and Trust, T. (1995) A conserved *Aeromonas*-porin provides protective immunity to rainbow-trout, *Infect. Immun.*, **63**, 3137-3142, doi: 10.1128/iai.63.8.3137-3142.1995.
32. Новикова О. Д., Хоменко В. А., Емельяненко В. И., Лихацкая Г. Н., Зелепуга Е. А., Ким Н. Ю., и др. (2011) OmpC-подобный порин из *Yersinia pseudotuberculosis*: молекулярная характеристика, физико-химические и функциональные свойства, *Биол. Мембр.*, **28**, 1-16.
33. Portnyagina, O., Zelepuga, E., Khomenko, V., Solov'eva, E., Solov'eva, T., and Novikova, O. (2018) In silico and in vitro analysis of cross-reactivity between *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin and thyroid-stimulating hormone receptor, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 2484-2491, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.133.
34. Skaper, S. D., Facci, L., and Zusso, M. (2018) An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 72, doi: 10.3389/fncel.2018.00072.
35. Müller, A., Günther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T. F., and Rudel, T. (1999) Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases, *EMBO J.*, **18**, 339-352, doi:10.1093/emboj/18.2.339.

36. Никифоров В. А., Кичикова В. В., Ефимов Е. И. (2011) Актуальные и нерешенные проблемы менингококковой инфекции на современном этапе, *Мед. Альманах*, **4**, 94-99.
37. Mattson, M. P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 120-129, doi: 10.1038/35040009.
38. Volles, M. J., and Lansbury P. T., Jr. (2003) Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease, *Biochemistry*, **42**, 7871-7878, doi: 10.1021/bi030086j.
39. Kuznetsova, T. A., Besednova, N. N., Somova, L. M., and Plekhova, N. G. (2014) Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia, *Mar. Drugs*, **12**, 886-898, doi: 10.3390/md12020886.
40. Galdiero, M., Cipollaro de L'ero, G., Donnarumma, G., Marcatili, A., and Galdiero, F. (1995) Interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in human monocytes stimulated with *Salmonella typhimurium* porins, *Immunology*, **86**, 612-619.
41. Galdiero, M., D'Amico, M., Gorga, F., Di Filippo, C., D'Isanto, M., Vitiello, M., et al. (2001) *Haemophilus influenzae* porin contributes to signaling of the inflammatory cascade in rat brain, *Infect. Immun.*, **69**, 221-227, doi: 10.1128/IAI.69.1.221-227.2001.
42. Sakharwade, S. C., and Mukhopadhyaya, A. (2015) *Vibrio cholerae* porin OmpU induces LPS tolerance by attenuating TLR-mediated signaling, *Mol. Immunol.*, **68**, 312-324, doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.021.
43. Портнягина О. Ю., Родина Э. Е., Новикова О. Д. (2019) Неспецифические порины *Yersinia pseudotuberculosis*, как индукторы синтеза цитокинов, *Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова, ТИБОХ ДВО РАН*, Владивосток, 11-15 сент. 2019 г.: материалы конференции, с. 95, EDN: RKZMVN.
44. Ruckdeschel, K. (2002) Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **50**, 131-137.
45. Tohidpour, A., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., Martynova, G. P., Khilazheva E. D., et al. (2017) Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 276, doi: 10.3389/fcimb.2017.00276.
46. Matheoud, D., Cannon, T., Voisin, A., Penttinen, A. M., Ramet, L., Fahmy, A. M., et al. (2019) Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in *Pink1*^{-/-} mice, *Nature*, **571**, 565-569, doi: 10.1038/s41586-019-1405-y.

NON-SPECIFIC PORINS FROM THE OUTER MEMBRANE OF *Yersinia pseudotuberculosis* EFFECT ON MICE BRAIN CORTEX TISSUES

O. Yu. Portnyagina^{1*}, D. N. Ivashkevich², I. V. Duizen², L. S. Shevchenko¹, and O. D. Novikova¹

¹ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690021 Vladivostok, Russia

² A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 690041 Vladivostok, Russia; e-mail: odd64@mail.ru

It was found that with a single immunization of OmpF and OmpC mice with *Yersinia pseudotuberculosis* porins, against the background of an increasing titer of specific antibodies, pathological changes develop in the deep layers of the cerebral cortex, characterized by dystrophic changes in cells. At the same time, an increased level of caspase 3 expression is observed in neurons, which indicates the induction of proapoptotic signaling pathways. The results obtained indicate the potential ability of nonspecific pore-forming proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria to initiate the development of degenerative changes in brain cells.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, OmpF, OmpC porins, neurodegeneration, caspase 3, apoptosis

АЦИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ МОЗГА КРЫСЫ ИЗМЕНЯЕТСЯ ПРИ СПЕЦИФИЧЕСКОМ ИНГИБИРОВАНИИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *in vivo*

© 2023 В.А. Алешин^{1,2}, Д.А. Сибирякина³, А.В. Казанцев^{1,4},
А.В. Граф^{1,3}, В.И. Буник^{1,2,5*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

² Сеченовский Университет, кафедра биохимии, 119048 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия

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

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.11.2022

После доработки 25.11.2022

Принята к публикации 25.11.2022

Адаптация организма к нарушениям обмена веществ требует существования механизмов, связывающих метаболизм с экспрессией генов. В числе таких механизмов в последнее время все чаще рассматривают ацилирование метаболических и гистоновых белков. Мы предположили, что изменение уровня ацилирования белков опосредует адаптационный ответ на ингибирование ключевого метаболического процесса, катализируемого продуцирующим ацетил-КоА комплексом пируватдегидрогеназы (ПДГ). Для проверки этой гипотезы животным интраназально вводили специфические ингибиторы ПДГ: ацетил(метил)фосфинат (АцМеФ) или метиловый эфир ацетилфосфоната (АцФМе) – с последующей оценкой физиологических параметров, ацилирования белков мозга, а также экспрессии и фосфорилирования кодируемой *PDHA* альфа-субъединицы ПДГ (α -ПДГ). При одинаковой дозе сильный ингибитор АцМеФ, в отличие от менее эффективного АцФМе, уменьшает уровень ацетилирования и увеличивает уровень сукцинирования белков головного мозга с кажущейся молекулярной массой 15–20 кДа. Белки 30–50 кДа демонстрируют изменения ацетилирования лишь под влиянием сильного ингибитора АцМеФ, в то время как менее эффективный АцФМе в основном увеличивает уровень их сукцинирования. Отсутствие изменений в сукцинировании белков массой 30–50 кДа после введения АцМеФ совпадает с индукцией этим ингибитором десукцинилазы SIRT5, которая не наблюдается у животных, получавших АцФМе. Экспрессия и фосфорилирование α -ПДГ в мозге, а также поведение животных и ЭКГ существенно не различаются между исследуемыми группами животных. Полученные результаты указывают на то, что кратковременное ингибирование ПДГ головного мозга влияет на уровень ацетилирования и/или сукцинирования белков головного мозга в зависимости от силы ингибитора, молекулярной массы белка и типа ацилирования. Стабильность физиологических параметров после ингибирования ПДГ свидетельствует в пользу гомеостатического характера этих изменений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ацетилирование белков мозга, сукцинирование белков мозга, фосфоновые/фосфиновые аналоги пирувата, пируватдегидрогеназа, сиртуин.

DOI: 10.31857/S0320972523010116, EDN: PCTPCD

Принятые сокращения: ПДГ – пируватдегидрогеназа; α -ПДГ – альфа-субъединица ПДГ; *PDHA* – ген, кодирующий α -ПДГ; ОГДГ – 2-оксоглутаратдегидрогеназа (альфа-кетоглутаратдегидрогеназа); МДГ – малатдегидрогеназа; интервал R-R – средний интервал между ударами сердца; SD – стандартное отклонение средних значений интервала R-R; dX – диапазон значений интервала R-R; RMSSD – среднеквадратичное значение последовательных различий в интервалах R-R.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Давно известно, что белковое ацетилирование регулирует организацию хроматина гистонами [1–3] и работу митохондриальных мультиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, которые продуцируют ацил-КоА и другие реакционноспособные ацилсодержащие интермедиаты [4, 5]. В последнее время посттрансляционные модификации путем ацилирования остатков лизина привлекают все больше внимания. Значительный интерес в этом плане приобретают как неядерные белки, помимо дегидрогеназ 2-оксокислот, так и NAD^+ -зависимые сиртуины – так называемые «омолаживающие» факторы, катализирующие деацилирование белков, отличных от гистонов [6–8]. В то же время, наряду с известной митохондриальной локализацией комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, была выявлена и их ядерная локализация, связанная с участием комплексов в ацилировании гистонов [9–12]. Кроме того, в дополнение к автоацилированию [4, 5] показано участие комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот в ацилировании различных метаболических белков [13, 14]. Таким образом, комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот могут поставлять ацильные производные коэнзима А (ацил-КоА) для ацилирования гистоновых и негистоновых белков. Поскольку основная функция комплексов тесно связана с аэробным окислением глюкозы мозга, саморегуляция этого ключевого для метаболизма мозга процесса с помощью ацилирования белков может участвовать в поддержании гомеостаза при нарушениях метаболизма. Действительно, адаптивная роль ацилирования была выявлена в недавнем исследовании вызванного судорогами дисбаланса обмена веществ в мозге на крысиной модели эпилепсии [15].

В дополнение к реакциям, катализируемым дегидрогеназами 2-оксокислот, молекулы ацил-КоА могут быть синтезированы и в других метаболических путях, таких как окисление жирных кислот или метаболизм кетоновых тел. В частности, в некоторых экспериментальных системах в ацетилирование гистонов вовлечены ацетат-зависимая ацетил-КоА-синтетаза 2 (ACSS2) или цитрат-зависимая АТФ-цитратлиаза [16, 17]. Поскольку потоки субстратов по генерирующим ацил-КоА путям зависят от тканеспецифичного метаболизма и экспрессии белков, вклад отдельных метаболических путей в ацилирование белков может меняться. В частности, ацетил-КоА, образующийся при окислении жирных кислот в условиях голодания, вызывает чрезмерное

ацетилирование белков печени у мышей [18]. Ацетилирование белков увеличивается и в том случае, если стимулировать окисление жирных кислот в культивируемых фибробластах человека [18]. Однако в этих экспериментальных системах окисление жирных кислот и гипер-ацетилирование белков вызваны направленными изменениями метаболизма. Физиологический уровень ацетилирования белка, как и его изменения в ответ на другие нарушения, вполне может быть обеспечен другими источниками ацетил-КоА, такими как полиферментный комплекс пируватдегидрогеназы (ПДГ).

Ацилирование белков мозга представляет особый интерес в связи с изучением молекулярных механизмов памяти. Ацетилирование гистонов имеет важное значение для формирования памяти, поскольку и обучение, и запоминание требуют ремоделирования хроматина, которое зависит от ацетилирования гистонов [19]. Недавно выявленное снижение уровня сукцинирования митохондриальных белков в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) [20] подтверждает патологическое значение давно известного снижения активности продуцента сукцинил-КоА – комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ) в мозге таких пациентов [21].

Цель нашей работы – охарактеризовать влияние продуцируемого ПДГ ацетил-КоА на ацилирование белков коры головного мозга крысы в модели кратковременной пертурбации метаболизма. Такое нарушение метаболизма может возникнуть под влиянием факторов внешней среды или иных подобных воздействиях, активирующих физиологические механизмы поддержания гомеостаза. В данной работе в качестве такого воздействия использовано кратковременное обратимое ингибирование ПДГ [22–25]. Такая фармакологическая регуляция фермента имеет преимущества перед манипуляциями с экспрессией генов или синтезом белка, поскольку последние могут затрагивать не только конкретную биохимическую реакцию, но и важные для организации биосистем белок-белковые взаимодействия.

