

Том 89, Номер 6

ISSN 0320-9725

Июнь 2024



БИОХИМИЯ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 6, 2024

Неупрощаемая сложность Нох-гена: путь к канонической функции Нох-кластера (обзор) <i>М.А. Кулакова, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич</i>	965
Методы функциональной характеристики полиморфизмов некодирующих регуляторных областей генома человека (обзор) <i>А.Н. Уварова, Е.А. Ткаченко, Е.М. Стасевич, Э.А. Жеремян, К.В. Корнеев, Д.В. Купраш</i>	982
Активность систем репарации ДНК в клетках долгоживущих грызунов и летучих мышей (обзор) <i>А.А. Попов, И.О. Петрусева, О.И. Лаврик</i>	996
Мутация С886Т в гене <i>TH</i> снижает активность тирозингидроксилазы в головном мозге мышей <i>И. Алсаллум, В.С. Москалюк, И.А. Рахов, Д.В. Базовкина, А.В. Куликов</i>	1007
Уникальные свойства синапсом и перспективы их использования для терапии болезни Альцгеймера (обзор) <i>А.С. Дашкова, В.И. Ковалев, А.В. Чаплыгина, Д.Ю. Жданова, Н.В. Бобкова</i>	1015
Особенности NMDA-рецепторов астроцитов (обзор) <i>А.М. Косенков, С.А. Майоров, С.Г. Гайдин</i>	1031
Порообразующие белки VDAC внешней мембраны митохондрий: их регуляция и патофизиологическая роль (обзор) <i>Н.В. Белослудцева, М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев</i>	1049
Формирование амилоидоподобных конформационных состояний β -структурных мембранных белков на примере порина OmpF наружной мембраны <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>О.Д. Новикова, Т.В. Рыбинская, Е.А. Зелепуга, В.Н. Уверский, Н.Ю. Ким, Е.А. Чингизова, Е.С. Менчинская, В.А. Хоменко, Д.К. Чистюлин, О.Ю. Портнягина</i>	1070
Дизайн, <i>in silico</i> оценка и определение противоопухолевой активности потенциальных ингибиторов протеинкиназ: применение к тирозинкиназе Bcr-Abl <i>Е.В. Королева, А.Л. Ермолинская, Ж.В. Игнатович, Ю.В. Корноушенко, О.В. Панибрат, В.И. Поткин, А.М. Андрианов</i>	1087
Ключевые ферменты серотониновой системы триптофангидроксилаза 2 и моноаминоксидаза А в мозге крыс, селекционированных по реакции на человека: влияние бензопентатиепина ТС-2153 <i>В.С. Москалюк, Р.В. Кожемякина, Т.М. Хоменко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, А.В. Куликов, В.С. Науменко, Е.А. Куликова</i>	1104
Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 сопряжена с активацией клеточных протеинкиназ DNA-РК и АТМ и фосфорилированием их мишеней <i>А.Н. Анисенко, А.А. Нефедова, И.И. Киреев, М.Б. Готтих</i>	1117

Особенности фотохимического преобразования энергии в фотосистеме 1 из зеленой микроводоросли *Chlorella ohadii*

Д.А. Черепанов, А.А. Петрова, М.С. Фадеева, Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев,
В.А. Надточенко, А.Ю. Семенов

1129

ХРОНИКА

К 100-летию со дня рождения Александра Яковлевича Фриденштейна

1142

CONTENTS

Vol. 89, Issue 6, 2024

Irreducible Complexity of <i>Hox</i> Gene: A Path to the Canonical Function of the Hox Cluster (Review) <i>M. A. Kulakova, G. P. Maslakov, and L. O. Poliushkevich</i>	965
Methods for Functional Characterization of Genetic Polymorphisms of Non-Coding Regulatory Regions of the Human Genome (Review) <i>A. N. Uvarova, E. A. Tkachenko, E. M. Stasevich, E. A. Zheremyan, K. V. Korneev, and D. V. Kuprash</i>	982
Activity of DNA Repair Systems in Cells of Long-Lived Rodents and Bats (Review) <i>A. A. Popov, I. O. Petruseva, and O. I. Lavrik</i>	996
The C886T Mutation in the <i>TH</i> Gene Reduces the Activity of Tyrosine Hydroxylase in the Brain of Mice <i>I. Alsallum, V. S. Moskaliuk, I. A. Rakhov, D. V. Bazovkina, and A. V. Kulikov</i>	1007
Unique Properties of Synaptosomes and Prospects for Their Use for the Treatment of Neurodegenerative Diseases (Review) <i>A. S. Dashkova, V. I. Kovalev, A. V. Chaplygina, D. Yu. Zhdanova, and N. V. Bobkova</i>	1015
Features of Astrocytic NMDA Receptors (Review) <i>A. M. Kosenkov, S. A. Maiorov, and S. G. Gaidin</i>	1031
Pore-Forming VDAC Proteins of the Outer Mitochondrial Membrane: Regulation and Pathophysiological Role (Review) <i>N. V. Belosludtseva, M. V. Dubinin, and K. N. Belosludtsev</i>	1049
Formation of Amyloid-Like Conformational States of β -Structured Membrane Proteins on the Example of the OmpF Porin from the <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Outer Membrane <i>O. D. Novikova, T. V. Rybinskaya, E. A. Zelepuga, V. N. Uversky, N. Yu. Kim, E. A. Chingizova, E. S. Menchinskaya, V. A. Khomenko, D. K. Chistyulin, and O. Yu. Portnyagina</i>	1070
Design, <i>in silico</i> Evaluation, and Determination of Antitumor Activity of Potential Inhibitors Against Protein Kinases: Application to Bcr-Abl Tyrosine Kinase <i>E. V. Koroleva, A. L. Ermolinskaya, Zh. V. Ignatovich, Y. V. Kornoushenko, O. V. Panibrat, V. I. Potkin, and A. M. Andrianov</i>	1087
Key Enzymes of Serotonergic System Tryptophan Hydroxylase 2 and Monoamine Oxidase A in the Brain of Rats Selectively Bred For Reaction Toward Humans: Effects of Benzopentathiepin TC-2153 <i>V. S. Moskaliuk, R. V. Kozhemyakina, T. M. Khomenko, K. P. Volcho, N. F. Salakhutdinov, A. V. Kulikov, V. S. Naumenko, and E. A. Kulikova</i>	1104
Post-Integrational DNA Repair of HIV-1 Is Associated with the Activation of DNA-PK and ATM Cellular Protein Kinases and Phosphorylation of Their Targets <i>A. N. Anisenko, A. A. Nefedova, I. I. Kireev, and M. B. Gottikh</i>	1117

Specificity of Photochemical Energy Conversion in Photosystem I from the Green
Microalga *Chlorella ohadii*

*D. A. Cherepanov, A. A. Petrova, M. S. Fadeeva, F. E. Gostev, I. V. Shelaev, V. A. Nadtochenko,
and A. Yu. Semenov*

1129

CHRONICLE

On the 100th Anniversary of the Birth of Alexander Yakovlevich Fridenstein

1142

НЕУПРОЩАЕМАЯ СЛОЖНОСТЬ *НОХ*-ГЕНА: ПУТЬ К КАНОНИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ *НОХ*-КЛАСТЕРА

Обзор

© 2024 М.А. Кулакова*, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: m.kulakowa@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.11.2023

После доработки 22.03.2024

Принята к публикации 27.03.2024

Эволюция крупных таксонов часто связана с появлением новых генных семейств. У всех многоклеточных животных, кроме губок и гребневиков, в геноме присутствуют *Нох*-гены – важнейшие регуляторы развития. Каноническая функция *Нох*-генов состоит в коллинеарном паттернировании отделов тела билатеральных животных. Эта общая функция реализуется при помощи сложных, тонко скоординированных механизмов, не все из которых эволюционно консервативны и до конца понятны. Мы полагаем, что появлению этой регуляторной сложности предшествовал этап кооперации между более древними морфогенетическими программами или их отдельными элементами. Следы этих программ могут присутствовать у современных животных для реализации неканонических *Нох*-функций. Неканонические функции *Нох*-генов нацелены на поддержание терминальной специфичности нервных клеток, аутофагию, оогенез, догастрюляционный эмбриогенез, передачу сигналов путём вертикального переноса и ряд общебиологических процессов. Эти функции реализуются при помощи базовых свойств гомеодоменного белка и могли стать триггером для эволюции *ParaNох*зоа, а затем и *Nephrozoa*. В нашем обзоре рассмотрены некоторые из них.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомеодомен, ANTP, *Нох*-гены, неканонические функции *Нох*-генов, Metazoa, *ParaNох*зоа, *Nephrozoa*, нейрогенез, аутофагия в развитии, оогенез, вертикальный сигналинг.

DOI: 10.31857/S0320972524060012 EDN: XMVUUG

ВВЕДЕНИЕ

История возникновения многоклеточных животных прочно связана с появлением нового класса транскрипционных факторов – ANTP (*Antennapedia*), принадлежащего к суперклассу гомеодоменных белков [1]. Быстрая структурная и функциональная эволюция генов ANTP привела к появлению самой многочисленной и разнообразной клады животного мира, которую сейчас называют *ParaNох*зоа [2]. В эту кладу входит приблизительно 7 млн видов билатеральных животных (*Bilateria*), примерно 10 тысяч видов кишечнополостных (*Cnidaria*) и несколько видов пластинчатых (*Placozoa*). Название клады указы-

вает на эволюционную границу внутри Metazoa, которая обособляет таксоны с *Hox/ParaHox*-генами (*Нох* – Homeotic Homeobox) от гребневиков и губок, у которых этих генов нет [2–5].

Нох-гены были первыми генами, для которых показали участие в развитии и эволюции [6]. Их открытие привело к появлению новой науки – эволюционной биологии развития (EvoDevo), и сделало *Нох*-гены самой изучаемой группой среди всех гомеобоксных генов у животных. Гомеобокс – консервативный участок первичной последовательности, который кодирует ДНК-связывающий мотив гомеодомен, нужный *Нох*-белку для взаимодействия с энхансерами подконтрольных генов-мишеней [7, 8]. *Нох*-гены организованы в кластер, т.е. физически сцеплены. Традиционно их подразделяют на 9 паралогических групп (PG1–8 и PG9/14). Принцип классификации по паралогическим группам основан на различиях в последовательностях *Нох*-белков и их относительных позициях

Принятые сокращения: ANTP – *Antennapedia*; GRN – генная регуляторная сеть; *Нох* – Homeotic Homeobox; *Ubx* – *Ultrabithorax*.

* Адресат для корреспонденции.

в кластерах. Уровень эволюционной консервативности внутри паралогической группы (например, между *lab* (PG1) мухи и *Hox1* (PG1) ланцетника) всегда выше, чем по сравнению с геном вне неё (между *lab* (PG1) и *pb* (PG2) мухи). В целом, структурная экспансия *Нох*-кластера и формирование большинства паралогических групп произошли до появления трёх крупных клад *Bilateria* [9, 10].

Главная черта *Нох*-кластера – способность к коллинеарной экспрессии. Коллинеарность – это соответствие между расположением генов на хромосоме и порядком их экспрессии вдоль передне-задней оси тела [11, 12]. Чем ближе *Нох*-ген к 3'-концу кластера, тем ближе к переднему концу эмбриона он будет работать. Такую коллинеарность называют пространственной. Коллинеарность также может быть временной (темпоральной), когда гены экспрессируются последовательно во времени, начиная с 3'-конца кластера [13].

Кластер *Нох*-генов – результат tandemных *cis*-дупликаций предковой последовательности, начиная с единственного прото-*Нох*-гена, который принадлежал к семейству NK [14, 15]. Это событие произошло до того, как образовались сестринские ветви *Bilateria* и *Cnidaria*, потому что *Нох*-гены, принадлежащие к паралогическим группам PG1, PG2 и PG4/14, уже есть в обеих ветвях [16]. Эти паралогические группы появились в результате диверсификации *cis*-дубликатов по двум сценариям: неофункционализации и субфункционализации. В первом случае копия приобретает новую функцию, а во втором – предковая функция разделяется между копиями [17]. Кластер может быть целым (компактным или релаксированным) или содержать перестройки и разрывы (поломки), вплоть до полной атомизации [18–21]. Целостность *Нох*-кластера принципиальна для поддержания темпоральной коллинеарности, но не важна для пространственной [22].

Парадоксальным образом *Нох*-гены одновременно консервативны и функционально пластичны. Они универсальны на этапе становления билатерального плана организации и видоспецифичны на уровне локальных паттернов, например, при формировании щетинок на ногах у разных видов *Drosophila* [23]. Это системное свойство известно как масштабируемость. В случае *Нох*-генов оно проявляется на онтогенетическом и филогенетическом уровнях.

Ошеломляющее многообразие билатеральных животных – результат быстрой эволюции программ развития, одновременно устойчивых и пластичных. Билатеральные животные сохраняют общий план организации за счёт консервативных участников и «участков» генных регуляторных сетей, которые начинают работать вскоре после завершения дробления и нужны для регионализа-

ции и паттернирования. Особенно ярко это видно на примере позвоночных и других сегментированных животных, для которых выделяют филотипический период или стадию «зоотипа» [24]. В этот период представители одного типа (или подтипа) максимально похожи друг на друга морфологически (например, все позвоночные на стадии фарингулы). На уровне молекулярной регуляции сходство ещё шире, поскольку сегментированные животные из разных типов (позвоночные, членистоногие, аннелиды) незадолго до или во время гастрюляции начинают упорядоченно экспрессировать *Нох*-гены [25–27]. Графическое выражение концепции зоотипа – песочные часы, где уровень перетяжки соответствует началу коллинеарной транскрипции *Нох*-кластеров вдоль передне-задней оси тела. Такая экспрессия концептуально сходна у любых сегментированных *Bilateria*, несмотря на существенные различия в механизмах реализации. *Нох*-белки детерминируют судьбу клеток в широких пространственных доменах эмбриона вдоль передне-задней оси тела. В этот ранний период их мишенями становятся гены сигнальных путей и факторов транскрипции, наборы которых будут качественно и количественно различаться в зависимости от *Нох*-кода. Такая разница в конечном счёте приведёт к морфологическим и функциональным различиям между участками эмбриона.

Эту функцию традиционно рассматривают как базовую, то есть **каноническую**. Именно её подразумевают, когда речь заходит о роли *Нох*-генов в развитии, и для этого есть несколько причин. Во-первых, животные, у которых мы наблюдаем раннюю коллинеарную транскрипцию *Нох*-генов в широких пространственных доменах (т.е. регионализующую функцию), принадлежат к трём надтипам – *Deuterostomia*, *Ecdysozoa* и *Lophotrochozoa*, которые объединяются в кладу *Nephrozoa*. Вероятность того, что такая функция *Нох*-генов возникла в этих группах независимым (конвергентным) образом, выглядит ниже вероятности её прямого наследования от общего предка всех *Nephrozoa*. Во-вторых, последовательная во времени ранняя активация генов *Нох*-кластера всегда связана с регионализацией, а такой способ включения зависит от целостного или минимально повреждённого кластера [22, 28]. Если структура кластера определяет его регионализующую функцию и при этом целый кластер априори считается первичным, то логично предположить, что и сама эта функция неразрывно связана с возникновением *Нох*-кластера.

Узкое место в «песочных часах» – показатель отсутствия изменчивости, доступной для отбора, поэтому можно смело говорить, что работа *Нох*-генов определяет план организации,

по крайней мере, сегментированных Bilateria. Однако при таком подходе остаются неразрешимые вопросы к начальным этапам эволюции системы. Координированная во времени и пространстве ранняя векторная экспрессия Нох-кластеров выглядит очень сложной. Трудно представить начальные и промежуточные шаги, сформировавшие эту гиперсеть. Кроме того, если каноническая функция Нох-генов первична, то последний общий предок Nephrozoa – сложное животное, не уступающее по уровню организации ланцетнику, дрозофиле или платинереису, что уводит нас к старому парадоксу о неупрощаемой сложности. Возможно, среди множества функций Нох-генов, которые не входят в число канонических, существуют такие, которые дают подсказку о первичном состоянии Нох-регуляции в линии ParaNohozoa и её последующей эволюции. В нашем обзоре рассмотрены некоторые из них.

НОХ-ГЕНЫ И НЕЙРОГЕНЕЗ

Чем древнее признак, тем с большей вероятностью его можно встретить у филогенетически удалённых друг от друга потомков вида, который этот признак приобрёл. Впервые идею о том, что анцестральная функция Нох-генов – паттернирование нервной системы, высказал Хорди Гарсиа Фернандес [29], и не без основания. Если вынести за скобки каноническую функцию Нох-генов, то остаётся самая распространённая и самая устойчивая к полумкам функция – контроль над нейрогенезом [30–32]. Контроль сохраняется даже у тех животных, которые отказались от ранней регионализующей функции (пиявки, аппендикулярии, коловратки) или используют её в отрыве от спецификации передне-задней оси (моллюски) [19–21, 33–36]. Примечательно, что у большинства изученных моллюсков именно в ганглиях нервной системы прослеживаются признаки Нох-коллинеарности [21, 35, 36].

Современные экспериментальные методы позволяют локально включать или выключать избранные гены на разных стадиях развития модельных животных (нематода, дрозофила, мышь). Эти эксперименты обнаружили важную закономерность. Оказалось, что Нох-гены не просто определяют клеточные территории, в которых закладываются нейробласты. Они контролируют пути их дифференцировки и, что особенно любопытно, устанавливают терминальную специфичность зрелых постмитотических нейронов [32]. Терминальная специфичность (neuronal terminal identity) приводит нейрон к функциональному состоянию. Он начинает формировать нейриты, синтезировать нейропептиды, белки, необходимые для про-

изводства нейротрансмиттеров, рецепторы к ним и компоненты ионных каналов. Все эти и многие другие изменения в постмитотических нейронах происходят за счёт не родственных друг другу регуляторных белков, которые называются терминальными селекторами. Один из таких селекторов у нематоды *Caenorhabditis elegans* – Unc-3 (ортолог EBF/Olf/Collier) – определяет терминальную дифференцировку холинергических двигательных нейронов (мотонейронов). Белок Unc-3 напрямую связывается с цис-регуляторными сайтами генов биосинтеза ацетилхолина, ионных каналов и множества других генов, но работает он не один, а в содружестве с разными Нох-белками, которые действуют как его кофакторы. Разные Нох-белки (в зависимости от участка тела) задают разницу в количестве и длине нейритов, синаптических связях и электрической активности мотонейронов. Эта общая схема справедлива и для других типов нейронов (сенсорных, двигательных и промежуточных) с другими терминальными селекторами [37]. Важно, что Нох-белки нужны червю не только для верной настройки нейрона в момент его терминальной дифференцировки, но и для его дальнейшей работы. Показано, что Нох-белок *C. elegans* Lin-39 (PG4/5) необходим во взрослой жизни для поддержания терминальной специфичности подконтрольных мотонейронов [38, 39].

Нематода просто устроена, и у взрослого червя (гермафродита) всего 302 зрелых нейрона [40]. Мозг взрослой *Drosophila* содержит порядка 200 тыс. нервных клеток [41], но их дифференцировка, нацеленность на мишени и количество синапсов определяются сходными процессами. Нейробласты мухи приобретают уникальные судьбы под действием Нох-белков [42], и, что более удивительно, под Нох-контролем находится формирование нервно-мышечных синапсов [31, 43]. Существует гипотеза, согласно которой сборка синаптического контакта между нейроном и мышечной клеткой возможна в том случае, если они экспрессируют один и тот же Нох-белок (или набор Нох-белков). Это справедливо по крайней мере для одной модельной системы, где Нох-белок Dfd (PG4) напрямую включает экспрессию анкирина (Ankyrin2-XL; синаптический белок) и выключает экспрессию Con (адгезивный белок, селективно работающий в нейромышечных синапсах другого типа) в мотонейронах и мышцах, которые они иннервируют [43].

Наконец, у *Drosophila* описан тип нейронов (leucokineric neurons), для которых Нох-белки из комплекса BX-C (Ubx (Ultrabithorax), abd-A (abdominal A), Abd-B (abdominal B)) являются прямыми терминальными селекторами, поскольку включают (Ubx, abd-A) и выключают (Abd-B) синтез нейропептида лейкокинина [44].

Не вдаваясь в подробности, заметим, что у млекопитающих (мышь, человек) обнаружены принципиально сходные правила установления пронеуральных территорий, дифференцировки нейронов и их постмитотических настроек под контролем *Нох*-генов [30]. Показано, что у млекопитающих тоже есть *Нох*-белки, которые работают терминальными селекторами мотонейронов [45] и нужны во взрослом состоянии. Развитие заднего мозга контролируют 24 *Нох*-гена, и они продолжают работать в сформированном мозге взрослых мышей [46]. Развитие переднего мозга у позвоночных – *Нох*-независимый процесс. Тем удивительней, что в постнатальном неокортексе и таламусе мыши начинают экспрессироваться *Нох*-гены из нескольких передних паралогических групп (PG1, 3-5) [46].

Итак, современные экспериментальные данные, полученные на разных модельных животных, подводят нас к мысли, что предковая функция *Нох*-генов – терминальная дифференцировка нейронов, вероятнее всего двигательных. У этой гипотезы есть сильная теоретическая и доказательная базы. Во-первых, недавно стало известно, что гомеобокс-содержащие факторы в целом имеют тенденцию запускать и поддерживать нейрогенные дифференцировки. В геноме *C. elegans* закодированы 102 гомеодомен-содержащих белка из разных семейств, которые селективно и комбинаторно работают терминальными селекторами или их партнёрами в зрелых нейронах [47, 48]. Поэтому спецификация нейронов при помощи *Нох*-белков – частный случай общего принципа.

Во-вторых, в генных регуляторных сетях (Gene Regulatory Networks; GRNs) прямая связь между высокоуровневыми регуляторными генами и генами терминальных дифференцировок может указывать на предковое состояние системы. Согласно гипотезе интеркалярной эволюции, регуляторные гены-посредники, которые формируют сложную архитектуру GRNs, разворачивающуюся в период регионализации и паттернирования – результат эволюционных интеркаляций (вставок) между исходным мастер-геном и его мишенью, например, между гомеобоксным геном *Pax6* и светочувствительным трансмембранным белком родопсином [49–51]. *Нох*-гены универсальным образом причастны к установлению и поддержанию терминальной спецификации нейронов у первичноротых и вторичноротых животных, что допускает существование просто организованного предка всех Nephrozoa, который использовал *Нох*-гены с той же целью. Изначально простые GRNs такого предка постепенно и независимо друг от друга усложнялись в разных эволюционных линиях за счёт вовлечения новых кладоспецифичных генов под контроль *Нох*-кластера, а гетерохронные сдвиги

сместили начало активности всех участников к более ранним срокам развития и привели их экспрессию к каноническому виду. Возможно, уже на первых этапах этого эволюционного процесса *Нох*-гены координировали формирование синапсов между двигательными нейронами и мышцами. Поэтому общий принцип коллинеарной транскрипции *Нох*-генов роднит *Drosophila* и млекопитающих на уровне двух зародышевых листков – эктодермального и мезодермального. Важно, что принцип интеркалярной эволюции допускает прирастание GRNs путём дубликации мастер-гена и субфункционализации генов-потомков с частичным сохранением предковой функции [51].

У этой привлекательной гипотезы есть внутренние противоречия. Во-первых, для того, чтобы специфицировать нейроны, не нужна физическая сцепленность терминальных селекторов. Большинство гомеобоксных генов, которые создают нейральный код у нематоды, не собраны в кластеры [47, 48].

Во-вторых, уровень сложности последнего общего предка всех Nephrozoa остаётся под вопросом, потому что его *Нох*-кластер уже состоял по меньшей мере из 7 или 8 генов, а именно из пяти передних (PG1–5), одного или двух срединных (PG6/8) и одного постериорного (PG9/14) [9]. Известно, что функции генов из разных паралогических групп существенно перекрываются [52], а это значит, что предковый кластер сформировался очень быстро, до того, как его участники начали сильно различаться спектрами своих мишеней. Если количественная информация, реализуемая *Нох*-белками, была в какой-то момент важнее качественной (паралог-специфичной), это могло подтолкнуть *Нох*-кластер к быстрой структурной экспансии с минимальной дивергенцией участников. При этом паралог-специфические функции стали появляться позже. Такое объяснение выглядит логичным, но оставляет вопросы: почему *Нох*-белки из разных паралогических групп качественно важны для спецификации нейронов и почему эти белки различаются структурно, а некоторые из их паралог-специфических функций консервативны (общие для Nephrozoa)? Создаётся впечатление, что отбор двигал эволюцию *Нох*-кластера сразу в нескольких направлениях, и это объяснимо, если нейрогенная функция не была единственной. Так это или нет, можно выяснить, обратившись к базальным таксонам.

За пределами группы Nephrozoa экспрессия *Нох*-генов изучена менее подробно, но известно, что маленькие и разорванные кластеры Acoelomorpha (сестринская ветвь Nephrozoa, ранее относимая к плоским червям) работают в нервной, мышечной и репродуктивной системах [53–56]. В единственном исследовании на эмбрионах [53]

показано, что три *Нох*-гена *Convolutriloba longifissura* (PG1, PG5 и PG9/14) коллинеарно включаются в пронеуральных территориях вскоре после гастрюляции. Два гена из трёх чуть позже или одновременно с этим событием работают в паренхиматозных внутренних доменах.

Нох-гены книдарий изучены довольно подробно [57–59] и экспрессию некоторых из них можно ассоциировать с нервной системой, например, *Нох1* (PG1) *Clytia hemisphaerica* работает в статоцистах, а *Anthox1* (PG9-подобный) – в апикальном султанчике у планул *Nematostella vectensis*. Однако на фоне разнообразных нейральных дифференцировок, в которых участвуют другие гомеобоксные гены книдарий, это очень скромный результат [60, 61]. Удивительно, что многие нейротрансмиттеры (в том числе ацетилхолин) и ферменты их биогенеза синтезируются у книдарий не в нейронах, а в клетках кишки [62]. Трудность анализа экспрессионных данных заключена ещё и в том, что прямое соответствие генов из *Нох*/Para*Нох*-классов у книдарий и билатерий неочевидно из-за сильной дивергенции или утраты ортологов [63]. И всё же среди генов, которые устойчиво попадают в категорию «PG1-подобные» или «PG2-подобные», нет прямых регуляторов нейрогенеза, зато есть гены с широкими доменами экспрессии на уровне эктодермы и энтомезодермы.

Итак, до появления последнего общего предка *Nephrozoa*, на уровне *Acoelomorpha*, *Нох*-гены уже были заняты в нескольких разных программах развития. Их функции у книдарий тоже не унифицируются до единственной и не завязаны на терминальную спецификацию нейронов. Путь от общего предка книдарий и билатерий до современных *Nephrozoa* сопровождался структурной экспансией *Нох*-кластера и сложными, скрытыми для нас перестройками регуляторных отношений между древними программами развития. Часть этих программ могла опираться на общие паралог-неспецифические функции *Нох*-генов, которые работают в отрыве от пространственной коллинеарной транскрипции. Мы предполагаем, что эти функции остались у современных животных, и чтобы их исследовать, нужно обратить внимание на общебиологические процессы, в которых задействованы *Нох*-гены. Существует некоторое количество примеров, где особенно ярко реализуется паралог-неспецифическая функция *Нох*-генов. Рассмотрим их в следующих разделах.

НОХ-БЕЛКИ КОНТРОЛИРУЮТ ТАЙМИНГ РАЗВИТИЯ ПРИ ПОМОЩИ АУТОФАГИИ

Аутофагия – это процесс клеточной деградации, необходимый для поддержания гомеостаза

клетки и обновления её цитоплазматических компонентов. Аутофагия высококонсервативна, и её влияние на разнообразные биологические функции описано у широкого круга организмов: от растений и дрожжей до человека [64]. Для билатерий аутофагия является важным инструментом раннего развития, так как она принимает участие в клеточных дифференцировках и тканевых перестройках [65, 66]. Например, у личинок дрозофилы активность аутофагии очень высока в жировом теле L3-бродячей (L3W) стадии, когда личинка быстро растёт и претерпевает метаморфоз, но не у более молодой L3-кормящейся (L3F) стадии. Было показано, что переход из стадии L3F в L3W контролируется экдизоном, и основными регуляторами аутофагии в этом случае выступают *Нох*-белки, которые подавляют преждевременную аутофагию на стадии L3F [67]. При нормальном развитии в жировом теле L3F-личинки обнаружена совместная неколлинеарная локализация *Нох*-белков из нескольких паралогических групп. Здесь *Нох*-белки подавляют экспрессию генов *atg* (18 генов), ответственных за аутофагию. Показано, что нокауты по отдельным *Нох*-генам (*Dfd*, *Scr*, *Ubx*, *abd-A*, *AbdB*) не приводят к преждевременному запуску аутофагии. Только единовременное выключение экспрессии всех *Нох*-паралогов в эксперименте на личинке L3F инициирует этот процесс [67]. Наоборот, пролонгированная экспрессия исследованных *Нох*-генов ингибирует аутофагию в клетках жирового тела личинок. Такие особи переходят в блуждающую стадию на 6–7 дней позже, чем контрольные, и это указывает на то, что принудительное поддержание экспрессии *Нох*-генов приводит к задержке развития дрозофилы. Таким образом, в жировом теле личинок универсальная активность *Нох*-белков несёт временную, а не пространственную информацию, регулируя наступление аутофагии на нужном этапе развития. Стоит отдельно отметить, что в культуре фибробластов млекопитающих *НохВ8* и *НохА9* тоже подавляют аутофагию. Эти же белки оказывают сходное действие на личинку дрозофилы при трансгенезе [67]. Эти предварительные исследования не исключают паралог-неспецифического участия *Нох*-генов в контроле аутофагии у последнего общего предка насекомых и позвоночных, но требуют проведения дополнительного анализа на широком круге объектов.

ЗАЧЕМ НОХ-ГЕНЫ РАБОТАЮТ ДО НАЧАЛА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ?

У многоклеточных животных *Нох*-гены не экспрессируются в тотипотентных и плюрипотентных клетках, поскольку эта экспрессия ин-

дуцирует дифференцировку. В эмбриональных стволовых клетках млекопитающих Нох-локусы имеют амбивалентный эпигенетический статус. Их гистоновый код содержит как репрессивные, так и пермиссивные метки [68]. Эти клетки не экспрессируют Нох-гены, но могут быстро начать это делать в случае дополнительных разрешающих сигналов, что приведёт их к началу дифференцировочного пути.

Несмотря на запрет работы Нох-генов в тотипотентных клетках, их материнские транскрипты были обнаружены в ооцитах млекопитающих (мышь, корова и человек [69]), амфибий (*Xenopus laevis* [70]), аннелид (*Platynereis dumerilii* [71]), многоножек (*Strigamia maritima* [72], *Trigoniulus corallinus* [73]), перепончатокрылых (муравьи трибы *Camponotini* [74]), декапод (*Macrobrachium olfersii* [75]) и даже у гидроидного полипа *Clitya hemisphaerica* [58]. Причём у всех животных, кроме *X. laevis*, в ооцитах экспрессировались гены из нескольких паралогических групп.

Структура ооцитарных транскриптов Нох-генов может дать подсказку об их функциях. На примере многоножки *Strigamia maritima* (Chilopoda) [72] было показано, что материнские РНК Нох-генов полиаденилированы, но некоторые из них не содержат открытой рамки считывания. Возможно, часть материнских РНК многоножки относится к классу регуляторных (белок-некодирующих) РНК. С другой стороны, транскрипты Нох-генов в ооцитах млекопитающих деаденилированы [69]. Это объяснимо, если такие материнские транскрипты нужны для поздних этапов развития и запасаются в стабильной (нетранслируемой) форме [76]. Кроме того, в ядрах ооцитов и в клетках ранних эмбрионов млекопитающих (мышь, корова) был обнаружен белок НОХВ9 [77], а белки Ubx и AbdA найдены в ооцитах муравьёв [74].

Очевидно, что ооцитарная функция Нох-генов отличается от канонической, поскольку представители разных паралогических групп локализуются в одной-единственной клетке. Консервативность этого явления говорит о его неслучайной природе. Пока не существует удачных экспериментов, однозначно указывающих на функции ооцитарных транскриптов Нох-генов, но можно выдвинуть несколько гипотез.

Не исключено, что большая часть материнских транскриптов Нох-генов не транслируются. Они могут быть элементом эпигенетической настройки зиготического генома. Известно, что некодирующая РНК часто работает каркасом для сборки белков ремоделинга хроматина, нацеливая их на подконтрольные локусы. Эта функция описана в том числе и для регуляторных РНК, которые считываются с Нох-кластеров позвоночных животных [78], и согласуется с наличием

транскриптов без открытой рамки считывания в ооцитах *Strigamia*. Важность некодирующей РНК в первых делениях дробления была показана на эмбрионах мыши [79].

С другой стороны, РНК-матрицы Нох-генов могут транслироваться. Например, белок НохВ9 присутствует в ядрах ооцитов (как зрелых, так и незрелых) и в ядрах клеток ранних эмбрионов [77]. Это не исключает раннюю функцию Нох-генов, направленную на оогенез. Известно, что у мыши ряд транскриптов Нох-генов и их кофакторов уже присутствует на стадии растущего ооцита [80]. Любопытно, что гомеодоменный белок Nobox из одноимённого семейства, одновременно близкого к ANTP- и PRD-классам [81], присутствует в ооцитах мыши и регулирует работу важных для оогенеза генов [82]. Нельзя исключить, что ооцитарные матрицы и белки Нох-генов нужны для транскрипционного контроля ранних зиготических генов [83].

Нох-белки могут быть не только транскрипционными регуляторами, но и регуляторами клеточного цикла, сплайсинга РНК, репликации и репарации ДНК [84–86]. Так, у некоторых Нох-белков есть сайты распознавания для серин/треонин-киназы ATM [87], чья роль в репарации двунитевых разрывов ДНК широко известна [88]. Как минимум для одного Нох-белка позвоночных, НохВ7, было экспериментально показано участие в этом процессе [85]. В эпителиальных клетках молочной железы НохВ7 увеличивает вероятность негомологичного соединения концов ДНК, связываясь с комплексом из гетеродимеров Ku70/80 (белками, узнающими двуцепочечные разрывы) и ДНК-протеинкиназой [85]. Экспрессия НохВ7 стимулирует работу ДНК-протеинкиназы, что коррелирует с эффективностью репарации, тогда как при нокауте по НохВ7 этот эффект пропадает. Кроме того, Нох-белки способствуют сборке пререпликативных комплексов. Например, НохD13 и НохC13 в различных клеточных культурах взаимодействуют при помощи гомеодоменов с белками пререпликативных комплексов ORC и Cdc6 [86, 89, 90]. Несмотря на то что упомянутые функции Нох-белков были описаны не в эмбриогенезе, мы предполагаем, что они всё же могут участвовать в первых стадиях развития многоклеточных животных. В раннем развитии синхронные деления бластомеров протекают с минимальным интервалом (нет G1- и G2-фаз цикла), поэтому для успешного завершения этапа дробления необходима очень точная настройка молекулярной машинерии ооцита. В данном случае ооцитарные Нох-белки могут ускорять сборку пререпликативных комплексов и усиливать репарацию ДНК для поддержания целостности генетического материала зародыша.

Безусловно, роль *Нох*-генов в оогенезе не прояснится без функциональных тестов на широком круге моделей. Не исключено, что ооцитарные РНК и белки *Нох*-генов могут быть «транскрипционным шумом» или побочными продуктами предыдущих этапов оогенеза [91].

ДОЗАЗАВИСИМЫЕ ФУНКЦИИ НОХ-БЕЛКОВ

Существуют дозозависимые функции Нох-белков, реализующиеся, когда морфология зачатка определяется их концентрацией [92]. У млекопитающих Нох-белки в дозозависимой манере задают морфологию позвонков [93] и устанавливают число и длину пальцев [94]. В обоих случаях постепенное снижение дозы Нох-белков усиливает выраженность морфологических изменений. Так,

при постепенном снижении дозы любого белка из постериорных паралогов НохА- и НохD-кластеров (*Noxd11*, *Noxd12*, *Noxa13*, *Noxd13*) пальцы линейно и паралог-независимо укорачиваются в зависимости от доли мутантных аллелей *Нох*-генов [94].

У беспозвоночных животных самый наглядный пример дозозависимой функции Нох-белков – регуляция морфологии крыльев. Эта функция описана у насекомых из разных клад и, по всей видимости, является универсальной для диверсификации формы и размера крыльев на втором (Т2) и третьем (Т3) грудных сегментах [92]. В её выполнении задействованы белки *Antp* и *Ubx*. У *Drosophila* дикого типа белок *Antp* присутствует только в Т2, а белок *Ubx* – в Т3, причём концентрация *Antp* в Т2 ниже, чем концентрация *Ubx* в Т3 (рис. 1, а) [95]. У мутантов *Ubx*^{-/-} вместо гальтера на Т3 образуется пара крыльев (рис. 1, б).

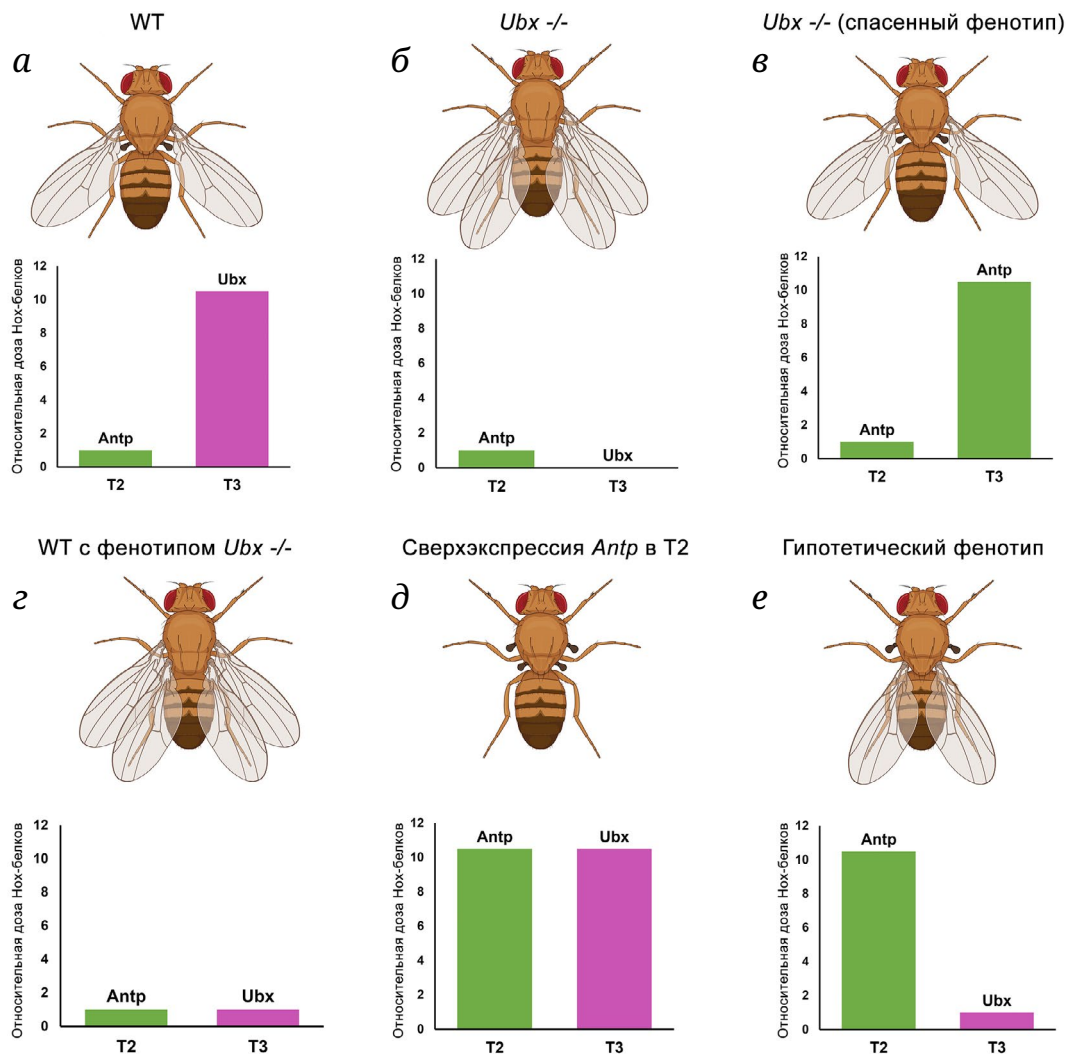


Рис. 1. Влияние дозы *Antp*- и *Ubx*-белков на фенотип *Drosophila*. а – «Дикий тип» (на рисунке обозначен как WT); б – мутант *Ubx*^{-/-}; в – доза *Antp* в Т3 на уровне *Ubx* в норме восстанавливает фенотип; г – доза *Ubx* в Т3 на уровне *Antp* в Т2 приводит к формированию крыла; д – доза *Antp* в Т2 на уровне *Ubx* в Т3 приводит к формированию гальтера; е – гипотетический фенотип, близкий к наблюдаемому у веерокрылых (отряд Strepsiptera), который может быть смоделирован на *Drosophila*. Иллюстрация подготовлена по данным статьи Paul et al. (2021) и Merabet, Carnesecchi (2024) [92, 95]

Если у таких мутантов повысить дозу Antp в T3 до уровня Ubx, то восстанавливается нормальный фенотип (на T3 образуются гальтеры (рис. 1, в) [95]. Наоборот, при снижении дозы Ubx в T3 вместо гальтер вырастают летательные крылья (рис. 1, з) [95]. Также при повышении дозы Antp в T2 вместо крыльев появляются гальтеры (рис. 1, д) [95].

НОХ-ФАКТОРЫ МОГУТ СЕКРЕТИРОВАТЬСЯ

Сложность, с которой сталкивается исследователь, решивший прояснить анцестральную функцию гомеобоксных генов из класса ANTP, связана с тем, что такая функция изначально не была единственной, по крайней мере, на уровне Metazoa. Это следует из устройства многозадачных гомеодоменных белков ANTP-класса (рис. 2). Ещё в конце прошлого столетия было обнаружено, что синтетический гомеодоменный белок из 60 аминокислотных остатков, повторяющий последовательность гомеодомена Antp *Drosophila*, может проникать сквозь мембраны нервных клеток крысы без посредничества каких-либо рецепторов. После проникновения он транспортируется в ядро и повышает уровень дифференцированности реципиентных клеток [96]. Позже выяснилось, что естественные гомеодоменные белки Emx1, Emx2, Engrailed-2 (En2), Ноха5, Нохб4, Нохс8, Knotted1, Otx2, Pax6 и Vax1 обнаруживаются в клетках, которые не экспрессируют их мРНК [97].

Оказалось, что способность к межклеточному переносу, подобно сигнальной молекуле или молекуле морфогена, есть у большинства гомеодо-

менных белков, в том числе за пределами класса ANTP [97–100]. Механизм, при помощи которого это происходит, ещё не вполне понятен. Известно, что секреция и интернализация зависят от двух перекрывающихся мотивов, локализованных в наиболее консервативных участках гомеодомена [100]. Кроме того, секреция зависит от отдельных гидрофобных аминокислот за пределами гомеодомена (рис. 2) [97]. Создаётся впечатление, что гомеодоменные белки способны попадать в любые типы клеток путём макропинацитарного эндоцитоза, но эффективность процесса зависит от устройства гликокаликса принимающей клетки [97, 101].

Во впечатляющем исследовании 2019 года [97] на способность к секреции и переносу были протестированы 162 человеческих гомеодоменных белка из разных классов, причём тест проводили одновременно на трёх разных культурах клеток (секреция – НЕК 293Т, GT1-7 и MDCK; интернализация – HeLa). Показано, что эффективность секреции сильно зависит от типа клеток и от характеристик первичной последовательности самих гомеодоменных белков. К примеру, белки EN2, НОХС8, РАХ6 и VAX1 секретируются во всех трёх клеточных культурах, а НОХА5 и ОТХ2 – только в двух. Десять белков, в числе которых оказался только один Нох (НОХА10), не секретируются во все, что, впрочем, не исключает такой возможности в других типах клеток. Все протестированные белки (включая не секретируемые) оказались способны к интернализации. Это значит, что именно секреция гомеодоменных белков – определяющий этап трансдукции, на котором клетки контролируют этот процесс.

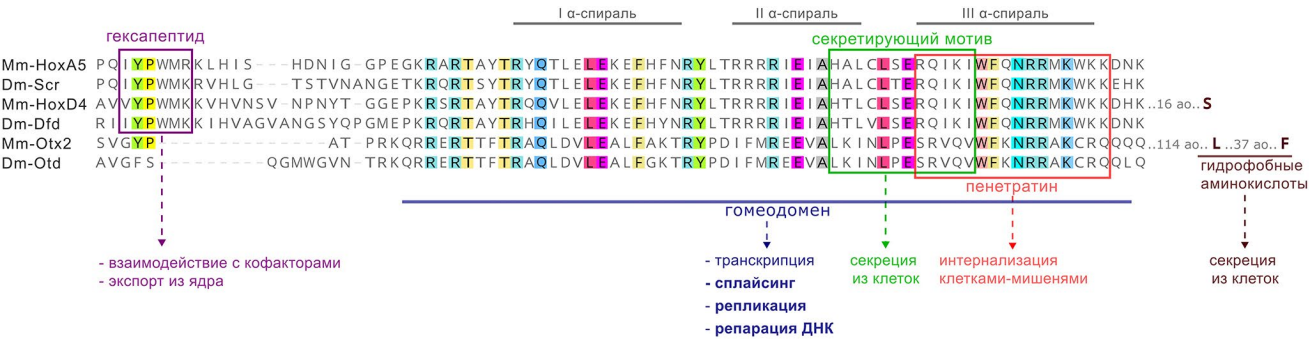


Рис. 2. Структурные мотивы белков из класса ANTP и их участие в реализации функций Нох-белков. Схема описывает функциональное значение основных доменов Нох-факторов. Гомеодомен, наиболее консервативный участок белков ANTP-класса, необходим Нох-факторам для реализации как канонических (транскрипция), так и неканонических функций. Помимо гомеодомена, высокая степень консервативности также характерна для короткого гексапептидного мотива, с помощью которого Нох-белки взаимодействуют с кофакторами [102]. Удивительно, что транспортная способность Нох-факторов также обуславливается этими доменами: гомеодомен содержит секретирующий и интернализирующий (пенетратин) мотивы, а консервативный остаток триптофана в гексапептиде необходим Нох-белкам для экспорта из ядра [103]. Для некоторых Нох-факторов показано, что их секреция может зависеть от отдельных гидрофобных аминокислот, локализованных в менее консервативных сайтах белка [97]. Цветными буквами в последовательностях отмечены консервативные позиции, цветными рамками окружены мотивы, неканонические функции выделены жирным шрифтом, Mm – *Mus musculus*, Dm – *Drosophila melanogaster*, ao – аминокислотные остатки

Гомеодоменные белки способны распространяться на два-три клеточных диаметра подобно паракринным сигнальным факторам, но есть примеры их обширной диффузии. У мыши белок *Otx2* синтезируется в сосудистом сплетении, секретруется в спинномозговую жидкость и накапливается по всей коре головного мозга [104].

Важно, что эндогенные белки преимущественно работают как транскрипционные факторы. Сразу после трансляции их захватывают кариоферины, распознающие сигнал ядерной локализации, и транспортируют в ядро. Экзогенные белки демонстрируют более широкий спектр функций. Показано, что секретируемый *Otx2* мыши перемещается в митохондрии, где связывается с митохондриальными АТР-синтазами и усиливает синтез АТР [105]. Ранее сообщалось, что экзогенный *En2* у *Xenopus* накапливается в конусах роста нейронов, управляет нацеливанием их аксонов на мишени и косвенно усиливает трансляцию [106].

Эти примеры не исключают проникновения экзогенных белков в ядра, где они запускают транскрипцию собственных мРНК и других специфических мишеней. Классический пример такого рода – вертикальный сигналинг во время гастрюляции у *Xenopus*. Было показано, что Нох-белки из пресомитной мезодермы последовательно включают экспрессию собственных *Нох*-генов в нейроэктодерме гастрюлы, т.е. происходит копирование позиционной информации из одного зародышевого листка в другой [104]. Прямой обмен транскрипционными факторами между слоями клеток координирует работу программ развития без посредничества морфогенов и сигнальных каскадов.

Поразительно, что сигнальная и регуляторная функции в общих случаях обеспечиваются здесь одним и тем же эволюционно древним, консервативным мотивом – гомеодоменом. Возможность решить две задачи при помощи одного инструмента могла использоваться для координации роста и развития первыми Metazoa, ещё до возникновения современных отношений между лигандами, способными перемещаться на большие расстояния (long range signaling), их мессенджерами и мишенями [104].

КАК НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ПРИВЕЛИ РАБОТУ НОХ-КЛАСТЕРА К КАНОНИЧЕСКОМУ ВИДУ?

Координированная работа *Нох*-генов, необходимая для выполнения канонической функции, остаётся большой эволюционной загадкой потому, что это многособытийный процесс. Он складывается из:

– эпигенетической настройки *Нох*-локусов, в том числе за счёт регуляторных РНК, закодированных в *Нох*-кластерах;

– установления топологически-ассоциированных доменов (TADs), которые стабилизируются в соответствии с положением клеток вдоль передне-задней оси;

– ответов на разнонаправленные сигналы морфогенов (ретиноевой кислоты, Wnt, Fgf, Vmp) в трёхмерных координатах эмбриона;

– согласованной экспрессии в клетках разных зародышевых листков за счёт уникального для гомеодоменных белков механизма – вертикального сигналинга;

– ответа на индивидуальные сигналы вышестоящих регуляторных белков, которые могут включать/выключать индивидуальные гены;

– реципрокных взаимодействий *Нох*-генов (постериорная супрессия и не только).

Некоторые из регуляторных механизмов представлены на рис. 3.

Как на основе неканонических функций могла возникнуть эта очень сложная картина? Возможно, разные способы регуляции *Нох*-кластера, нужные для выполнения отдельных задач, были кооптированы в новую программу. Интуитивно верным кажется предположение, что эта новая программа – гастрюляция в её «билатеральном варианте». На эту мысль наводит временная сопряжённость активации *Нох*-кластера и гастрюляционных процессов у вторичноротых животных. Кроме того, есть данные о преадаптации – два *Нох*-гена книдарии *Nematostella vectensis* (передний, *NvAx6*, и срединно-постериорный, *NvAx1*) важны для гастрюляции и спецификации орально-аборальной оси. Сайты их экспрессии маркируют оральный и аборальный полюса, а морфолиновый нокдаун подавляет гастрюляцию [107]. Однако эти гены не образуют кластер и работают в разных зародышевых листках. У *Drosophila* осевой паттерн *Нох*-генов устанавливается до начала гастрюляции, и пока нет исследований, где бы достоверно подтверждалось или опровергалось участие *Нох*-генов в гастрюляции у членистоногих. У некоторых спиральных животных (аннелиды, брахиоподы, моллюски) ранняя активация *Нох*-генов совпадает с началом или продолжением гастрюляции, но функциональные тесты пока отсутствуют [26, 108, 109].

С высокой степенью уверенности можно утверждать, что у последнего общего предка билатеральных животных *Нох*-кластер был один. Этот кластер мог использоваться для решения нескольких разных задач, например, для спецификации двигательных нейронов, установления нервно-мышечных синапсов и для какой-то из функций, требующих количественного изменения

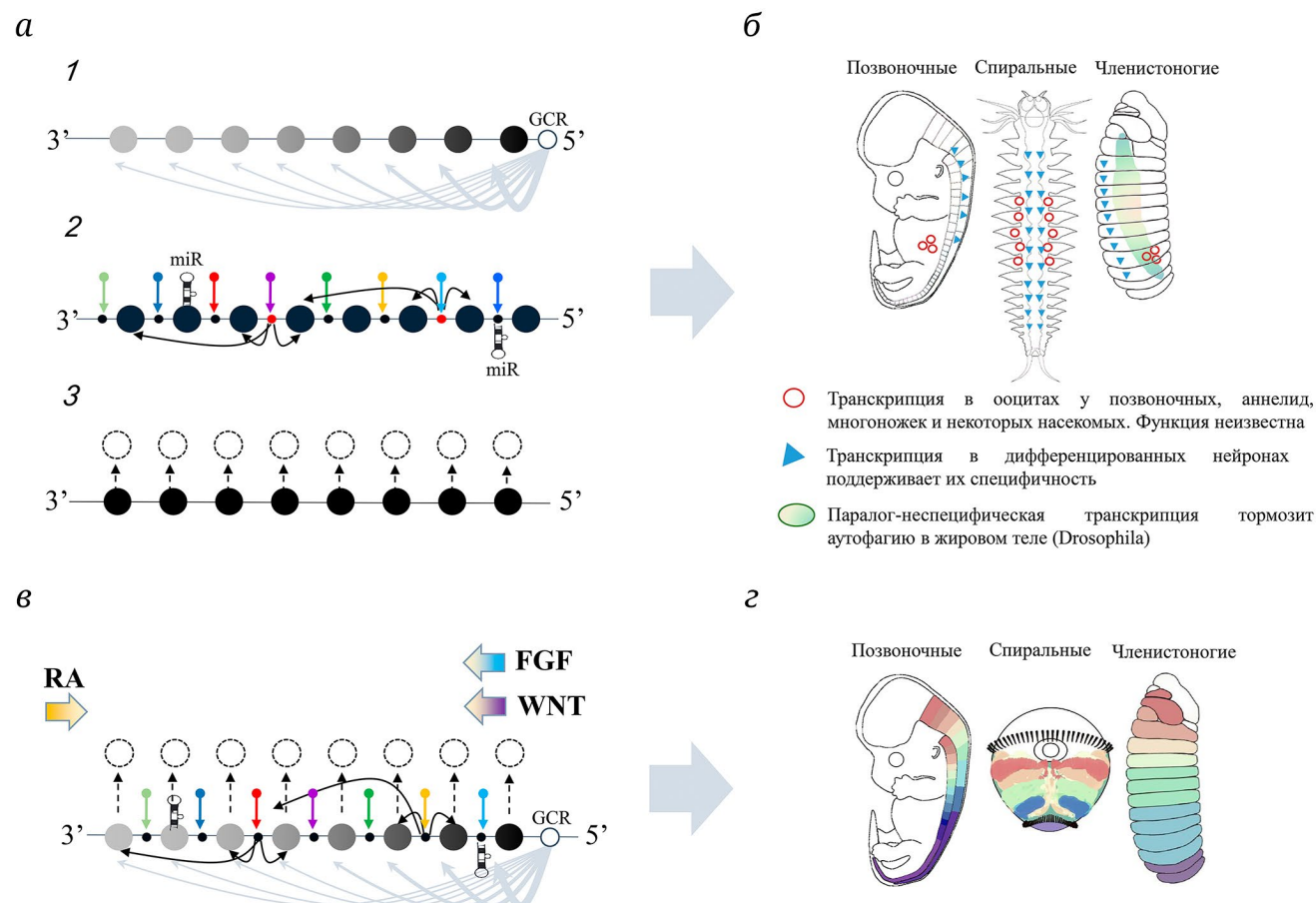


Рис. 3. Управление транскрипцией Нох-кластера. **а** – Некоторые механизмы контроля над Нох-кластером у билатеральных животных. 1 – GCR (Global Control Region), глобальный контролирующий элемент. Регуляторные элементы этого типа описаны у позвоночных; 2 – локальные *cis*-регуляторные модули (индивидуальные и обобщённые), сайт-специфичные транскрипционные факторы и микроРНК (miR), закодированные в последовательностях Нох-кластеров. Присутствуют у первичноротых и вторичноротых животных; 3 – вертикальный сигналинг – описан у позвоночных. **б** – Неканонические функции *Нох*-генов, которые могут быть реализованы при помощи отдельных элементов контроля. **в** – Упрощённая схема регуляции Нох-кластера во время реализации канонической функции осевого паттернирования. Не все из механизмов представлены на схеме и не все из представленных универсальны. У членистоногих не найдены GCR и не показан вертикальный сигналинг. Спиральные животные в целом плохо изучены на уровне активационных механизмов Нох-кластера, но среди них есть объекты с темпоральной коллинеарностью и изначальной мезодермальной транскрипцией. RA (Retinoic Acid), FGF и WNT – градиенты морфогенов

транскриптов в ответ на стимул (вероятно, концентрацию морфогена). Такая древняя функция могла быть связана с аутофагией, контролем над пролиферацией или гаметогенезом. Важно, что эта функция обеспечивалась градиентным распределением Нох-белков вдоль оси и удерживала *Нох*-гены в кластере. Предок *Nephrozoa* мог использовать весь кластер или какие-то гены из него для управления гастрულიей, но в линии современных *Ascoelomorpha* (сестринская ветвь *Nephrozoa*) это не так, потому что все *Нох*-гены *Convolutriloba* включаются после гастрულიи [53].

Разные способы управления одним и тем же кластером, очевидно, давали сбои, и какие-то из aberrантных вариантов подхватывались отбором. В эволюции билатеральных животных из линии *Nephrozoa* могли произойти два важных собы-

тия – объединение нескольких систем регуляции Нох-кластера в одной программе и гетерохронный сдвиг её активации в сторону более раннего развития. Наименее катастрофичный вариант предполагает серию гетерохронных сдвигов коллинеарной экспрессии *Нох*-генов во внутренних, мезодермальных по происхождению структурах вплоть до стадии гаструлы. После этого при помощи вертикального сигналинга *Нох*-гены начали коллинеарно включаться в прилегающей эктодерме (будущей нейроэктодерме), и животные приобрели новый мощный инструмент для контроля над ранним развитием. Этот инструмент легко масштабировался в зависимости от градиента морфогенов, он координировал развитие эктодермальных и мезодермальных тканей и был эволюционно пластичен за счёт многих элементов

управления, пришедших из более древних программ. Возможно, именно этот новый молекулярный механизм «детонировал» и вызвал «Кембрийский взрыв», потому что мог быстро изменять раннее развитие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие неканонических функций Нох-генов определяется самой структурой гомеодоменного белка, который может работать не только транскрипционным фактором, но и регулятором общебиологических процессов, таких как репарация ДНК, репликация, трансляция и сплайсинг РНК.

Модель «песочных часов», при всей наглядности, оставляет неканонические функции Нох-генов невидимыми. Согласно модели «обратных песочных часов» (Inverse hourglass model), которая справедлива для Metazoa в целом [110], существует принципиальное сходство в работе генов на самых ранних этапах развития (плюрипотентное состояние клеток, дробление) и на более поздних (дифференцировка, органогенез). Однако животные из разных типов будут сильно различаться ансамблями регуляторных генов и характером их вовлечённости в морфогенез в середине развития (mid-developmental transition), как раз между дроблением и коммитированной дифференцировкой [110]. Именно эти различия и определяют фундаментальную разницу между типами внутри Metazoa. Иными словами, можно выявить отдельные наборы сигнальных путей и транскрипционных факторов, которые взаимодействуют в период установления планов организации Metazoa. Их частная совокупность формирует облик типа. Оказалось, что гомеобоксные гены в целом и Нох-

гены в частности не попадают в категорию таких «типоспецифичных» регуляторов, потому что в дивергентный период развития их функции шире и консервативней.

Мы предполагаем, что у прото-Нох-гена изначально уже был широкий репертуар функций, причём часть из них опиралась на сигнальную природу его белка. Животные из ветви ParaHoxozoa оказались наследниками этой регуляторной сложности и приумножили её за счёт кооперации между программами развития, в которых использовались разные функциональные возможности Нох-белков. Эти программы возникали на разных этапах эволюции, и их следы сохранились у современных животных в виде отдельных паралог-неспецифических и дозозависимых функций.

Вклад авторов. М.А. Кулакова – концепция и руководство работой; М.А. Кулакова, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич – написание текста; М.А. Кулакова, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт Российского научного фонда (проект № 23-24-00426).

Благодарности. В работе использовали программное обеспечение для анализа последовательностей Geneious® 2023.2.1, доступ к которому был предоставлен ресурсным центром «ЦКП Хромас» Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Degnan, B. M., Vervoort, M., Larroux, C., and Richards, G. S. (2009) Early evolution of metazoan transcription factors, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 591-599, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.008>.
2. Ryan, J. F., Pang, K., Mullikin, J. C., Martindale, M. Q., and Baxevanis, A. D. (2010) The homeodomain complement of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa, *EvoDevo*, **1**, 9, <https://doi.org/10.1186/2041-9139-1-9>.
3. Pang, K., and Martindale, M. Q. (2008) Developmental expression of homeobox genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, *Dev. Genes Evol.*, **218**, 307-319, <https://doi.org/10.1007/s00427-008-0222-3>.
4. Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N. H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., and Carpenter, M. L. (2008) The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans, *Nature*, **454**, 955-960, <https://doi.org/10.1038/nature07191>.
5. Pastrana, C. C., DeBiasse, M. B., and Ryan, J. F. (2019) Sponges lack ParaHox genes, *Genome Biol. Evol.*, **11**, 1250-1257, <https://doi.org/10.1093/gbe/evz052>.
6. Lewis, E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Nature*, **276**, 565-570, <https://doi.org/10.1038/276565a0>.
7. Корчагина Н., Бакаленко Н., Кулакова М. (2010) Нох-кластер и эволюция морфогенозов, *Онтогенез*, **41**, 353-363.

8. Hubert, K. A., and Wellik, D. M. (2023) Hox genes in development and beyond, *Development*, **150**, <https://doi.org/10.1242/dev.192476>.
9. De Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B., and Balavoine, G. (1999) Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution, *Nature*, **399**, 772-776, <https://doi.org/10.1038/21631>.
10. Balavoine, G., de Rosa, R., and Adoutte, A. (2002) Hox clusters and bilaterian phylogeny, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **24**, 366-373, [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(02\)00237-3](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(02)00237-3).
11. Dressler, G. R., and Gruss, P. (1989) Anterior boundaries of Hox gene expression in mesoderm-derived structures correlate with the linear gene order along the chromosome, *Differentiation*, **41**, 193-201, <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00747.x>.
12. Duboule, D., and Dolle, P. (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes, *EMBO J.*, **8**, 1497-1505, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03534.x>.
13. Duboule, D. (1994) Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony, *Dev. Suppl.*, 135-142.
14. Larroux, C., Fahey, B., Degnan, S. M., Adamski, M., Rokhsar, D. S., and Degnan, B. M. (2007) The NK homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes, *Curr. Biol.*, **17**, 706-710, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.008>.
15. Copley, R. R. (2023) The ancestry of Antennapedia-like homeobox genes, *bioRxiv*, 2023.2003.2014.532566, <https://doi.org/10.1101/2023.03.14.532566>.
16. DuBuc, T. Q., Ryan, J. F., Shinzato, C., Satoh, N., and Martindale, M. Q. (2012) Coral comparative genomics reveal expanded Hox cluster in the cnidarian-bilaterian ancestor, *Integr. Comp. Biol.*, **52**, 835-841, <https://doi.org/10.1093/icb/ics098>.
17. Lynch, V. J., Roth, J. J., and Wagner, G. P. (2006) Adaptive evolution of Hox-gene homeodomains after cluster duplications, *BMC Evol. Biol.*, **6**, 86, <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-86>.
18. Duboule, D. (2007) The rise and fall of Hox gene clusters, *Development*, **134**, 2549-2560, <https://doi.org/10.1242/dev.001065>.
19. Seo, H. C., Edvardsen, R. B., Maeland, A. D., Bjordal, M., Jensen, M. F., Hansen, A., Flaatt, M., Weissenbach, J., Lehrach, H., Wincker, P., Reinhardt, R., and Chourrout, D. (2004) Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*, *Nature*, **431**, 67-71, <https://doi.org/10.1038/nature02709>.
20. Fröblius, A. C., and Funch, P. (2017) Rotiferan Hox genes give new insights into the evolution of metazoan bodyplans, *Nat. Commun.*, **8**, 9, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00020-w>.
21. Lee, P. N., Callaerts, P., De Couet, H. G., and Martindale, M. Q. (2003) Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties, *Nature*, **424**, 1061-1065, <https://doi.org/10.1038/nature01872>.
22. Monteiro, A. S., and Ferrier, D. E. (2006) Hox genes are not always Colinear, *Int. J. Biol. Sci.*, **2**, 95-103, <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.95>.
23. Stern, D. L. (1998) A role of Ultrabithorax in morphological differences between *Drosophila* species, *Nature*, **396**, 463-466, <https://doi.org/10.1038/24863>.
24. Slack, J. M., Holland, P. W., and Graham, C. F. (1993) The zootype and the phylotypic stage, *Nature*, **361**, 490-492, <https://doi.org/10.1038/361490a0>.
25. Lemaire, L., and Kessel, M. (1997) Gastrulation and homeobox genes in chick embryos, *Mech. Dev.*, **67**, 3-16, [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00102-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00102-0).
26. Kulakova, M., Bakalenko, N., Novikova, E., Cook, C. E., Eliseeva, E., Steinmetz, P. R., Kostyuchenko, R. P., Dondua, A., Arendt, D., Akam, M., and Andreeva, T. (2007) Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa), *Dev. Genes Evol.*, **217**, 39-54, <https://doi.org/10.1007/s00427-006-0119-y>.
27. Michaut, L., Jansen, H. J., Bardine, N., Durston, A. J., and Gehring, W. J. (2011) Analyzing the function of a hox gene: an evolutionary approach, *Dev. Growth Differ.*, **53**, 982-993, <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01307.x>.
28. Fröblius, A. C., Matus, D. Q., and Seaver, E. C. (2008) Genomic organization and expression demonstrate spatial and temporal Hox gene colinearity in the lophotrochozoan *Capitella* sp. I, *PLoS One*, **3**, e4004, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004004>.
29. Garcia-Fernández, J. (2005) The genesis and evolution of homeobox gene clusters, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 881-892, <https://doi.org/10.1038/nrg1723>.
30. Philippidou, P., and Dasen, J. S. (2013) Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization, *Neuron*, **80**, 12-34, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>.
31. Joshi, R., Sipani, R., and Bakshi, A. (2021) Roles of *Drosophila* Hox genes in the assembly of neuromuscular networks and behavior, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 786993, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.786993>.