Ввиду строгой селективности ингибирующего действия использованных нами фосфонатового и фосфинового аналогов пирувата на ПДГ *in vivo* [22, 23] и значительно более высокой (порядка 100-кратной) ингибирующей способности фосфинатного аналога, по сравнению с фосфонатным [23–25], в нашей работе используются два синтетических аналога пирувата, представленные на рис. 1. Эти аналоги, ацетил(метил)фосфинат (АцМеФ) и метиловый эфир ацетилфосфоната (АцФМе),

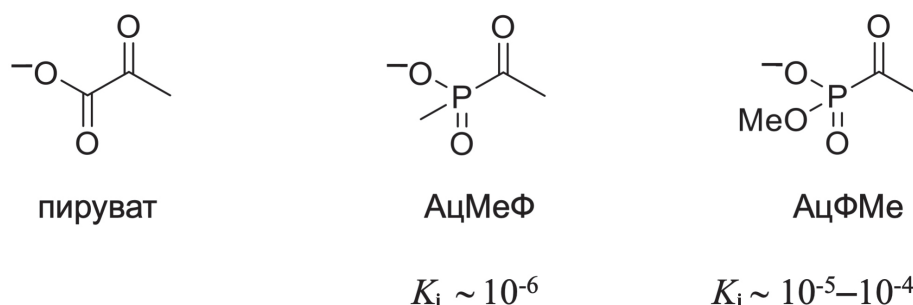


Рис. 1. Структуры пирувата (2-оксосустрата ПДГ) и его фосфинатного (АцМеФ) и фосфонатного (АцФМе) аналогов. Константы ингибирования (K_i) приведены по опубликованным результатам [23–25]

обладают сходными электростатическими и стерическими свойствами; таким образом, они не должны существенно отличаться по своей биодоступности. Следовательно, введение одной и той же дозы этих разных по силе ингибиторов должно моделировать различный уровень ингибирования ПДГ в головном мозге. Ввиду недавно охарактеризованной взаимозависимости различных типов ацилирования белка из-за перекрывающихся сайтов ацилирования и конкуренции между комплексами ПДГ и ОГДГ за их общий субстрат КоА [15], ингибирование ПДГ может оказывать не только прямое влияние на ацетилирование белков, но и косвенно влиять на другие типы ацилирования. В частности, ингибирование ПДГ может влиять на сукцинирование белков, поскольку существует тесная метаболическая связь между комплексами ПДГ и ОГДГ через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК): комплекс ПДГ поставляет ацетил-КоА в качестве субстрата ЦТК, а комплекс ОГДГ, продуцирующий сукцинил-КоА, лимитирует поток субстратов через ЦТК [25, 26]. Таким образом, в данной работе мы характеризуем ответ мозга на ингибирование ПДГ на уровне как ацетилирования, так и сукцинирования белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Натриевые соли АцМеФ и АцФМе синтезированы, как опубликовано ранее [24, 27], и их чистота была подтверждена методом ЯМР. В работе использованы буферы, соли и другие реагенты производства «Merck» (Германия) или наивысшей из доступных степени чистоты. Для приготовления растворов использовали деионизированную (MQ) воду. Используемые антитела указаны ниже в разделе, посвященном Вестерн-блоттингу.

Лабораторные животные. Самцы крыс линии Вистар ($n = 22$) приобретены в Государственном исследовательском центре

Российской Федерации Института медико-биологических проблем РАН (ИМБП). В эксперименте использованы крысы в возрасте 11–12 недель (массой 320 ± 30 г). Животных содержали при температуре 21 ± 2 °C и относительной влажности $53 \pm 5\%$ с 12/12-часовым циклом свет/темнота (свет включается в 9:00 = ZT 0 и выключается в 21:00 = ZT 12). Животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму для грызунов и водопроводной воде. Для содержания животных использованы стандартные клетки Т/4К (555/4К, $580 \times 375 \times 200$ мм), по 4–5 животных в каждой клетке.

Введение ингибиторов пируватдегидрогеназы. Интраназальное введение водного раствора натриевых солей АцФМе или АцМеФ (в дозе 0,1 ммоль/кг) проводили один раз утром в $10:00 \pm 1$ ч. Интраназальное введение является неинвазивным методом, обеспечивающим прямой (в обход гематоэнцефалического барьера) доступ к центральной нервной системе [28, 29]. Разделение животных на группы, получавшие физиологический раствор (0,9% NaCl; $n = 6$), АцФМе ($n = 8$) или АцМеФ ($n = 8$), является случайным. Через 24 ч после введения ингибиторов проведены физиологические тесты (процедуры описаны ниже) с последующей декапитацией на гильотине («OpenScience», Россия). Декапитация считается одним из наименее стрессовых методов эвтаназии молодых крыс [30–32]. Процедуру проводят в соответствии с рекомендуемыми протоколами [30–32]. После каждого использования гильотина тщательно промывается водой и этанолом, чтобы запах крови не вызывал стресса у экспериментальных крыс. Извлеченный мозг немедленно помещали в лед. Отделяемую в течение 60–90 с после декапитации кору головного мозга замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70 °C до проведения биохимических анализов.

Поведенческие тесты и ЭКГ. Оценку поведенческой активности проводили в тесте

«Открытое поле», как описано ранее [33]. Для тестирования использовали круглую полипропиленовую арену («OpenScience», Россия). Поведенческие параметры (время и количество актов груминга, время замираний, количество стоек и количество пересечений любого типа линий) определяли в качестве показателей тревожности, исследовательской и локомоторной активности [34, 35].

ЭКГ с использованием неинвазивных электродов регистрировали у бодрствующих животных в течение 3 мин, как описано ранее [33]. С помощью ЭКГ оценивают следующие параметры: средний интервал между сердечными сокращениями (интервал R-R, мс); стандартное отклонение средних значений интервала R-R (SD, мс); диапазон значений интервала R-R, т.е. разница между максимальными и минимальными значениями (dX, мс); среднеквадратичное значение последовательных отклонений в интервалах R-R (RMSSD, мс) и стресс-индекс (условные единицы).

Приготовление гомогенатов коры головного мозга крысы. Гомогенизацию ткани и обработку гомогенатов ультразвуком и детергентами проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [36].

Измерения активности ферментов. Активность малатдегидрогеназы (МДГ) измеряют, как описано ранее [37].

Анализ уровней и посттрансляционных модификаций белков в коре головного мозга с помощью Вестерн-блоттинга. Уровни белковой экспрессии SIRT3, SIRT5, α -ПДГ, фосфорилированной по Ser293 α -ПДГ и ацетилированных белков в коре головного мозга крыс определены методом Вестерн-блоттинга с использованием первичных антител («Cell Signaling Technology», США). Уровень сукцинирования белков определен с использованием антител («PTM Biolabs», США). Все первичные антитела использованы в разведениях 1:2000 с применением вторичных антител к кроличьим антигенам, конъюгированных с HRP («Имтек», Россия). Относительная количественная оценка хемилюминесценции проведена в программе ChemiDoc Imager («Bio-Rad», США) с использованием программного обеспечения Image Lab версии 6.0.1 («Bio-Rad»). Уровни иммунореактивности нормализованы на общий белок в соответствующих полосах геля с использованием количественного определения флуоресценции нанесенного на дорожку геля белка после взаимодействия с 2,2,2-трихлорэтанолом [38]. Общую интенсивность окрашивания определяли как интегральную интенсивность всего трека от конца геля до области

молекулярной массы белков 100 кДа. Полные изображения мембран, окрашенных антителами, и соответствующих гелей, окрашенных 2,2,2-трихлорэтанолом, используемых для нормировки на белок дорожки, приведены на Fig. S1 в Приложении.

Статистический анализ данных. Данные проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software Inc.», США). Все данные на графиках показаны в виде столбцов со средними значениями и стандартными ошибками среднего (SEM) с дополнительным приведением индивидуальных значений параметров для каждого животного. Корреляции между параметрами проанализированы с использованием метода Спирмена. Статистическая значимость различий при сравнении трех экспериментальных групп оценена с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием post-hoc-критерия Тьюки. Статистически значимые ($p \leq 0,05$) различия показаны на графиках. Статистическая значимость ($p \leq 0,05$) фактора обработки, согласно ANOVA и F-значения со степенями свободы, показана под графиками как F (DFn, DFd). Во всех этих случаях значения F превышают соответствующие критические значения, подтверждая значимость представленных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

АцМеФ уменьшает уровень ацетилирования основной белковой полосы 15 кДа, оказывая разные эффекты на ацетилирование белков головного мозга 30–50 кДа. Вестерн-блоттинг с антителами к ацетилированным белкам выявил основную полосу ацетилированных белков головного мозга в области 15 кДа (рис. 2, д). Значительная интенсивность этой полосы и сходство ее кажущейся молекулярной массы с таковой у коровых гистонов [3] позволяют предположить, что полоса содержит гистоновые белки мозга.

Чем сильнее ингибитор ПДГ, тем более выражены его эффекты на ацетилирование белков головного мозга. Действительно, введение АцМеФ ($K_i \sim 10^{-6}$ М) изменяет уровни ацетилирования во всех четырех количественно охарактеризованных полосах ацетилированных белков, в то время как обработка АцФМе ($K_i \sim 10^{-5}$ – 10^{-4} М) изменяет уровень ацетилирования только белковой полосы 31 кДа (рис. 2, б–в; верхняя часть). Примечательно, что АцМеФ оказывает противоположные эффекты на ацилирование белков с разными молекулярными массами. Так, аце-

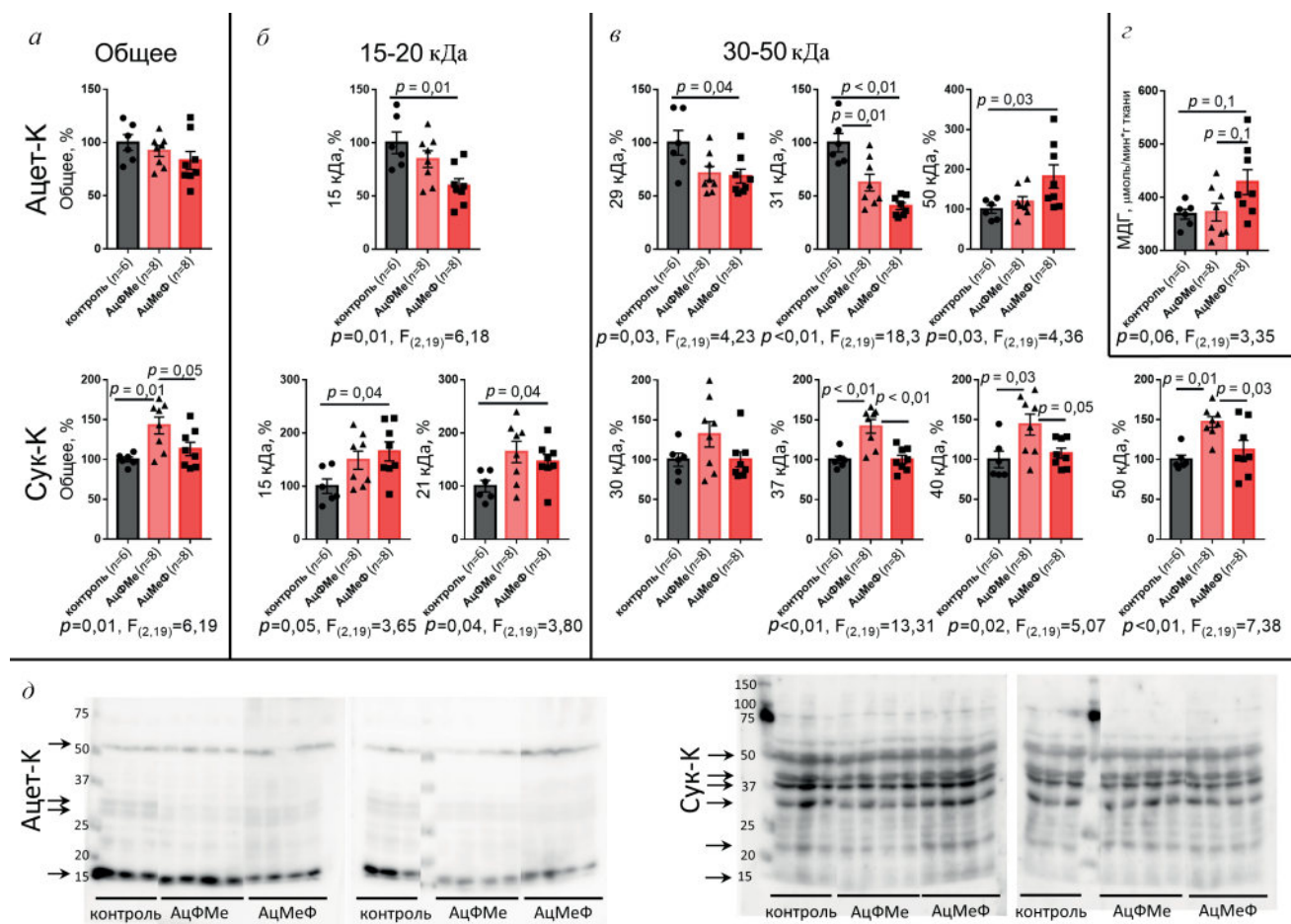


Рис. 2. Ацилирование белков в гомогенатах коры головного мозга через 24 ч после введения ингибиторов ПДГ. *а–в* – Ацетилирование и сукцинирование показаны в верхней и нижней частях рисунков. Интенсивность каждой полосы нормализовалась на общее содержание белка в дорожке и оценивалась относительно среднего значения нормализованной интенсивности полос в контрольной группе крыс, как описано в разделе «Материалы и методы». Значимость различий между группами на панелях (*а–г*) обозначена линиями с указанием *p*-значений над ними. Когда фактор обработки является значимым согласно анализу ANOVA, характеристические *p*- и *F*-значения приведены под графиками. *а* – Общее ацетилирование и сукцинирование белков. *б* – Изменения ацилирования низкомолекулярных белков (15–20 кДа). *в* – Изменения ацилирования белков 30–50 кДа. *г* – Влияние ингибиторов ПДГ на общую активность малакдегидрогеназы (МДГ) в гомогенатах коры головного мозга. *д* – Репрезентативные Вестерн-блоты ацетилированных (слева) и сукцинированных (справа) белков головного мозга, использованные для количественных оценок, представленных на панелях (*а–в*). Маркеры молекулярной массы приведены слева. Стрелками указаны полосы, использованные для количественного анализа. Здесь и далее одна панель образцов объединяет соответствующие части, вырезанные из одного блота, тогда как полные изображения мембран и соответствующих гелей, используемых для нормализации белка, показаны на Fig. S1 в Приложении

тирование белков с массами 15, 29, 31 кДа уменьшается после обработки АцМеФ, в то время как ацетилирование белков 50 кДа увеличивается (рис. 2, *б–в*; верхняя часть). В результате противоположных эффектов АцМеФ на ацетилирование разных белков и низкого вклада полосы 31 кДа, изменяющейся под действием АцФМе, в общую интенсивность суммарный уровень ацетилирования белков головного мозга не меняется после введения ни АцМеФ, ни АцФМе (рис. 2, *а*; верхняя часть).

Индуктированное АцМеФ увеличение ацетилирования белковой полосы 50 кДа согласуется с результатами функциональных тестов. Активность МДГ (36 кДа), для которой из-

вестно повышение при ацетилировании фермента [39], демонстрирует тенденцию ($p = 0,1$) к увеличению (рис. 2, *г*) одновременно с индуцированным АцМеФ увеличением ацетилирования метаболических белков (50 кДа; рис. 2, *в*; верхняя часть).

Сукцинирование и ацетилирование белков мозга меняются при ингибировании ПДГ по-разному. Снижение под действием АцМеФ уровня ацетилирования белков массой 15 кДа сопровождается увеличением уровня сукцинирования белков массой 15–20 кДа. При этом менее эффективный ингибитор АцФМе не влияет на уровень сукцинирования белков головного мозга с низкой молекулярной

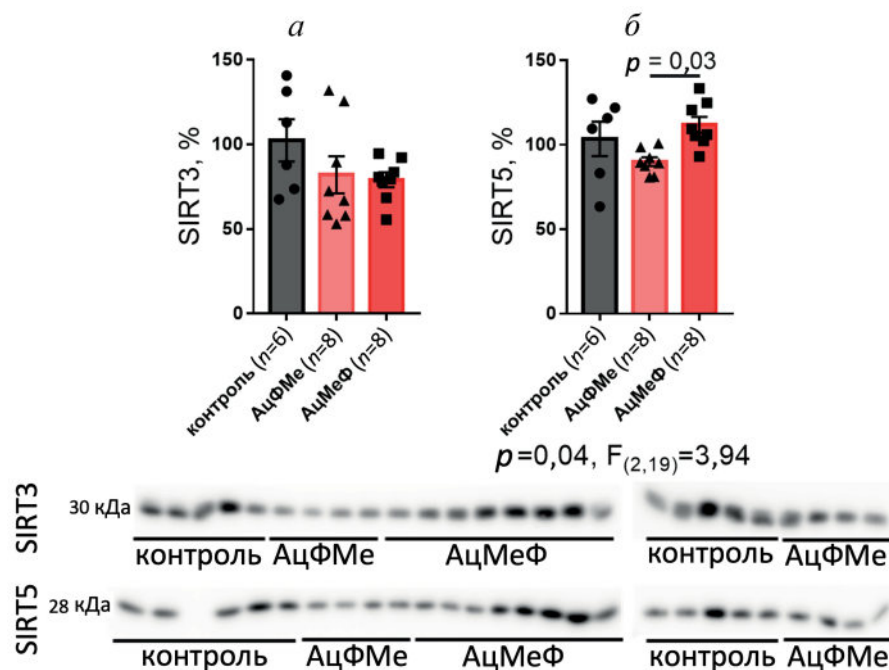


Рис. 3. Изменения уровней митохондриальной деацетилазы SIRT3 (а) и деацетилазы отрицательно заряженных ацильных групп SIRT5 (б) в гомогенатах коры головного мозга после введения ингибиторов ПДГ. Интенсивность каждого образца нормализована на содержание общего белка в дорожке и приведена в % к среднему значению такой интенсивности в контрольной группе крыс (см. раздел «Материалы и методы»). Репрезентативные Вестерн-блоты, использованные для количественной оценки, показаны под графиками. Различия между группами и соответствующие им *p*-значения показаны на графиках линиями. При значимости фактора обработки согласно анализу ANOVA, под графиками приведены характеристические *p*- и *F*-значения

массой (рис. 2, а–в; нижняя часть). Иная ситуация наблюдается для сукцинирования белков головного мозга массой 30–50 кДа. Сукцинирование этих белковых полос значительно увеличивается при воздействии менее эффективного ингибитора ПДГ – АцФМе, но не изменяется под действием сильного ингибитора АцМеФ (рис. 2, а–в; нижняя часть). Поскольку белки с массой 30–50 кДа представляют собой наибольшую часть сукцинированных белков, общий уровень сукцинирования также увеличивается под действием АцФМе, в отличие от АцМеФ.

Таким образом, сильный ингибитор ПДГ АцМеФ действует по-разному не только на ацилирование белков с разной молекулярной массой, но и на различные типы ацилирования. Вызванное АцМеФ снижение ацетилирования белков с кажущейся молекулярной массой, близкой к молекулярной массе коровых гистонов (15–20 кДа), сопровождается повышенным уровнем сукцинирования этих белков, тогда как на сукцинирование метаболитических белков (30–50 кДа) АцМеФ не влияет.

Экспрессия митохондриальной деацетилазы SIRT3 и десукцинилазы SIRT5 после ингибирования ПДГ. Принимая во внимание изменения в уровне ацетилирования и сукцинирования белков мозга под действием ингибиторов

ПДГ (рис. 2), мы оценили уровни экспрессии соответствующих митохондриальных деацетилаз мозга: деацетилазы сиртуина 3 (SIRT3) и десукцинилазы сиртуина 5 (SIRT5) (рис. 3). Ингибиторы ПДГ не индуцируют существенных изменений в уровнях SIRT3 или SIRT5 по сравнению с контрольными животными, однако уровень SIRT5 значительно повышается после воздействия АцМеФ по сравнению с АцФМе (рис. 3). Получавшие АцМеФ и АцФМе животные также существенно различались по уровням сукцинирования белковых полос в интервале масс 37–50 кДа (рис. 2, в; нижняя часть). Таким образом, умеренное ингибирование ПДГ при действии АцФМе не влияет на уровни SIRT3 и SIRT5 (рис. 3), но увеличивает сукцинирование белков массой 37–50 кДа по сравнению с контрольными и получившими АцМеФ животными (рис. 2, в). При более сильном ингибировании ПДГ у животных, получавших АцМеФ, по сравнению с получавшими АцФМе животными повышается экспрессия десукцинилазы SIRT5 (рис. 3, б), что согласуется с отсутствием роста сукцинирования белков массой 37–50 кДа у этой группы по сравнению с контролем, в отличие от обработанной АцФМе группы (рис. 2, в).

Комплементарные изменения экспрессии SIRT5 и сукцинирования белков при

ингибировании ПДГ показывают критическую роль SIRT5 в поддержании уровня сукцинирования белков. Контроль сукцинирования за счет экспрессии SIRT5 согласуется с существованием отрицательной корреляции между уровнем сукцинирования белков мозга и уровнем десукцилиназы SIRT5 в мозге (табл. 1). Напротив, отрицательной корреляции между уровнем ацетилирования белков и уровнем митохондриальной деацетилазы SIRT3 не выявлено. Вместо этого и общее ацетилирование, и ацетилирование белков массой 15 кДа положительно коррелируют с уровнем SIRT3 (табл. 1). Таким образом, взаимосвязи между белковым ацетилированием и экспрессией деацетилаз могут быть сложнее, чем взаимосвязи между белковым сукцинированием и экспрессией десукцилиназ. По-видимому, это связано с существенно большим количеством метаболических путей, генерирую-

щих и утилизирующих ацетильные остатки по сравнению с теми, что участвуют в генерации и утилизации сукцинильных остатков.

С другой стороны, уровень сукцинирования белков массой 30 кДа положительно коррелирует с уровнем деацетилазы SIRT3 в мозге (табл. 1). Это наблюдение свидетельствует о конкурентных отношениях между ацетилированием и сукцинированием данных белков. По-видимому, деацетилирование лизинов под действием SIRT3 может увеличивать их доступность для сукцинирования.

Экспрессия альфа-субъединицы ПДГ и степень ее фосфорилирования по Ser293 после ингибирования ПДГ. Экспрессия ПДГ и регуляция фермента фосфорилированием могут участвовать в компенсаторном ответе на ингибирование ПДГ, поскольку физиологические уровни активности ПДГ контролируются системой (де)фосфорилирования фермента. Фосфорилирование ПДГ по Ser293 киназой ПДГ инактивирует фермент, в то время как дефосфорилирование фосфатазой ПДГ увеличивает активность. Как видно из рис. 4, экспрессия кодируемой *PDHA* альфа-субъединицы ПДГ в мозге и фосфорилирование ее Ser293 достоверно не изменяются после введения ингибиторов ПДГ по сравнению с контролем. Дисперсионный анализ ANOVA показывает влияние ингибирования на фосфорилирование Ser293 (рис. 4, б), однако достоверной разницы между тремя исследованными группами не выявлено. Не отличаются эти группы животных и по отношению фосфорилированной субъединицы к общей экспрессии α -ПДГ (рис. 4, в), что свидетельствует о пропорциональном изменении обоих параметров без изменения уровня фосфорилирования белка. Таким образом, ингибирование ПДГ, изменяющее ацетилирование и сукцинирование белков мозга (рис. 2 и 3), не вызывает компенсаторного повышения активности ПДГ посредством дефосфорилирования фермента (рис. 4).