32. Feng, W., Li, Y., and Kratsios, P. (2021) Emerging roles for hox proteins in the last steps of neuronal development in worms, flies, and mice, *Front. Neurosci.*, **15**, 801791, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.801791>.
33. Kourakis, M. J., Master, V. A., Lokhorst, D. K., Nardelli-Haeffliger, D., Wedeen, C. J., Martindale, M. Q., and Shankland, M. (1997) Conserved anterior boundaries of Hox gene expression in the central nervous system of the leech *Helobdella*, *Dev. Biol.*, **190**, 284-300, <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8689>.
34. Samadi, L., and Steiner, G. (2010) Expression of Hox genes during the larval development of the snail, *Gibbula varia* (L.)—further evidence of non-colinearity in molluscs, *Dev. Genes Evol.*, **220**, 161-172, <https://doi.org/10.1007/s00427-010-0338-0>.
35. Hinman, V. F., O'Brien, E. K., Richards, G. S., and Degnan, B. M. (2003) Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*, *Evol. Dev.*, **5**, 508-521, <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2003.03056.x>.
36. Barrera Grijalba, C. C., Rodríguez Monje, S. V., Gestal, C., and Wollesen, T. (2023) Octopod Hox genes and cephalopod plesiomorphies, *Sci. Rep.*, **13**, 15492, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42435-0>.
37. Kratsios, P., Kerk, S. Y., Catela, C., Liang, J., Vidal, B., Bayer, E. A., Feng, W., De La Cruz, E. D., Croci, L., Consalez, G. G., Mizumoto, K., and Hobert, O. (2017) An intersectional gene regulatory strategy defines subclass diversity of *C. elegans* motor neurons, *Elife*, **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.25751>.
38. Feng, W., Li, Y., Dao, P., Aburas, J., Islam, P., Elbaz, B., Kolarzyk, A., Brown, A. E., and Kratsios, P. (2020) A terminal selector prevents a Hox transcriptional switch to safeguard motor neuron identity throughout life, *Elife*, **9**, <https://doi.org/10.7554/eLife.50065>.
39. Li, Y., Osuma, A., Correa, E., Okebalama, M. A., Dao, P., Gaylord, O., Aburas, J., Islam, P., Brown, A. E., and Kratsios, P. (2020) Establishment and maintenance of motor neuron identity via temporal modularity in terminal selector function, *Elife*, **9**, <https://doi.org/10.7554/eLife.59464>.
40. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., and Brenner, S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **314**, 1-340, <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>.
41. Raji, J. I., and Potter, C. J. (2021) The number of neurons in *Drosophila* and mosquito brains, *PLoS One*, **16**, e0250381, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250381>.
42. Estacio-Gómez, A., and Díaz-Benjumea, F. J. (2014) Roles of *Hox* genes in the patterning of the central nervous system of *Drosophila*, *Fly (Austin)*, **8**, 26-32, <https://doi.org/10.4161/fly.27424>.
43. Friedrich, J., Sorge, S., Bujupi, F., Eichenlaub, M. P., Schulz, N. G., Wittbrodt, J., and Lohmann, I. (2016) Hox function is required for the development and maintenance of the *Drosophila* feeding motor unit, *Cell Rep.*, **14**, 850-860, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.077>.
44. Estacio-Gómez, A., Moris-Sanz, M., Schäfer, A. K., Perea, D., Herrero, P., and Díaz-Benjumea, F. J. (2013) Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergic neurons in the *Drosophila* central nervous system, *Development*, **140**, 2139-2148, <https://doi.org/10.1242/dev.090423>.
45. Catela, C., Chen, Y., Weng, Y., Wen, K., and Kratsios, P. (2022) Control of spinal motor neuron terminal differentiation through sustained *Hoxc8* gene activity, *Elife*, **11**, <https://doi.org/10.7554/eLife.70766>.
46. Hutlet, B., Theys, N., Coste, C., Ahn, M. T., Doshishti-Agolli, K., Lizen, B., and Gofflot, F. (2016) Systematic expression analysis of *Hox* genes at adulthood reveals novel patterns in the central nervous system, *Brain Struct. Funct.*, **221**, 1223-1243, <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0965-8>.
47. Reilly, M. B., Cros, C., Varol, E., Yemini, E., and Hobert, O. (2020) Unique homeobox codes delineate all the neuron classes of *C. elegans*, *Nature*, **584**, 595-601, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2618-9>.
48. Hobert, O. (2021) Homeobox genes and the specification of neuronal identity, *Nat. Rev. Neurosci.*, **22**, 627-636, <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00497-x>.
49. Sheng, G., Thouvenot, E., Schmucker, D., Wilson, D. S., and Desplan, C. (1997) Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors, *Genes Dev.*, **11**, 1122-1131, <https://doi.org/10.1101/gad.11.9.1122>.
50. Gehring, W. J., and Ikeo, K. (1999) *Pax 6*: mastering eye morphogenesis and eye evolution, *Trends Genet.*, **15**, 371-377, [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01776-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01776-x).
51. Gehring, W. J. (2005) New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors, *J. Hered.*, **96**, 171-184, <https://doi.org/10.1093/jhered/esi027>.
52. Merabet, S., and Mann, R. S. (2016) To be specific or not: the critical relationship between Hox and TALE proteins, *Trends Genet.*, **32**, 334-347, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.004>.
53. Hejnol, A., and Martindale, M. Q. (2009) Coordinated spatial and temporal expression of *Hox* genes during embryogenesis in the acoel *Convolutriloba longifissura*, *BMC Biol.*, **7**, 65, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-65>.
54. Moreno, E., Nadal, M., Baguña, J., and Martínez, P. (2009) Tracking the origins of the bilaterian *Hox* patterning system: insights from the acoel flatworm *Syngasteria roscoffensis*, *Evol. Dev.*, **11**, 574-581, <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00363.x>.

55. Moreno, E., De Mulder, K., Salvenmoser, W., Ladurner, P., and Martínez, P. (2010) Inferring the ancestral function of the posterior *Hox* gene within the bilateria: controlling the maintenance of reproductive structures, the musculature and the nervous system in the acoel flatworm *Isodiametra pulchra*, *Evol. Dev.*, **12**, 258-266, <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2010.00411.x>.
56. Moreno, E., Permanyer, J., and Martinez, P. (2011) The origin of patterning systems in bilateria-insights from the *Hox* and *ParaHox* genes in Acoelomorpha, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **9**, 65-76, [https://doi.org/10.1016/s1672-0229\(11\)60010-7](https://doi.org/10.1016/s1672-0229(11)60010-7).
57. Finnerty, J. R., and Martindale, M. Q. (1999) Ancient origins of axial patterning genes: *Hox* genes and *ParaHox* genes in the Cnidaria, *Evol. Dev.*, **1**, 16-23, <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.1999.99010.x>.
58. Chiori, R., Jager, M., Denker, E., Wincker, P., Da Silva, C., Le Guyader, H., Manuel, M., and Quéinnec, E. (2009) Are *Hox* genes ancestrally involved in axial patterning? Evidence from the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria), *PLoS One*, **4**, e4231, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004231>.
59. Nong, W., Cao, J., Li, Y., Qu, Z., Sun, J., Swale, T., Yip, H. Y., Qian, P. Y., Qiu, J. W., Kwan, H. S., Bendena, W., Tobe, S., Chan, T. F., Yip, K. Y., Chu, K. H., Ngai, S. M., Tsim, K. Y., Holland, P. W. H., and Hui, J. H. L. (2020) Jellyfish genomes reveal distinct homeobox gene clusters and conservation of small RNA processing, *Nat. Commun.*, **11**, 3051, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16801-9>.
60. Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., and Chera, S. (2009) Origins of neurogenesis, a cnidarian view, *Dev. Biol.*, **332**, 2-24, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.563>.
61. Faltine-Gonzalez, D., Havrilak, J., and Layden, M. J. (2023) The brain regulatory program predates central nervous system evolution, *Sci. Rep.*, **13**, 8626, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35721-4>.
62. Oren, M., Brickner, I., Appelbaum, L., and Levy, O. (2014) Fast neurotransmission related genes are expressed in non nervous endoderm in the sea anemone *Nematostella vectensis*, *PLoS One*, **9**, e93832, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093832>.
63. Steinworth, B. M., Martindale, M. Q., and Ryan, J. F. (2023) Gene loss may have shaped the Cnidarian and Bilaterian *Hox* and *ParaHox* complement, *Genome Biol. Evol.*, **15**, <https://doi.org/10.1093/gbe/evac172>.
64. Reggiori, F., and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell, *Eukaryot. Cell*, **1**, 11-21, <https://doi.org/10.1128/ec.01.1.11-21.2002>.
65. Wada, Y., Sun-Wada, G. H., Kawamura, N., and Aoyama, M. (2014) Role of autophagy in embryogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **27**, 60-66, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.010>.
66. Tsukamoto, S., Kuma, A., and Mizushima, N. (2008) The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition, *Autophagy*, **4**, 1076-1078, <https://doi.org/10.4161/auto.7065>.
67. Banreti, A., Hudry, B., Sass, M., Saurin, A. J., and Graba, Y. (2014) *Hox* proteins mediate developmental and environmental control of autophagy, *Dev. Cell*, **28**, 56-69, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.024>.
68. Sachs, M., Onodera, C., Blaschke, K., Ebata, K. T., Song, J. S., and Ramalho-Santos, M. (2013) Bivalent chromatin marks developmental regulatory genes in the mouse embryonic germline *in vivo*, *Cell Rep.*, **3**, 1777-1784, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.032>.
69. Paul, D., Bridoux, L., Rezsöházy, R., and Donnay, I. (2011) *HOX* genes are expressed in bovine and mouse oocytes and early embryos, *Mol. Reprod. Dev.*, **78**, 436-449, <https://doi.org/10.1002/mrd.21321>.
70. Kondo, M., Yamamoto, T., Takahashi, S., and Taira, M. (2017) Comprehensive analyses of *hox* gene expression in *Xenopus laevis* embryos and adult tissues, *Dev. Growth Differ.*, **59**, 526-539, <https://doi.org/10.1111/dgd.12382>.
71. Maslakov, G. P., Kulishkin, N. S., Surkova, A. A., and Kulakova, M. A. (2021) Maternal transcripts of *Hox* genes are found in oocytes of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Nereididae), *J. Dev. Biol.*, **9**, <https://doi.org/10.3390/jdb9030037>.
72. Chipman, A. D., Ferrier, D. E., Brena, C., Qu, J., Hughes, D. S., Schröder, R., Torres-Oliva, M., Znassi, N., Jiang, H., Almeida, F. C., Alonso, C. R., Apostolou, Z., Aqrawi, P., Arthur, W., Barna, J. C., Blankenburg, K. P., Brites, D., Capella-Gutiérrez, S., Coyle, M., Dearden, P. K., et al. (2014) The first myriapod genome sequence reveals conservative arthropod gene content and genome organisation in the centipede *Strigamia maritima*, *PLoS Biol.*, **12**, e1002005, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002005>.
73. Qu, Z., Nong, W., So, W. L., Barton-Owen, T., Li, Y., Leung, T. C. N., Li, C., Baril, T., Wong, A. Y. P., Swale, T., Chan, T. F., Hayward, A., Ngai, S. M., and Hui, J. H. L. (2020) Millipede genomes reveal unique adaptations during myriapod evolution, *PLoS Biol.*, **18**, e3000636, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000636>.
74. Rafiqi, A. M., Rajakumar, A., and Abouheif, E. (2020) Origin and elaboration of a major evolutionary transition in individuality, *Nature*, **585**, 239-244, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2653-6>.
75. Jaramillo, M. L., Ammar, D., Quispe, R. L., Bonatto Paese, C. L., Gruending, A. P., Müller, Y. M., and Nazari, E. M. (2022) Identification of *Hox* genes and their expression profiles during embryonic development of the emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **338**, 292-300, <https://doi.org/10.1002/jez.b.23118>.

76. Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., and Navarro, P. A. (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence, *Theriogenology*, **71**, 836-848, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>.
77. Sauvegarde, C., Paul, D., Bridoux, L., Jouneau, A., Degrelle, S., Hue, I., Rezsosazy, R., and Donnay, I. (2016) Dynamic pattern of HOXB9 protein localization during oocyte maturation and early embryonic development in mammals, *PLoS One*, **11**, e0165898, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165898>.
78. Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., and Chang, H. Y. (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs, *Cell*, **129**, 1311-1323, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>.
79. Iyyappan, R., Aleshkina, D., Zhu, L., Jiang, Z., Kinterova, V., and Susor, A. (2021) Oocyte specific lncRNA variant *Rose* influences oocyte and embryo development, *Noncoding RNA Res.*, **6**, 107-113, <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2021.06.001>.
80. Kageyama, S., Gunji, W., Nakasato, M., Murakami, Y., Nagata, M., and Aoki, F. (2007) Analysis of transcription factor expression during oogenesis and preimplantation development in mice, *Zygote*, **15**, 117-128, <https://doi.org/10.1017/s096719940700411x>.
81. Holland, P. W., Booth, H. A., and Bruford, E. A. (2007) Classification and nomenclature of all human homeobox genes, *BMC Biol.*, **5**, 47, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47>.
82. Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., and Matzuk, M. M. (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression, *Science*, **305**, 1157-1159, <https://doi.org/10.1126/science.1099755>.
83. Jukam, D., Shariati, S. A. M., and Skotheim, J. M. (2017) Zygotic genome activation in vertebrates, *Dev. Cell*, **42**, 316-332, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.026>.
84. Carnesecchi, J., Boumpas, P., van Nierop, Y. S. P., Domsch, K., Pinto, H. D., Borges Pinto, P., and Lohmann, I. (2022) The Hox transcription factor Ultrabithorax binds RNA and regulates co-transcriptional splicing through an interplay with RNA polymerase II, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 763-783, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1250>.
85. Rubin, E., Wu, X., Zhu, T., Cheung, J. C., Chen, H., Lorincz, A., Pandita, R. K., Sharma, G. G., Ha, H. C., Gasson, J., Hanakahi, L. A., Pandita, T. K., and Sukumar, S. (2007) A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair, *Cancer Res.*, **67**, 1527-1535, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-06-4283>.
86. Salsi, V., Ferrari, S., Ferraresi, R., Cossarizza, A., Grande, A., and Zappavigna, V. (2009) HOXD13 binds DNA replication origins to promote origin licensing and is inhibited by geminin, *Mol. Cell Biol.*, **29**, 5775-5788, <https://doi.org/10.1128/MCB.00509-09>.
87. Primon, M., Hunter, K. D., Pandha, H. S., and Morgan, R. (2019) Kinase regulation of HOX transcription factors, *Cancers (Basel)*, **11**, <https://doi.org/10.3390/cancers11040508>.
88. Lavin, M. F., and Kozlov, S. (2007) ATM activation and DNA damage response, *Cell Cycle*, **6**, 931-942, <https://doi.org/10.4161/cc.6.8.4180>.
89. Comelli, L., Marchetti, L., Arosio, D., Riva, S., Abdurashidova, G., Beltram, F., and Falaschi, A. (2009) The homeotic protein HOXC13 is a member of human DNA replication complexes, *Cell Cycle*, **8**, 454-459, <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7649>.
90. Marchetti, L., Comelli, L., D'Innocenzo, B., Puzzi, L., Luin, S., Arosio, D., Calvello, M., Mendoza-Maldonado, R., Peverali, F., Trovato, F., Riva, S., Biamonti, G., Abdurashidova, G., Beltram, F., and Falaschi, A. (2010) Homeotic proteins participate in the function of human-DNA replication origins, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8105-8119, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq688>.
91. Vieux, K. F., and Clarke, H. J. (2018) CNOT6 regulates a novel pattern of mRNA deadenylation during oocyte meiotic maturation, *Sci. Rep.*, **8**, 6812, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25187-0>.
92. Merabet, S., and Carnesecchi, J. (2024) Hox dosage and morphological diversification during development and evolution, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **152-153**, 70-75, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.11.009>.
93. Horan, G. S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A., and Behringer, R. R. (1995) Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed, *Genes Dev.*, **9**, 1667-1677, <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1667>.
94. Zákány, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X., and Duboule, D. (1997) Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13695-13700, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13695>.
95. Paul, R., Giraud, G., Domsch, K., Duffrais, M., Marmigère, F., Khan, S., Vanderperre, S., Lohmann, I., Stoks, R., Shashidhara, L. S., and Merabet, S. (2021) Hox dosage contributes to flight appendage morphology in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **12**, 2892, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23293-8>.
96. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1864-1868, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.

97. Lee, E. J., Kim, N., Park, J. W., Kang, K. H., Kim, W. I., Sim, N. S., Jeong, C. S., Blackshaw, S., Vidal, M., Huh, S. O., Kim, D., Lee, J. H., and Kim, J. W. (2019) Global analysis of intercellular homeodomain protein transfer, *Cell Rep.*, **28**, 712-722.e713, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.056>.
98. Lucas, W. J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., and Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata, *Science*, **270**, 1980-1983, <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1980>.
99. Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015) Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system, *Neuron*, **85**, 911-925, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.019>.
100. Spatazza, J., Di Lullo, E., Joliot, A., Dupont, E., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2013) Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed, *Pharmacol. Rev.*, **65**, 90-104, <https://doi.org/10.1124/pr.112.006577>.
101. Joliot, A. H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C., and Prochiantz, A. (1991) alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide, *New Biol.*, **3**, 1121-1134.
102. Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Bérenger, H., Pradel, J., and Graba, Y. (2003) The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions, *Dev. Cell*, **4**, 761-768, [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00126-6).
103. Duffraisse, M., Paul, R., Carnesecchi, J., Hudry, B., Banreti, A., Reboulet, J., Ajuria, L., Lohmann, I., and Merabet, S. (2020) Role of a versatile peptide motif controlling Hox nuclear export and autophagy in the *Drosophila* fat body, *J. Cell Sci.*, **133**, <https://doi.org/10.1242/jcs.241943>.
104. Bardine, N., Lamers, G., Wacker, S., Donow, C., Knoechel, W., and Durston, A. (2014) Vertical signalling involves transmission of Hox information from gastrula mesoderm to neurectoderm, *PLoS One*, **9**, e115208, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115208>.
105. Kim, H. T., Kim, S. J., Sohn, Y. I., Paik, S. S., Caplette, R., Simonutti, M., Moon, K. H., Lee, E. J., Min, K. W., Kim, M. J., Lee, D. G., Simeone, A., Lamonerie, T., Furukawa, T., Choi, J. S., Kweon, H. S., Picaud, S., Kim, I. B., Shong, M., and Kim, J. W. (2015) Mitochondrial protection by exogenous Otx2 in mouse retinal neurons, *Cell Rep.*, **13**, 990-1002, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.075>.
106. Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons, *Nature*, **438**, 94-98, <https://doi.org/10.1038/nature04110>.
107. DuBuc, T. Q., Stephenson, T. B., Rock, A. Q., and Martindale, M. Q. (2018) Hox and Wnt pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation, *Nat. Commun.*, **22**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04184-x>.
108. Schiemann, S. M., Martín-Durán, J. M., Børve, A., Vellutini, B. C., Passamaneck, Y. J., and Hejnol, A. (2017). Clustered brachiopod Hox genes are not expressed collinearly and are associated with lophotrochozoan novelties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1913-1922, <https://doi.org/10.1073/pnas.1614501114>.
109. Salamanca-Díaz, D. A., Calcino, A. D., de Oliveira, A. L., Wanninger, A. (2021). Non-collinear Hox gene expression in bivalves and the evolution of morphological novelties in mollusks, *Sci. Rep.*, **11**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82122-6>.
110. Levin, M., Anavy, L., Cole, A. G., Winter, E., Mostov, N., Khair, S., Senderovich, N., Kovalev, E., Silver, D. H., Feder, M., Fernandez-Valverde, S. L., Nakanishi, N., Simmons, D., Simakov, O., Larsson, T., Liu, S. Y., Jerafi-Vider, A., Yaniv, K., Ryan, J. F., Martindale, M. Q., et al. (2016) The mid-developmental transition and the evolution of animal body plans, *Nature*, **531**, 637-641, <https://doi.org/10.1038/nature16994>.

IRREDUCIBLE COMPLEXITY OF *HOX* GENE: A PATH TO THE CANONICAL FUNCTION OF THE *HOX* CLUSTER

Review

M. A. Kulakova*, G. P. Maslakov, and L. O. Poliushkevich

Department of Embryology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; e-mail: m.kulakowa@spbu.ru

The evolution of major taxa is often associated with the emergence of new gene families. In all multicellular animals except sponges and comb jellies, the genomes contain *Hox* genes, which are crucial

regulators of development. The canonical function of *Hox* genes involves the collinear patterning of body parts in bilateral animals. This general function is implemented through complex, precisely coordinated mechanisms, not all of which are evolutionarily conserved and fully understood. We suggest that the emergence of this regulatory complexity was preceded by a stage of cooperation between more ancient morphogenetic programs or their individual elements. Footprints of these programs may be present in modern animals to execute non-canonical *Hox* functions. Non-canonical functions of *Hox* genes are involved in maintaining terminal nerve cell specificity, autophagy, oogenesis, pre-gastrulation embryogenesis, vertical signaling, and a number of general biological processes. These functions are realized by the basic properties of homeodomain protein and could have triggered the evolution of ParaHoxozoa and Nephrozoa subsequently.

Keywords: homeodomain, ANTP, *Hox* genes, non-canonical functions of *Hox* genes, Metazoa, ParaHoxozoa, Nephrozoa, neurogenesis, developmental autophagy, oogenesis, vertical signaling

МЕТОДЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИМОРФИЗМОВ НЕКОДИРУЮЩИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Обзор

© 2024 А.Н. Уварова^{1*}, Е.А. Ткаченко^{2,3}, Е.М. Стасевич^{1,4}, Э.А. Жеремян¹,
К.В. Корнеев¹, Д.В. Купраш^{1,3}

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

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

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

⁴ Московский физико-технический институт, 141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 20.11.2023

После доработки 27.03.2024

Принята к публикации 11.04.2024

В настоящее время благодаря полногеномным исследованиям охарактеризовано множество ассоциаций между генетическими полиморфизмами и различными заболеваниями. Большинство клинически значимых полиморфизмов локализованы в некодирующих областях генома. Современные биоинформатические ресурсы позволяют предсказывать молекулярные механизмы влияния некодирующих полиморфизмов на экспрессию генов, однако такие гипотезы нуждаются в экспериментальной проверке. В представленном обзоре рассмотрены основные методы определения молекулярных механизмов зависимости патогенеза заболеваний от тех или иных генетических вариантов некодирующих последовательностей. В частности, рассмотрены способы определения факторов транскрипции, эффективность связывания которых зависит от варианта полиморфизма. Биоинформатические ресурсы, позволяющие предсказывать механизм влияния полиморфизмов на патогенез заболеваний, достигли впечатляющего развития, однако необходимость в экспериментальных подходах к данному вопросу остается актуальной.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: функциональные полиморфизмы, регуляторные области, транскрипционные факторы, репортерный анализ, CRISPR-Cas.

DOI: 10.31857/S0320972524060023 EDN: XMSUZO

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то что геномы людей на 99,9% идентичны, именно оставшиеся 0,1% генетических вариаций лежат в основе фенотипических различий, в том числе восприимчивости к болезням [1]. К таким генетическим вариантам отно-

сят однонуклеотидные полиморфизмы (SNV, Single Nucleotide Variation или SNP, Single Nucleotide Polymorphism), инсерции/делеции (indel), а также структурные вариации длиной более 50 п.н. (SV, Structural Variation) [2]. Наиболее распространенным генетическим вариантом является SNP – вариация (вариант аллеля) последовательности

Принятые сокращения: ДЦР – двухцепочечный разрыв ДНК; НТО – нетранслируемая область; ТФ – транскрипционный фактор; ChIP – иммунопреципитация хроматина; CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; EMSA – анализ сдвига электрофоретической подвижности; GWAS – полногеномные исследования; HDR – гомологически направленная репарация; MPRA – массовый параллельный репортерный анализ; QTL – локус количественного признака; eQTL – локус количественного признака, регулирующий экспрессию генов на уровне транскрипции; raQTL – локус количественного признака, определяемый по активности репортерного гена; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

* Адресат для корреспонденции.

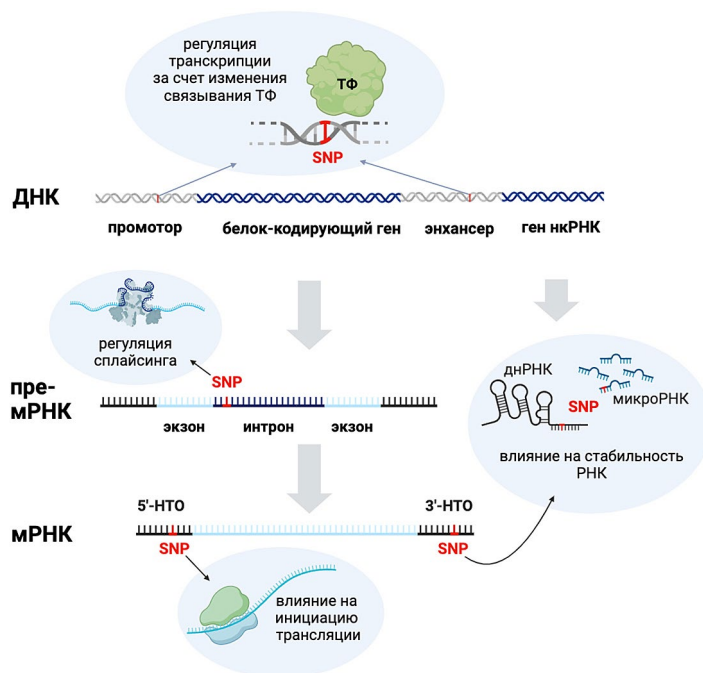


Рис. 1. Основные механизмы влияния некодирующих полиморфизмов на регуляцию экспрессии генов (изображение сделано с помощью BioRender.com)

ДНК размером в один нуклеотид у представителей одного вида, встречающаяся в популяции с частотой не менее 1% [3]. SNP встречаются в геноме каждые 200–300 п.н., располагаются как в кодирующих частях генома, так и в регуляторных (промоторы, энхансеры, интроны и нетранслируемые области) [4, 5]. Актуальность изучения SNP заключается в том, что такие генетические варианты часто ассоциированы с различными заболеваниями, что показано с помощью многочисленных полногеномных исследований (Genome-Wide Association Studies, GWAS). Порядка 95% клинически значимых SNP локализованы в некодирующих областях генома [6], и их функциональная значимость может быть связана с изменением регуляторных характеристик областей, окружающих полиморфизм [7]. К таким регуляторным областям эукариотического генома можно отнести промоторы, энхансеры 5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО) белок-кодирующих генов, области генов некодирующих РНК (нкРНК) и регуляторные элементы сплайсинга (SRE, splicing regulatory elements) [5, 8]. Промоторы инициируют транскрипцию генов, а энхансерные элементы усиливают эту инициацию [9]. Промоторы являются предпочтительными местами посадки транскрипционных факторов (ТФ) и РНК-полимеразы II на ДНК и включают в себя область первого транскрибируемого нуклеотида транскрипта (сайт начала транскрипции, TSS) [10]. Энхансеры, впервые идентифицированные с помощью репортерного анализа как элементы, способные увеличивать экспрессию репортерного гена [11], представляют собой плат-

формы для связывания ТФ, способные действовать независимо от ориентации, расстояния и расположения по отношению к гену-мишени [12]. 5'- и 3'-НТО играют важную роль в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и являются частью зрелой кодирующей мРНК. Так, 5'-НТО содержат различные регуляторные компоненты, влияющие на инициацию трансляции, а в состав 3'-НТО входят последовательности, связывающие микроРНК и приводящие к деградации транскрипта [5]. Также следует отметить, что некодирующие полиморфизмы в составе НТО могут участвовать и в регуляции транскрипции, поскольку последовательность 5'-НТО обычно пересекается с промоторными регионами генов, а последовательность 3'-НТО может пересекаться с другими регуляторными элементами генов – например, энхансерами [13]. Некодирующие полиморфизмы также располагаются в нкРНК, о влиянии которых на созревание РНК, регуляцию транскрипции, ремоделирование хроматина и посттранскрипционные модификации РНК за последние годы получено много информации [14].

Будучи наиболее часто встречающимся классом генетических вариантов, SNP являются основным генетическим маркером при картировании локусов количественных признаков (QTL, Quantitative Trait Loci), которые можно условно разделить на те, которые регулируют экспрессию генов непосредственно на уровне транскрипции и хроматина, что отражается на уровне мРНК (eQTL – expression QTL, регулирующий экспрессию генов на уровне транскрипции), и те,

которые влияют на посттранскрипционные процессы (sQTL – splicing QTL, регулирующие альтернативный сплайсинг пре-мРНК; pQTL – protein QTL, регулирующие экспрессию белка) [15]. Механизмом функционального влияния полиморфизмов на геномном уровне может быть нарушение функционирования регуляторных элементов вследствие изменения последовательности сайтов взаимодействия ТФ с ДНК (как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения эффективности связывания) [16]. На посттранскрипционном уровне некодирующие полиморфизмы могут влиять на активность 5'- и 3'-НТО мРНК, которые играют важную роль в регуляции трансляции и стабильности мРНК, в том числе за счет изменения связывания регуляторных микроРНК [17–19]. Также SNP в последовательности незрелой микроРНК могут влиять на эффективность созревания микроРНК и изменять эффективность связывания с мРНК [20, 21], а аллельные варианты в составе днРНК (длинных некодирующих РНК) – с разной эффективностью модулировать концентрацию комплементарных микроРНК [22]. Значительное количество функциональных генетических вариантов, классифицируемых как sQTL, располагаются в регуляторных элементах сплайсинга, непосредственно изменяя последовательность сайтов сплайсинга или модифицируя сайты связывания РНК-связывающих белков [23]. Основные механизмы влияния некодирующих полиморфизмов на регуляцию экспрессии генов представлены на рис. 1.

В представленном обзоре описаны основные экспериментальные подходы к анализу функциональных некодирующих аллельных вариантов, в том числе рассмотрены способы определения ТФ, эффективность связывания которых зависит от аллельного варианта.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОВ-РЕПОРТЕРОВ

Экспериментальные методы изучения влияния полиморфизмов на экспрессию гена можно разделить на две большие группы: исследования с использованием генетических репортерных конструкций и изучение полиморфизмов непосредственно в нативном геномном контексте.

Первая группа методов включает в себя использование репортерных генетических конструкций, в которых влияние генетического варианта на регуляторный элемент определяется по активности репортерного гена (reporter assay QTL, гаQTL). К ним относится и классический метод люциферазного репортерного анализа, когда

аллельные варианты исследуемой регуляторной последовательности (промотора или энхансера) интегрируют в репортерную конструкцию и сравнивают активность гена-репортера в полученных конструкциях после их трансфекции в физиологически релевантную культуру клеток [24]. С помощью метода двойного люциферазного теста описано множество гаQTL в разных типах клеток и регуляторных элементах. Так, ранее были предложены молекулярные механизмы, объясняющие связь между развитием заболеваний и генетическими полиморфизмами, расположенными в регуляторных зонах различных генов: промоторе [25–28], близкорасположенных энхансерных областях [29, 30] и энхансерах, расположенных в отдаленных межгенных локусах [31, 32].