Корреляционный анализ уровня ацетилирования белков головного мозга и экспрессии субъединицы α -ПДГ (скорость-лимитирующего компонента ПДГ-комплекса), определенных у животных всех исследованных групп, показал, что экспрессия α -ПДГ коррелирует положительно с ацетилированием белков массой 50 кДа и отрицательно — с ацетилированием белков массой около 30 кДа (табл. 2). Такой результат корреляционного анализа соответствует противоположным изменениям средних уровней ацетилирования этих белков при действии ингибиторов ПДГ (рис. 2). Уровень фосфорилированной α -ПДГ (α -ПДГ-Ф) положительно

Таблица 1. Корреляции Спирмена между ацилированием различных белков и экспрессией SIRT3 и SIRT5

Белки	SIRT3		SIRT5	
	R_s	p	R_s	p
Ац-К Общее	0,45	0,04	0,15	0,51
Ац-К 15 кДа	0,55	0,01	0,03	0,90
Ац-К 29 кДа	−0,02	0,92	−0,26	0,24
Ац-К 31 кДа	−0,11	0,63	−0,35	0,11
Ац-К 50 кДа	−0,02	0,92	0,21	0,34
Сук-К Общее	0,12	0,6	−0,33	0,13
Сук-К 50 кДа	−0,03	0,89	−0,5	0,02
Сук-К 40 кДа	0,30	0,18	−0,37	0,09
Сук-К 37 кДа	0,20	0,36	−0,67	0,00
Сук-К 30 кДа	0,39	0,07	−0,21	0,34
Сук-К 21 кДа	0,11	0,62	0,05	0,84
Сук-К 15 кДа	−0,18	0,43	0,17	0,44

Примечание. Корреляции определены с использованием параметров исследованных животных всех групп ($n = 22$). Ац-К — Ацетилированные лизиновые остатки белков; Сук-К — сукцинированные лизиновые остатки белков; R_s — коэффициент корреляции; SIRT3 — митохондриальная деацетилаза; и SIRT5 — десукцилиназа; p — значимость корреляции. Статистически значимые ($p < 0,05$) положительные или отрицательные корреляции окрашены в красный или синий цвета соответственно и выделены жирным шрифтом; тенденции ($0,05 < p < 0,1$) выделены жирным курсивом.

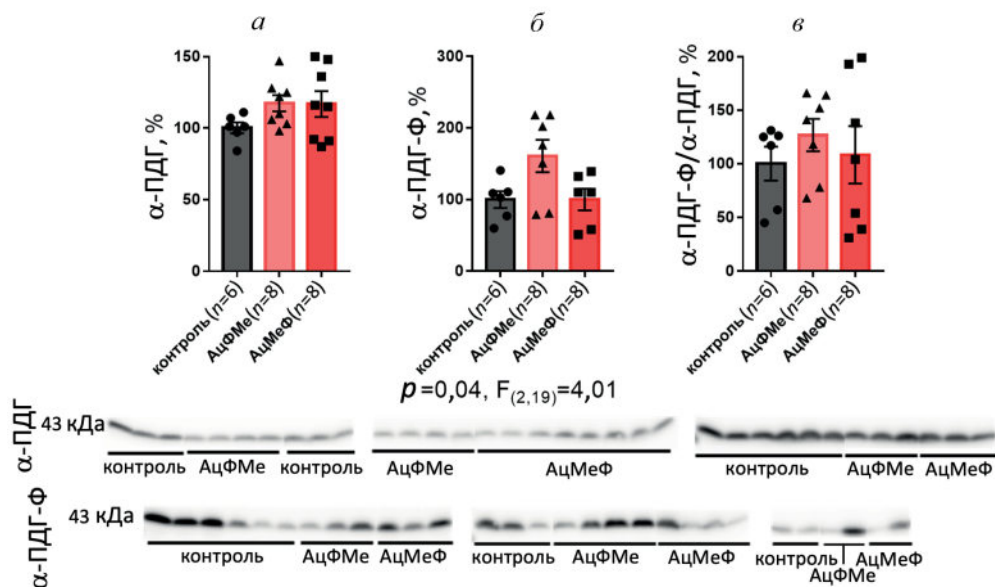


Рис. 4. Регуляция экспрессии и фосфорилирования α -ПДГ в гомогенатах коры головного мозга при введении ингибиторов ПДГ. *a* – Уровень альфа-субъединицы ПДГ (α -ПДГ); *б* – уровень α -ПДГ, фосфорилированной по Ser293 (α -ПДГ-Ф); *в* – отношение между фосфорилированной и общей α -ПДГ. α -ПДГ и ее фосфорилирование определяли по Вестерн-блотам, показанным под графиками. Интенсивность каждой полосы нормализована на общий белок дорожки и представлена в % от среднего значения нормализованной на белок интенсивности в контрольной группе крыс (см. раздел «Материалы и методы»). В случае статистической значимости фактора обработки согласно анализу ANOVA, характеристические p - и F -значения приведены под графиками

Таблица 2. Корреляции Спирмена между ацетилированием или сукцинированием белков и экспрессией α -ПДГ, ее фосфорилированием по Ser293 и отношением фосфорилированной формы к общей экспрессии α -ПДГ

Белки	α -ПДГ		α -ПДГ-Ф		α -ПДГ-Ф/ α -ПДГ	
	R_s	p	R_s	p	R_s	p
Ац-К Общее	0,11	0,64	0,03	0,90	0,04	0,87
Ац-К 15 кДа	0,03	0,88	0,02	0,92	0,01	0,96
Ац-К 29 кДа	−0,60	0,00	−0,01	0,95	0,30	0,18
Ац-К 31 кДа	−0,52	0,01	−0,17	0,46	0,15	0,52
Ац-К 50 кДа	0,58	0,00	0,01	0,97	−0,21	0,35
Сук-К Общее	−0,02	0,91	0,47	0,03	0,25	0,26
Сук-К 50 кДа	−0,02	0,94	0,50	0,02	0,26	0,23
Сук-К 40 кДа	0,06	0,77	0,44	0,04	0,24	0,29
Сук-К 37 кДа	0,03	0,89	0,54	0,01	0,34	0,12
Сук-К 30 кДа	−0,14	0,53	0,27	0,22	0,13	0,56
Сук-К 21 кДа	0,14	0,54	0,14	0,53	−0,10	0,67
Сук-К 15 кДа	0,01	0,96	0,15	0,52	−0,10	0,64

Примечание. Уровни белковой экспрессии и ацилирования определяли с помощью Вестерн-блоттинга, как описано в разделе «Материалы и методы». Ац-К – Ацетилирование; Сук-К – сукцинированные лизинозные остатки белков; α -ПДГ-Ф – фосфорилирование субъединицы по Ser293; R_s – коэффициент корреляции Спирмена; p – статистическая значимость корреляций. Статистически значимые ($p < 0,05$) положительные или отрицательные корреляции выделены жирным шрифтом и окрашены в красный или синий цвета соответственно.

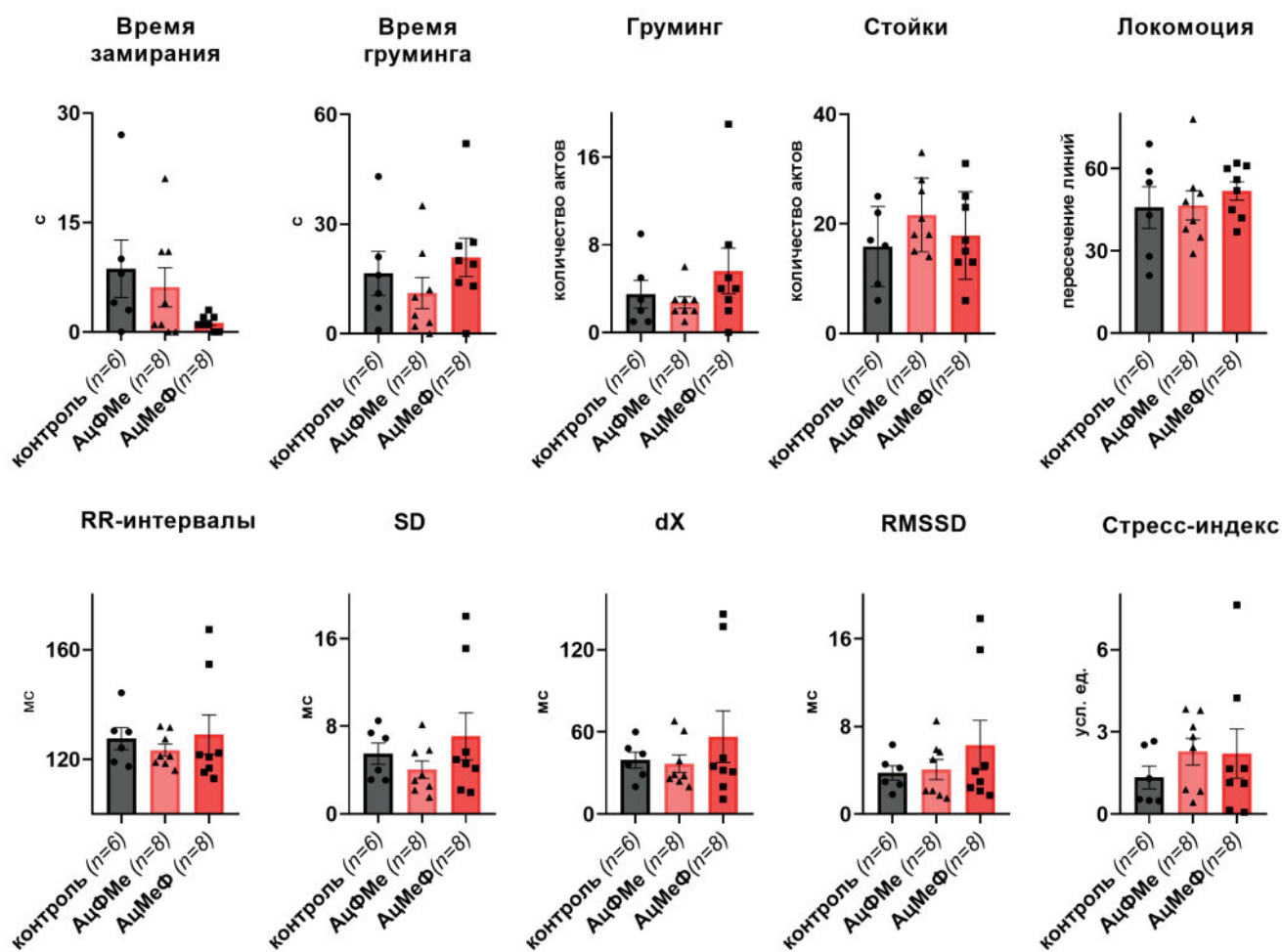


Рис. 5. Параметры поведения и ЭКГ через 24 ч после введения ингибиторов ПДГ. Время замирания, время груминга, количество актов груминга, стоек и локомоции определены в тесте «Открытое поле», как описано в «Материалах и методах». Длина интервала R-R (мс), стандартное отклонение средних значений интервала R-R (SD, мс), показатель вариабельности сердечного ритма dX, парасимпатический (релаксационный) RMSSD индекс и стресс-индекс симпатической регуляции определены по ЭКГ, как описано в разделе «Материалы и методы»

коррелирует с уровнем сукцинирования метаболических белков (табл. 2; Сук-К 37–50 кДа). Таким образом, когда активность ПДГ-комплекса снижена в результате ее фосфорилирования или действия ингибитора АцФМе (рис. 2, б–в; нижняя часть), сукцинирование метаболических белков увеличивается.

Физиологические параметры экспериментальных животных не изменяются под действием ингибиторов ПДГ. Для определения потенциальных эффектов ингибиторов ПДГ на физиологическое состояние оценивали поведение животных в тесте «Открытое поле» (рис. 5, верхняя часть) и параметры неинвазивной ЭКГ (рис. 5, нижняя часть). Отсутствие существенных изменений данных параметров у животных после введения АцМеФ или АцФМе по сравнению с контрольной группой показывает, что биохимические изменения в мозге отражают адаптационный ответ, поддерживающий постоянство физиологических параметров

экспериментальных животных на контрольном уровне. Однако следует отметить, что при отсутствии существенных изменений в средних по выборке значениях физиологических параметров внутригрупповые различия между отдельными животными могут значительно изменяться под действием ингибиторов ПДГ. Например, у крыс, получавших сильный ингибитор ПДГ АцМеФ, наблюдается снижение вариабельности такого параметра как продолжительность замирания, а вариабельность параметров ЭКГ возрастает по сравнению с контрольными крысами, тогда как слабый ингибитор АцФМе не оказывает такого действия (рис. 5).

Важность изученных компонентов системы ацилирования мозга для физиологии очевидна из ряда значимых корреляций с параметрами поведения (табл. 3) и ЭКГ (табл. 4). Так, экспрессия SIRT5 демонстрирует положительную корреляцию со временем замирания; количество стоек положительно коррелирует

Таблица 3. Корреляции Спирмена между компонентами системы ацилирования мозга и параметрами поведения

Компоненты	Длительность замирания		Длительность груминга		Акты груминга		Стойки		Локомоция	
	R_s	p	R_s	p	R_s	p	R_s	p	R_s	p
SIRT3	–0,05	0,83	–0,29	0,18	–0,20	0,37	0,01	0,98	–0,22	0,33
SIRT5	0,41	0,06	0,22	0,33	0,11	0,61	–0,17	0,44	0,20	0,37
Ац-К Общее	0,12	0,58	–0,06	0,79	–0,49	0,02	–0,03	0,90	–0,26	0,24
Ац-К 15 кДа	–0,02	0,94	–0,22	0,33	–0,38	0,08	0,01	0,97	–0,37	0,09
Ац-К 29 кДа	0,07	0,75	0,14	0,54	0,05	0,81	0,19	0,39	0,24	0,29
Ац-К 31 кДа	–0,03	0,88	–0,01	0,97	–0,07	0,76	0,10	0,67	0,09	0,69
Ац-К 50 кДа	0,12	0,58	0,29	0,19	–0,26	0,24	–0,16	0,47	–0,16	0,47
Сук-К Общее	–0,13	0,56	–0,30	0,18	0,07	0,76	0,43	0,05	–0,01	0,97
Сук-К 50 кДа	–0,17	0,46	–0,17	0,44	0,15	0,50	0,31	0,17	–0,04	0,87
Сук-К 40 кДа	–0,10	0,67	–0,33	0,13	–0,13	0,55	0,38	0,08	0,01	0,96
Сук-К 37 кДа	–0,25	0,27	–0,35	0,11	–0,03	0,89	0,30	0,18	–0,18	0,42
Сук-К 30 кДа	–0,04	0,85	–0,12	0,59	0,07	0,77	0,37	0,09	–0,01	0,96
Сук-К 21 кДа	–0,27	0,23	–0,29	0,20	0,11	0,62	0,41	0,06	0,06	0,79
Сук-К 15 кДа	–0,14	0,52	–0,04	0,87	0,37	0,09	0,15	0,50	0,09	0,68
α -ПДГ	–0,14	0,55	0,09	0,69	–0,40	0,07	–0,01	0,95	–0,41	0,06
α -ПДГ-Ф	–0,12	0,61	–0,14	0,52	0,07	0,75	0,00	0,98	–0,16	0,47
α -ПДГ-Ф/ α -ПДГ	0,05	0,84	–0,21	0,35	0,11	0,61	0,04	0,87	0,11	0,62
МДГ	–0,02	0,94	0,19	0,40	0,44	0,04	0,08	0,74	0,39	0,07

Примечание. R_s – Коэффициенты корреляций Спирмена; p – статистическая значимость корреляций. Статистически значимые ($p < 0,05$) положительные или отрицательные корреляции окрашены в красный или синий цвета соответственно и выделены жирным шрифтом; тенденции ($0,05 < p < 0,1$) выделены жирным курсивом. Принятые сокращения даны в Примечании к табл. 2.

с сукцинированием белков мозга, в то время как количество актов груминга и в меньшей степени локомоторная активность связаны с ацетилированием белков мозга и экспрессией α -ПДГ (табл. 3).

Среди компонентов системы ацилирования мозга, коррелирующих с параметрами ЭКГ, ацетилирование белков с молекулярной массой 29 кДа демонстрирует сильную положительную корреляцию с частотой сердечных сокращений и вариабельностью сердечного ритма, коррелируя отрицательно со стресс-индексом, характеризующим симпатическую активность. Индекс парасимпатической (релаксационной)

активности (RMSSD) имеет тенденцию к отрицательной корреляции с уровнем деацетилазы SIRT3 (табл. 4). Таким образом, получены взаимодополняющие результаты о том, что релаксация падает с ростом деацетилирования митохондриальных белков, а стресс падает с ростом ацетилирования белков 29 кДа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При помощи фармакологического ингибирования ПДГ фосфинатным и фосфонатным аналогами пирувата мы определили связь между

Таблица 4. Корреляции Спирмена между компонентами системы ацилирования головного мозга и параметрами ЭКГ

Компоненты	Интервалы R-R		SD		dX		RMSSD		Стресс-индекс	
	R_s	p	R_s	p	R_s	p	R_s	p	R_s	p
SIRT3	−0,06	0,79	−0,27	0,23	−0,04	0,87	−0,36	0,10	0,20	0,38
SIRT5	−0,07	0,76	−0,03	0,91	−0,12	0,60	−0,06	0,79	0,12	0,60
Ац-К Общее	0,10	0,65	0,00	0,99	0,14	0,54	−0,09	0,68	−0,08	0,73
Ац-К 15 кДа	0,06	0,77	−0,12	0,58	0,07	0,77	−0,20	0,38	0,02	0,92
Ац-К 29 кДа	0,58	0,00	0,49	0,02	0,46	0,03	0,25	0,27	−0,50	0,02
Ац-К 31 кДа	0,29	0,18	0,29	0,20	0,17	0,44	0,11	0,63	−0,30	0,18
Ац-К 50 кДа	−0,29	0,19	−0,11	0,63	−0,19	0,40	0,02	0,94	0,19	0,40
Сук-К Общее	0,05	0,84	−0,06	0,79	0,25	0,27	0,02	0,91	−0,01	0,97
Сук-К 50 кДа	0,05	0,84	−0,04	0,87	0,16	0,48	0,05	0,84	0,00	0,99
Сук-К 40 кДа	0,10	0,67	−0,12	0,60	0,18	0,41	−0,11	0,64	0,03	0,89
Сук-К 37 кДа	−0,05	0,84	−0,29	0,19	−0,02	0,94	−0,18	0,43	0,19	0,39
Сук-К 30 кДа	0,21	0,35	−0,02	0,92	0,34	0,12	0,05	0,84	−0,07	0,77
Сук-К 21 кДа	−0,17	0,44	−0,27	0,23	−0,02	0,92	−0,15	0,49	0,23	0,30
Сук-К 15 кДа	−0,13	0,55	−0,01	0,95	0,14	0,55	0,12	0,60	0,03	0,89
α -ПДГ	−0,34	0,12	−0,24	0,27	−0,21	0,34	−0,22	0,33	0,25	0,26
α -ПДГ-Ф	−0,08	0,73	−0,03	0,90	0,12	0,60	0,24	0,29	−0,03	0,90
α -ПДГ-Ф/ α -ПДГ	0,01	0,97	0,03	0,89	0,08	0,73	0,20	0,38	−0,10	0,66
МДГ	−0,03	0,90	0,12	0,58	0,10	0,67	−0,11	0,63	−0,07	0,75

Примечание. Расшифровка параметров ЭКГ приводится в подписи к рис. 5 и в разделе «Материалы и методы». R_s – Коэффициенты корреляций Спирмена; p – статистическая значимость корреляций. Статистически значимые ($p < 0,05$) положительные или отрицательные корреляции окрашены в красный или синий цвета соответственно и выделены жирным шрифтом; тенденции ($0,05 < p < 0,1$) выделены жирным курсивом. Принятые сокращения даны в Примечании к табл. 2.

катализируемой ПДГ реакцией и ацилированием белков мозга. Согласно охарактеризованной ранее [23–25] эффективности действия данных ингибиторов ПДГ, введение животным одной и той же дозы АцМеФ и АцФМе должно приводить к различным уровням ингибирования фермента *in vivo*. Определенная нами иерархичность ответа системы ацилирования мозга на введение этих ингибиторов ПДГ хорошо согласуется с разными уровнями ингибирования фермента (рис. 6). При умеренном уровне ингибирования ПДГ (рис. 6, а) ацетилирование значимо уменьшается только для белков массой 31 кДа, но значительно растет сукцинили-

рование белков головного мозга. При сильном ингибировании ПДГ (рис. 6, б) значительно уменьшается ацетилирование основной полосы белкового ацетилирования, молекулярная масса которой (15 кДа) соответствует массе гистонов, а сукцинирование этих белков увеличивается. Для белков с другими молекулярными массами при сильном ингибировании ПДГ наблюдается как уменьшение (29 и 31 кДа), так и увеличение (50 кДа) ацетилирования. При этом уровень сукцинирования этих негистоновых белков не меняется, а экспрессия десукцинилазы SIRT5 растет (рис. 3). Наблюдаемые изменения системы ацилирования мозга в ответ

на ингибирование ПДГ согласуются с ядерной локализацией гистонов (15 кДа), вовлекаемых в транскрипционную регуляцию при сильном ингибировании ПДГ и митохондриальной/цитоплазматической локализацией других белков (30–50 кДа), реагирующих на умеренный уровень ингибирования ПДГ (рис. 6). Примечательно, что в независимом исследовании с использованием специфических антител к белкам разной внутриклеточной локализации и ингибирования ПДГ за счет нарушенного липоилирования ПДГ-комплекса были также показаны различия в изменении ацетилирования белков в зависимости от их локализации [40].

Повышенное сукцинирование белков головного мозга с кажущейся молекулярной массой, соответствующей гистонам (15–20 кДа) (рис. 2, б), совпадает с повышенной экспрессией десукцинилазы SIRT5 (рис. 3, б). Такие сопряженные изменения могут быть следствием ожидаемой активации транскрипции при сукцинировании гистонов, меняющим заряд лизиновых остатков гистонов с положительного на отрицательный. Тот факт, что повышенная экспрессия десукцинилазы метаболических белков (SIRT5) уменьшает сукцинирование негистоновых белков (30–50 кДа, рис. 2), но не белков массой 15 кДа, свидетельствует в пользу

локализации этих белков вне и внутри ядра соответственно, поскольку SIRT5 предназначен для десукцинирования негистоновых белков, тогда как деацетилазы гистонов являются ферментами другого типа.

Результаты данного исследования указывают на отсутствие однонаправленного ответа ацетилирования всех белков мозга на изменения функций ПДГ (продуцента ацетильных остатков) и SIRT3 (деацетилазы). В частности, повышенное ацетилирование белков головного мозга с кажущейся молекулярной массой, соответствующей массе гистонов (15 кДа), положительно коррелирует с уровнями митохондриального SIRT3, что может свидетельствовать о вкладе ацетилирования митохондриальных белков в ретроградную передачу сигнала от митохондрий к ядру (рис. 6). Напротив, экспрессия α -ПДГ положительно коррелирует с уровнем ацетилирования негистоновых белков, молекулярная масса которых (50 кДа) соответствует массе тубулина. С другой стороны, ацетилирование белков с массой около 30 кДа с уровнем α -ПДГ коррелирует отрицательно. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что функция ПДГ по-разному контролирует ацетилирование конкретных белков мозга.