Поиск sQTL в системах с геном-репортером обычно затруднен размером исследуемого гена, превышающим емкость репортерной плазмиды. В такой ситуации используют так называемые репортерные мини-гены. Конструкция мини-гена включает в себя фрагмент исследуемого локуса, содержащий полиморфизм и достаточный для воспроизведения природной картины сплайсинга между репортерами сплайсинга (как правило, между двумя экзонами). Способность исследуемой области влиять на эффективность сплайсинга измеряется по экспрессии целевого транскрипта либо в ядерном экстракте с помощью количественного ПЦР-анализа (кПЦР), либо в живых клетках, если кодируемый мини-геном репортерный белок позволяет это сделать [33]. Так, с помощью репортерного анализа мини-генов были охарактеризованы полиморфизмы, регулирующие сплайсинг гена субъединицы кальциевого канала *SCN1A*, связанного с эпилепсией [34], компонента системы репарации ДНК *RAD51C*, проявляющего себя в качестве онкосупрессора [35] и ряда других.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ РЕПОРТЕРНЫЕ АНАЛИЗЫ

За последнее десятилетие появилось множество модификаций высокопроизводительных репортерных анализов. Их можно классифицировать по регуляторным областям, которые они позволяют исследовать, а также по техническим особенностям. Так, протокол массового параллельного репортерного анализа (MPRA, Massively Parallel Reporter Assay) включает в себя синтез последовательностей ДНК (потенциальных энхансеров/промоторов, 5'-НТО либо 3'-НТО) с добавлением уникальных баркодов и клонирование этих последовательностей в репортерные плазмиды, которые затем трансфицируются в типы клеток, интересующие исследователей. Анализ активности

регуляторных областей происходит с помощью высокопроизводительного секвенирования и количественного определения баркодов, которые однозначно определяют конкретную регуляторную последовательность и коррелируют с уровнем РНК репортерного гена [36, 37]. Метод MPRA естественным образом подходит не только для изучения функциональности регуляторных элементов, но и для оценки функционального влияния их генетических вариантов [38]. Так, например, с помощью метода MPRA был проведен скрининг полиморфизмов, расположенных в некодирующих областях генома и ассоциированных с шизофренией и с болезнью Альцгеймера. Интересно, что из 148 SNP, показавших аллельные различия в клетках K562 и 53 – в клетках SK-SY5Y, только 9 показали аллельные различия в обеих клеточных линиях, наглядно демонстрируя, что генетические варианты обычно оказывают свое регуляторное действие только в определенных типах клеток [39]. Применение метода MPRA к библиотеке 5'-НТО генов человека позволило выявить 45 ассоциированных с заболеваниями аллельных вариантов, которые значительно влияют на процесс загрузки мРНК на рибосомы, однако интересно, что для большинства из найденных вариантов полученных данных оказалось недостаточно для изменения классификации патогенности в базе данных Clinvar, а наиболее яркий эффект показали 3 полиморфизма, которые создавали новый стартовый кодон, то есть влияли на структуру белка [40]. В другой работе Griesemer в 6 клеточных линиях человека было изучено более 12 000 3'-НТО-вариантов, ассоциированных с заболеваниями человека и/или находящихся под положительным давлением в человеческой популяции [41]. Оказалось, что несколько сотен из них значимо влияли на уровень репортерного транскрипта хотя бы в одной клеточной линии и несколько десятков совпали с ранее охарактеризованными вариантами с каким-либо уровнем клинической значимости. Интересно, что лишь для двух SNP, находящихся в гене вирусной защиты *TRIM14* и в гене *PILRB*, ассоциированном с возрастной макулярной дегенерацией, сочетание новизны и степени влияния на уровень транскрипта оказалось достаточным для проверки гипотезы при помощи Cas9-опосредованной замены аллеля в геномном контексте [41]. Технические ограничения метода MPRA также включают в себя длину тестируемых фрагментов ДНК до 130–230 п.н. и количество тестируемых конструкций – до 100–200 тысяч последовательностей [42].

Существуют высокопроизводительные подходы, в которых используются последовательности, полученные из геномной ДНК. Так, метод SuRE (Survey of Regulatory Elements) был разработан с

использованием данных секвенирования геномов клеточных линий, происходящих от четырех различных этнических групп, и оптимизирован для изучения потенциального влияния однонуклеотидной замены на активность регуляторных элементов [43]. Случайные фрагменты геномной ДНК длиной в несколько сотен п.н. клонируются в репортерную плазмиду без промотора, которая при трансфекции в культивируемые клетки продуцирует транскрипт только в том случае, если вставленный фрагмент несет функциональный сайт начала транскрипции. Так как транскрипты могут производить как активные промоторы, так и энхансеры, этот метод позволяет анализировать активность обоих типов регуляторных элементов. Как и в методе MPRA, транскрипты анализируются с помощью высокопроизводительного секвенирования и количественно оцениваются с использованием баркода, уникального для каждого изучаемого геномного фрагмента. Такой подход позволяет протестировать активность регуляторных элементов, содержащих альтернативные аллели нескольких миллионов различных SNP (то есть большинства из известных).

Еще один метод, позволяющий идентифицировать *raQTL* – High-resolution Dissection of Regulatory Activity (HiDRA) [42] – также использует фрагментацию геномной ДНК и представляет собой комбинацию подходов ATAC-seq и STARR-seq. ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) позволяет обогатить образцы доступным для транспозазы, т.е. открытым, хроматином, в то время как STARR-seq (Self-Transcribing Active Regulatory Region sequencing) представляет собой репортерный анализ, в ходе которого предполагаемые регуляторные элементы (способные повышать транскрипционную активность репортера) клонируются в 3'-НТО гена-репортера и, таким образом, способствуют собственной транскрипции. Затем активные последовательности ДНК идентифицируют и количественно оценивают с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК [44]. Так, с помощью HiDRA в локусе гена *IKZF3* был найден драйверный элемент длиной 76 п.н., включающий в себя rs12946510, который ассоциирован с рассеянным склерозом, что позволяет выделить этот SNP в качестве потенциально функционального [42]. Действительно, при дальнейшем функциональном тестировании было показано, что присутствие рискового аллеля rs12946510 снижало активацию Т-хелперов и экспрессию генов *IKZF3* и *ORMDL3* [45]. Важным этапом обработки результатов каждого из описанных высокопроизводительных методов является использование вероятностных математических моделей, таких, например, как алгоритм SHARPR-RE (Systematic High-resolution Activation and Repression Prediction from Reporter

assays with Random Endpoints) [46], для анализа наложения последовательностей и оценки влияния конкретных нуклеотидов на активность этих последовательностей.

К высокопроизводительным репортерным анализам полиморфных вариантов относится метод MaPSY (Massively Parallel Splicing Assay) [47], который был использован для изучения нарушений сплайсинга при расстройствах аутистического спектра. По результатам скрининга были охарактеризованы генетические варианты в генах *TNRC6C*, *MAPK8IP1* и *USP45* и показано, что белки семейства TNRC6 могут увеличивать риск развития аутизма [48]. Недавно был предложен метод Cre-зависимого MPRA *in vivo* для функционального анализа библиотеки 3'-НТО с генетическими вариантами, ассоциированными с аутизмом. Количественная оценка транскриптов в зависимости от активности регуляторного элемента осуществлялась в определенных типах нейронов за счет трансдукции библиотек в ткани мозга мышей с тканеспецифической экспрессией Cre-рекомбиназы. Этот метод позволяет изучить регуляторный эффект в более релевантном клеточном контексте, поскольку нейроны имеют совершенно другую экспрессию транс-действующих факторов (например, ТФ и микроРНК), чем клеточные линии [49].

Главное ограничение методов, основанных на репортерных тестах, состоит в отсутствии релевантного хроматинового контекста, который сопровождает регуляторный элемент в нативном геноме. Отчасти это ограничение снимается в методе lentiMPRA, когда библиотека с исследуемыми регуляторными элементами создается в лентивирусном векторе, который интегрируется в геном, обеспечивая анализ транскрипции внутри хроматинового контекста [50].

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В НАТИВНОМ ГЕНОМНОМ КОНТЕКСТЕ

Говоря о влиянии генетических вариантов на патогенез заболевания, важно учитывать контекст хроматина, который, в свою очередь, различается у разных типов и функциональных состояний клеток. Картирование eQTL само по себе позволяет связать конкретный генотип с изменением уровней мРНК потенциальных генов-мишеней в нативном геномном контексте, в том числе тканеспецифично [51, 52]. Функциональная связь генов с регуляторными локусами, находящимися на расстоянии от них, может быть найдена с помощью определения трехмерной организации хроматина такими методами, как Hi-C (high-throughput chromosome conformation capture),

ChIA-PET (chromatin interaction analysis with paired-end tag sequencing) и их модификациями [53, 54]. Сопоставление трехмерных тканеспецифических геномных карт с болезнью-ассоциированными регуляторными SNP позволяет идентифицировать наиболее вероятные гены-участники патогенеза. Наиболее точным методом проверки построенных таким образом гипотез является редактирование генома и получение клеток с нужными комбинациями вариантов. Точное и эффективное редактирование отдельных нуклеотидов в геноме человека стало трудновыполнимой, но реальной задачей благодаря РНК-программируемым бактериальным нуклеазам, найденным в системе CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas [55]. Двухцепочечный разрыв ДНК (ДЦР), индуцированный в целевом сайте нуклеазой Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (наиболее популярным на настоящий момент геномным редактором), запускает клеточные механизмы репарации ДНК, в том числе гомологически направленную репарацию HDR [56], которая задействована в методах семейства CRISPR-HDR, когда восстановление целевого участка происходит в присутствии гомологичной последовательности ДНК, содержащей нужный аллельный вариант.

Данный метод, использованный во многих работах по изучению полиморфизмов [57, 58], имеет существенное ограничение по эффективности, так как у млекопитающих репарация ДЦР преимущественно происходит с помощью нехомологического соединения концов (NHEJ) [59]. Исходя из этих особенностей, редактирование CRISPR-HDR требует больших усилий и может приводить к нарушениям экспрессии близлежащих генов [45]. Другим подходом к точному редактированию генома, хорошо проявляющим себя в подходящем нуклеотидном контексте, является редактирование азотистых оснований (BE, base editing) с помощью каталитически неактивной dCas9 (dead Cas9) или Cas9 с никазной активностью (nCas9), слитой с ферментом дезаминазой. В зависимости от специфичности фермента выделяют цитозиновые (преобразуют С•G в Т•A) и адениновые (А•T в G•C) редакторы, а также редактор с цитидиндезаминазой и урацил-ДНК-гликозилазой (преобразуют С•G в G•C) [60–63]. Так, с помощью технологии цитозинового редактора был исследован полиморфизм rs12603332, ассоциированный с риском развития астмы, и показано его влияние на экспрессию генов регулятора биосинтеза сфинголипидов *ORMDL3* и модулятора клеточного ответа на стресс *ATF6a* в Т-клеточной линии Jurkat [64]. Благодаря отсутствию этапа образования ДЦР метод BE является более безопасным для клеток, чем CRISPR-HDR, однако он имеет ограничения в плане активности ферментов и нецелевого редак-

тирования близлежащих нуклеотидов [60, 61]. Еще один недавно разработанный перспективный подход к редактированию генома – праймированное редактирование (prime editing). Редактор основан на мутантной нуклеазе Cas9, вносящей одноцепочечные разрывы (nCas9), слитой с обратной транскриптазой (MMLV RT), и использует модифицированную направляющую РНК (pegRNA), которая одновременно определяет целевой сайт для nCas9, выступает в роли праймера для MMLV RT и является РНК-матрицей для синтеза новой последовательности ДНК. Отредактированная цепь ДНК затем включается в геном посредством эндогенных клеточных процессов [65].

Благодаря высокой точности редактирования и более широкой, чем у стандартных редакторов оснований, области применения, праймированное редактирование имеет большой потенциал для работы с однонуклеотидными полиморфизмами. С помощью однонуклеотидных замен осуществляют направленную эволюцию, применяемую в селекции сельскохозяйственных культур [66, 67]. В мышинных моделях была показана низкая внецелевая активность праймированного редактирования при изменении варианта некодирующего полиморфизма в сравнении CRISPR-HDR-методом [68]. Также с помощью Prime-редактирования в миобластах человека была скорректирована мутация в белок-кодирующей части гена кальциевого канала *RYR1*, связанная с двигательными нарушениями [69]. Основным принципиальным ограничением метода праймированного редактирования является большой размер и сложности с доставкой редактора в клетки [70]. При построении систем для высокопроизводительного скрининга проблема доставки может быть решена при помощи лентивирусной трансдукции целевых клеток конструктами, кодирующими редактор и pegRNA. Последующее культивирование клеток в течение нескольких недель позволяет достичь эффективности редактирования, достаточной для исследования функционального эффекта сотен и даже тысяч однонуклеотидных замен в одном эксперименте [71].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, ОПОСРЕДУЮЩИХ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКУЮ РАЗНИЦУ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Определение различных типов QTL (eQTL, гаQTL и т.д.) не дает информации о конкретном молекулярном механизме, на который влияет определенный генетический вариант, поэтому остается актуальной дальнейшая функциональная

аннотация. Как упоминалось ранее, к механизмам влияния полиморфизмов на функции регуляторного элемента относятся изменения свойств промоторных и энхансерных областей, 5'-НТО и 3'-НТО, нкРНК, а также нарушения сплайсинга. Наиболее изученной причиной зависимости свойств регуляторных элементов от располагающихся в них SNP является способность однонуклеотидной замены влиять на сродство к функциональному транскрипционному фактору.

Существуют разнообразные *in silico* подходы для предсказания предпочтительных мотивов связывания ТФ, в большинстве случаев основанные на позиционных весовых матрицах (PWM, Positional Weight Matrix), формируемых с помощью множественного выравнивания ТФ-связывающих последовательностей [72, 73]. В свою очередь, информация о конкретных ТФ-связывающих последовательностях может быть получена с помощью высокопроизводительных методов полногеномного картирования сайтов связывания *in vivo*, например, основанных на иммунопреципитации хроматина ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) или на высокопроизводительном HT-SELEX (high-throughput systematic evolution of ligands by exponential enrichment) для отбора последовательностей связывания ТФ *in vitro* [74]. Для идентификации последовательностей генома, связанных со специфическими белками в их нативном хроматиновом контексте, используют метод ChIP-seq, сочетающий в себе иммунопреципитацию хроматина с последующим высокопроизводительным секвенированием ДНК [75]. Последовательности, оптимальные для связывания определенного ТФ (возможно, не существующие в природе), ищут при помощи SELEX-семейства методик обогащения библиотек случайно сгенерированных олигонуклеотидов специфическими последовательностями с высоким сродством к данному ТФ [76]. К широко известным базам данных, основанных на методе PWM, относятся TRANSFAC [77], HOCOMOCO [78], JASPAR [79], HOMER [80], iRegulon [81] и др. Биоинформатические приложения позволяют оценивать потенциальное изменение силы связывания ТФ в зависимости от варианта полиморфизма. Эффективность аллель-специфического связывания ТФ может быть оценена непосредственно по данным ChIP-Seq, если глубина секвенирования позволяет обнаружить статистически значимые отклонения в частотах альтернативных аллелей SNP в сайте связывания [82, 83]. Комбинация ChIP с количественным определением аллелей, ChIP-AS-qPCR (ChIP-based allele-specific quantitative PCR), позволяет измерить влияние аллельных вариантов на эффективность связывания ТФ в живой клетке [57]. Был предложен высокопроизводительный вариант анализа связывания ТФ

с полиморфизмами регуляторных областей SNP-SELEX на основе HT-SELEX. Этот метод позволяет анализировать влияние порядка 100 000 аллельных вариантов потенциально регуляторных SNP (GWAS-аннотированных) на связывание нескольких сотен ТФ [84]. К экспериментальным подходам идентификации ТФ можно также отнести классический метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на сдвиге электрофоретической подвижности – EMSA (electrophoretic mobility shift assay). В процессе EMSA происходит специфическое связывание исследуемых белков с меченой олигонуклеотидной пробой с последующим анализом подвижности таких фрагментов при электрофорезе в полиакриламидном геле в нативных условиях, причем количество образующегося комплекса позволяет оценить относительную силу связывания [85]. Специфичность определения белковых компонентов в комплексах достигается путем добавления антитела к конкретному белку в реакции: EMSA-supershift [86]. Также существуют высокопроизводительные методы анализа большого количества SNP на предмет влияния аллельных вариантов на связывание ТФ, основанные на инкубации SNP-содержащих олигонуклеотидов с ядерным экстрактом из интересующего типа клеток, с последующим анализом обогащенных библиотек с помощью секвенирования; к таким методам относятся SNPs-Seq [57] и Reel-Seq [87]. Ни один из этих методов сам по себе не позволяет установить, какой ТФ связывается с конкретным аллельным вариантом, однако такая информация может быть получена с помощью масс-спектрометрии и/или с использованием очищенного ТФ вместо ядерного экстракта [24, 88].

Среди удобных биоинформатических баз данных для точечного анализа интересующего SNP

можно выделить онлайн-ресурс PERFECTOS-ARE <https://opera.autosome.org/perfectosare> [76], в котором собраны предсказанные мотивы сайтов связывания ТФ из ряда баз данных: HOCOMOCO [78], JASPAR [79], HT-SELEX [89] и других. Другой биоинформатический ресурс, ADAstra [82], содержащий обширные данные об аллель-специфическом связывании ТФ с аллельными вариантами в разных типах клеток, базируется на данных HOCOMOCO и SPRy-SARUS [90], а также на аллель-специфичных данных ДНКазного футпринтинга [91]. Ресурс ANANASTRA [92], построенный на основе систематического анализа аллельного дисбаланса в экспериментах ChIP-Seq, позволяет аннотировать большое количество генетических вариантов параллельно.

В качестве примеров использования такой аннотации можно привести функциональную характеристику SNP rs7873784 и rs71327024, расположенных в регуляторных областях генов *TLR4* и *CXCR6* соответственно [13, 31]. По результатам GWAS для обоих SNP была показана ассоциация с заболеваниями: минорный С-аллель rs7873784 ассоциирован с ревматоидным артритом, а минорный Т-аллель rs71327024 ассоциирован с тяжелым течением COVID-19. Репортерные тесты показали, что оба SNP являются *raQTL*, поэтому с помощью биоинформатического анализа были найдены релевантные для соответствующих типов клеток ТФ PU.1 (rs7873784) и c-Myb (rs71327024), аллель-зависимо связывающиеся с сайтами, содержащими SNP. Для подтверждения этой гипотезы был проведен генетический нокдаун ТФ с использованием малых интерферирующих РНК (siRNA) и метод иммунопреципитации «ДНК pull-down» [93]. Последний метод включает в себя инкубацию олигонуклеотидов, содержащих альтернативные

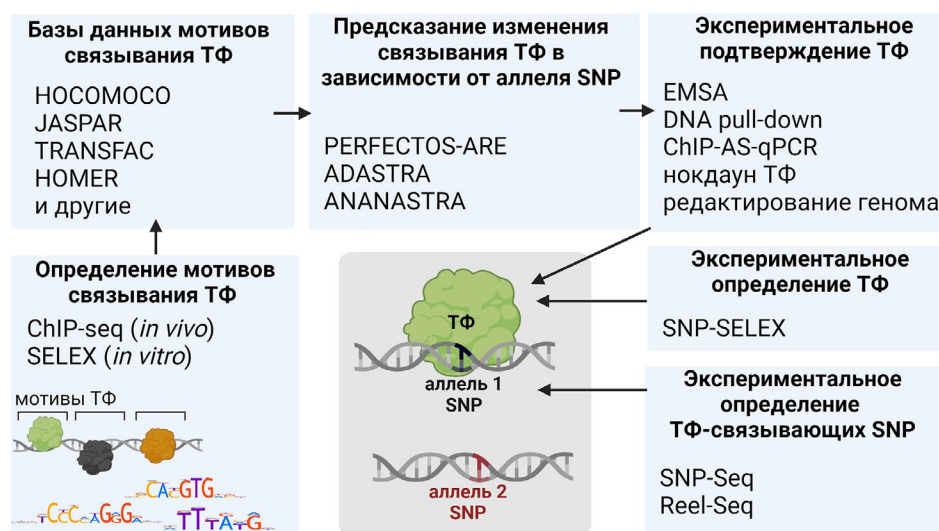


Рис. 2. Методы определения функциональных транскрипционных факторов, аллель-специфически связывающихся с областью полиморфизма (изображение сделано с помощью BioRender.com)

варианты SNP, с ядерным экстрактом из релевантных клеток, иммунопреципитацию специфическими антителами к предсказанному ТФ и последующую количественную оценку обогащенных олигонуклеотидов. Описанные методы определения транскрипционных факторов, эффективность связывания которых зависит от аллеля полиморфизма, представлены на рис. 2.

Благодаря постоянно растущему объему данных и современным моделям машинного обучения, биоинформатические расчеты позволяют со все большей точностью аннотировать кандидатные ТФ, аллель-специфически связывающиеся с областью SNP [94–96]. Однако клиническая валидация и тем более использование этих данных в диагностике и, возможно, в терапии заболеваний возможны только после экспериментального подтверждения в разных типах клеток в релевантном функциональном контексте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время благодаря метаанализу большого количества экспериментальных данных создаются биоинформатические приложения для поиска наиболее вероятных функциональных генетических вариантов, а также предсказания конкретных механизмов их влияния на патогенез заболеваний. Подавляющая часть генетических вариантов располагается в некодирующих областях генома и влияет на функционирование генов

за счет регуляции их экспрессии. Такая регуляция может широко варьироваться в зависимости от типа клеток и их функционального состояния, что не всегда учитывается в *in silico* подходах, допускающих статистические обобщения. В связи с этим остается актуальной необходимость в разносторонних экспериментальных методах характеристики конкретных генетических вариантов. Наиболее информативным способом изучения влияния генетических вариантов на фенотип является создание точных генетических моделей с помощью технологий редактирования генома. Однако из-за сложности процедуры точного редактирования по-прежнему сохраняет актуальность предварительная характеристика исследуемых аллельных вариантов с использованием репортерных тестов.

Вклад авторов. А.Н. Уварова – концепция и руководство работой; А.Н. Уварова, Е.А. Ткаченко, Е.М. Стасевич, Э.А. Жеремян – написание текста; К.В. Корнеев, Д.В. Купраш – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00987).

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. Ahmed, Z., Zeeshan, S., Mendhe, D., and Dong, X. (2020) Human gene and disease associations for clinical-genomics and precision medicine research, *Clin. Transl. Med.*, **10**, 297-318, <https://doi.org/10.1002/ctm2.28>.
2. Lappalainen, T., Scott, A. J., Brandt, M., and Hall, I. M. (2019) Genomic analysis in the age of human genome sequencing, *Cell*, **177**, 70-84, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.032>.
3. Wright, A. F. (2005) Genetic variation: polymorphisms and mutations, in *eLS*, <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005005>.
4. Salisbury, B. A., Pungliya, M., Choi, J. Y., Jiang, R., Sun, X. J., and Stephens, J. C. (2003) SNP and haplotype variation in the human genome, *Mutat. Res.*, **526**, 53-61, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00014-9).
5. Fabo, T., and Khavari, P. (2023) Functional characterization of human genomic variation linked to polygenic diseases, *Trends Genet.*, **39**, 462-490, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.02.014>.
6. Orozco, G., Schoenfelder, S., Walker, N., Eyre, S., and Fraser, P. (2022) 3D genome organization links non-coding disease-associated variants to genes, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 995388, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.995388>.
7. Johnston, A. D., Simões-Pires, C. A., Thompson, T. V., Suzuki, M., and Greally, J. M. (2019) Functional genetic variants can mediate their regulatory effects through alteration of transcription factor binding, *Nat. Commun.*, **10**, 3472, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11412-5>.
8. Grodecká, L., Buratti, E., and Freiburger, T. (2017) Mutations of pre-mRNA splicing regulatory elements: Are predictions moving forward to clinical diagnostics? *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1668, <https://doi.org/10.3390/ijms18081668>.
9. Andersson, R., and Sandelin, A. (2020) Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 71-87, <https://doi.org/10.1038/S41576-019-0173-8>.
10. Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A. M., Taylor, M. S., Engström, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T.,

- Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grimmond, S. M., Wells, C. A., Orlando, V., Wahlestedt, C., Liu, E. T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V. B., Hume, D. A., and Hayashizaki, Y. (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution, *Nat. Genet.*, **38**, 626-635, <https://doi.org/10.1038/NG1789>.
11. Banerji, J., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1981) Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences, *Cell*, **27**, 299-308, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90413-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90413-X).
 12. Krivega, I., and Dean, A. (2012) Enhancer and promoter interactions-long distance calls, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **22**, 79-85, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.11.001>.
 13. Korneev, K. V., Sviriaeva, E. N., Mitkin, N. A., Gorbacheva, A. M., Uvarova, A. N., Ustiugova, A. S., Polanovsky, O. L., Kulakovskiy, I. V., Afanasyeva, M. A., Schwartz, A. M., and Kuprash, D. V. (2020) Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4 expression., *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165626, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165626>.
 14. Panni, S., Lovering, R.C., Porras, P., and Orchard, S. (2020) Non-coding RNA regulatory networks, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1863**, 194417, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>.
 15. Lappalainen, T., and MacArthur, D. G. (2021) From variant to function in human disease genetics, *Science*, **373**, 1464-1468, <https://doi.org/10.1126/science.abi8207>.
 16. Tseng, C. C., Wong, M. C., Liao, W. T., Chen, C. J., Lee, S. C., Yen, J. H., and Chang, S. J. (2021) Genetic variants in transcription factor binding sites in humans: triggered by natural selection and triggers of diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4187, <https://doi.org/10.3390/ijms22084187>.
 17. Pan, X., Zhao, J., Zhou, Z., Chen, J., Yang, Z., Wu, Y., Bai, M., Jiao, Y., Yang, Y., Hu, X., Cheng, T., Lu, Q., Wang, B., Li, C. L., Lu, Y. J., Diao, L., Zhong, Y. Q., Pan, J., Zhu, J., Xiao, H. S., Qiu, Z. L., Li, J., Wang, Z., Hui, J., Bao, L., and Zhang, X. (2021) 5'-UTR SNP of *FGF13* causes translational defect and intellectual disability, *eLife*, **10**, e63021, <https://doi.org/10.7554/eLife.63021>.
 18. Cui, Y., Peng, F., Wang, D., Li, Y., Li, J. S., Li, L., and Li, W. (2022) 3'aQTL-atlas: An atlas of 3'UTR alternative polyadenylation quantitative trait loci across human normal tissues, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D39-D45, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab740>.
 19. Chhichholiya, Y., Suryan, A.K., Suman, P., Munshi, A., and Singh, S. (2021) SNPs in miRNAs and target sequences: role in cancer and diabetes, *Front. Genet.*, **12**, 793523, <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.793523>.
 20. Hrdlickova, B., de Almeida, R.C., Borek, Z., and Withoff, S. (2014) Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1842**, 1910-1922, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.03.011>.
 21. Rykova, E., Ershov, N., Damarov, I., and Merkulova, T. (2022) SNPs in 3'UTR miRNA target sequences associated with individual drug susceptibility, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13725, <https://doi.org/10.3390/ijms232213725>.
 22. Feng, T., Feng, N., Zhu, T., Li, Q., Zhang, Q., Wang, Y., Gao, M., Zhou, B., Yu, H., Zheng, M., and Qian, B. (2020) A SNP-mediated lncRNA (LOC146880) and microRNA (miR-539-5p) interaction and its potential impact on the NSCLC risk, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 1-12, <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01652-5>.
 23. Garrido-Martín, D., Borsari, B., Calvo, M., Reverter, F., and Guigó, R. (2021) Identification and analysis of splicing quantitative trait loci across multiple tissues in the human genome, *Nat. Commun.*, **12**, 727, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20578-2>.
 24. Degtyareva, A. O., Antontseva, E. V., and Merkulova, T. I. (2021) Regulatory snps: Altered transcription factor binding sites implicated in complex traits and diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6454, <https://doi.org/10.3390/ijms22126454>.
 25. Gorbacheva, A. M., Korneev, K. V., Kuprash, D. V., and Mitkin, N. A. (2018) The risk G allele of the single-nucleotide polymorphism rs928413 creates a CREB1-binding site that activates IL33 promoter in lung epithelial cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2911, <https://doi.org/10.3390/ijms19102911>.
 26. Putlyaeva, L. V., Demin, D. E., Korneev, K. V., Kasyanov, A. S., Tatosyan, K. A., Kulakovskiy, I. V., Kuprash, D. V., and Schwartz, A. M. (2018) Potential markers of autoimmune diseases, alleles rs115662534(T) and rs548231435(C), disrupt the binding of transcription factors STAT1 and EBF1 to the regulatory elements of human CD40 gene, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1534-1542, <https://doi.org/10.1134/S0006297918120118>.
 27. Zhou, J., To, K. K. W., Dong, H., Cheng, Z. S., Lau, C. C. Y., Poon, V. K. M., Fan, Y. H., Song, Y. Q., Tse, H., Chan, K. H., Zheng, B. J., Zhao, G. P., and Yuen, K. Y. (2012) A functional variation in CD55 increases the severity of 2009 pandemic H1N1 influenza A virus infection, *J. Infect. Dis.*, **206**, 495-503, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis378>.
 28. Matveeva, M. Y., Kashina, E. V., Reshetnikov, V. V., Bryzgalov, L. O., Antontseva, E. V., Bondar, N. P., and Merkulova, T. I. (2016) Regulatory single nucleotide polymorphisms (rSNPs) at the promoters 1A and 1B of the human APC gene, *BMC Genet.*, **17**, 127-135, <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0460-8>.

29. Mitkin, N. A., Muratova, A. M., Korneev, K. V., Pavshintsev, V. V., Rumyantsev, K. A., Vagida, M. S., Uvarova, A. N., Afanasyeva, M. A., Schwartz, A. M., and Kuprash, D. V. (2018) Protective C allele of the single-nucleotide polymorphism rs1335532 is associated with strong binding of Ascl2 transcription factor and elevated CD58 expression in B-cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1864**, 3211-3220, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.008>.
30. Uvarova, A. N., Ustiugova, A. S., Mitkin, N. A., Schwartz, A. M., Korneev, K. V., and Kuprash, D. V. (2022) The minor T allele of the single nucleotide polymorphism rs13360222 decreases the activity of the HAVCR2 gene enhancer in a cell model of human macrophages, *Mol. Biol.*, **56**, 90-96, <https://doi.org/10.1134/S0026893322010095>.
31. Uvarova, A. N., Stasevich, E. M., Ustiugova, A. S., Mitkin, N. A., Zheremyan, E. A., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Bogolyubova, A. V., Rubtsov, M. A., Kulakovskiy, I. V., Kuprash, D. V., Korneev, K. V., and Schwartz, A. M. (2023) rs71327024 Associated with COVID-19 hospitalization reduces CXCR6 promoter activity in human CD4⁺ T cells via disruption of c-Myb binding, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 13790, <https://doi.org/10.3390/IJMS241813790>.
32. Ustiugova, A. S., Korneev, K. V., Kuprash, D. V., and Afanasyeva, M. A. (2019) Functional SNPs in the human autoimmunity-associated locus 17q12-21, *Genes*, **10**, 77, <https://doi.org/10.3390/GENES10020077>.
33. Cooper, T. A. (2005) Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements, *Methods*, **37**, 331-340, <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2005.07.015>.
34. Sparber, P., Sharova, M., Davydenko, K., Pyankov, D., Filatova, A., and Skoblov, M. (2023) Deciphering the impact of coding and non-coding SCN1A gene variants on RNA splicing, *Brain*, **147**, 1278-1293, <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAD383>.
35. Sanoguera-Miralles, L., Bueno-Martínez, E., Valenzuela-Palomo, A., Esteban-Sánchez, A., Llinares-Burguet, I., Pérez-Segura, P., García-Álvarez, A., de la Hoya, M., and Velasco-Sampedro, E. A. (2022) Minigene splicing assays identify 20 spliceogenic variants of the breast/ovarian cancer susceptibility gene RAD51C, *Cancers*, **14**, 2960, <https://doi.org/10.3390/CANCERS14122960/S1>.
36. Nguyen, T. A., Jones, R. D., Snavely, A. R., Pfenning, A. R., Kirchner, R., Hemberg, M., and Gray, J. M. (2016) High-throughput functional comparison of promoter and enhancer activities, *Genome Res.*, **26**, 1023-1033, <https://doi.org/10.1101/GR.204834.116>.
37. Melnikov, A., Murugan, A., Zhang, X., Tesileanu, T., Wang, L., Rogov, P., Feizi, S., Gnirke, A., Callan, C. G., Kinney, J. B., Kellis, M., Lander, E. S., and Mikkelsen, T. S. (2012) Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay, *Nat. Biotechnol.*, **30**, 271-277, <https://doi.org/10.1038/nbt.2137>.
38. Tewhey, R., Kotliar, D., Park, D. S., Liu, B., Winnicki, S., Reilly, S. K., Andersen, K. G., Mikkelsen, T. S., Lander, E. S., Schaffner, S. F., and Sabeti, P. C. (2016) Direct identification of hundreds of expression-modulating variants using a multiplexed reporter assay, *Cell*, **172**, 1519-1529, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.021>.
39. Myint, L., Wang, R., Boukas, L., Hansen, K. D., Goff, L. A., and Avramopoulos, D. (2020) A screen of 1,049 schizophrenia and 30 Alzheimer's-associated variants for regulatory potential, *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, **183**, 61-73, <https://doi.org/10.1002/AJMG.B.32761>.
40. Sample, P. J., Wang, B., Reid, D. W., Presnyak, V., McFadyen, I. J., Morris, D. R., and Seelig, G. (2019) Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 803-809, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0164-5>.
41. Griesemer, D., Xue, J. R., Reilly, S. K., Ulirsch, J. C., Kukreja, K., Davis, J. R., Kanai, M., Yang, D. K., Butts, J. C., Guney, M. H., Luban, J., Montgomery, S. B., Finucane, H. K., Novina, C. D., Tewhey, R., and Sabeti, P. C. (2021) Genome-wide functional screen of 3'UTR variants uncovers causal variants for human disease and evolution, *Cell*, **184**, 5247-5260, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.025>.
42. Wang, X., He, L., Goggin, S. M., Saadat, A., Wang, L., Sinnott-Armstrong, N., Claussnitzer, M., and Kellis, M. (2018) High-resolution genome-wide functional dissection of transcriptional regulatory regions and nucleotides in human, *Nat. Commun.*, **9**, 5380, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07746-1>.
43. Van Arensbergen, J., Pagie, L., FitzPatrick, V. D., de Haas, M., Baltissen, M. P., Comoglio, F., van der Weide, R. H., Teunissen, H., Vösa, U., Franke, L., de Wit, E., Vermeulen, M., Bussemaker, H. J., and van Steensel, B. (2019) High-throughput identification of human SNPs affecting regulatory element activity, *Nat. Genet.*, **51**, 1160-1169, <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0455-2>.
44. Arnold, C. D., Gerlach, D., Stelzer, C., Boryń, Ł. M., Rath, M., and Stark, A. (2013) Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq, *Science*, **339**, 1074-1077, https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1232542/SUPPL_FILE/ARNOLD.SM.PDF.
45. Ustiugova, A. S., Dvorianinova, E. M., Melnikova, N. V., Dmitriev, A. A., Kuprash, D. V., and Afanasyeva, M. A. (2023) CRISPR/Cas9 genome editing demonstrates functionality of the autoimmunity-associated SNP rs12946510, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1869**, 166599, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166599>.