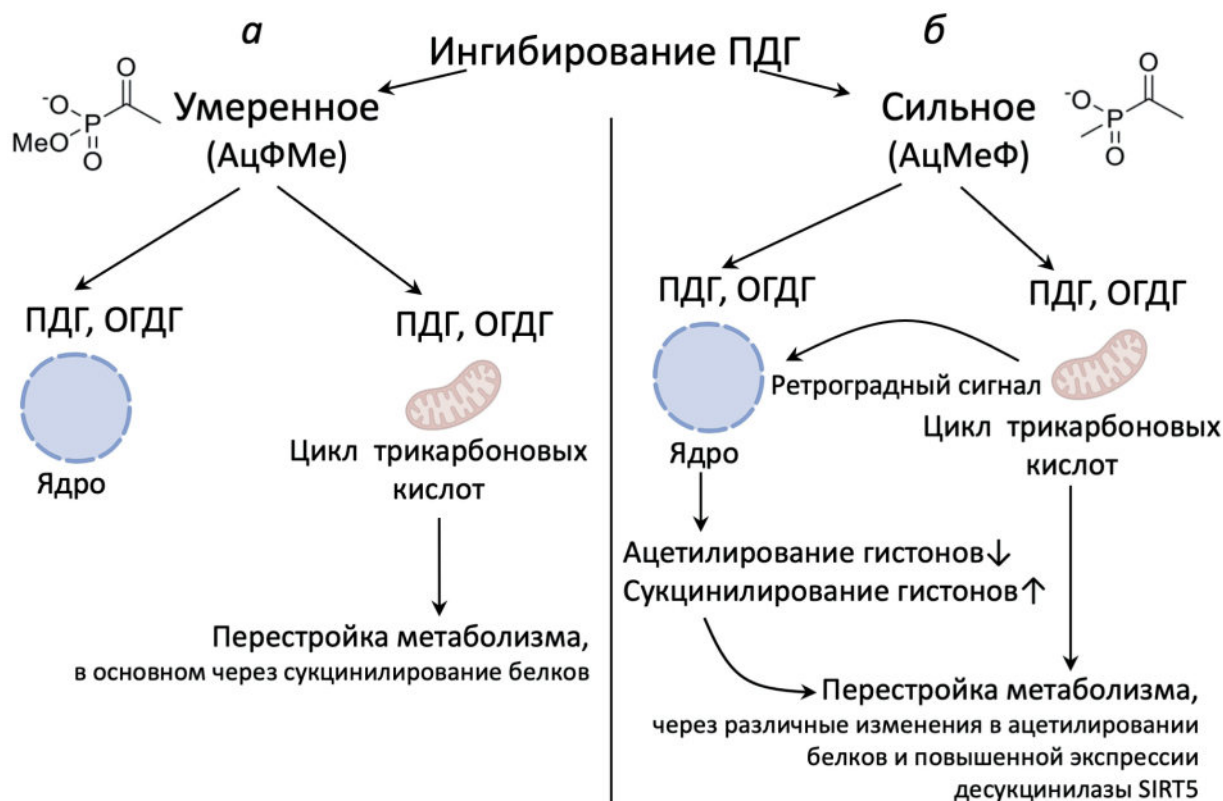


Рис. 6. Схема предполагаемых механизмов адаптационной перестройки метаболизма мозга через ацилирование белков, изменяющееся под действием ингибиторов ПДГ АцФМе (а) и АцМеФ (б). Указаны известные локализации полиферментных комплексов пируватдегидрогеназы (ПДГ) и 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ) в митохондриях и ядре

Одной из особенностей этой сложной системы является сильная взаимозависимость различных типов ацилирования белка. Результаты протеомных исследований, хранящиеся в базах данных (например, PhosphoSite [41]), показывают, что во многих случаях одни и те же остатки лизина могут подвергаться различным типам ацилирования. Вероятная конкуренция различных типов ацилирования за реакционноспособные белковые остатки лизина может приводить к тому, что сукцинилирование некоторых остатков увеличивается, когда их ацетилирование — уменьшается. Такая конкуренция может объяснять наблюдаемую нами положительную корреляцию сукцинилирования белков массой 30 кДа с уровнем деацетилазы SIRT3 в мозге (табл. 1) и аналогичные результаты недавнего масс-спектрометрического исследования белкового ацилирования на крысиной модели эпилепсии [15]. Конкуренция комплексов ПДГ и ОГДГ за их субстрат КоА, который является предшественником ацилирующих белки производных КоА, может также вносить вклад в конкуренцию между разными типами ацилирования белков. Так, повышение доступности свободного КоА за счет уменьшения выработки ацетил-КоА заингибированным комплексом ПДГ может стимулировать выработку сукцинил-КоА комплексом ОГДГ.

С другой стороны, как в данной работе (табл. 1), так и в недавнем исследовании модели эпилепсии у крыс [15] уровни ацетилирования белков коррелируют с уровнями деацетилаз SIRT3 и SIRT2 положительно. Это указывает на отсутствие прямого контроля состояния ацетилирования клеточных белков за счет экспрессии деацетилаз. Возможно, взаимные отношения между деацетилазами и уровнем белкового ацетилирования неоднозначны из-за различных источников и мишеней ацетилирования белков. Напротив, сукцинилирование негистоновых белков коррелирует с экспрессией десукцинилазы метаболических белков (SIRT5) отрицательно, что соответствует непосредственному контролю уровня сукцинилирования с помощью экспрессии десукцинилазы. Таким образом, факторы конкуренции и специфическая регуляция источников и мишеней ацилирования могут обусловить наблюдаемые взаимные влияния процессов ацетилирования и сукцинилирования белков мозга, продемонстрированные при специфическом ингибировании ПДГ.

Фосфорилирование α -ПДГ не претерпевает существенных изменений в ответ на кратковременное действие ингибиторов ПДГ. Действительно, известно, что фосфорилирование α -ПДГ реагирует на гормональный фон [42–

45], который, по-видимому, не нарушен в наших экспериментальных условиях. В результате адаптационный ответ на кратковременное ингибирование ПДГ поддерживается взаимосвязанными реакциями ацилирования, а не фосфорилированием α -ПДГ. Тем не менее уровень фосфорилированной (неактивной) α -ПДГ положительно коррелирует с сукцинилированием негистоновых белков (табл. 2), что хорошо соответствует росту сукцинилирования при фармакологическом ингибировании ПДГ. Корреляция может отражать известное участие фосфорилирования α -ПДГ в метаболическом переключении потоков субстратов между циклом трикарбоновых кислот, генерирующим сукцинил-КоА, и гликолизом [46–48]. Механизм такого переключения может включать образование комплекса между фосфорилированной α -ПДГ и пируваткиназой 2М, выступающего в качестве регулятора транскрипции [44]. Схожее транскрипционное действие известно для ОГДГ в комплексе с ацетил-КоА-ацилтрансферазой 2, связывание которой с ДНК контролирует ацилирование гистонов [12]. Исследования ацилирования белков мозга указывают, что формирование памяти и ее возрастные или патологические нарушения зависят не только от давно известного ацетилирования [17, 49–51], но и от сукцинилирования гистонов [12]. Нарушение сукцинилирования негистоновых белков головного мозга является характерной чертой мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [21], для которого давно известно снижение активности комплекса ОГДГ — продуцента сукцинил-КоА [20].

Наши результаты показывают иерархию изменений ацетилирования и сукцинилирования белков, направленных на поддержание стабильности физиологических параметров в условиях метаболического стресса. Умеренный ингибитор ПДГ АцФМе изменяет ацилирование белков массой 30–50 кДа, а ацилирование белков массой 15–20 кДа изменяется под действием сильного ингибитора АцМеФ (рис. 2). Мы предполагаем, что такая последовательность событий указывает на два уровня системного ответа мозга на ингибирование ПДГ. В первую очередь реагирует система ацилирования метаболических белков, а далее наблюдается регуляция транскрипции за счет ацилирования гистонов (рис. 6).

Корреляции между различными компонентами системы ацилирования белков головного мозга и физиологическими параметрами (табл. 3 и 4) раскрывают физиологическое значение ацилирования белков — тему, которая еще очень мало разработана. В частности,

отрицательные корреляции между SIRT3 в мозге и RMSSD ЭКГ, а также между уровнем ацетилирования белков 29 кДа мозга и стресс-индексом ЭКГ (табл. 4) указывают на связь баланса парасимпатической (релаксационной) и симпатической (стрессорной) вегетативной регуляции с уровнем ацетилирования белков головного мозга. Эта взаимосвязь может быть обусловлена тем фактом, что более высокий «потенциал ацетилирования» может отражать повышенный биосинтез ацетил-КоА, который является субстратом для биосинтеза нейромедиатора парасимпатической нервной системы ацетилхолина. Известно, что баланс контролирующей стресс симпатической и парасимпатической систем находится в сложной взаимосвязи с формированием памяти [52], причем при определенных условиях стресс может улучшать память [53]. В этой связи обнаруженные нами корреляции между активностью парасимпатической системы и ацетилированием белков мозга могут указывать на зависимость памяти и когнитивных функций от ацилирования белков мозга. Дальнейшая идентификация специфических белков в составе белковых полос, ацилирование которых изменяется в ответ на ингибиторы ПДГ и коррелирует с физиологическими параметрами, может способствовать определению специфических компонентов системы ацилирования мозга, важных для контролируемых ацилированием белков мозга физиологических процессов. Эти компоненты могут участвовать и в нарушениях регуляции системы ацилирования при заболеваниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усиление ингибирования комплекса ПДГ в головном мозге уменьшает ацетилирование и увеличивает сукцинирование белков массой 15 кДа, в то время как влияние ингибиторов ПДГ на ацилирование белков головного мозга

массой 30–50 кДа неоднозначно. В отличие от ацилирования белков мозга, фосфорилирование ПДГ существенно не изменяется после 24-часового воздействия ингибиторов ПДГ. Таким образом, изменение ацилирования белков головного мозга представляет собой кратковременный ответ на ингибирование ПДГ, который может обеспечивать адаптацию организма к метаболическому стрессу и участвовать в механизмах развития патологий.

Вклад авторов. ВАА изучал белковое ацилирование, проводил анализ и визуализацию биохимических экспериментов; ДАС выполняла животные эксперименты и изучала экспрессию и фосфорилирование α -ПДГ; АВК предоставил аналоги пирувата; АВГ руководила работой с животными, спланировала и анализировала животные эксперименты; ВИБ получила финансирование, сформулировала концепцию и руководила исследованием, написала и отредактировала текст статьи. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией.

Финансирование. Эта работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00116).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Финансирующие спонсоры не принимали участия в разработке дизайна исследования, а также в сборе, анализе или интерпретации данных, написании рукописи или в принятии решения о публикации результатов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с методическими Директивами Хельсинкской декларации и были одобрены Комитетом по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 139-а от 11 ноября 2021 года).

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте: <https://www.springer.com/journal/10541>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joseph, A. D. A., Robert, A. T., and Lawrence, R. G. (1980) Concentration-Dependent effects of sodium butyrate in Chinese hamster cells: cell-cycle progression, inner-histone acetylation, histone H1 dephosphorylation, and induction of an H1-like protein, *Biochemistry*, **19**, 2656–2671, doi: 10.1021/BI00553A019.
2. Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003) Histone and chromatin cross-talk, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 172–183, doi: 10.1016/s0955-0674(03)00013-9.
3. Jeans, C., Thelen, M. P., and Noy, A. (2006) Single molecule studies of chromatin, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 699771, doi: 10.2172/877892.
4. Akiyama, S. K., and Hammes, G. G. (1980) Elementary steps in the reaction mechanism of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: kinetics of acetylation and deacetylation, *Biochemistry*, **19**, 4208–4213, doi: 10.1021/BI00559A011.

5. Waskiewicz, D. E., and Hammes, G. G. (1984) Elementary steps in the reaction mechanism of the α -ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: kinetics of succinylation and desuccinylation, *Biochemistry*, **23**, 3136-3143, doi: 10.1021/BI00309A005.
6. Xu, Y., Shi, Z., and Bao, L. (2022) An expanding repertoire of protein acylations, *Mol. Cell. Proteomics*, **21**, 100193, doi: 10.1016/J.MCPRO.2022.100193.
7. Bruzzzone, S., Parenti, M. D., Grozio, A., Ballestrero, A., Bauer, I., del Rio, A., and Nencioni, A. (2013) Rejuvenating sirtuins: the rise of a new family of cancer drug targets, *Ingentaconnect. Com.*, **19**, 614-623, doi: 10.2174/138161213804581954.
8. Grabowska, W., Sikora, E., and Bielak-Zmijewska, A. (2017) Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process, *Biogerontology*, **18**, 447-476, doi: 10.1007/S10522-017-9685-9.
9. Sutendra, G., Kinnaird, A., Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T. H., Haromy, A., Hashimoto, K., Zhang, N., Flaim, E., and Michelakis, E. D. (2014) A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of Acetyl-CoA and histone acetylation, *Cell*, **158**, 84-97, doi: 10.1016/J.CELL.2014.04.046.
10. Chueh, F. Y., Leong, K. F., Cronk, R. J., Venkitachalam, S., Pabich, S., and Yu, C. L. (2011) Nuclear localization of pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2), a mitochondrial enzyme, and its role in signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)-dependent gene transcription, *Cell Signal.*, **23**, 1170-1178, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2011.03.004.
11. Wang, Y., Guo, Y. R., Liu, K., Yin, Z., Liu, R., Xia, Y., Tan, L., Yang, P., Lee, J. H., Li, X. J., Hawke, D., Zheng, Y., Qian, X., Lyu, J., He, J., Xing, D., Tao, Y. J., and Lu, Z. (2017) KAT2A coupled with the α -KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase, *Nature*, **552**, 273-277, doi: 10.1038/NATURE25003.
12. Choi, S., Pflieger, J., Jeon, Y. H., Yang, Z., He, M., Shin, H., Sayed, D., Astrof, S., and Abdellatif, M. (2019) Oxoglutarate dehydrogenase and acetyl-CoA acyltransferase 2 selectively associate with H2A. Z-occupied promoters and are required for histone modifications, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1862**, 194436, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2019.194436.
13. Boyko, A. I., Karlina, I. S., Zavileyskiy, L. G., Aleshin, V. A., Artiukhov, A. V., Kaehne, T., Ksenofontov, A. L., Ryabov, S. I., Graf, A. V., Tramonti, A., and Bunik, V. I. (2022) Delayed impact of 2-oxoadipate dehydrogenase inhibition on the rat brain metabolism is linked to protein glutarylation, *Front. Med.*, **9**, 896263, doi: 10.3389/fmed.2022.896263.
14. Gibson, G. E., Xu, H., Chen, H.-L., Chen, W., Denton, T. T., and Zhang, S. Z. (2015) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines, *J. Neurochem.*, **134**, 86-96, doi: 10.1111/jnc.13096.
15. Zavileyskiy, L. G., Aleshin, V. A., Kaehne, T., Karlina, I. S., Artiukhov, A. V., Maslova, M. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2022) The brain protein acylation system responds to seizures in the rat model of PTZ-induced epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12302, doi: 10.3390/ijms232012302.
16. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., and Kroemer, G. (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger, *Cell Metab.*, **21**, 805-821, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.014.
17. Mews, P., Donahue, G., Drake, A. M., Luczak, V., Abel, T., and Berger, S. L. (2017) Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory, *Nature*, **546**, 381-386, doi: 10.1038/NATURE22405.
18. Pougovkina, O., te Brinke, H., Ofman, R., van Cruchten, A. G., Kulik, W., Wanders, R. J. A., Houten, S. M., and de Boer, V. C. J. (2014) Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3513-3522, doi: 10.1093/HMG/DDU059.
19. Gräff, J., and Tsai, L.-H. (2013) Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 97-111, doi: 10.1038/nrn3427.
20. Gibson, G. E., Blass, J. P., Beal, M. F., and Bunik, V. (2005) The α -ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration, *Mol. Neurobiol.*, **31**, 43-63, doi: 10.1385/MN:31:1-3:043.
21. Yang, Y., Tapias, V., Acosta, D., Xu, H., Chen, H., Bhawal, R., Anderson, E. T., Ivanova, E., Lin, H., Sagdullaev, B. T., Chen, J., Klein, W. L., Viola, K. L., Gandy, S., Haroutunian, V., Beal, M. F., Eliezer, D., Zhang, S., and Gibson, G. E. (2022) Altered succinylation of mitochondrial proteins, APP and tau in Alzheimer's disease, *Nat. Commun.*, **13**, 159, doi: 10.1038/S41467-021-27572-2.
22. Bunik, V. I., Tylicki, A., and Lukashev, N. V. (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models, *FEBS J.*, **280**, 6412-6442, doi: 10.1111/febs.12512.
23. Bunik, V. I., Artiukhov, A., Kazantsev, A., Goncalves, R., Daloso, D., Oppermann, H., Kulakovskaya, E., Lukashev, N., Fernie, A., Brand, M., and Gaunitz, F. (2015) Specific inhibition by synthetic analogs of pyruvate reveals that the pyruvate dehydrogenase reaction is essential for metabolism and viability of glioblastoma cells, *Oncotarget*, **6**, 40036-40052, doi: 10.18632/ONCOTARGET.5486.
24. Nemeria, N. S., Korotchkina, L. G., Chakraborty, S., Patel, M. S., and Jordan, F. (2006) Acetylphosphinate is the most potent mechanism-based substrate-like inhibitor of both the human and *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase components of the pyruvate

- dehydrogenase complex, *Bioorg. Chem.*, **34**, 362-379, doi: 10.1016/J.BIOORG.2006.09.001.
25. Artiukhov, A. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2016) Directed regulation of multienzyme complexes of 2-oxo acid dehydrogenases using phosphonate and phosphinate analogs of 2-oxo acids, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1498-1521, doi: 10.1134/S0006297916120129.
26. Bunik, V. I., and Fernie, A. R. (2009) Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation, *Biochem. J.*, **422**, 405-421, doi: 10.1042/BJ20090722.
27. Artiukhov, A. V., Aleshin, V. A., Karlina, I. S., Kazantsev, A. V., Sibiryakina, D. A., Ksenofontov, A. L., Lukashev, N. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2022) Phosphonate inhibitors of pyruvate dehydrogenase perturb homeostasis of amino acids and protein succinylation in the brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13186, doi: 10.3390/IJMS232113186.
28. Badhan, R. K. S., Kaur, M., Lungare, S., and Obuobi, S. (2014) Improving brain drug targeting through exploitation of the nose-to-brain route: a physiological and pharmacokinetic perspective, *Curr. Drug Deliv.*, **11**, 458-471, doi: 10.2174/1567201811666140321113555.
29. Djupesland, P. G., Messina, J. C., and Mahmoud, R. A. (2014) The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview, *Ther. Deliv.*, **5**, 709-733, doi: 10.4155/tde.14.41.
30. Pierozan, P., Jernerén, F., Ransome, Y., and Karlsson, O. (2017) The choice of euthanasia method affects metabolic serum biomarkers, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **121**, 113-118, doi: 10.1111/BCPT.12774.
31. Suckow, M., Stevens, K., and Wilson, R. (2012) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Academic Press.
32. Underwood, W., and Anthony, R. (2020) AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 edition.
33. Aleshin, V. A., Graf, A. V., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Ksenofontov, A. L., Maslova, M. V., Nogués, I., di Salvo, M. L., and Bunik, V. I. (2021) Physiological and biochemical markers of the sex-specific sensitivity to epileptogenic factors, delayed consequences of seizures and their response to vitamins B1 and B6 in rat model, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 737, doi: 10.3390/ph14080737.
34. Jackson, H. F., and Broadhurst, P. L. (1982) The effects of Parachlorophenylalanine and stimulus intensity on open-field test measures in rats, *Neuropharmacology*, **21**, 1279-1282, doi: 10.1016/0028-3908(82)90133-2.
35. Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., and Landgraf, R. (1998) Behavioral profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour, *Behavioural. Brain Res.*, **94**, 301-310, doi: 10.1016/S0166-4328(97)00198-8.
36. Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., Kaehne, T., Graf, A. V., Maslova, M. V., and Bunik, V. I. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration, *Wiley Online Library*, **153**, 80-102, doi: 10.1111/jnc.14951.
37. Tsepikova, P., Artiukhov, A., Boyko, A., Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., Zvyagintseva, M. A., Ryabov, S. I., Ksenofontov, A. L., Baratova, L. A., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723-736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
38. Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., and Edwards, R. A. (2004) Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining, *Anal. Biochem.*, **326**, 13-20, doi: 10.1016/J.AB.2003.10.047.
39. Kim, E. Y., Kim, W. K., Kang, H. J., Kim, J. H., Chung, S. J., Seo, Y. S., Park, S. G., Lee, S. C., and Bae, K. H. (2012) Acetylation of malate dehydrogenase 1 promotes adipogenic differentiation via activating its enzymatic activity, *J. Lipid Res.*, **53**, 1864-1876, doi: 10.1194/JLR.M026567.
40. Tong, W. H., Maio, N., Zhang, D. L., Palmieri, E. M., Ollivierre, H., Ghosh, M. C., McVicar, D. W., and Rouault, T. A. (2018) TLR-activated repression of Fe-S cluster biogenesis drives a metabolic shift and alters histone and tubulin acetylation, *Blood Adv.*, **2**, 1146-1156, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2018015669.
41. Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D512-520, doi: 10.1093/nar/gku1267.
42. Arumugam, R., Horowitz, E., Noland, R. C., Lu, D., Fleenor, D., and Freemark, M. (2010) Regulation of islet β -cell pyruvate metabolism: interactions of prolactin, glucose, and dexamethasone, *Endocrinology*, **151**, 3074-3083, doi: 10.1210/EN.2010-0049.
43. Consitt, L. A., Saxena, G., Saneda, A., and Houmard, J. A. (2016) Age-related impairments in skeletal muscle PDH phosphorylation and plasma lactate are indicative of metabolic inflexibility and the effects of exercise training, *J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **311**, E145-156, doi: 10.1152/ajpendo.00452.2015.
44. Hossain, A. J., Islam, R., Kim, J.-G., Dogsom, O., Cap, K. C., and Park, J.-B. (2022) Pyruvate dehydrogenase A1 phosphorylated by insulin associates with pyruvate kinase M2 and induces LINC00273 through histone acetylation, *Biomedicines*, **10**, 1256, doi: 10.3390/BIOMEDICINES10061256.
45. Denton, R. M., McCormack, J. G., Rutter, G. A., Burnett, P., Edgell, N. J., Moule, S. K., and Diggle, T. A. (1996) The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex, *Adv. Enzyme Regul.*, **36**, 183-198, doi: 10.1016/0065-2571(95)00020-8.