46. Ernst, J., Melnikov, A., Zhang, X., Wang, L., Rogov, P., Mikkelsen, T. S., and Kellis, M. (2016) Genome-scale high-resolution mapping of activating and repressive nucleotides in regulatory regions, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 1180-1190, <https://doi.org/10.1038/nbt.3678>.
47. Soemedi, R., Cygan, K. J., Rhine, C. L., Wang, J., Bulacan, C., Yang, J., Bayrak-Toydemir, P., McDonald, J., and Fairbrother, W. G. (2017) Pathogenic variants that alter protein code often disrupt splicing, *Nat. Genet.*, **49**, 848-855, <https://doi.org/10.1038/ng.3837>.
48. Rhine, C. L., Neil, C., Wang, J., Maguire, S., Buerer, L., Salomon, M., Meremikwu, I. C., Kim, J., Strande, N. T., and Fairbrother, W. G. (2022) Massively parallel reporter assays discover *de novo* exonic splicing mutants in paralogs of Autism genes, *PLoS Genet.*, **18**, e1009884, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009884>.
49. Lagunas, T., Plassmeyer, S. P., Fischer, A. D., Friedman, R. Z., Rieger, M. A., Selmanovic, D., Sarafinowska, S., Sol, Y. K., Kasper, M. J., Fass, S. B., Aguilar Lucero, A. F., An, J. Y., Sanders, S. J., Cohen, B. A., and Dougherty, J. D. (2023) A Cre-dependent massively parallel reporter assay allows for cell-type specific assessment of the functional effects of non-coding elements *in vivo*, *Commun. Biol.*, **6**, 1-14, <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05483-w>.
50. Gordon, M. G., Inoue, F., Martin, B., Schubach, M., Agarwal, V., Whalen, S., Feng, S., Zhao, J., Ashuach, T., Ziffra, R., Kreimer, A., Georgakopoulos-Soares, I., Yosef, N., Ye, C. J., Pollard, K. S., Shendure, J., Kircher, M., and Ahituv, N. (2020) lentiMPRA and MPRAflow for high-throughput functional characterization of gene regulatory elements, *Nat. Protoc.*, **15**, 2387-2412, <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0333-5>.
51. GTEx Consortium (2020) The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues, *Science*, **369**, 1318-1330, <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>.
52. Bryois, J., Calini, D., Macnair, W., Foo, L., Urich, E., Ortmann, W., Iglesias, V. A., Selvaraj, S., Nutma, E., Marzin, M., Amor, S., Williams, A., Castelo-Branco, G., Menon, V., De Jager, P., and Malhotra, D. (2022) Cell-type-specific cis-eQTLs in eight human brain cell types identify novel risk genes for psychiatric and neurological disorders, *Nat. Neurosci.*, **25**, 1104-1112, <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01128-z>.
53. Capurso, D., Tang, Z., and Ruan, Y. (2020) Methods for comparative ChIA-PET and Hi-C data analysis, *Methods*, **170**, 69-74, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.09.019>.
54. Huang, L., Yang, Y., Li, G., Jiang, M., Wen, J., Abnoui, A., Rosen, J. D., Hu, M., and Li, Y. (2022) A systematic evaluation of Hi-C data enhancement methods for enhancing PLAC-seq and HiChIP data, *Brief. Bioinform.*, **23**, 1-14, <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAC145>.
55. Khalil, A.M. (2020) The genome editing revolution: review, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **18**, 68, <https://doi.org/10.1186/S43141-020-00078-Y>.
56. Moon, S. B., Kim, D. Y., Ko, J. H., and Kim, Y. S. (2019) Recent advances in the CRISPR genome editing tool set, *Exp. Mol. Med.*, **51**, 1-11, <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0339-7>.
57. Zhang, P., Xia, J. H., Zhu, J., Gao, P., Tian, Y. J., Du, M., Guo, Y. C., Suleman, S., Zhang, Q., Kohli, M., Tillmans, L. S., Thibodeau, S. N., French, A. J., Cerhan, J. R., Wang, L. D., Wei, G. H., and Wang, L. (2018) High-throughput screening of prostate cancer risk loci by single nucleotide polymorphisms sequencing, *Nat. Commun.*, **9**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04451-x>.
58. Rodríguez-Rodríguez, D. R., Ramírez-Solís, R., Garza-Elizondo, M. A., Garza-Rodríguez, M. D. L., and Barrera-Saldaña, H. A. (2019) Genome editing: a perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review), *Int. J. Mol. Med.*, **43**, 1559-1574, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4112>.
59. Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., Zhang, J., and Xia, N. (2020) Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 Induced-double strand breaks, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6461, <https://doi.org/10.3390/IJMS21186461>.
60. Rees, H. A., and Liu, D. R. (2018) Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 770-788, <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0059-1>.
61. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., and Liu, D. R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, *Nature*, **533**, 420-424, <https://doi.org/10.1038/nature17946>.
62. Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., and Liu, D. R. (2017) Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage, *Nature*, **551**, 464-471, <https://doi.org/10.1038/nature24644>.
63. Zhao, D., Li, J., Li, S., Xin, X., Hu, M., Price, M. A., Rosser, S. J., Bi, C., and Zhang, X. (2021) Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 35-40, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0592-2>.
64. Weng, N., Miller, M., Pham, A. K., Komor, A. C., and Broide, D. H. (2022) Single-base editing of rs12603332 on chromosome 17q21 with a cytosine base editor regulates ORMDL3 and ATF6a expression, *Allergy*, **77**, 1139-1149, <https://doi.org/10.1111/ALL.15092>.
65. Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., and Liu, D. R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA, *Nature*, **576**, 149-157, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>.

66. Jiang, Y., Chai, Y., Qiao, D., Wang, J., Xin, C., Sun, W., Cao, Z., Zhang, Y., Zhou, Y., Wang, X. C., and Chen, Q. J. (2022) Optimized prime editing efficiently generates glyphosate-resistant rice plants carrying homozygous TAP-IVS mutation in EPSPS, *Mol. Plant*, **15**, 1646-1649, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.09.006>.
67. Hassan, M. M., Yuan, G., Chen, J. G., Tuskan, G. A., and Yang, X. (2020) Prime editing technology and its prospects for future applications in plant biology research, *BioDes. Res.*, **2020**, 9350905, <https://doi.org/10.34133/2020/9350905>.
68. Gao, P., Lyu, Q., Ghanam, A. R., Lazzarotto, C. R., Newby, G. A., Zhang, W., Choi, M., Slivano, O. J., Holden, K., Walker, J. A., Kadina, A. P., Munroe, R. J., Abratte, C. M., Schimenti, J. C., Liu, D. R., Tsai, S. Q., Long, X., and Miano, J. M. (2021) Prime editing in mice reveals the essentiality of a single base in driving tissue-specific gene expression, *Genome Biol.*, **22**, 1-21, <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02304-3>.
69. Godbout, K., Rousseau, J., and Tremblay, J. P. (2023) Successful correction by prime editing of a mutation in the *RYR1* gene responsible for a myopathy, *Cells*, **13**, 31, <https://doi.org/10.3390/CELLS13010031>.
70. Petrova, I. O., and Smirnikhina, S. A. (2023) The development, optimization and future of prime editing, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 17045, <https://doi.org/10.3390/IJMS242317045>.
71. Ren, X., Yang, H., Nierenberg, J. L., Sun, Y., Chen, J., Beaman, C., Pham, T., Nobuhara, M., Takagi, M. A., Narayan, V., Li, Y., Ziv, E., and Shen, Y. (2023) High-throughput PRIME-editing screens identify functional DNA variants in the human genome, *Mol. Cell*, **83**, 4633-4645.e9, <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2023.11.021>.
72. Ambrosini, G., Vorontsov, I., Penzar, D., Groux, R., Fornes, O., Nikolaeva, D. D., Ballester, B., Grau, J., Grosse, I., Makeev, V., Kulakovskiy, I., and Bucher, P. (2020) Insights gained from a comprehensive all-against-all transcription factor binding motif benchmarking study, *Genome Biol.*, **21**, 1-18, <https://doi.org/10.1186/s13059-020-01996-3>.
73. Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., and Weirauch, M. T. (2018) The human transcription factors, *Cell*, **172**, 650-665, <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.01.029>.
74. Tognon, M., Giugno, R., and Pinello, L. (2023) A survey on algorithms to characterize transcription factor binding sites, *Brief Bioinform.*, **24**, bbad156, <https://doi.org/10.1093/bib/bbad156>.
75. Mundade, R., Ozer, H. G., Wei, H., Prabhu, L., and Lu, T. (2014) Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond, *Cell Cycle*, **13**, 2847-2852, <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949201>.
76. Vorontsov, I. E., Kulakovskiy, I. V., Khimulya, G., Nikolaeva, D. D., and Makeev, V. J. (2015) PERFECTOS-APE: Predicting regulatory functional effect of SNPs by approximate P-value estimation, *Bioinforma. 2015 – 6th Int. Conf. Bioinforma. Model. Methods Algorithms, Proceedings; Part 8th Int. Jt. Conf. Biomed. Eng. Syst. Technol., BIOSTEC 2015*, **2**, 102-108, <https://doi.org/10.5220/0005189301020108>.
77. Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Liebich, I., Krull, M., Matys, V., Michael, H., Ohnhäuser, R., Prüß, M., Schacherer, F., Thiele, S., and Urbach, S. (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 281-283, <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.281>.
78. Vorontsov, I. E., Eliseeva, I. A., Zinkevich, A., Nikonov, M., Abramov, S., Boytsov, A., Kamenets, V., Kasianova, A., Kolmykov, S., Yevshin, I. S., Favorov, A., Medvedeva, Y. A., Jolma, A., Kolpakov, F., Makeev, V. J., and Kulakovskiy, I. V. (2024) HOCOMOCO in 2024: a rebuild of the curated collection of binding models for human and mouse transcription factors, *Nucleic Acids Res.*, **52**, D154-D163, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD1077>.
79. Castro-Mondragon, J. A., Riudavets-Puig, R., Rauluseviciute, I., Berhanu Lemma, R., Turchi, L., Blanc-Mathieu, R., Lucas, J., Boddie, P., Khan, A., Perez, N. M., Fornes, O., Leung, T. Y., Aguirre, A., Hammal, F., Schmelter, D., Baranasic, D., Ballester, B., Sandelin, A., Lenhard, B., Vandepoele, K., Wasserman, W. W., Parcy, F., and Mathelier, A. (2022) JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D165-D173, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1113>.
80. Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C. K. (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities, *Mol. Cell*, **38**, 576-589, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>.
81. Janky, R., Verfaillie, A., Imrichová, H., van de Sande, B., Standaert, L., Christiaens, V., Hulselmans, G., Hertens, K., Naval Sanchez, M., Potier, D., Svetlichnyy, D., Kalender Atak, Z., Fiers, M., Marine, J. C., and Aerts, S. (2014) iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003731, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003731>.
82. Abramov, S., Boytsov, A., Bykova, D., Penzar, D. D., Yevshin, I., Kolmykov, S. K., Fridman, M. V., Favorov, A. V., Vorontsov, I. E., Baulin, E., Kolpakov, F., Makeev, V. J., and Kulakovskiy, I. V. (2021) Landscape of allele-specific transcription factor binding in the human genome, *Nat. Commun.*, **12**, 2751, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23007-0>.
83. Li, Y., Zhang, X. O., Liu, Y., and Lu, A. (2023) Allele-specific binding (ASB) analyzer for annotation of allele-specific binding SNPs, *BMC Bioinform.*, **24**, 464, <https://doi.org/10.1186/S12859-023-05604-6>.

84. Yan, J., Qiu, Y., Ribeiro dos Santos, A. M., Yin, Y., Li, Y. E., Vinckier, N., Nariai, N., Benaglio, P., Raman, A., Li, X., Fan, S., Chiou, J., Chen, F., Frazer, K. A., Gaulton, K. J., Sander, M., Taipale, J., and Ren, B. (2021) Systematic analysis of binding of transcription factors to noncoding variants, *Nature*, **591**, 147-151, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03211-0>.
85. Hellman, L. M., and Fried, M. G. (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions, *Nat. Protoc.*, **2**, 1849-1861, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>.
86. Parés-Matos, E. I. (2013) Electrophoretic mobility-shift and super-shift assays for studies and characterization of protein-DNA complexes, *Methods Mol. Biol.*, **977**, 159-167, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-284-1_12.
87. Zhao, Y., Wu, D., Jiang, D., Zhang, X., Wu, T., Cui, J., Qian, M., Zhao, J., Oesterreich, S., Sun, W., Finkel, T., and Li, G. (2020) A sequential methodology for the rapid identification and characterization of breast cancer-associated functional SNPs, *Nat. Commun.*, **11**, 1-11, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17159-8>.
88. Butter, F., Davison, L., Viturawong, T., Scheibe, M., Vermeulen, M., Todd, J. A., and Mann, M. (2012) Proteome-wide analysis of disease-associated SNPs that show allele-specific transcription factor binding, *PLoS Genet.*, **8**, e1002982, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002982>.
89. Jolma, A., Kivioja, T., Toivonen, J., Cheng, L., Wei, G., Enge, M., Taipale, M., Vaquerizas, J. M., Yan, J., Sillanpää, M. J., Bonke, M., Palin, K., Talukder, S., Hughes, T. R., Luscombe, N. M., Ukkonen, E., and Taipale, J. (2010) Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities, *Genome Res.*, **20**, 861-873, <https://doi.org/10.1101/gr100552.109>.
90. Mille, M., Ripoll, J., Cazaux, B., and Rivals, E. (2023) dipwmsearch: a Python package for searching di-PWM motifs, *Bioinformatics*, **39**, btad141, <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAD141>.
91. Maurano, M. T., Haugen, E., Sandstrom, R., Vierstra, J., Shafer, A., Kaul, R., and Stamatoyannopoulos, J. A. (2015) Large-scale identification of sequence variants influencing human transcription factor occupancy *in vivo*, *Nat. Genet.*, **47**, 1393-1401, <https://doi.org/10.1038/ng.3432>.
92. Boytsov, A., Abramov, S., Aiusheeva, A. Z., Kasianova, A. M., Baulin, E., Kuznetsov, I. A., Aulchenko, Y. S., Kolmykov, S., Yevshin, I., Kolpakov, F., Vorontsov, I. E., Makeev, V. J., and Kulakovskiy, I. V (2022) ANANASTRA: annotation and enrichment analysis of allele-specific transcription factor binding at SNPs, *Nucleic Acids Res.*, **50**, W51-W56, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac262>.
93. Mitkin, N. A., Korneev, K. V., Gorbacheva, A. M., and Kuprash, D. V. (2019) Relative efficiency of transcription factor binding to allelic variants of regulatory regions of human genes in immunoprecipitation and real-time PCR, *Mol. Biol.*, **53**, 346-353, <https://doi.org/10.1134/S0026893319030117>.
94. Yevshin, I., Sharipov, R., Valeev, T., Kel, A., and Kolpakov, F. (2017) GTRD: a database of transcription factor binding sites identified by ChIP-seq experiments, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D61-D67, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw951>.
95. Zhang, Y., Mo, Q., Xue, L., and Luo, J. (2021) Evaluation of deep learning approaches for modeling transcription factor sequence specificity, *Genomics*, **113**, 3774-3781, <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2021.09.009>.
96. Chen, C., Hou, J., Shi, X., Yang, H., Birchler, J. A., and Cheng, J. (2021) DeepGRN: prediction of transcription factor binding site across cell-types using attention-based deep neural networks, *BMC Bioinformatics*, **22**, 1-18, <https://doi.org/10.1186/S12859-020-03952-1>.

METHODS FOR FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF GENETIC POLYMORPHISMS OF NON-CODING REGULATORY REGIONS OF THE HUMAN GENOME

Review

**A. N. Uvarova^{1*}, E. A. Tkachenko^{2,3}, E. M. Stasevich^{1,4}, E. A. Zheremyan¹,
K. V. Korneev¹, and D. V. Kuprash^{1,3}**

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: uvarowww@gmail.com

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

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, 141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Currently, numerous associations between genetic polymorphisms and various diseases have been characterized through Genome-Wide Association Studies. The majority of clinically significant polymorphisms are localized in non-coding regions of the genome. While modern bioinformatic resources make it possible to predict molecular mechanisms that explain the influence of non-coding polymorphisms on gene expression, such hypotheses require experimental verification. This review discusses the methods for elucidating the molecular mechanisms underlying the dependence of disease pathogenesis on specific genetic variants within non-coding sequences. A particular focus is on the methods to identify the transcription factors with binding efficiency contingent upon polymorphic variations. Despite remarkable progress in the bioinformatic resources enabling the prediction of the impact of polymorphisms on disease pathogenesis, the imperative for experimental approaches to this inquiry still persists.

Keywords: functional polymorphisms, regulatory genomic regions, transcription factors, reporter analysis, CRISPR-Cas

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК В КЛЕТКАХ ДОЛГОЖИВУЩИХ ГРЫЗУНОВ И ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ

Обзор

© 2024 А.А. Попов¹, И.О. Петрусева¹, О.И. Лаврик^{1,2*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 24.01.2024

После доработки 15.03.2024

Принята к публикации 03.04.2024

Накопление в геномной ДНК повреждений различного происхождения может приводить к нарушению стабильности генома, что рассматривается как одна из главных причин старения клеток. Имеющиеся в клетках млекопитающих системы репарации ДНК обеспечивают эффективное удаление повреждений и восстановление структуры генома, в связи с чем активность данных систем, как предполагается, может быть взаимосвязана с высокой максимальной продолжительностью жизни, наблюдаемой у долгоживущих млекопитающих. В обзоре обсуждаются имеющиеся к настоящему времени результаты работ по определению активности систем репарации ДНК и изучению свойств ключевых белков-регуляторов данного процесса в клетках долгоживущих грызунов и летучих мышей. На основании рассмотренных в обзоре работ можно заключить, что долгоживущие грызуны и летучие мыши, в целом, демонстрируют высокую эффективность в функционировании и регуляции систем репарации ДНК. Тем не менее в контексте изучения репарации ДНК в клетках долгоживущих грызунов и летучих мышей все еще остается ряд недостаточно изученных вопросов, которые открывают перспективы к проведению дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репарация ДНК, клеточное старение, долголетие, поли(ADP-рибоза)-полимераза 1, сиртуин 6.

DOI: 10.31857/S0320972524060032 EDN: XMKEQY

ВВЕДЕНИЕ

Старение представляет собой возрастное ухудшение физиологических функций организма, которое может стать основой для развития сердечно-сосудистых, раковых и нейродегенеративных заболеваний. На клеточном уровне процесс старения проявляется в результате патологических изменений клеточного гомеостаза, сопровождаемая необратимой остановкой клеточного цикла, приобретением клетками характерного фенотипа, развитием хронической воспалительной реакции на тканевом уровне и многими другими призна-

ками [1]. Возрастное накопление «стареющих» клеток в организме, обусловленное снижением эффективности их удаления из тканей, способствует старению организма и развитию ассоциированных со старением заболеваний [2]. Одной из главных причин старения клеток является нарушение структуры генома, которое может возникать как спонтанно (ошибки репликации, дезаминирование азотистых оснований и депуринизация), так и в результате воздействия факторов экзогенного (УФ-излучение, лекарственные препараты и т.д.) и эндогенного (реакционноспособные формы кислорода) происхождения [3–6]. В поддержание

Принятые сокращения: BER – эксцизионная репарация оснований; HR – гомологичная рекомбинация; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; NHEJ – негомологичное соединение концов ДНК; PARP1 – поли(ADP-рибоза)-полимераза 1; SIRT6 – гистондеацетилаза сиртуин 6.

* Адресат для корреспонденции.

стабильности генома млекопитающих вовлечены различные клеточные механизмы [7–9], среди которых важнейшую роль играют системы репарации ДНК. Рассмотрению связи репарации ДНК со старением посвящено много работ [5, 10, 11]; и на сегодняшний день известно, что снижение активности систем репарации ДНК ведет к увеличению количества повреждений в геноме и скорости их накопления, что значительно увеличивает риск развития патологий, ассоциированных со старением [9, 12, 13]. Вместе с тем результаты сравнительных исследований активности систем репарации ДНК, а также характерных особенностей, сопряженных с функционированием и регуляцией этих систем у долгоживущих млекопитающих, практически не обсуждались ранее. Представление актуальной информации о функциональном статусе систем репарации ДНК и особенностях работы соответствующих белков в клетках долгоживущих млекопитающих могло бы способствовать более детальному пониманию связи репарации ДНК со старением.

Наиболее популярными моделями при проведении сравнительных исследований старения у млекопитающих являются различные представители отряда грызунов (Rodentia) [14–16], среди которых имеются животные, демонстрирующие высокую максимальную продолжительность жизни (более чем 30 лет), устойчивость к длительному воздействию окислительного стресса и раковым заболеваниям [17–19]. Большое внимание привлечено также к летучим мышам (Chiroptera), как потенциальным моделям для изучения старения у млекопитающих, в связи с выявленной у многих представителей этого отряда высокой максимальной продолжительности жизни (~30–40 лет) и практически неисследованными особенностями функционирования систем репарации ДНК в их клетках [20]. Таким образом, поиск и изучение этих особенностей, которые могут способствовать стабильности генома и обеспечивать высокую продолжительность жизни долгоживущих грызунов и летучих мышей, представляет огромный исследовательский интерес.

Целью данного обзора является рассмотрение актуальных данных об активности систем репарации ДНК в клетках долгоживущих грызунов и летучих мышей. Первая часть обзора посвящена описанию результатов исследования активности систем репарации ДНК в клетках этих млекопитающих. Во второй части обзора обсуждаются результаты исследования активности NAD⁺-зависимых поли(ADP-рибоза)-полимеразы 1 (poly (ADP-ribose)polymerase 1, PARP1) и гистондеацетилазы сиртуина 6 (sirtuin 6, SIRT6), как основных белков-регуляторов процессов репарации ДНК. Обзор частично перекрывается с недавно

опубликованными работами Yamamura et al. [19], Gorbunova et al. [20] и Boughey et al. [21]. Представленная в обзоре информация о результатах, полученных при исследовании процессов репарации ДНК в клетках долгоживущих грызунов и летучих мышей, может быть актуальна и полезна для исследователей, нацеленных не только на изучение молекулярных основ долголетия млекопитающих, в том числе человека, но и на разработку эффективных стратегий продления жизни и лечение заболеваний, ассоциированных со старением.

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

В ответ на повреждения ДНК в клетке активируются специализированные системы репарации ДНК, работа которых сопряжена с регуляцией клеточного цикла и процессом клеточной гибели [22]. Серьезными нарушениями структуры генома, которые при длительном сохранении могут приводить к гибели клеток или переходу их в состояние клеточного старения, являются спонтанно образуемые апурин/апириимидиновые (АП) сайты, одно- и двухцепочечные разрывы, межцепочечные сшивки ДНК–ДНК, а также сшивки ДНК–белок и различные объемные повреждения ДНК. При эффективной работе систем репарации ДНК, таких как эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER) и нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), а также процессов гомологичной рекомбинации (homologous recombination, HR) и негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), обеспечивающих удаление широкого спектра повреждений, клеткам удается поддерживать структуру генома, что способствует их нормальной жизнедеятельности. Это дает основание выдвигать репарацию ДНК на роль одного из основных факторов, способствующих долголетию [5]. При поиске взаимосвязи максимальной продолжительности жизни и эффективности функционирования данных систем репарации ДНК был выполнен ряд экспериментальных работ по сравнительному изучению репаративного статуса клеток млекопитающих с различной максимальной продолжительностью жизни: человека, грызунов и летучих мышей.

Секвенирование РНК (RNA sequencing, RNA-seq) и последующий анализ экспрессии 130 генов белков, вовлеченных в репарацию ДНК, выявили, что уровни экспрессии более чем 30 генов, среди которых были гены, кодирующие белки, участвующие в процессах BER и NHEJ, в клетках печени голого землекопа (*Heterocephalus glaber*, ~28 лет) и человека были заметно выше по сравнению с клетками мыши (*Mus musculus*, ~4 года) [23, 24]. Выполненный позже с помощью qPCR количе-

ственный анализ содержания мРНК показал, что в течение 24 часов после УФ-облучения уровни экспрессии ряда генов белков BER и NER в фибробластах мыши значительно возрастали, в то время как клетки голого землекопа не демонстрировали выраженного ответа на уровне экспрессии этих генов. При этом сравнительная оценка активности данных систем репарации показала, что активность белков репарации ДНК у голого землекопа в 1,5–3 раза выше, чем у мыши [25].

В работе Tian et al. [26] методом реактивации экспрессии репортерного белка в клетках хозяина (host cell reactivation, HCR) было показано, что эффективность репарации плазмиды, содержащей множественные УФ-повреждения, белками NER *in vivo* значительно варьирует среди 18 видов грызунов и не коррелирует с продолжительностью жизни. В то же время аналогичным методом, но с использованием другой модельной плазмиды, была впервые установлена прямая корреляция между эффективностью репарации двухцепочечных разрывов белками систем NHEJ и гомологичной рекомбинации (homologous recombination, HR) в легочных ($r^2 = 0,31$; $P < 0,05$) и кожных ($r^2 = 0,57$; $P < 0,01$) фибробластах и продолжительностью жизни исследуемой группы грызунов [26]. Несмотря на некоторые недостатки, связанные со сложностью получения модельных плазмид, достоинства метода HCR делают его дальнейшее применение особенно востребованным для возможности измерения активности систем репарации ДНК на уровне клеток [27].

С помощью RNA-seq было показано, что клетки долгоживущей ближневосточной слепушонки (*Spalax ehrenbergi*, ~20 лет) также демонстрируют более высокие уровни экспрессии генов белков BER и HR по сравнению с клетками короткоживущих серой крысы (*Rattus norvegicus*, ~5 лет) [28] и мыши [29]. Схожие уровни экспрессии генов репарации ДНК у слепушонки и голого землекопа, как предполагается, могут быть следствием адаптации к гипоксическим условиям их обитания. Повышение экспрессии генов белков репарации ДНК в условиях гипоксии также наблюдается и у некоторых других грызунов [30, 31].

Выявленная в последующих работах высокая устойчивость клеток голого землекопа к воздействию ДНК-повреждающих агентов (метилметансульфонат, 5-фторурацил и этопозид) [32] и гамма-излучения [33, 34] может быть результатом эффективного функционирования систем репарации ДНК. Фибробласты кожи долгоживущей слепушонки также демонстрируют более высокую устойчивость к воздействию этопозидов по сравнению с клетками человека и мыши, что позволяет клеткам слепушонки избегать индуцированного стрессом старения [35].

Полногеномное секвенирование клеток кишечника и кожи 18 представителей млекопитающих и последующий статистический анализ результатов показали, что скорость накопления мутаций в геноме соматических клеток находится в обратной корреляции с продолжительностью жизни млекопитающих [36]. Примечательно, что скорость накопления мутаций в соматических клетках голого землекопа была почти в 8 раз ниже, чем у мыши. В работе Robinson et al. [12] была проведена количественная оценка уровня и скорости накопления спонтанно образуемых циклопуриновых повреждений ДНК в клетках мышей дикого типа и в клетках мышей с пониженной экспрессией *ERCC1* (NER). С использованием масс-спектрометрии было показано, что уровень содержания циклопуринов в клетках мышей *ERCC1*^{-/-} 5-месячного возраста был выше, чем у мышей дикого типа, и сопоставим с уровнем у трехлетних мышей дикого типа. Таким образом, при отсутствии функционально активной NER скорость накопления спонтанных повреждений ДНК в клетках увеличивается, а уровень спонтанных повреждений достигает такового, характерного для стареющих клеток. Результаты анализа β -галактозидазной активности в совокупности с данными, полученными с помощью метода FISH, показали, что данные повреждения, будучи не устраненными, могут способствовать старению клеток в тканях млекопитающих [12]. Эти предположения были экспериментально подтверждены при дальнейшем изучении мутантных мышей с нокаутом гена *ERCC1*, которые демонстрировали хроническую воспалительную реакцию и характерный старческий фенотип [37].

Исследований, направленных на изучение репарации ДНК в клетках летучих мышей, проведено относительно мало; в контексте определения активности различных систем репарации ДНК исследования прежде не проводились. Сравнительный транскриптомный анализ клеток различных тканей большой ночницы (*Myotis myotis*, ~37 лет) и других млекопитающих с разной продолжительностью жизни, среди которых были мышь, серая крыса, человек и голый землекоп, показал, что в клетках большой ночницы повышен уровень экспрессии генов ряда белков, участвующих в репарации ДНК и регуляции клеточного цикла (например, *ATM*, *PARP1*, *RAD50*, *RFC3*, *RPA1*, *MLH3*, *XRCC5*) [38]. Выполненный позднее транскриптомный анализ образцов крови долгоживущей большой ночницы выявил повышенный уровень экспрессии 32 генов белков различных систем репарации ДНК, среди которых 13 генов кодируют белки системы NER [39]. Примечательно, что уровни экспрессии генов белков репарации ДНК в клетках большой ноч-

ницы увеличиваются с возрастом, в то время как в клетках человека наблюдается снижение уровней экспрессии этих генов. С использованием тех же методов и образцов авторы данной работы позднее провели сравнительный транскриптомный анализ клеток долгоживущей большой ночницы и короткоживущего бархатного складчатогуба (*Molossus molossus*, ~5,6 лет) и показали, что уровни экспрессии генов белков репарации ДНК и генов белков макроаутофагии значительно повышены именно в клетках долгоживущей большой ночницы [40].

На основании рассмотренных данных можно заключить, что долгоживущие грызуны, в отличие от короткоживущих, действительно демонстрируют высокую активность систем репарации ДНК, что способствует своевременному удалению возникающих повреждений ДНК и, как следствие, снижению уровня и скорости их накопления в геноме. В совокупности эти данные подтверждают современные представления о роли репарации ДНК в старении млекопитающих [5]. Однако некоторые противоречия, которые наблюдаются при сопоставлении результатов транскриптомного анализа и оценки активности систем репарации ДНК у грызунов [23–25], указывают на необходимость проведения экспериментов, направленных на дальнейшую идентификацию и изучение белковых участников этого процесса протеомными методами, а также на оценку их активности, поскольку уровни экспрессии генов не всегда коррелируют с уровнями экспрессии соответствующих белков, их содержанием в клетке и тем более с их активностью. Для долгоживущих летучих мышей показано лишь увеличение уровня экспрессии генов, кодирующих белки репарации ДНК, и ничего не известно о функциональном статусе систем репарации ДНК в их клетках. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования с применением методов определения активности систем репарации ДНК и количественной оценки уровня повреждений ДНК.

PARP1 И SIRT6 – КЛЮЧЕВЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕПАРАЦИИ ДНК

Эффективный поиск повреждений, сборка репарационных комплексов и работа белков репарации в значительной степени затруднены ввиду хроматиновой компактизации генома. В этой связи особое внимание привлекают два NAD^+ -зависимых белка – PARP1 и SIRT6, которые играют ключевую роль во многих клеточных процессах, включая регуляцию работы белков репарации, в том числе и доступ последних в хроматиновые области [41, 42].

Наряду с ферментативными функциями PARP1 и SIRT6 выполняют роль «сенсоров» повреждений в ДНК. Проводя реакцию поли (ADP-рибозил)ирования при активации ферментативной активности, вызванной связыванием с повреждением в ДНК, PARP1 способна привлекать к месту повреждения факторы ремоделирования хроматина и белки репарации ДНК, регулируя их и свою собственную активность [43–45]. Имеются данные о том, что через взаимодействие с аутомодифицированной PARP1 в процесс репарации ДНК вовлекается белок p53 [46], который играет важную роль в определении судьбы клетки [47, 48]. Синтезируемые PARP1 разветвленные полимеры поли(ADP-рибозы) (poly(ADP-ribose), PAR) участвуют в образовании немембранных структур, так называемых компартментов, в которых на поврежденном участке ДНК концентрируются белки комплексов репарации для эффективного осуществления этого процесса [49–51]. SIRT6, который производит деацетилирование гистонов и других белков, регулируя их активность, способствует привлечению факторов ремоделирования хроматина и связыванию белков репарации с поврежденными участками ДНК [52, 53]. В ряде работ показано, что SIRT6 одним из первых связывается с двухцепочечными разрывами ДНК, способствуя привлечению и моно(ADP-рибозил)ированию PARP1 [54, 55]. В то же время есть данные, что первым с двухцепочечными разрывами ДНК связывается PARP1, инициируя дальнейшие процессы NHEJ или HR [56, 57]. Помимо репарации ДНК, PARP1 и SIRT6 активно вовлечены в поддержание целостности теломера и регуляцию клеточного цикла [41, 52].

Работ по изучению PARP1 и SIRT6 проведено достаточно много, однако функционирование этих белков ввиду их широкой вовлеченности в самые разнообразные клеточные процессы все еще нуждается в детальном изучении. Большой интерес представляет функциональная взаимосвязь PARP1 и SIRT6 в контексте репарации ДНК, поскольку для осуществления своих каталитических функций оба белка задействуют внутриядерный пул NAD^+ и, по всей видимости, конкурируют за него [58]. Не до конца выясненным остается вопрос о совместном участии PARP1 и SIRT6 в репарации одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК; представленные в литературе данные расходятся [54–57].

В контексте изучения старения также имеются противоречивые экспериментальные данные о роли PARP1, полученные с использованием мышей, нокаутных по гену *PARP1*. Есть данные, которые позволяют полагать, что из-за вовлеченности в активацию транскрипционного фактора NF- κ B, стимулирующего воспалительную реакцию путем экспрессии провоспалительных цитокинов,

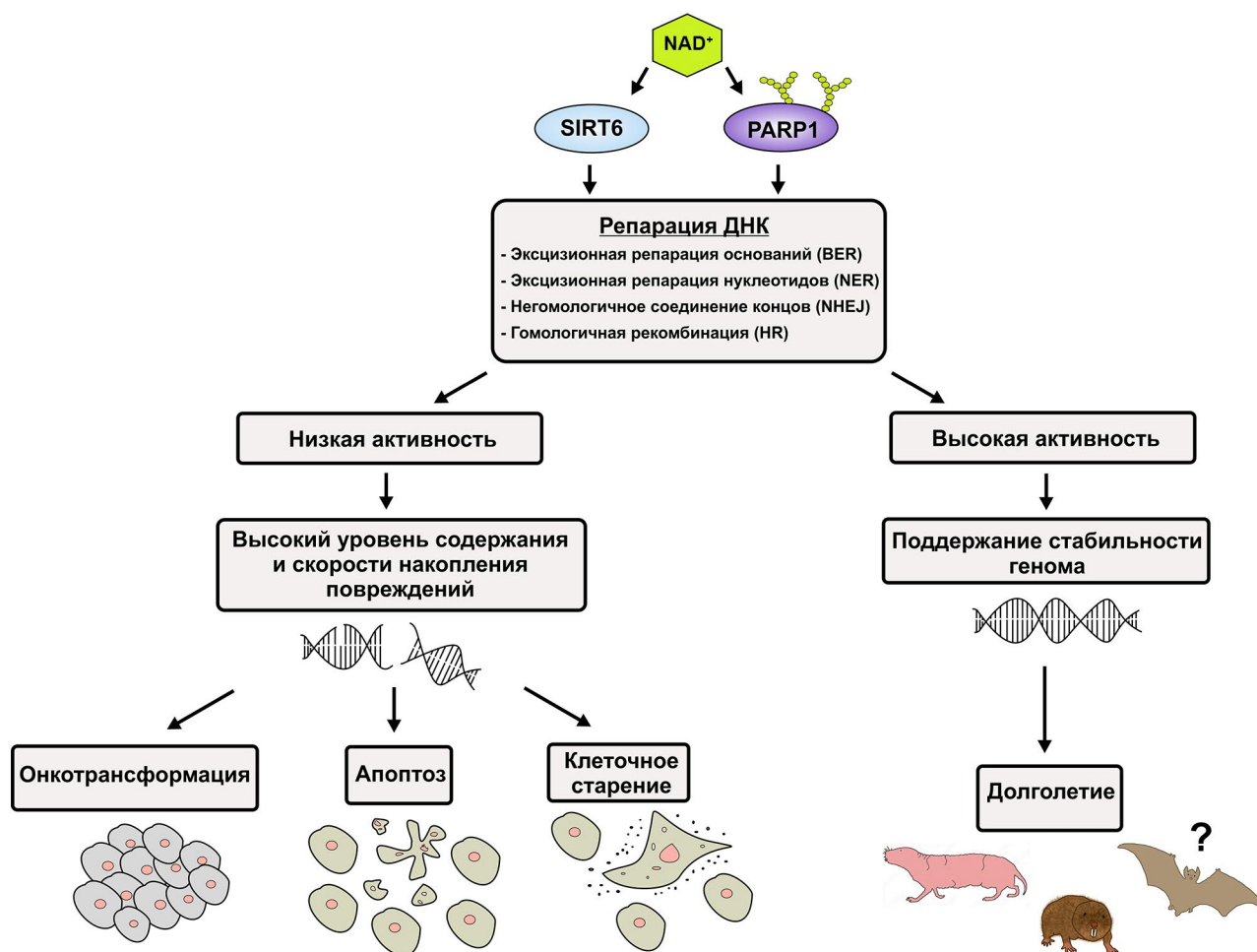
PARP1 может быть причислена к факторам, способствующим старению [59–61]. При этом в работе Piskunova et al [62] было обнаружено, что нокаутные по *PARP1* мыши, наоборот, демонстрируют признаки ускоренного старения. Примечательно, что SIRT6 способствует снижению активации NF-κB путем деацетилирования гистона H3 на участке промотора гена белка NF-κB [63]. Таким образом, изучение PARP1 и SIRT6 является перспективным направлением исследований, результаты которых могли бы способствовать значительному прогрессу не только в понимании того, как организован и регулируется процесс репарации ДНК в клетках млекопитающих, но и какова роль этих белков в старении.

На данный момент работ по сравнению особенностей функционирования PARP1 в клетках млекопитающих с различной продолжительностью жизни проведено совсем немного. Grube и Bürkle [64] впервые выполнили сравнительный анализ активности PARP1 в лейкоцитах 13 видов млекопитающих, который позволил выявить прямую корреляцию ($r^2 = 0,84$; $P < 0,001$) между активностью данного белка и продолжительностью жизни исследованных животных. Позднее эти данные были подкреплены результатами сравнения кинетических характеристик рекомбинантных PARP1 человека и короткоживущей серой крысы [65, 66]. Недавно было показано, что уровень продукции PAR, синтезируемой PARP1 экстракта клеток голого землекопа, был в 1,5–2,5 раза выше, чем у мыши [25, 67]. Фотоаффинная модификация белков клеточных экстрактов, выполненная с использованием фотоактивных ДНК, содержащих аналоги интермедиатов BER, показала, что PARP1 голого землекопа в 2–3 раза более эффективно взаимодействовала с модельными ДНК, чем PARP1 мыши. Более высокие выходы продуктов фотоаффинной модификации PARP1 послужили основанием высказать предположение о более высоком содержании этого белка в экстракте клеток голого землекопа [67]. Особенности структуры и функционирования PARP1 голого землекопа в сравнении с аналогичным ферментом мыши, таким образом, требуют дальнейшего исследования.

Недавно в работе Schwarz et al. [68] была проанализирована потенциальная роль PARP1 в деметилировании ДНК эмбриональных стволовых клеток мыши. Деметилирование и последовательное окисление 5-метилцитозина до 5-карбокситозина осуществляется белками комплекса TEN (ten-eleven translocation proteins) [69], после чего 5-карбокситозин удаляется тимин-ДНК-гликозилазой (Thymine-DNA glycosylase, TDG) с образованием АП-сайта, с которым TDG остается связанной, и тем самым ограничивает на некоторое время

доступ к АП-сайту белков BER. С использованием различных биохимических подходов было показано, что PARP1 в эмбриональных стволовых клетках мыши осуществляет поли(ADP-рибозил)ирование TDG, способствуя ее быстрой диссоциации из комплекса с ДНК, а также обеспечивает поли(ADP-рибозил)ирование себя и белков BER, необходимое для эффективной репарации АП-сайта *in vitro* и *in vivo* [68]. В совокупности это обеспечивало не только более быстрый оборот TDG и, как следствие, быстрое удаление модифицированных оснований из ДНК, но и опосредованно способствовало снижению уровня метилирования ДНК в клетках мыши. Поскольку скорость метилирования ДНК в клетках крови и кожи млекопитающих обратно коррелирует с величиной максимальной продолжительности жизни ($r^2 = 0,81$ и $0,80$ соответственно; $P < 0,001$) [70], полученные в работе Schwarz et al. [68] результаты подтверждают важную роль PARP1 в регуляции процесса BER и обеспечении долголетия млекопитающих. Стоит отметить, что для эффективной PARP1-опосредованной регуляции BER в клетках млекопитающих критически важным фактором является уровень содержания доступного NAD^+ в клетке [71]. С возрастом в клетках наблюдается снижение уровня NAD^+ и эффективности репарации ДНК [71, 72]. Дальнейшие исследования выявили еще одну причину взаимосвязи концентрации NAD^+ и активности PARP1 в клетках млекопитающих. Партнером PARP1 является белок DBC1 (deleted breast cancer 1 protein), который блокирует ее работу. Белок-белковые взаимодействия между DBC1 и PARP1 регулируются уровнем NAD^+ , при снижении этого уровня с возрастом происходит DBC1-опосредованное ингибирование активности PARP1 и, как следствие, снижение эффективности репарации ДНК [73].

Роль SIRT6 в регуляции репарации ДНК в клетках долгоживущих млекопитающих активно исследуется, но все еще остается недостаточно изученной. Вестерн-блот-анализ экспрессии SIRT6 в клетках человеческих доноров разного возраста показал обратную корреляцию ($r^2 = 0,65867$; $P < 0,0001$) уровня экспрессии SIRT6 с возрастом и прямую корреляцию ($r^2 = 0,32568$; $P < 0,05$) с эффективностью BER [74]. Повышение экспрессии SIRT6 в мышечных эмбриональных фибробластах приводило к увеличению эффективности BER почти в 2 раза. Примечательно, что ингибирование PARP1 с помощью PJ34 или нокаун соответствующего гена в иммортализованных клетках аденокарциномы человека HCA2-hTERT приводило к нарушению активации BER независимо от уровня экспрессии SIRT6, что, по мнению авторов, указывает на необходимость SIRT6-опосредованного вовлечения PARP1 для активации BER [74].



Активность систем репарации ДНК и ее значение для обеспечения стабильности генома млекопитающих. PARP1 (поли(ADP-рибоза)-полимераза 1) и SIRT6 (сиртуин 6) – NAD⁺-зависимые регуляторы репарации ДНК

В работе Tian et al. [26] была проанализирована активность SIRT6 у грызунов с различной продолжительностью жизни. Методом HCR с использованием соответствующей плазмидной конструкции удалось установить прямую корреляцию между стимуляцией NHEJ ($r^2 = 0,34$; $P < 0,05$) и HR ($r^2 = 0,40$; $P < 0,01$), обусловленной высокой активностью SIRT6, и продолжительностью жизни исследованных грызунов. Результаты дополнительных экспериментов, выполненных с использованием рекомбинантных SIRT6 долгоживущего канадского бобра (*Castor canadensis*, ~24 года) и короткоживущей мыши, позволили установить, что SIRT6 канадского бобра демонстрирует несколько большее сродство к NAD⁺ и более высокую скорость его превращения в реакции моно (ADP-рибозил)ирования ($K_m = 138,6 \pm 10,6$ и $V_{max} = 10,4 \pm 0,25$ соответственно), чем SIRT6 мыши ($K_m = 150,9 \pm 9,6$ и $V_{max} = 5,0 \pm 0,1$ соответственно), что может значительно увеличивать SIRT6-опосредованную стимуляцию PARP1 для участия в NHEJ и HR в клетках канадского бобра [26]. Наблюдаемые различия, по мнению авторов данной работы, могут быть

обусловлены обнаруженными при сравнении аминокислотной последовательности SIRT6 канадского бобра с белком мыши двумя уникальными заменами – His249Gly и Thr263Cys [26]. Выявленные позднее в последовательности SIRT6 людей-долгожителей два редких однонуклеотидных полиморфизма, которые приводили к появлению аминокислотных замен Asn308Lys и Ala313Ser, были ответственны за практически двукратное повышение моно (ADP-рибозил) трансферазной активности SIRT6 в клетках человека [75].

Несмотря на немногочисленные исследования по изучению SIRT6 и PARP1 у долгоживущих грызунов, имеющиеся результаты позволяют предположить, что тенденция к повышению активности этих белков в клетках долгожителей обусловлена необходимостью обеспечения более эффективной регуляции процессов репарации ДНК. Совершенно неизученным остается вопрос об особенностях функционирования и свойствах SIRT6 и PARP1 в клетках долгоживущих летучих мышей. Стоит также обратить внимание на то, что одним из главных факторов, обеспечивающих высокую

эффективность репарации ДНК, является также модуляция активности SIRT6 и PARP1 другими белками-партнерами [73, 76, 77]. Учитывая значение SIRT6 и PARP1 для клеточных процессов, которые могут быть ассоциированы со старением [61, 63], дальнейшее изучение этих белков представляет большой интерес.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стабильность структуры и функционирования генома является одной из основ высокой продолжительности жизни. Важнейшую роль в поддержании стабильности генома играют процессы репарации ДНК. Рассмотренные в обзоре результаты исследований позволяют сделать вывод о том, что грызуны с высокой максимальной продолжительностью жизни демонстрируют эффективную и хорошо скоординированную работу систем репарации ДНК (рисунок). Ввиду малого количества имеющихся данных и, как следствие, недостаточной изученности, вопрос о функциональном статусе систем репарации ДНК и активности PARP1 и SIRT6 у летучих мышей, демонстрирующих высокую максимальную продолжительность жизни, на сегодня остается открытым. Для понимания того,

чем обусловлена высокая эффективность работы систем репарации в клетках долгоживущих млекопитающих, необходимо проведение дальнейших исследований свойств белков-участников репарации ДНК, а также их возможного вклада в другие клеточные процессы, которые могут быть связаны со старением. Кроме того, необходимо проведение прямых сравнительных оценок функционального статуса систем репарации ДНК в клетках долгоживущих млекопитающих (не только на уровне транскриптомного анализа экспрессии генов) с применением более совершенных методов.

Вклад авторов. А.А. Попов, И.О. Петрусева – написание текста статьи; О.И. Лаврик – редактирование текста статьи; И.О. Петрусева, О.И. Лаврик – руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10056-П).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. López-Otín C., Pietrocola, F., Roiz-Valle, D., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2023) Meta-hallmarks of aging and cancer, *Cell Metab.*, **35**, 12-35, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.11.001>.
2. Dodig, S., Čepelak, I., and Pavić, I. (2019) Hallmarks of senescence and aging, *Biochem. Med. (Zagreb)*, **29**, 030501, <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>.
3. Yousefzadeh, M., Henpita, C., Vyas, R., Soto-Palma, C., Robbins, P., and Niedernhofer, L. (2021) DNA damage-how and why we age? *Elife*, **10**, e62852, <https://doi.org/10.7554/eLife.62852>.
4. Vijg, J. (2021) From DNA damage to mutations: all roads lead to aging, *Ageing Res. Rev.*, **68**, 101316, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101316>.
5. Schumacher, B., Pothof, J., Vijg, J., and Hoeijmakers, J. H. J. (2021) The central role of DNA damage in the ageing process, *Nature*, **592**, 695-703, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03307-7>.
6. López-Gil, L., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2023) Genomic instability and epigenetic changes during aging, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 14279, <https://doi.org/10.3390/ijms241814279>.
7. Wu, Y., Wei, Q., and Yu, J. (2019) The cGAS/STING pathway: a sensor of senescence-associated DNA damage and trigger of inflammation in early age-related macular degeneration, *Clin. Interv. Aging*, **14**, 1277-1283, <https://doi.org/10.2147/CIA.S200637>.
8. Gorbunova, V., Seluanov, A., Mita, P., McKerrow, W., Fenyö, D., Boeke, J. D., Linker, S. B., Gage, F. H., Kreiling, J. A., Petrashen, A. P., Woodham, T. A., Taylor, J. R., Helfand, S. L., and Sedivy, J. M. (2021) The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases, *Nature*, **596**, 43-53. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03542-y>.
9. Zhao, Y., Simon, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2023) DNA damage and repair in age-related inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, **23**, 75-89, <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00751-y>.
10. D'Amico, A. M., and Vasquez, K. M. (2021) The multifaceted roles of DNA repair and replication proteins in aging and obesity, *DNA Repair (Amst)*, **99**, 103049, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103049>.
11. Panier, S., Wang, S., and Schumacher, B. (2024) Genome instability and DNA repair in somatic and reproductive aging, *Annu. Rev. Pathol.*, **19**, 261-290, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051122-093128>.
12. Robinson, A. R., Yousefzadeh, M. J., Rozgaja, T. A., Wang, J., Li, X., Tilstra, J. S., Feldman, C. H., Gregg, S. Q., Johnson, C. H., Skoda, E. M., Frantz, M. C., Bell-Temin, H., Pope-Varsalona, H., Gurkar, A. U., Nasto, L. A.,

- Robinson, R. A. S., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Czerwinska, J., McGowan, S. J., Cantu-Medellin, N., Harris, J. B., Maniar, S., Ross, M. A., Trussoni, C. E., LaRusso, N. F., Cifuentes-Pagano, E., Pagano, P. J., Tudek, B., Vo, N. V., Rigatti, L. H., Opresko, P. L., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Burd, C. E., Croix, C. M. S., Siuzdak, G., Yates, N. A., Robbins, P. D., Wang, Y., Wipf, P., Kelley, E. E., and Niedernhofer, L. J. (2018) Spontaneous DNA damage to the nuclear genome promotes senescence, redox imbalance and aging, *Redox Biol.*, **17**, 259-273, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.007>.
13. Chen, Y., Geng, A., Zhang, W., Qian, Z., Wan, X., Jiang, Y., and Mao, Z. (2020) Fight to the bitter end: DNA repair and aging, *Ageing Res. Rev.*, **64**, 101154, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101154>.
14. Vanhooren, V., and Libert, C. (2013) The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 8-21, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.010>.
15. Dutta, S., and Sengupta, P. (2016) Men and mice: relating their ages, *Life Sci.*, **152**, 244-248, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>.
16. Lange, S., and Inal, J. M. (2023) Animal models of human disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15821, <https://doi.org/10.3390/ijms242115821>.
17. Gorbunova, V., Seluanov, A., Zhang, Z., Gladyshev, V. N., and Vijg, J. (2014) Comparative genetics of longevity and cancer: insights from long-lived rodents, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 531-540, <https://doi.org/10.1038/nrg3728>.
18. Domankevich, V., Eddini, H., Odeh, A., and Shams, I. (2018) Resistance to DNA damage and enhanced DNA repair capacity in the hypoxia-tolerant blind mole rat *Spalax carmeli*, *J. Exp. Biol.*, **221**, jeb174540, <https://doi.org/10.1242/jeb.174540>.
19. Yamamura, Y., Kawamura, Y., Oka, K., and Miura, K. (2022) Carcinogenesis resistance in the longest-lived rodent, the naked mole-rat, *Cancer Sci.*, **113**, 4030-4036, <https://doi.org/10.1111/cas.15570>.
20. Gorbunova, V., Seluanov, A., and Kennedy, B. K. (2020) The world goes bats: living longer and tolerating viruses, *Cell Metab.*, **32**, 31-43, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>.
21. Boughey, H., Jurga, M., and El-Khamisy, S. F. (2021) DNA homeostasis and senescence: lessons from the naked mole rat, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6011, <https://doi.org/10.3390/ijms22116011>.
22. Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., and d'Adda di Fagagna, F. (2021) Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **22**, 75-95, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.
23. MacRae, S. L., Croken, M. M., Calder, R. B., Aliper, A., Milholland, B., White, R. R., Zhavoronkov, A., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., Gorbunova, V., Zhang, Z. D., and Vijg, J. (2015) DNA repair in species with extreme lifespan differences, *Aging (Albany NY)*, **7**, 1171-1184, <https://doi.org/10.18632/aging.100866>.
24. MacRae, S. L., Zhang, Q., Lemetre, C., Seim, I., Calder, R. B., Hoeijmakers, J., Suh, Y., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., Gorbunova, V., and Vijg, J., Zhang, Z. D. (2015) Comparative analysis of genome maintenance genes in naked mole rat, mouse, and human, *Aging Cell*, **14**, 288-291, <https://doi.org/10.1111/acel.12314>.
25. Evdokimov, A., Kutuzov, M., Petruseva, I., Lukjanchikova, N., Kashina, E., Kolova, E., Zemerova, T., Romanenko, S., Perelman, P., Prokopov, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Graphodatsky, A., Trifonov, V., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2018) Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1454-1473, <https://doi.org/10.18632/aging.101482>.
26. Tian, X., Firsanov, D., Zhang, Z., Cheng, Y., Luo, L., Tomblin, G., Tan, R., Simon, M., Henderson, S., Steffan, J., Goldfarb, A., Tam, J., Zheng, K., Cornwell, A., Johnson, A., Yang, J. N., Mao, Z., Manta, B., Dang, W., Zhang, Z., Vijg, J., Wolfe, A., Moody, K., Kennedy, B. K., Bohmann, D., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2019) SIRT6 is responsible for more efficient DNA double-strand break repair in long-lived species, *Cell*, **177**, 622-638.e22, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.043>.
27. Popov, A. A., Petruseva, I. O., Naumenko, N. V., and Lavrik, O. I. (2023) Methods for assessment of nucleotide excision repair efficiency, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 11, 1844-1856, <https://doi.org/10.1134/S0006297923110147>.
28. Malik, A., Domankevich, V., Lijuan, H., Xiaodong, F., Korol, A., Avivi, A., and Shams, I. (2016) Genome maintenance and bioenergetics of the long-lived hypoxia-tolerant and cancer-resistant blind mole rat, *Spalax*: a cross-species analysis of brain transcriptome, *Sci. Rep.*, **6**, 38624, <https://doi.org/10.1038/srep38624>.
29. Altwasser, R., Paz, A., Korol, A., Manov, I., Avivi, A., and Shams, I. (2019) The transcriptome landscape of the carcinogenic treatment response in the blind mole rat: insights into cancer resistance mechanisms, *BMC Genomics*, **20**, 17, <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5417-z>.
30. Dong, Q., Wang, Z., Jiang, M., Sun, H., Wang, X., Li, Y., Zhang, Y., Cheng, H., Chai, Y., Shao, T., Shi, L., and Wang, Z. (2020) Transcriptome analysis of the response provided by *Lasiopodomys mandarinus* to severe hypoxia includes enhancing DNA repair and damage prevention, *Front. Zool.*, **17**, 9, <https://doi.org/10.1186/s12983-020-00356-y>.
31. Li, M., Pan, D., Sun, H., Zhang, L., Cheng, H., Shao, T., and Wang, Z. (2021) The hypoxia adaptation of small mammals to plateau and underground burrow conditions, *Animal Model Exp. Med.*, **4**, 319-328, <https://doi.org/10.1002/ame2.12183>.

32. Evdokimov, A., Popov, A., Ryabchikova, E., Koval, O., Romanenko, S., Trifonov, V., Petruseva, I., Lavrik, I., and Lavrik, O. (2021) Uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat, *Aging (Albany NY)*, **13**, 3239-3253, <https://doi.org/10.18632/aging.202577>.
33. Zhao, Y., Tyshkovskiy, A., Muñoz-Espín, D., Tian, X., Serrano, M., de Magalhaes, J. P., Nevo, E., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2018) Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 1801-1806, <https://doi.org/10.1073/pnas.1721160115>.
34. Yamamura, Y., Kawamura, Y., Oiwa, Y., Oka, K., Onishi, N., Saya, H., and Miura, K. (2021) Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells in the subventricular zone of the naked mole-rat brain, *Inflamm. Regen.*, **41**, 31, <https://doi.org/10.1186/s41232-021-00182-7>.
35. Odeh, A., Dronina, M., Domankevich, V., Shams, I., and Manov, I. (2020) Downregulation of the inflammatory network in senescent fibroblasts and aging tissues of the long-lived and cancer-resistant subterranean wild rodent, *Spalax*, *Aging Cell*, **19**, e13045, <https://doi.org/10.1111/accel.13045>.
36. Cagan, A., Baez-Ortega, A., Brzozowska, N., Abascal, F., Coorens, T. H. H., Sanders, M. A., Lawson, A. R. J., Harvey, L. M. R., Bhosle, S., Jones, D., Alcantara, R. E., Butler, T. M., Hooks, Y., Roberts, K., Anderson, E., Lunni, S., Flach, E., Spiro, S., Januszczak, I., Wrigglesworth, E., Jenkins, H., Dallas, T., Masters, N., Perkins, M. W., Deaville, R., Druce, M., Bogeska, R., Milsom, M. D., Neumann, B., Gorman, F., Constantino-Casas, F., Peachey, L., Bochynska, D., Smith, E. S. J., Gerstung, M., Campbell, P. J., Murchison, E. P., Stratton, M. R., and Martincorena, I. (2022) Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals, *Nature*, **604**, 517-524, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04618-z>.
37. Yousefzadeh, M. J., Flores, R. R., Zhu, Y., Schmiechen, Z. C., Brooks, R. W., Trussoni, C. E., Cui, Y., Angelini, L., Lee, K. A., McGowan, S. J., Burrack, A. L., Wang, D., Dong, Q., Lu, A., Sano, T., O'Kelly, R. D., McGuckian, C. A., Kato, J. I., Bank, M. P., Wade, E. A., Pillai, S. P. S., Klug, J., Ladiges, W. C., Burd, C. E., Lewis, S. E., LaRusso, N. F., Vo, N. V., Wang, Y., Kelley, E. E., Huard, J., Stromnes, I. M., Robbins, P. D., and Niedernhofer, L. J. (2021) An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs, *Nature*, **594**, 100-105, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7>.
38. Foley, N. M., Hughes, G. M., Huang, Z., Clarke, M., Jebb, D., Whelan, C. V., Petit, E. J., Touzalin, F., Farcy, O., Jones, G., Ransome, R. D., Kacprzyk, J., O'Connell, M. J., Kerth, G., Rebelo, H., Rodrigues, L., Puechmille, S. J., and Teeling, E. C. (2018) Growing old, yet staying young: The role of telomeres in bats' exceptional longevity, *Sci. Adv.*, **4**, eaao0926, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao0926>.
39. Huang, Z., Whelan, C. V., Foley, N. M., Jebb, D., Touzalin, F., Petit, E. J., Puechmille, S. J., and Teeling, E. C. (2019) Longitudinal comparative transcriptomics reveals unique mechanisms underlying extended healthspan in bats, *Nat. Ecol. Evol.*, **3**, 1110-1120, <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0913-3>.
40. Huang, Z., Whelan, C. V., Dechmann, D., and Teeling, E. C. (2020) Genetic variation between long-lived versus short-lived bats illuminates the molecular signatures of longevity, *Aging (Albany NY)*, **12**, 15962-15977, <https://doi.org/10.18632/aging.103725>.
41. Eisemann, T., and Pascal, J. M. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**, 19-33, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03366-0>.
42. De Céu Teixeira, M., Sanchez-Lopez, E., Espina, M., Garcia, M. L., Durazzo, A., Lucarini, M., Novellino, E., Souto, S. B., Santini, A., and Souto, E. B. (2019) Sirtuins and SIRT6 in carcinogenesis and in diet, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4945, <https://doi.org/10.3390/ijms20194945>.
43. Sinha, S., Molla, S., and Kundu, C. N. (2021) PARP1-modulated chromatin remodeling is a new target for cancer treatment, *Med. Oncol.*, **38**, 118, <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01570-2>.
44. Bilkis, R., Lake, R. J., Cooper, K. L., Tomkinson, A., and Fan, H. Y. (2023) The CSB chromatin remodeler regulates PARP1- and PARP2-mediated single-strand break repair at actively transcribed DNA regions, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 7342-7356, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad515>.
45. Rouleau-Turcotte, É., and Pascal, J. M. (2023) ADP-ribose contributions to genome stability and PARP enzyme trapping on sites of DNA damage; paradigm shifts for a coming-of-age modification, *J. Biol. Chem.*, **299**, 105397, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105397>.
46. Wang, Y. H., and Sheetz, M. P. (2023) Transcription-independent functions of p53 in DNA repair pathway selection, *Bioessays*, **45**, e2200122, <https://doi.org/10.1002/bies.202200122>.
47. Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., and Lahav, G. (2019) The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 199-210, <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>.
48. Engeland, K. (2022) Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling, *Cell Death Differ.*, **29**, 946-960, <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>.
49. Singatulina, A. S., Hamon, L., Sukhanova, M. V., Desforges, B., Joshi, V., Bouhss, A., Lavrik, O. I., and Pastré, D. (2019) PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA, *Cell Rep.*, **27**, 1809-1821.e5, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.031>

50. Leung, A. K. L. (2020) Poly(ADP-ribose): a dynamic trigger for biomolecular condensate formation, *Trends Cell Biol.*, **30**, 370-383, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.002>.
51. Alemasova, E., and Lavrik, O. (2022) Poly(ADP-ribose) in condensates: the PARTnership of phase separation and site-specific interactions, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14075, <https://doi.org/10.3390/ijms232214075>.
52. Klein, M. A., and Denu, J. M. (2020) Biological and catalytic functions of sirtuin 6 as targets for small-molecule modulators, *J. Biol. Chem.*, **295**, 11021-11041, <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011438>.
53. Kang, W., Hamza, A., Curry, A. M., Korade, E., Donu, D., and Cen, Y. (2023) Activation of SIRT6 deacetylation by DNA strand breaks, *ACS Omega*, **8**, 41310-41320, <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04859>.
54. Onn, L., Portillo, M., Ilic, S., Cleitman, G., Stein, D., Kaluski, S., Shirat, I., Slobodnik, Z., Einav, M., Erdel, F., Akabayov, B., and Toiber, D. (2020) SIRT6 is a DNA double-strand break sensor, *Elife*, **9**, e51636, <https://doi.org/10.7554/eLife.51636>.
55. Van Meter, M., Simon, M., Tomblin, G., May, A., Morello, T. D., Hubbard, B. P., Bredbenner, K., Park, R., Sinclair, D. A., Bohr, V. A., Gorbunova, V., and Seluanov, A. (2016) JNK phosphorylates SIRT6 to stimulate DNA double-strand break repair in response to oxidative stress by recruiting PARP1 to DNA breaks, *Cell Rep.*, **16**, 2641-2650, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.006>.
56. Yang, G., Liu, C., Chen, S. H., Kassab, M. A., Hoff, J. D., Walter, N. G., and Yu, X. (2018) Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3446-3457, <https://doi.org/10.1093/nar/gky088>.
57. Reber, J. M., Božić-Petković, J., Lippmann, M., Mazzardo, M., Dilger, A., Warmers, R., Bürkle, A., and Mangerich, A. (2023) PARP1 and XRCC1 exhibit a reciprocal relationship in genotoxic stress response, *Cell Biol. Toxicol.*, **39**, 1, 345-364, <https://doi.org/10.1007/s10565-022-09739-9>.
58. Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A., and Verdin, E. (2021) NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 119-141, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x>.
59. Hassa, P. O., and Hottiger, M. O. (2002) The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders, *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1534-1553, <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8527-2>.
60. Altmeyer, M., and Hottiger, M. O. (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging, *Aging (Albany NY)*, **1**, 458-469, <https://doi.org/10.18632/aging>.
61. Mangerich, A., and Bürkle, A. (2012) Pleiotropic cellular functions of PARP1 in longevity and aging: genome maintenance meets inflammation, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 321653, <https://doi.org/10.1155/2012/321653>.
62. Piskunova, T. S., Yurova, M. N., Ovsyannikov, A. I., Semchenko, A. V., Zabezhinski, M. A., Popovich, I. G., Wang, Z. Q., and Anisimov, V. N. (2008) Deficiency in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) accelerates aging and spontaneous carcinogenesis in mice, *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.*, **2008**, 754190, <https://doi.org/10.1155/2008/754190>.
63. Kawahara, T. L., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R. A., Ongaigui, K. C., Boxer, L. D., Chang, H. Y., and Chua, K. F. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span, *Cell*, **136**, 62-74, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.052>.
64. Grube, K., and Bürkle, A. (1992) Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11759-11763, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11759>.
65. Beneke, S., Alvarez-Gonzalez, R., and Bürkle, A. (2000) Comparative characterization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 from two mammalian species with different life span, *Exp. Gerontol.*, **35**, 8, 989-1002, [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00134-0](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00134-0).
66. Beneke, S., Scherr, A. L., Ponath, V., Popp, O., and Bürkle, A. (2010) Enzyme characteristics of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases-1 of rat and human origin mirror the correlation between cellular poly(ADP-ribosylation) capacity and species-specific life span, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 366-369, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.04.003>.
67. Kosova, A. A., Kutuzov, M. M., Evdokimov, A. N., Ilina, E. S., Belousova, E. A., Romanenko, S. A., Trifonov, V. A., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) and DNA repair synthesis in the extracts of naked mole rat, mouse, and human cells, *Aging (Albany NY)*, **11**, 2852-2873, <https://doi.org/10.18632/aging.101959>.
68. Schwarz, S. D., Xu, J., Gunasekera, K., Schürmann, D., Vågbø, C. B., Ferrari, E., Slupphaug, G., Hottiger, M. O., Schär, P., and Steinacher, R. (2024) Covalent PARylation of DNA base excision repair proteins regulates DNA demethylation, *Nat. Commun.*, **15**, 184, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44209-8>.
69. Joshi, K., Liu, S., Breslin, S. J. P., and Zhang, J. (2022) Mechanisms that regulate the activities of TET proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 363, <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04396-x>.
70. Crofts, S. J. C., Latorre-Crespo, E., and Chandra, T. (2023) DNA methylation rates scale with maximum lifespan across mammals, *Nat. Aging*, **4**, 27-32, <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00535-6>.