46. Kim, W., and Kaelin, J. W. G. (2003) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer, *Curr. Opin. Genet Dev.*, **13**, 55-60, doi: 10.1016/S0959-437X(02)00010-2.
47. Li, X., Jiang, Y., Meisenhelder, J., Yang, W., Hawke, D. H., Zheng, Y., Xia, Y., Aldape, K., He, J., Hunter, T., Wang, L., and Lu, Z. (2016) Mitochondria-translocated PGK1 functions as a protein kinase to coordinate glycolysis and the TCA cycle in tumorigenesis, *Mol. Cell*, **61**, 705-719, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2016.02.009.
48. Nie, H., Ju, H., Fan, J., Shi, X., Cheng, Y., Cang, X., Zheng, Z., Duan, X., and Yi, W. (2020) O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth, *Nat. Commun.*, **11**, 36, doi: 10.1038/S41467-019-13601-8.
49. Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T. J. F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J. E., DePinho, R. A., Jaenisch, R., and Tsai, L. H. (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity, *Nature*, **459**, 55-60, doi: 10.1038/NATURE07925.
50. Li, X., Zhang, J., Li, D., He, C., He, K., Xue, T., Wan, L., Zhang, C., and Liu, Q. (2021) Astrocytic ApoE reprograms neuronal cholesterol metabolism and histone-acetylation-mediated memory, *Neuron*, **109**, 957-970.e8, doi: 10.1016/J.NEURON.2021.01.005.
51. Stilling, R. M., and Fischer, A. (2011) The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Learn Mem.*, **96**, 19-26, doi: 10.1016/J.NLM.2011.04.002.
52. Shields, G. S., Sazma, M. A., McCullough, A. M., and Yonelinas, A. P. (2017) The effects of acute stress on episodic memory: A meta-analysis and integrative review, *Psychol. Bull.*, **143**, 636-675, doi: 10.1037/BUL0000100.
53. Goldfarb, E. V. (2019) Enhancing memory with stress: Progress, challenges, and opportunities, *Brain Cogn.*, **133**, 94-105, doi: 10.1016/J.BANDC.2018.11.009.

ACYLATION OF THE RAT BRAIN PROTEINS IS AFFECTED BY THE INHIBITION OF PYRUVATE DEHYDROGENASE *in vivo*

V. A. Aleshin^{1,2}, D. A. Sibiryakina³, A. V. Kazantsev^{1,4}, A. V. Graf^{1,3}, and V. I. Bunik^{1,2,5*}

¹ A. N. Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Department of Biokinetics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: bunik@belozersky.msu.ru

² Department of Biochemistry, Sechenov University, 119048 Moscow, Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁵ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Organism adaptation to metabolic challenges requires coupling of metabolism to gene expression. In this regard, acylations of histones and metabolic proteins acquire significant interest. We hypothesize that adaptive response to inhibition of a key metabolic process, catalyzed by the acetyl-CoA-generating pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, is mediated by changes in the protein acylations. The hypothesis is tested by intranasal administration to animals of PDH-specific inhibitors acetyl(methyl)phosphinate (AcMeP) or acetylphosphonate methyl ester (AcPMe), followed by the assessment of physiological parameters, brain protein acylation, and expression/phosphorylation of PDHA subunit. At the same dose, AcMeP, but not AcPMe, decreases acetylation and increases succinylation of the brain proteins with apparent molecular masses of 15-20 kDa. Regarding the proteins of 30-50 kDa, a strong inhibitor AcMeP affects acetylation only, while a less efficient AcPMe mostly increases succinylation. The unchanged succinylation of the 30-50 kDa proteins after the administration of AcMeP coincides with the upregulation of desuccinylase SIRT5. No significant differences between the levels of brain PDHA expression, PDHA phosphorylation, parameters of behavior or ECG are observed in the studied animal groups. The data indicate that the short-term inhibition of brain PDH affects acetylation and/or succinylation of the brain proteins, that depends on the inhibitor potency, protein molecular mass, and acylation type. The homeostatic nature of these changes is implied by the stability of physiological parameters after the PDH inhibition.

Keywords: brain protein acetylation, brain protein succinylation, phosphonate/phosphinate analog of pyruvate, pyruvate dehydrogenase, sirtuin

**О СТАТЬЕ Л.А. ГАВРИЛОВА И Н.С. ГАВРИЛОВОЙ
«ИСТОРИЧЕСКИЕ ТРЕНДЫ ВИДОВОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ
ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА И АКТУАРНОЙ СКОРОСТИ СТАРЕНИЯ»,
ОПУБЛИКОВАННОЙ В Т. 87, ВЫП. 12, С. 1998–2011**

© 2023 А.И. Михальский

*Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова Российской академии наук,
117997 Москва, Россия; электронная почта: ipuran@yandex.ru*

Поступила в редакцию 28.11.2022

После доработки 10.01.2023

Принята к публикации 10.01.2023

DOI: 10.31857/S0320972523010128, EDN: PCVBVW

В статье «Исторические тренды видовой продолжительности жизни человека и актуарной скорости старения» Л.А. Гаврилова и Н.С. Гавриловой проверяется выполнение компенсаторного эффекта смертности (СЕМ), заключающегося в увеличении скорости старения с уменьшением начальной смертности, в современной популяции людей. При исследовании использовались поперечные данные из базы данных HMDB, а в качестве инструментария количественной оценки СЕМ – математические модели Гомпертца, Гомпертца–Мэйкхема, проводилось сравнение с зависимостью, называемой «корреляция Стрелера–Милдвана».

Модель Гомпертца имеет формальное математическое обоснование из области надёжности и описывает изменение смертности μ_x в зависимости от возраста x , используя параметры начальной смертности R_0 и темпа старения a (обозначения взяты из статьи):

$$\mu_x = R_0 \exp(ax). \quad (1)$$

В модели Гомпертца–Мэйкхема добавлен параметр A , не зависящий от возраста и имеющий смысл независимого риска от внешних причин:

$$\mu_x = A + R_0 \exp(ax). \quad (2)$$

Корреляция Стрелера–Милдвана вытекает из общей теории «General theory of mortality and aging» [1], опирающейся на понятия жизненной силы организма (vitality) и устойчивости организма к внешнему негативному воздействию. Её развитие содержится в работе Yashin et al. [2]. Важно отметить, что теоретически все

три подхода описывают старение одного организма, а не группы или популяции. В статье Гавриловых это обстоятельство игнорируется и обсуждается в настоящем комментарии.

Применение математических моделей для описания демографических данных должно учитывать, что все методы оценки параметров математических моделей исходят из того, что экспериментальные данные имеют одинаковое вероятностное распределение. Они должны быть однородны в этом смысле. Чтобы добиться однородности демографических данных, проводят разбиение по полу, странам, социально-экономическим группам, этническому происхождению и так далее. При исследовании старения дополнительно необходимо, чтобы все исследуемые были одного года рождения. При этом в максимально возможной степени удаётся учесть эффект влияния внешних воздействий (войны, экономические кризисы) на людей одного возраста. Люди одного года рождения образуют *когорту рождения*. Данные, организованные таким образом, называют *когортными* данными в отличие от *поперечных* (cross-sectional) данных, использованных в статье. Поперечные данные содержат информацию о числе живущих и о числе умерших в одном и том же году, но в разных возрастных группах. В результате получается «гипотетическая» неоднородная когорта, в разных возрастных группах которой представлены данные о людях разного года рождения и, следовательно, имеющих различные накопленные риски здоровью. Такие данные лишь косвенно связаны с законами физиологического старения и несут на себе отпечаток событий, происходивших в различное время.

Использование для анализа неоднородных данных методов, не учитывающих наличие неоднородности, может привести к парадоксальным эффектам и неверной интерпретации найденных эмпирически зависимостей. Например, смертность, оцененная по данным без учёта неоднородности, демонстрирует снижение скорости роста смертности и даже стабилизацию смертности в старших возрастных группах [3]. Индивидуальная смертность при этом может расти экспоненциально с возрастом. Другой пример приведён на рис. 4а в статье Avchaciov et al. [4]. Кривая дожития в генетически гетерогенной популяции мышей в возрасте старше 125 недель демонстрирует повышение вероятности дожития по сравнению с кривой дожития, построенной по модели Гомпертца для этих же данных.

Поскольку смысл параметра a при использовании модели Гомпертца для анализа поперечных данных теряет биологический смысл, то для него принято использовать термин *actuarial aging rate* (актуарный темп старения), как и поступают авторы статьи, вместо *true aging rate* (истинный темп старения), который отражает физиологические изменения в организме.

Не вдаваясь в обсуждение достоинств и недостатков рассмотренных в статье подходов, возникают два вопроса: какое значение имеет изучение актуарного темпа старения для понимания законов старения и насколько полученные оценки отражают существующие закономерности?

Ответ на первый вопрос в статье отсутствует. Вывод, что увеличение актуарного темпа старения «скорее всего, вызван более быстрым снижением смертности в молодых по сравнению со старыми возрастными груп-

пами», сделанный на основании полученных оценок, конечно, подтверждает наличие компенсаторного эффекта смертности на популяционном уровне, но не согласуется с гипотезой revealed-slow-aging [5]. Согласно этой гипотезе, люди, имеющие генетически невысокие шансы дожить до старости, отличаются замедленным старением. По мере развития медицины эти люди стали доживать до преклонного возраста, сохраняя свойство замедленного старения. Доля таких людей в популяции растёт, что ведёт к снижению истинного и актуарного темпов старения и наблюдаемому в настоящее время увеличению продолжительности жизни. Видимо, описанный эффект не удаётся наблюдать, исследуя неоднородные данные, к которым относятся и используемые в статье данные поперечных наблюдений. Проблемы, существующие при поиске связи актуарного темпа старения со смертностью в гетерогенных данных, отмечены также в работе Hawkes et al. [6].

Второй вопрос связан с методологией анализа данных дожития. Авторы используют параметрический подход, задаваясь структурой модели Гомпертца и оценивая её параметры по экспериментальным данным. В статье справедливо отмечается, что получаемые оценки обладают свойством высокой чувствительности к случайным изменениям данных, как указано в работе Tarkhov et al. [7]. Используемый в статье Гавриловых приём центрирования возраста при вычислении оценок нелинейным методом наименьших квадратов кажется недостаточным для стабилизации оценок. Анализ трендов продолжительности жизни человека в исторической перспективе требует дальнейшего и более глубокого исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Strehler, B. L., and Mildvan, A. S. (1960) General theory of mortality and aging. A stochastic model relates observations on aging, physiologic decline, mortality, and radiation, *Science*, **132**, 14-21, doi: 10.1126/science.132.3418.14.
2. Yashin, A. I., Begun, A. S., Boiko, S. I., Ukraintseva, S. V., and Oeppen, J. (2002) New age patterns of survival improvement in Sweden: do they characterize changes in individual aging? *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 637-647, doi: 10.1016/S0047-6374(01)00410-9.
3. Vaupel, J., and Yashin, A. I. (1985). Heterogeneity's ruses: some surprising effects of selection on population dynamics, *Am. Statist.*, **39**, 176-185, doi: 10.1080/00031305.1985.10479424.
4. Avchaciov, K., Antoch, M. P., Andrianova, E. L., Tarkhov, A. E., Menshikov, L. I., et al. (2022) Un-
5. supervised learning of aging principles from longitudinal data, *Nat. Commun.*, **13**, 6529, doi: 10.1038/s41467-022-34051-9.
6. Blagosklonny, M. (2010) Why human lifespan is rapidly increasing: solving "longevity riddle" with "revealed-slow-aging" hypothesis, *Aging*, **2**, 177-182, doi: 10.18632/aging.100139.
7. Hawkes, K., Smith, K. R., and Blevins, J. K. (2012) Human actuarial aging increases faster when background death rates are lower: a consequence of differential heterogeneity? *Evolution*, **66**, 103-114, doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01414.x.
8. Tarkhov, A. E., Menshikov, L. I., and Fedichev, P. O. (2017) Strehler-Mildvan correlation is a degenerate manifold of Gompertz fit, *J. Theor. Biol.*, **416**, 180-189, doi: 10.1016/j.jtbi.2017.01.017.