71. Saville, K. M., Clark, J., Wilk, A., Rogers, G. D., Andrews, J. F., Koczor, C. A., and Sobol, R. W. (2020) NAD⁺-mediated regulation of mammalian base excision repair, *DNA Repair (Amst)*, **93**, 102930, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102930>.
72. Garrido, A., and Djouder, N. (2017) NAD⁺ deficits in age-related diseases and cancer, *Trends Cancer*, **3**, 593-610, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.001>.
73. Li, J., Bonkowski, M. S., Moniot, S., Zhang, D., Hubbard, B. P., Ling, A. J., Rajman, L. A., Qin, B., Lou, Z., Gorbunova, V., Aravind, L., Steegborn, C., and Sinclair, D. A. (2017) A conserved NAD⁺ binding pocket that regulates protein-protein interactions during aging, *Science*, **355**, 1312-1317, <https://doi.org/10.1126/science.aad8242>.
74. Xu, Z., Zhang, L., Zhang, W., Meng, D., Zhang, H., Jiang, Y., Xu, X., Van Meter, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., and Mao, Z. (2015) SIRT6 rescues the age related decline in base excision repair in a PARP1-dependent manner, *Cell Cycle*, **14**, 269-276, <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.980641>.
75. Simon, M., Yang, J., Gigas, J., Earley, E. J., Hillpot, E., Zhang, L., Zagorulya, M., Tomblin, G., Gilbert, M., Yuen, S. L., Pope, A., Van Meter, M., Emmrich, S., Firsanov, D., Athreya, A., Biashad, S. A., Han, J., Ryu, S., Tare, A., Zhu, Y., Hudgins, A., Atzmon, G., Barzilai, N., Wolfe, A., Moody, K., Garcia, B. A., Thomas, D. D., Robbins, P. D., Vijg, J., Seluanov, A., Suh, Y., and Gorbunova, V. (2022) A rare human centenarian variant of SIRT6 enhances genome stability and interaction with Lamin A, *EMBO J.*, **41**, e110393, <https://doi.org/10.15252/emboj.2021110393>.
76. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>.
77. Grootaert, M. O. J., Finigan, A., Figg, N. L., Uryga, A. K., and Bennett, M. R. (2021) SIRT6 protects smooth muscle cells from senescence and reduces atherosclerosis, *Circ. Res.*, **128**, 474-491, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318353>.

ACTIVITY OF DNA REPAIR SYSTEMS IN CELLS OF LONG-LIVED RODENTS AND BATS

Review

A. A. Popov¹, I. O. Petrusheva¹, and O. I. Lavrik^{1,2*}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

² Novosibirsk National Research State University, 630090 Novosibirsk, Russia

The accumulation of damage in the genomic DNA of various origins can lead to a violation of its stability, which is considered as one of the main causes of cell aging. DNA repair systems available in mammalian cells ensure effective removal of damage and restoration of the genome structure, and therefore it is assumed that the activity of these systems may be interrelated with the high maximum life expectancy observed in long-lived mammals. The review discusses the currently available results of work on determining the activity of DNA repair systems and studying the properties of key regulatory proteins of this process in the cells of long-lived rodents and bats. Based on the studies reviewed in the review, it can be concluded that long-lived rodents and bats, in general, demonstrate high efficiency in the functioning and regulation of DNA repair systems. Nevertheless, in the context of studying DNA repair in the cells of long-lived rodents and bats, there are still a number of insufficiently studied issues that open up prospects for further research.

Keywords: DNA repair, cellular senescence, longevity, poly(ADP-ribose)polymerase 1, sirtuin 6

МУТАЦИЯ С886Т В ГЕНЕ *TH* СНИЖАЕТ АКТИВНОСТЬ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ

© 2024 И. Алсаллум^{1,2}, В.С. Москалюк¹, И.А. Рахов²,
Д.В. Базовкина¹, А.В. Куликов^{1,2*}

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
630090 Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: v_kulikov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 16.03.2024

После доработки 15.04.2024

Принята к публикации 25.04.2024

Тирозингидроксилаза (ТН) гидроксилирует L-тирозин до L-3,4-диоксифенилаланина, что представляет собой первую и ключевую стадию синтеза дофамина, норадреналина и адреналина. Мутации в гене *Th* человека ассоциированы с наследственными нарушениями моторики. В гене *Th* мыши выявлена встречающаяся у распространённых лабораторных линий мышей мутация С886Т, приводящая к замене R278H в молекуле фермента. В работе исследовали влияние данной мутации на активность ТН в среднем мозге мыши. Было показано, что активность ТН в мозге мышей подвиги *Mus musculus castaneus* (CAST), гомозиготных по аллели 886С, выше, чем у мышей инбредных линий C57BL/6 и DBA/2, гомозиготных по аллели 886Т. При этом такая разница в активности фермента не связана с изменением в уровне мРНК гена *Th* и концентрации белка ТН. В среднем мозге мышей из популяции расщепляющихся интеркроссов F2 между C57BL/6 и CAST выявлено сцепление аллели 886С с высокой активностью фермента и полное доминирование данной аллели над аллелью 886Т. В то же время данная мутация не влияла на уровень белка ТН в мозге. Это доказывает, что мутация С886Т является основным генетическим фактором, определяющим активность ТН в мозге мышей распространённых лабораторных линий. Мутация С886Т является первой спонтанной распространённой мутацией в гене *Th* мыши, для которой показано влияние на активность фермента. Полученный результат создаёт базу для углубления представлений о роли ТН в механизмах адаптивного и патологического поведения, о молекулярных механизмах регуляции активности данного фермента и поиска фармакологических средств коррекции его активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тирозингидроксилаза, мутация С886Т, активность, экспрессия, мозг, мыши.

DOI: 10.31857/S0320972524060048 **EDN:** XMIESK

ВВЕДЕНИЕ

Дофаминовая (DA) система мозга играет ключевую роль в регуляции нервной системы, эндокринных желез и в механизмах адаптивного и патологического поведения [1–4]. Нигростриарная DA система регулирует моторику, её гиперфункция сопровождается гиперактивностью [5–7], а её гипофункция – дистонией [8–10] и каталепсией/кататонией [11, 12]. Мезолимбическая DA система участвует в оценке значимости сигнала для организма и играет ключевую роль в процессе обуче-

ния [13–15] и формирования наркотической зависимости [16–19].

В мозге DA синтезируется из аминокислоты L-тирозина в два этапа: на первом этапе фермент тирозингидроксилаза (ТН) гидроксилирует L-тирозин до L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-DOPA), на втором этапе фермент декарбоксилаза ароматических аминокислот декарбоксилирует L-DOPA до DA. Реакция гидроксилирования L-тирозина является ключевой, определяющей уровень DA в мозге. Действительно, нокаут гена *Th* снижает уровень DA в головном мозге мышей [20, 21]. Показана ассо-

Принятые сокращения: CAST – *Mus musculus castaneus*; DA – дофамин; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; L-DOPA – L-3,4-диоксифенилаланин; ТН – тирозингидроксилаза.

* Адресат для корреспонденции.

ция некоторых мутаций в гене *TH* человека с дистонией и детским паркинсонизмом [22], риском болезни Паркинсона [22, 23], дистонией [24–27] и биполярными расстройствами [28]. Однако изучение цепи молекулярных событий, связывающих мутацию в гене *TH* с нарушениями нервной системы, моторики и психических функций человека, затруднено социальными и этическими ограничениями. Поэтому задача моделирования нарушения молекулярных событий, вызванных мутациями, на лабораторных грызунах является чрезвычайно актуальной.

В базе данных Ensembl genome database (<https://www.ensembl.org/index.html>) можно найти информацию о 21 однонуклеотидном полиморфизме (SNP) в гене *Th* мыши, вызывающем замену аминокислоты в молекуле ТН. Только одна мутация из 21 SNP, а именно С886Т, приводящая к замене R278Н в молекуле ТН, выявлена в гене *Th* широко распространённых линий лабораторных мышей. Аллель 886Т обнаружена у мышей большинства лабораторных линий, таких как C57BL/6, C3H, DBA/2, CBA, в то время как аллель 886С выявлена у мышей подвида *Mus musculus castaneus* (CAST). Ранее было показано, что мутация G1449А в гене *Tph2* мыши (замена R441Н в молекуле триптофангидроксилазы 2) резко снижает активность данного фермента в мозге мышей [29, 30]. Поскольку ТН и ТРН2 являются родственными ферментами из группы гидроксилаз ароматических аминокислот [31], можно ожидать, что мутация С886Т также будет снижать активность ТН.

Целью исследования было изучение влияния мутации С886Т в гене *Th* на активность ТН в мозге мыши. Для этого были сравнены активности ТН в среднем мозге – структуре, содержащей тела DA нейронов – у мышей линий C57BL/6 (886Т), DBA/2 (886Т) и CAST (886С). Чтобы учесть возможное влияние на активность ТН межлинейных различий по уровню экспрессии гена *Th*, был определён уровень мРНК данного гена и уровень белка ТН в среднем мозге этих линий мышей. Чтобы оценить вклад данной мутации в активность ТН на фоне влияния других генов, было изучено сцепление аллелей 886Т и 886С с активностью фермента в среднем мозге расщепляющихся интеркроссов F2 между мышами C57BL/6 и CAST.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты проводились на половозрелых самцах линий C57BL/6 ($n = 6$), DBA/2 ($n = 6$) и самцах подвида CAST ($n = 5$), а также на 41 половозрелых самцах и самках интеркроссов F2 между мышами C57BL/6 и CAST. Последние были получены в результате скрещивания между собой

гибридов первого поколения F1(C57BL/6× CAST). На момент начала эксперимента все мыши были в возрасте 12 недель и имели статус SPF (specific pathogen free) на протяжении всего эксперимента. Животные содержались в стандартных условиях SPF-вивария при постоянной температуре 23 °С и световом режиме «14 ч свет и 10 ч темнота» (включение и выключение света в 01:00 и 15:00 соответственно). Полноценный стерильный сухой корм и воду животные получали без ограничений. В возрасте 3 недель молодых животных отсаживали от матерей в группы по 4–5 животных одного пола в клетке (Optimice, «Animal Care Systems, Inc.», США). Животных маркировали засечками на ушах, и кусочки ушей, полученные при маркировке, использовали для выделения ДНК и определения генотипа животного. За два дня до начала эксперимента животных изолировали в отдельные клетки, чтобы уменьшить возможное влияние группового эффекта на активность ТН. Животных усыпляли CO₂, декапитировали, выделяли средний мозг, содержащий тела DA нейронов, экспрессирующих ТН, замораживали его в жидком азоте и хранили при –80 °С до определения активности ТН.

Генотипирование аллелей 886Т и 886С. Образцы геномной ДНК выделяли из кусочков ушей, полученных при маркировке животных, с помощью осаждения насыщенным раствором NaCl, растворяли в стерильной воде, измеряли их оптическую плотность на спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) и разводили до концентрации 50 нг/мкл. Определение аллелей 886Т и 886С проводили с помощью разработанного нами метода количественной ПЦР реального времени, используя набор реактивов R-402 («Синтол», Россия), прямого праймера (5'-GTAAGGGACCTCGCATCAGA-3') и двух обратных Т-аллель-(5'-CAGCTGGAGGATGTGTACAC-3') и С-аллель-(5'-CAGCTGGAGGATGTGTACAC-3') специфичных праймеров. Для увеличения специфичности Т в 18 позиции аллель-специфичных праймеров был заменён на А. Для диагностики аллелей каждый образец ДНК (50 нг) амплифицировали сначала в присутствии прямого и Т-специфичного праймеров, а затем прямого и С-специфичного праймеров на амплификаторе реального времени CFX96 («BioRad», США) по рекомендованному производителем («Синтол») протоколу: 94 °С – 5 мин, (94 °С – 15 с, 60 °С – 60 с, 80 °С – 2 с, измерение флуоресценции) × 40 циклов. Количество продуктов определяли по флуоресценции флуорофора Sybr Green после нагревания смеси до 80 °С для плавления димеров. Пороговый цикл был 24–25 при совпадении аллели в образце ДНК с выбранным аллель-специфическим праймером и больше 28 в противном случае. Для большей точности диагностику каждой пробы повторяли 3 раза.

Приготовление проб для ОТ-ПЦР и ВЭЖХ.

Для определения активности ТН и уровня мРНК гена *Th* средний мозг гомогенизировали в 400 мкл холодного 50 мМ Tris-HCl, pH 6,0, с помощью микрогомогенизатора (Z359971, «Sigma-Aldrich», Германия). Аликвоту 100 мкл гомогената немедленно смешивали с 1 мл реагента ExtractRNA («Eurogene», Россия) для экстракции общей РНК, согласно протоколу производителя. Осадок РНК растворяли в 25 мкл стерильной воды, обрабатывали свободной от РНК ДНКазой EM-100 («Биолабмикс», Россия), согласно протоколу производителя, измеряли оптическую плотность на спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific»), разводили стерильной водой до концентрации 125 нг/мкл и хранили при -80 °С. Качество образцов общей РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле: в дальнейшем исследование были взяты только образцы с чётко выраженными двумя полосами рибосомальной РНК.

Оставшиеся 300 мкл гомогената центрифугировали 15 мин при 12 700 об./мин (4 °С). Чистый супернатант переносили в чистые пробирки, определяли концентрацию белка по Бредфорду с помощью набора Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad»), согласно протоколу производителя, хранили при -80 °С и использовали для определения активности ТН.

Определение активности ТН. Нами был разработан метод количественного определения активности ТН в тканях мозга с помощью ВЭЖХ по скорости синтеза L-DOPA. Аликвоту 15 мкл чистого супернатанта, содержащего ТН, инкубировали 15 мин при 37 °С в присутствии 0,3 мМ L-тирозина («Sigma-Aldrich»), 0,3 мМ искусственного кофактора 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптеридина (DMPH₄, «Sigma-Aldrich»), 0,3 мМ ингибитора декарбоксилазы, m-гидроксibenзилгидразина («Sigma-Aldrich»), и 5 ед. каталазы («Sigma-Aldrich») в конечном объёме 25 мкл. Инкубацию останавливали путём добавления 75 мкл 0,6 М HClO₄. Белок осаждали центрифугированием 15 мин при 14 000 об./мин. Чистый супернатант разбавляли вдвое ультрачистой водой, чтобы снизить концентрацию кислоты до безопасного для детектора значения, 0,3 М. Синтезированный L-DOPA отделяли на колонке Luna C18(2) (длина 100 мм, диаметр 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, «Phenomenex», США), которой предшествовала предколонка Zorbax SB-C8 (длина 12,5 мм, диаметр 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, «Agilent», США) на хроматографе LC-20AD («Shimadzu Corporation», Япония). Мобильная фаза (pH 3,2) содержала 13,06 г KH₂PO₄, 200 мкл 0,5 М Na₂ЭДТА, 300 мг натриевой соли 1-октансульфоновой кислоты, 940 мкл концентрированной H₃PO₄ и 130 мл метанола (13%) в 1 л. Скорость мобильной фазы была 0,6 мл/мин. Концентрацию синтезиро-

ванного L-DOPA определяли с помощью электрохимического детектора DECADE II™ и стеклоуглеродного электрода VT-03 (3 мм, «Antec», Нидерланды). Температура колонки и детектора была 40 °С. В этих условиях время освобождения L-DOPA с колонки составляло 4 мин. Площадь пика L-DOPA определяли с помощью программы LabSolution LG/GC, версия 5.54 («Shimadzu Corporation») и калибровали с помощью стандартов 25, 50 и 100 пмоль L-DOPA. Активность ТН выражали в пмоль L-DOPA, синтезированного за 1 мин, в пересчёте на 1 мг белка, измеренного по Бредфорду.

Примечание 1. Поскольку не было обнаружено следов эндогенного L-DOPA в супернатанте, тканевый контроль проб не проводился.

Примечание 2. К сожалению, время освобождения L-DOPA с колонки (4 мин) совпадает с таковым для кофакторов 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина и 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптерина. Поэтому в исследованиях использовался только DMPH₄ в качестве кофактора.

Определение уровня мРНК гена *Th*. Синтез кДНК осуществляли со случайным гексануклеотидным праймером с помощью набора реактивов R01 («Биолабмикс»), согласно протоколу производителя. Уровень кДНК гена *Th* определяли с помощью набора реактивов R-402 («Синтол»), прямого (5'-CCGTACACCCTGGCCATTGATG-3') и обратного (5'-ATGAAGGCCAGGAGGAATGCAGG-3') праймеров, специфичных для нуклеотидной последовательности экзона гена *Th* мыши, согласно протоколу производителя: 94 °С – 5 мин, (94 °С – 15 с, 64 °С – 60 с, 80 °С – 2 с, измерение флуоресценции) × 40 [31]. В качестве гена домашнего хозяйства использовали *Polr2a*. Образцы кДНК амплифицировали с прямым (5'-GTTGTCTGGGAGCAGAGATGTAG-3') и обратным (5'-TCAATGAGACCTTCTCGTCCTCC-3') праймерами, специфичными для нуклеотидной последовательности экзона гена *Polr2a* мыши, согласно протоколу производителя: 94 °С – 5 мин, (94 °С – 15 с, 63 °С – 60 с, 80 °С – 2 с, измерение флуоресценции) × 40 [32]. Для калибровки значений порогового цикла использовали батарею стандартов, содержащих соответственно 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 и 3200 копий геномной ДНК мыши в 1 мкл. Уровень экспрессии гена *Th* оценивали числом копий кДНК данного гена в пересчёте на 100 копий кДНК гена *Polr2a* [33].

Определение количества белка с помощью Вестерн-блот анализа. Уровень белка ТГ определяли с помощью Вестерн-блот анализа, как описано ранее [34]. Белок разделяли в 10%-ном геле с помощью SDS-PAGE гель-электрофореза. На одну дорожку добавляли аликвоту образца с общей концентрацией белка 10 мкг. Для выявления целевого белка были использованы поликлональные антитела кролика к белку ТГ (1 : 500, ab112, «Abcam»,

Великобритания). В качестве внутреннего контроля были использованы поликлональные антитела кролика к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе, GAPDH (1 : 2000, ab9485, «Abscam»), и моноклональные антитела мыши к GAPDH (1 : 10 000, HC301, «TransGen», Китай). Экспрессию белка ТН нормировали на экспрессию белка GAPDH и выражали в относительных единицах. Белок ТН детектировали на 60 кДа, GAPDH – на 37 кДа.

Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Statistica 9.0 («StatSoft, Inc.»). Значения уровня мРНК гена *Th*, уровня белка и активности ТН в среднем мозге выражали как среднее $\pm$ ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного (межлинейные различия) и двухфакторного (F2) ANOVA с последующим межгрупповым сравнением методом LSD по Фишеру. Соответствие расщепления генотипов ТТ, ТС и СС среди интеркроссов F2 соотношению 1 : 2 : 1 проверяли с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Уровень значимости был принят равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнение экспрессии гена *Th* и активности ТН в среднем мозге самцов мышей линий C57BL/6 (886Т), DBA/2 (886Т), CAST (886С). Мыши трёх исследуемых линий различались по активности ТН в среднем мозге ($F(2,14) = 21,68, p < 0,001$). Активность фермента в среднем мозге мышей CAST была значительно выше, чем у мышей ли-

ний C57BL/6 ($p < 0,001$) и DBA/2 ($p < 0,001$) (рис. 1). В то же время межлинейных различий по уровню транскриптов гена *Th* ($F(2,13) = 2,67, p = 0,11$) и белка ТН ($F(2,14) = 1,23, p = 0,32$) в среднем мозге данных линий мышей не выявлено (рис. 1).

Генотип	Самцы	Самки	Самцы + самки
ТТ	5	3	8
ТС	13	10	23
СС	5	6	11

Активность ТН в среднем мозге интеркроссов F2. Количество самцов и самок генотипов ТТ, ТС и СС среди 42 интеркроссов F2 представлено в таблице. Для статистики данные по самцам и самкам каждого генотипа были объединены. Полученные значения хорошо соответствуют ожидаемому распределению 1 : 2 : 1 ($\chi^2(1) = 0,805, p > 0,05$).

Двухфакторный ANOVA выявил высокий вклад фактора «генотип» в активность ТН в среднем мозге F2 ($F(2,34) = 9,47, p < 0,001$). В то же время не было обнаружено влияния фактора «пол» ($F(1,34) < 1$) и взаимодействия факторов ($F(2,34) = 1,74, p = 0,19$) на активность ТН в среднем мозге мышей F2, что позволяет объединить значения для самцов и самок одного генотипа, чтобы увеличить выборки для каждого генотипа.

Двухфакторный ANOVA выявил высокий вклад фактора «генотип» в активность ТН в среднем мозге F2 ($F(2,34) = 9,47, p < 0,001$). В то же время не было обнаружено влияния фактора «пол» ($F(1,34) < 1$) и взаимодействия факторов ($F(2,34) = 1,74, p = 0,19$) на активность ТН в среднем мозге мышей F2, что позволяет объединить значения для самцов и самок одного генотипа, чтобы увеличить выборки для каждого генотипа.

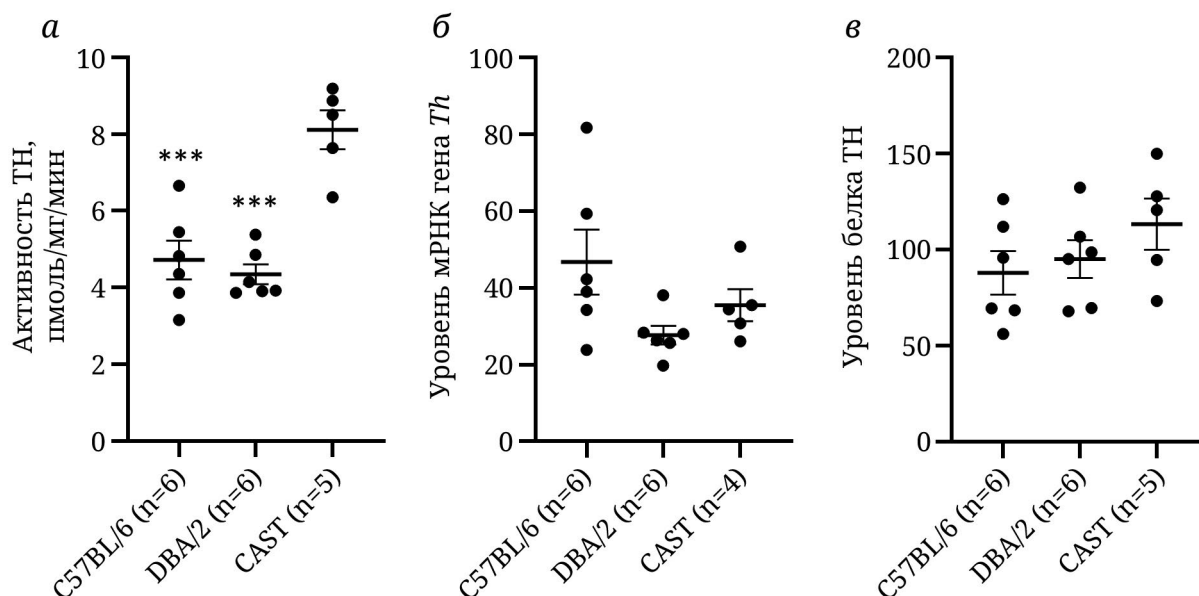


Рис. 1. Активность ТН (а), уровень мРНК гена *Th* (б) и уровень белка ТН (в) в среднем мозге мышей инбредных линий C57BL/6 (ТТ), DBA/2 (ТТ) и подвида CAST (СС). Представлены индивидуальные значения, средние $\pm$ ошибки средних. Экспрессия гена *Th* калибрована на экспрессию гена *Polr2a*, а уровень белка ТН калиброван на уровень белка GAPDH. *** $p < 0,001$ vs CAST

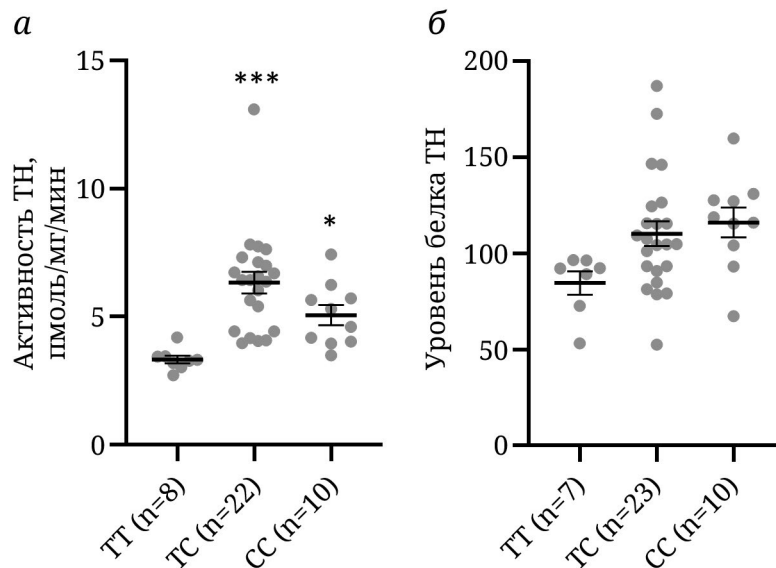


Рис. 2. Активность (а) и уровень белка (б) ТН в среднем мозге интеркроссов F2 с генотипами ТТ, ТС и СС. Данные по самцам и самкам объединены. Представлены индивидуальные значения, средние $\pm$ ошибки средних. Уровень белка ТН калиброван на уровень белка GAPDH. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs TT

Активность ТН в среднем мозге у особей с генотипом ТТ была ниже, чем у особей с генотипом ТС ($p < 0,001$) и СС ($p = 0,02$) (рис. 2). В то же время различий между генотипами по уровню белка ТН выявлено не было ($F(2,38) = 2,22$, $p = 0,12$) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование предоставляет первое экспериментальное доказательство влияния распространённой мутации C886T в гене *Th* на активность ТН в среднем мозге лабораторных мышей. Данная структура была выбрана потому, что ТН экспрессируется в телах дофаминовых и норадреналиновых нейронов, расположенных в среднем мозге, а затем аксональным транспортом распределяется по другим структурам мозга, имеющим проекции от данных нейронов. На первом этапе исследования были сравнены активности ТН в среднем мозге мышей двух генотипов, ТТ (C57BL/6 и DBA/2) и СС (CAST), и было обнаружено увеличение активности фермента у мышей с генотипом СС по сравнению с животными с генотипом ТТ. Хотя данная мутация находится в каталитическом домене молекулы ТН и даже теоретически не может влиять на экспрессию гена *Th*, нельзя исключить, что увеличенная активность фермента у мышей CAST может быть вызвана неизвестными генетическими факторами, увеличивающими экспрессию данного гена и/или уровень белка. Для проверки этого предположения была измерена экспрессия гена *Th* и белка ТН в среднем мозге мышей линий C57BL/6, DBA/2 и CAST. Не были

выявлены различия по данным признакам между этими генотипами мышей. Можно предположить, что у данных трёх исследованных генотипов различия в активности фермента не связаны с регуляцией экспрессии кодирующего его гена и/или стабильности белка.

Строгое доказательство связи аллелей 886C и 886T с высокой и низкой активностью ТН может быть получено только демонстрацией сцепления данных аллелей с высокой/низкой активностью фермента соответственно. Для этого были получены расщепляющиеся интеркроссы F2 и исследована связь активности ТН с генотипами ТТ, ТС и СС у этих мышей. Было показано, что распределение данных генотипов среди F2 хорошо соответствует ожидаемому менделевскому расщеплению 1 : 2 : 1, что, в свою очередь, может служить доказательством отсутствия влияния данной мутации на выживание мышей. Было показано, что активность ТН в мозге мышей F2 с генотипами ТС и СС выше, чем у мышей с генотипом ТТ. Этот результат не только демонстрирует сцепление высокой активности фермента с аллелью 886C, но и свидетельствует о том, что данный полиморфизм C886T в гене *Th* является основным генетическим фактором, определяющим активность ТН в головном мозге мышей. Действительно, влияние данного фактора на активность ТН настолько велико, что расщепление по огромному числу мутаций, по которым различаются мыши C57BL/6 и CAST, но которые теоретически могут влиять на активность ТН, не может замаскировать эффект мутации C886T. В то же время не было выявлено сцепления данной мутации с уровнем белка ТН.

Этот результат можно рассматривать как дополнительное экспериментальное доказательство того, что полиморфизм С886Т не влияет на экспрессию и/или стабильность белка ТН.

Возникает закономерный вопрос о возможном молекулярном механизме снижения активности ТН, вызванного заменой R278N в молекуле фермента. Наиболее ожидаемый механизм – снижение уровня активного белка за счёт уменьшения стабильности и времени жизни мутантного белка. В этом случае активность ТН у гетерозигот должна равняться средней арифметической таковой у обоих гомозигот. Недавно было показано, что мутация С1473G в гене *Trh2* мыши, вызывающая замену Р447R в молекуле фермента, снижает стабильность молекулы ТРН2, уменьшает время её жизни и, как следствие, число активных молекул фермента [35]. Было показано, что активность ТРН2 в мозге гетерозигот 1473CG равна среднему арифметическому активности фермента у гомозиготных особей 1473CC и 1473GG [36]. В данном исследовании не было обнаружено различий по активности ТН между генотипами 886ТС и 886СС, что свидетельствует о полном доминировании действия аллели 886С. Такой характер наследования противоречит гипотезе о влиянии мутации С886Т на уровень белка ТН. Поскольку ТН, как и все гидроксилазы ароматических аминокислот, является тетрамером, состоящим из 4 субъединиц, можно предположить, что присутствие в сборке «нормальной» субъединицы (аллель 886С) у гетерозиготных животных каким-то образом корректирует негативное воздействие «дефектной» субъединицы (аллель 886Т) на активность всего тетрамера. Однако выяснение точного механизма действия замены R278N на активность ТН требует специального исследования на рекомбинантных молекулах ТН.

Поскольку ТН является ключевым ферментом синтеза ДА, который регулирует двигательную активность, можно предполагать связь аллели 886С с увеличением уровня/метаболизма ДА и двигательной активности. Однако на настоящем этапе эти предположения проверить невозможно из-за

значительной неконтролируемой генетической вариабельности данных признаков. Для изучения связи мутации С886Т с уровнем ДА и двигательной активностью необходимо значительно снизить долю неконтролируемой вариации этих признаков за счёт проведения минимум 10 последовательных беккроссирований гетерозиготных особей (886СТ) на линию С57BL/6 (886ТТ).

Данное исследование является пилотным, в котором однозначно доказано, что полиморфизм С886Т представляет собой ключевой фактор, определяющий активность ТН в мозге мышей. Мутация С886Т является первой естественной распространённой мутацией в гене *Th* мыши, для которой показано влияние на активность фермента. Это открывает широкие возможности для экспериментального моделирования влияния функциональных мутаций в гене *Th* на выраженность физиологических функций в норме и при патологиях.

Вклад авторов. А.В. Куликов – концепция и руководство работой; И. Алсаллум, И.А. Рахов, А.В. Куликов – проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – обсуждение результатов исследования; А.В. Куликов – написание текста; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован 15.08.2016, № 43232). Условия содержания животных и проведённые экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chinta, S. J., and Andersen, J. K. (2005) Dopaminergic neurons, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 942-946, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>.
2. Björklund, A., and Dunnett, S. B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update, *Trends Neurosci.*, **30**, 194-202, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>.
3. Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., and Correa, R. G. (2019) Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **39**, 31-59, <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>.
4. Channer, B., Matt, S. M., Nickoloff-Bybel, E. A., Pappa, V., Agarwal, Y., Wickman, J., and Gaskill, P. J. (2023) Dopamine, immunity, and disease, *Pharmacol. Rev.*, **75**, 62-158, <https://doi.org/10.1124/pharmrev.122.000618>.

5. Tripp, G., and Wickens, J. R. (2009) Neurobiology of ADHD, *Neuropharmacology*, **57**, 579-589, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.026>.
6. Del Campo, N., Chamberlain, S. R., Sahakian, B. J., and Robbins, T. W. (2011) The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Biol. Psychiatry*, **69**, e145-157, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.02.036>.
7. Faraone, S. V. (2018) The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **87**, 255-270, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.02.001>.
8. Ribot, B., Aupy, J., Vidailhet, M., Mazère, J., Pisani, A., Bezard, E., Guehl, D., and Burbaud, P. (2019) Dystonia and dopamine: from phenomenology to pathophysiology, *Prog. Neurobiol.*, **182**, 101678, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101678>.
9. Cherian, A., Paramasivan, N. K., and Divya, K. P. (2021) Dopa-responsive dystonia, DRD-plus and DRD look-alike: a pragmatic review, *Acta Neurol. Belg.*, **121**, 613-623, <https://doi.org/10.1007/s13760-020-01574-1>.
10. Scarduzio, M., Hess, E. J., Standaert, D. G., and Eskow Jaunarajs, K. L. (2022) Striatal synaptic dysfunction in dystonia and levodopa-induced dyskinesia, *Neurobiol. Dis.*, **166**, 105650, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105650>.
11. Lander, M., Bastiampillai, T., and Sareen, J. (2018) Review of withdrawal catatonia: what does this reveal about clozapine? *Transl. Psychiatry*, **8**, 139, doi:10.1038/s41398-018-0192-9.
12. Slavnic, B., Barnett, B. S., McIntire, S., Becker, R., Saba, S., Vellanki, K. D., Honaker, L., Weleff, J., and Carroll, B. T. (2023) Methamphetamine-associated catatonia: case series and systematic review of the literature from 1943-2020, *Ann. Clin. Psychiatry*, **35**, 167-177, <https://doi.org/10.12788/acp.0116>.
13. Puig, M. V., Antzoulatos, E. G., and Miller, E. K. (2014) Prefrontal dopamine in associative learning and memory, *Neuroscience*, **282**, 217-229, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.026>.
14. Zafiri, D., and Duvarci, S. (2022) Dopaminergic circuits underlying associative aversive learning, *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 1041929, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1041929>.
15. Kourosh-Arami, M., Komaki, A., and Zarrindast, M. R. (2023) Dopamine as a potential target for learning and memory: contributing to related neurological disorders, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **22**, 558-576, <https://doi.org/10.2174/1871527321666220418115503>.
16. Baik, J. H. (2013) Dopamine signaling in reward-related behaviors, *Front. Neural Circuits*, **7**, 152, <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00152>.
17. Hou, H., Wang, C., Jia, S., Hu, S., and Tian, M. (2014) Brain dopaminergic system changes in drug addiction: a review of positron emission tomography findings, *Neurosci. Bull.*, **30**, 765-776, <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1469-5>.
18. Solinas, M., Belujon, P., Fernagut, P. O., Jaber, M., and Thiriet, N. (2019) Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research, *J. Neural Transm. (Vienna)*, **126**, 481-516, <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1957-2>.
19. Poisson, C. L., Engel, L., and Saunders, B. T. (2021) Dopamine circuit mechanisms of addiction-like behaviors, *Front. Neural Circuits*, **15**, 752420, <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.752420>.
20. Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H., Mizuguchi, T., Yamada, K., Nagatsu, I., Hata, T., Watanabe, Y., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice, *J. Biol. Chem.*, **270**, 27235-27243, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27235>.
21. Kobayashi, K., Noda, Y., Matsushita, N., Nishii, K., Sawada, H., Nagatsu, T., Nakahara, D., Fukabori, R., Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Miura, M., Kano, M., Mamiya, T., Miyamoto, Y., and Nabeshima, T. (2000) Modest neuropsychological deficits caused by reduced noradrenaline metabolism in mice heterozygous for a mutated tyrosine hydroxylase gene, *J. Neurosci.*, **20**, 2418-2426, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-02418.2000>.
22. Bademci, G., Vance, J. M., and Wang, L. (2012) Tyrosine hydroxylase gene: another piece of the genetic puzzle of Parkinson's disease, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **11**, 469-481, <https://doi.org/10.2174/187152712800792866>.
23. Nagatsu, T., Nakashima, A., Ichinose, H., and Kobayashi, K. (2019) Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders, *J. Neural Transm. (Vienna)*, **126**, 397-409, <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1903-3>.
24. Kobayashi, K., and Nagatsu, T. (2005) Molecular genetics of tyrosine 3-monooxygenase and inherited diseases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 267-270, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.186>.
25. Asmus, F., and Gasser, T. (2010) Dystonia-plus syndromes, *Eur. J. Neurol.*, **17**, 37-45, <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03049.x>.
26. Lee, W. W., and Jeon, B. S. (2014) Clinical spectrum of dopa-responsive dystonia and related disorders, *Curr. Neurol Neurosci. Rep.*, **14**, 461, doi:10.1007/s11910-014-0461-9.
27. Dong, H. Y., Feng, J. Y., Yue, X. J., Shan, L., and Jia, F. Y. (2020) Dopa-responsive dystonia caused by tyrosine hydroxylase deficiency: three cases report and literature review, *Medicine (Baltimore)*, **99**, e21753, doi:10.1097/MD.00000000000021753.

28. Craddock, N., Davé, S., and Greening, J. (2001) Association studies of bipolar disorder, *Bipolar Disord.*, **3**, 284-298, <https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2001.30604.x>.
29. Beaulieu, J. M., Zhang, X., Rodriguiz, R. M., Sotnikova, T. D., Cools, M. J., Wetsel, W. C., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2008) Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1333-1338, <https://doi.org/10.1073/pnas.0711496105>.
30. Kulikova, E. A., and Kulikov, A. V. (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models, *Expert Opin. Ther. Targets*, **23**, 655-667, <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1634691>.
31. Fitzpatrick, P. F. (2023) The aromatic amino acid hydroxylases: structures, catalysis, and regulation of phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and tryptophan hydroxylase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **735**, 109518, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109518>.
32. Popova, N. K., Kulikov, A. V., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kulikova, E. A., Krasnov, I. B., Shenkman, B. S., Bazhenova, E. Y., Sinyakova, N. A., and Naumenko, V. S. (2015) Risk neurogenes for long-term spaceflight: dopamine and serotonin brain system, *Mol. Neurobiol.*, **51**, 1443-1451, <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8821-7>.
33. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>.
34. Moskaliuk, V. S., Kozhemyakina, R. V., Bazovkina, D. V., Terenina, E., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., and Kulikova, E. (2022) On an association between fear-induced aggression and striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in the brain of Norway rats, *Biomed. Pharmacother.*, **147**, 112667, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112667>.
35. Arefieva, A. B., Komleva, P. D., Naumenko, V. S., Khotskin, N. V., and Kulikov, A. V. (2023) *In vitro* and *in vivo* chaperone effect of (R)-2-amino-6-(1R, 2S)-1,2-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydropterin-4(3H)-one on the C1473G mutant tryptophan hydroxylase 2, *Biomolecules*, **13**, 1458, <https://doi.org/10.3390/biom13101458>.
36. Куликов А. В., Осипова Д. В., Попова Н. К. (2007) Полиморфизм C1473G в гене *trh2* – основной фактор, определяющий генетическую изменчивость активности триптофангидроксилазы-2 в головном мозге мышей, *Генетика*, **43**, 1676-1682.

THE C886T MUTATION IN THE *TH* GENE REDUCES THE ACTIVITY OF TYROSINE HYDROXYLASE IN THE BRAIN OF MICE

I. Alsallum^{1,2}, V. S. Moskaliuk¹, I. A. Rakhov², D. V. Bazovkina¹, and A. V. Kulikov^{1,2*}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru*

Tyrosine hydroxylase (TH) catalyzes hydroxylation of L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine, the initial and rate-limiting step in the synthesis of dopamine, noradrenaline, and adrenaline. Mutations in the human *TH* gene are associated with hereditary motor disorders. The common C886T mutation identified in the mouse *Th* gene results in the R278H substitution in the enzyme molecule. We investigated the impact of this mutation on the TH activity in the mouse midbrain. The TH activity in the midbrain of *Mus musculus castaneus* (CAST) mice homozygous for the 886C allele was higher compared to C57BL/6 and DBA/2 mice homozygous for the 886T allele. Notably, this difference in the enzyme activity was not associated with changes in the *Th* gene mRNA levels and TH protein content. Analysis of the TH activity in the midbrain in mice from the F2 population obtained by crossbreeding of C57BL/6 and CAST mice revealed that the 886C allele is associated with a high TH activity. Moreover, this allele showed complete dominance over the 886T allele. However, the C886T mutation did not affect the levels of TH protein in the midbrain. These findings demonstrate that the C886T mutation is a major genetic factor determining the activity of TH in the midbrain of common laboratory mouse strains. Moreover, it represents the first common spontaneous mutation in the mouse *Th* gene whose influence on the enzyme activity has been demonstrated. These results will help to understand the role of TH in the development of adaptive and pathological behavior, elucidate molecular mechanisms regulating the activity of TH, and explore pharmacological agents for modulating its function.

Keywords: tyrosine hydroxylase, C886T mutation, activity, expression, brain, mice

УНИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СИНАПТОСОМ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Обзор

© 2024 А.С. Дашкова*, В.И. Ковалев**, А.В. Чаплыгина,
Д.Ю. Жданова, Н.В. Бобкова

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия;
электронная почта: kovalev@chemist.com

Поступила в редакцию 25.10.2023

После доработки 21.03.2024

Принята к публикации 23.03.2024

Болезнь Альцгеймера (БА) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, от которого страдают миллионы людей во всем мире. Рост распространенности БА коррелирует с увеличением продолжительности жизни и старением населения в развитых странах. Поскольку БА является многофакторным заболеванием и включает в себя различные патологические процессы, такие как: синаптическая дисфункция, нейровоспаление, окислительный стресс, неправильное сворачивание белков и т.д., комплексный подход, направленный одновременно на несколько мишеней, может оказаться эффективным и замедлить прогрессирование заболевания. Клеточная терапия и дальнейшее ее развитие в виде трансплантации клеточных везикул и особенно митохондрий являются весьма перспективным подходом для лечения нейродегенерации. Использование синаптосом, благодаря уникальности их содержания, может стать новым этапом на пути разработки комплексной терапии нейродегенеративных заболеваний и БА, в частности. Синаптосомы содержат уникальные митохондрии памяти, отличающиеся не только по размеру, но и по функциональности в сравнении с митохондриями в нейрональной коме. Эти синаптосомальные митохондрии активно участвуют в клеточной коммуникации и передаче сигналов внутри синапсов. Синаптосомы содержат и другие элементы, такие как: собственный аппарат для синтеза белка, синаптические везикулы с нейромедиаторами, молекулы синаптической адгезии, микроРНК – все они чрезвычайно необходимы для синаптической передачи и, как следствие, когнитивных процессов. Сложный молекулярный ансамбль обеспечивает сохранение синаптической автономии митохондрий. Также синаптосомы, обладая тропностью к нейронам, могут служить оптимальной платформой для адресной доставки лекарств к нервным клеткам. В данном обзоре обсуждаются особенности состава синаптосом, их возможности и преимущества, а также ограничения их использования в качестве терапевтического средства для лечения нейродегенеративных патологий, в частности БА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Альцгеймера, митохондрии, нейродегенеративные заболевания, память, синаптосомы.

DOI: 10.31857/S0320972524060058 EDN: XMEWUC

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующим ухудшением когнитивных

функций, важнейшими из которых являются память и речь, а также нарушениями поведения и мышления у людей пожилого возраста [1]. Ожидается, что с увеличением продолжительности жизни и старением населения в развитых

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; Аβ – β-амилоид; МДМ – метаболическая ДНК мозга; ИВ – интраназальное введение; ЭВ – экстраклеточные везикулы; APP – белок-предшественник амилоида; circRNAs – кольцевые РНК; RRP – немедленно готовый к высвобождению пул.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

странах заболеваемость будет увеличиваться [2]. К сожалению, на сегодняшний день не существует препаратов, способных остановить прогрессирование БА и восстановить структуры мозга, пораженные заболеванием [3]. Однако новые исследования расширяют границы наших знаний о патологических механизмах, лежащих в основе БА, и предлагают перспективные терапевтические решения. В настоящее время существует два основных подхода к лечению нейродегенеративных заболеваний: монотерапия, использующая молекулы органических и неорганических соединений, а также антитела, направленные на определенные патологические мишени в организме больного, и комплексная терапия, постепенно привлекающая все большее внимание, направленная на модификацию заболевания путем удаления токсичных агрегатов, стимуляции нейрогенеза и усиления нейропротекции [4, 5]. В связи с многофакторной природой БА, включающей синаптическую и митохондриальную дисфункции, нейровоспаление, окислительный стресс, неправильный белковый фолдинг и нейротоксичность, мы считаем, что комплексный подход к терапии БА более оправдан, поскольку нацеливание на несколько мишеней позволяет достичь синергический эффект и замедлить прогрессирование заболевания.

КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ БА

Примером комплексного подхода является клеточная терапия с использованием стволовых клеток, важнейшими из которых являются мезенхимные стромальные клетки (МСК) и нейральные клетки-предшественники (НКП) [6]. Терапевтические эффекты этих клеток обусловлены их способностью секретировать факторы роста, противовоспалительные белки, мембранные рецепторы и микроРНК, которые оказывают нейропротективное действие за счет блокирования апоптоза и усиления нейрогенеза, синаптогенеза и ангиогенеза [7]. Положительное действие трансплантированных клеток обусловлено, прежде всего, паракринным эффектом ряда факторов роста и противовоспалительных медиаторов, содержащихся в том числе и в экстраклеточных везикулах (ЭВ), а не способностью НКП дифференцироваться в нейроны и заменять погибшие [8]. При этом статистически значимые терапевтические эффекты стволовых клеток были в основном продемонстрированы в доклинических исследованиях на клеточных культурах и моделях БА на животных [4]. ЭВ обладают рядом преимуществ по сравнению со стволовыми клетками, а именно: проявляют низкую иммуногенность и токсичность, высокую стабильность, способность проникать через ГЭБ,

имеют более высокий профиль безопасности, а также могут использоваться не только в качестве самостоятельного терапевтического агента, но и как модифицируемый носитель для различных лекарственных препаратов [9]. Несмотря на то что существует много экспериментальных работ, посвященных оценке эффективности использования ЭВ, к настоящему времени есть лишь одно зарегистрированное клиническое исследование об эффективности и безопасности экзосом из стволовых клеток жировой ткани при лечении деменции, вызванной БА. Сообщается, что участники получают экзосомальный препарат интраназально в виде капель в нос. Результаты данного исследования еще не опубликованы [10].

Еще одним инновационным подходом к лечению нейродегенеративных заболеваний стала трансплантация здоровых, интактных митохондрий в мозг, пораженный БА, для уменьшения митохондриальной дисфункции, которая лежит в основе развития нейродегенеративного процесса [11]. Трансплантация митохондрий позволяет преодолеть ряд ограничений, свойственных для фармакологической коррекции митохондриальной дисфункции, так как сложность и неоднозначность вовлечения митохондрий в патологические процессы, наряду с их многофакторной регуляцией, делает задачу подбора лекарственных средств крайне тяжелой [12].

Трансплантированные митохондрии, являясь целостными органеллами, способны проникнуть в клетку и заменить дисфункциональные митохондрии [13]. Огромный потенциал митохондриальной трансплантации стал основой для поиска способов их эффективной доставки в мозг [14]. Одной из новых и до сих пор недостаточно изученных стратегий является предложенное Picone et al. [15] использование синапсом в качестве мембранных структур для доставки функциональных митохондрий в клетки.

Синапсомы – это субклеточная фракция, представляющая собой искусственно замкнутые в результате выделения синаптические окончания нейронов. В сравнении с другими мембранными структурами, использованными для защиты митохондрий во внеклеточной среде и их эффективной доставки [14, 16], синапсомы являются естественными системами, содержащими митохондрии. Они обладают хорошей стабильностью, не склонны к флокуляции или агрегации, демонстрируют специфическое взаимодействие с нейрональными клетками и выдерживают криоконсервацию с сохранением функциональной целостности митохондрий в них [15].

Потенциал синапсом не ограничивается только возможностью доставки содержащихся в них митохондрий. Уникальный состав синапсом,

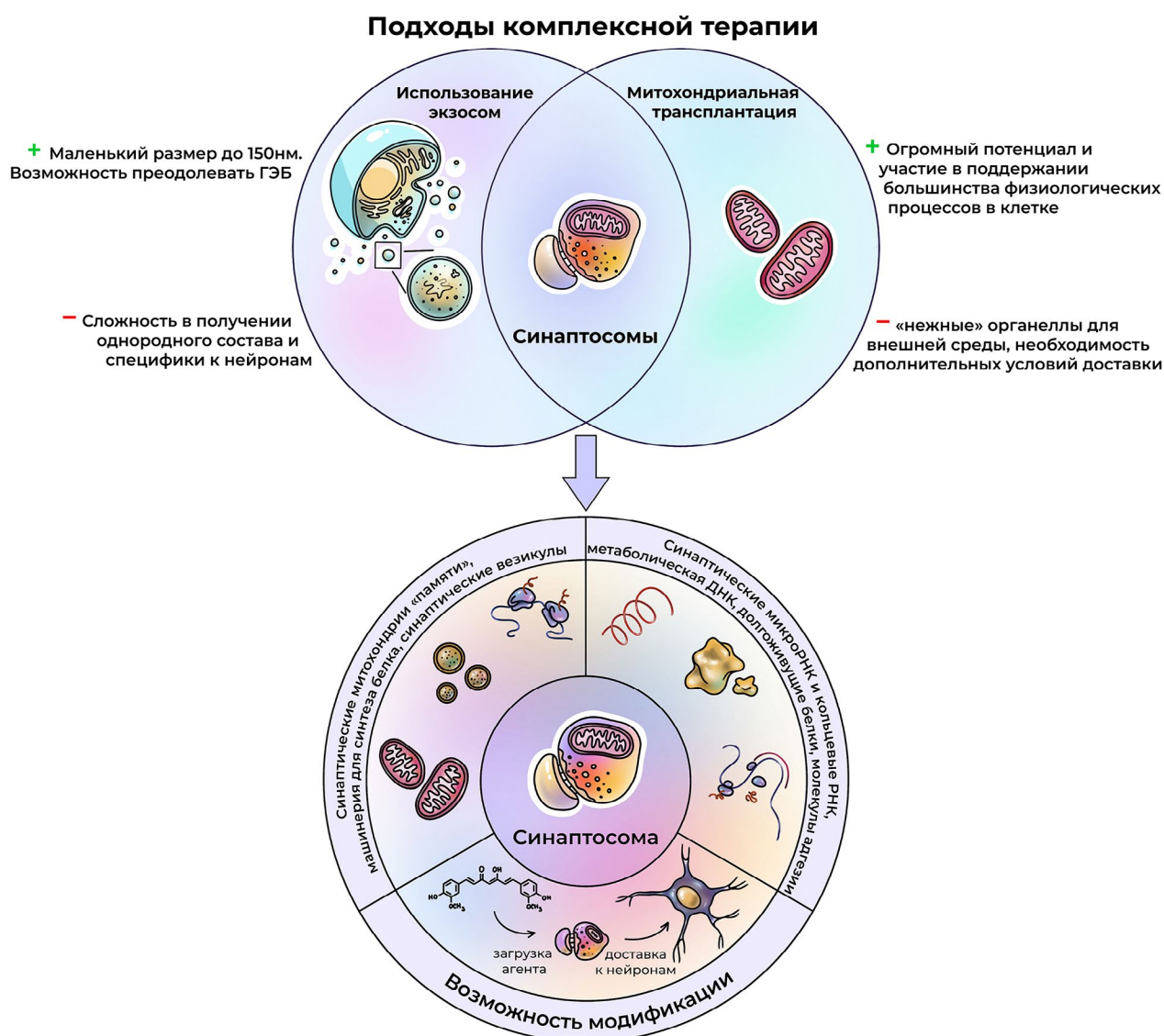


Рис. 1. Синапсосомы как «золотая середина» между терапией экзосомами и митохондриальной трансплантацией. Синапсосомы содержат основные необходимые для поддержания синаптической функции элементы (синаптические митохондрии, аппарат для синтеза белка, набор микровезикул с нейромедиаторами); также синапсосомы содержат дополнительные элементы, имеющие потенциал для терапевтических приложений (микроРНК, кольцевые РНК, мозговая метаболитическая ДНК, долгоживущие белки и молекулы синаптической адгезии). Также синапсосомы можно дополнительно модифицировать и нагружать различными терапевтическими агентами

их структурные и функциональные особенности позволяют им оказывать влияние на когнитивные процессы и дают возможность рассматривать их в качестве перспективного комплексного средства терапии БА и других нейродегенеративных заболеваний. Мы считаем, что функциональные синапсосомы являются многообещающим агентом для комплексной терапии: они сочетают в себе уникальные свойства и способности митохондрий, обладают стабильным и безопасным составом и имеют мембранную защиту как у ЭВ, позволяющую использовать их как в свободном виде, так и модифицировать их поверхность и нагружать дополнительными веществами (рис. 1).

Изучение синапсов в настоящее время имеет решающее значение для всей нейробиологии. Развитие представлений о биогенезе и организации синаптических окончаний, их кальциевом и энергетическом метаболизме, а также об изменениях, происходящих в синапсах в ходе нормального и патологического развития нервной ткани, углубляет знания о ЦНС и приближает нас к пониманию таких глобальных тем, как формирование памяти, старение и нейродегенеративные процессы. Интересно, что, несмотря на многолетнюю историю исследования синапсов и их ключевую роль в осуществлении синаптических функций, идея использования синапсосом в качестве

терапевтических агентов не была предложена даже в классических работах [17, 18]. Стоит отметить, что изучения синаптических окончаний активно проводятся с 1950-х гг., когда благодаря появлению электронной микроскопии стало возможным исследовать их ультраструктуру [19]. В 1960-е гг. Whittaker et al. [20, 21] получили препарат изолированных нервных окончаний, который под названием «синаптосома» стал основой для огромного количества последующих исследований синаптических связей в мозге. Интерес к синаптосомам достиг пика в 1980-е гг. и сопровождался волной научных публикаций, посвященных синтезу, высвобождению и деградации нейромедиаторов [22–24]. В настоящее время синаптосомы продолжают активно изучаться. Так, за последние 10 лет было проведено большое количество протеомных и транскриптомных исследований синаптосом [25, 26], а также работ, изучающих синаптосомы в контексте нейродегенеративных заболеваний [27], или для разработки нейрофармакологических препаратов [28]. Синаптосомы являются особенно полезным инструментом для моделирования синаптической дисфункции и изучения способов ее устранения [27]. Сегодня не возникает сомнений, что синаптическая дисфункция является одним из ранних проявлений БА [29]: нарушения структуры и функций синапсов наблюдаются задолго до появления амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков [30]. Более того, для дисфункции и потери синаптических окончаний была продемонстрирована наиболее сильная корреляция с деградацией когнитивных функций, нарушением поведения и памяти [31]. По этой причине многие современные стратегии терапии БА направлены на сохранение синапсов и их правильное функционирование [29]. В связи с растущим интересом к использованию наночастиц естественного происхождения для лечения различных заболеваний синаптосомы также были предложены в качестве препарата комплексной терапии БА [32, 33]. В частности, была высказана идея о применении синаптосом в качестве биологических систем доставки митохондрий в нервные клетки [15] с целью восстановления митохондриальной дисфункции как одной из главных причин патологических процессов в синапсах [34, 35].

СИНАПТИЧЕСКИЕ МИТОХОНДРИИ. МИТОХОНДРИАЛЬНО-НЕЙРОННЫЙ БАЛАНС

Из-за высокой энергетической потребности синаптических процессов наличие митохондрий в синапсах, по-видимому, имеет решающее значение для их правильного функционирования [36, 37]. Неудивительно, что в сравнении с другими участ-

ками клетки, синаптические окончания нейронов характеризуются наибольшим количеством митохондрий [38]. В частности, в пресинаптических окончаниях митохондрии необходимы для интенсивной генерации аденозинтрифосфата (АТФ), который расходуется на высвобождение синаптических пузырьков, обратный захват нейротрансмиттеров [39], генерацию и поддержание потенциала действия, а также для регуляции уровней Ca^{2+} и участия в различных сигнальных путях [36, 40].

В связи с особой ролью, которую выполняют митохондрии в синапсах, в последние годы стало появляться все больше данных, свидетельствующих о структурном и функциональном различии митохондрий, расположенных в соме нейронов (несинаптические митохондрии) и локализованных в пресинаптических окончаниях (синаптические митохондрии) [41]. Показано, что, в сравнении с несинаптическими митохондриями, для синаптических характерны меньшие размеры [42], разные протеомные [43] и липидомные [44] профили, различная активность ферментов цикла трикарбоновых кислот [45] и процессов окислительного фосфорилирования [46], а также большая восприимчивость к Ca^{2+} [47] и к ингибированию электрон-транспортной цепи [48]. Синаптические митохондрии отличаются более высоким отношением площади поверхности крист к площади наружной митохондриальной мембраны [49], а также повышенным уровнем цитохрома с и плотностью крист [50]. Все эти отличия позволяют говорить о синаптических митохондриях как об особом пуле нейрональных митохондрий, специализированном на поддержании функциональности синапса, в том числе буферизации Ca^{2+} и генерации АТФ для обеспечения энергией синаптических окончаний [36, 41].

На фоне интереса к синаптическим митохондриям вопрос, посвященный их биогенезу, также не мог остаться без внимания. Так, в настоящее время рассматриваются две гипотезы функционирования синаптических митохондрий. Согласно первой, пул митохондрий в синапсе пополняется за счет антероградного транспорта органелл из сомы, а в соответствии со второй, существует локальный биогенез митохондрий в пресинаптических окончаниях. На данный момент обе теории находят подтверждение, что позволяет предположить гармоничное сосуществование обоих механизмов [50–53]. Вторая гипотеза представляет особый интерес в контексте диагностики и терапии нейродегенеративных заболеваний. Так, можно предположить, что в связи с отдельным биогенезом нарушения в процессах деления несинаптических митохондрий будут, скорее всего, приводить к серьезным патологиям во всей клетке,

вплоть до ее гибели, в то время как сбои в биогенезе синаптических митохондрий с большей вероятностью будут наблюдаться на более ранних стадиях заболевания и будут связаны с дисфункцией единичных синапсов [51].

Было показано, что патологические изменения в синаптических митохондриях возникают раньше, чем в митохондриях сомы. Сравнение двух субпопуляций митохондрий, выделенных из мозга мышей с наследственной формой БА, показало накопление β -амилоидов ($A\beta$) в синаптических митохондриях в возрасте 4 месяца – задолго до его появления в несинаптических органеллах и накопления вне клеток [54]. Синаптические митохондрии с $A\beta$ продемонстрировали раннее проявление митохондриальной дисфункции, выражавшееся в повышенной проницаемости митохондриальной мембраны, ухудшении дыхания и активности цитохрома *c*. Похожие результаты были получены Olesen et al. [55], которые изучали митохондриальное старение на здоровых мышцах и наблюдали дисфункцию синаптических митохондрий уже в возрасте 12 месяцев – за 6 месяцев до появления сходных патологий у несинаптических митохондрий [55]. Кроме того, показано увеличение чувствительности синаптических митохондрий к токсическому действию $A\beta$ -пептида на моделях нарушения синаптического гомеостаза [56, 57].

В последние годы на моделях различных нейродегенеративных заболеваний была продемонстрирована тесная взаимосвязь между дисфункцией синаптических митохондрий и нарушениями в работе синапсов [34, 35]. В частности, было показано регион-специфичное уменьшение количества митохондрий в пресинаптических окончаниях аутопсийного мозга больных БА [58], а также уменьшение общего количества синапсов, меньшая представленность пресинапсов с множественными митохондриями и увеличение синапсов с поврежденными митохондриями в биоптатах мозга пациентов с БА [59]. Это положительно коррелирует с результатами, демонстрирующими необходимость присутствия митохондрий в синаптических окончаниях и основаниях аксональных ветвей для поддержания их жизнеспособности [60, 61].

Таким образом, синаптическим митохондриям отводится важная роль в обеспечении правильной работы синапсов. В связи с повышенной чувствительностью этих органелл для них были показаны более ранние функциональные и структурные патологии, в том числе накопление $A\beta$, чем для пула несинаптических митохондрий. Все это говорит о необходимости более пристального внимания к синаптическим митохондриям, особенно на ранних стадиях БА, и о рассмотрении

варианта трансплантации специфических синаптических митохондрий в качестве альтернативы трансплантации с использованием неспециализированных органелл.

Помимо работ, посвященных дисфункции синаптических митохондрий, были также проведены исследования, посвященные изучению патологических изменений в структуре и количестве синаптических везикул – пузырьков, осуществляющих хранение и квантовое высвобождение нейромедиаторов в синаптическую щель [62]. В частности, в исследовании Wang et al. [59] было показано, что, по сравнению с синаптическими окончаниями из мозга здоровых людей, в которых наблюдались симметричные синаптические везикулы, заполняющие собой весь пресинапс, для пациентов с БА было характерно обилие синаптических окончаний с пустыми участками, а также синапсов с очень крупными везикулами и везикулами с характерным плотным центром. Так, для пациентов с БА количество пресинапсов с прозрачными круглыми синаптическими пузырьками составило 56%, что значительно меньше, чем для здоровых людей (83%; $p < 0,0001$). В синапсах принято классифицировать синаптические везикулы по трем пулам: немедленно готовый к высвобождению (ready releasable pool, RRP), рециклирующий и резервный. Wang et al. [59] также оценили изменения в количестве везикул каждого из пулов при БА и выявили, что, несмотря на отсутствие изменений в количестве везикул RRP и рециклирующего пула, в резервном пуле было выявлено значительно меньшее число синаптических пузырьков. Анализируя связь между митохондриальной дисфункцией и нарушениями синаптических везикул, авторы обнаружили положительную корреляцию плотности синаптических везикул с общим количеством митохондрий в пресинаптических окончаниях, но отрицательную корреляцию – с процентом поврежденных митохондрий. В частности, была также продемонстрирована положительная связь между количеством поврежденных митохондрий и дефектными везикулами (увеличенными везикулами и везикулами с плотным центром) [59].

Не менее интересными оказались выводы Chakroborty et al. [63], которые наблюдали повышенное спонтанное высвобождение нейротрансмиттеров в синапсах модельных мышей 3xTg с наследственной формой БА, а также меньшую плотность синаптических везикул RRP и резервного пула. Исследователи связывают данные дефекты пресинапсов с нарушением обмена Ca^{2+} , что также может быть следствием аномальной работы синаптических митохондрий при БА [63].

Формирование синаптических связей и хранение информации требуют от нейронов постоянной

реконструкции и модификации синаптического протеома. Однако в связи со значительной длиной дендритов и аксонов быстрая настройка и поддержание определенного набора синаптических белков путем их антероградного транспорта из сомы были бы проблематичны. Нервные клетки решили данную проблему, расположив машинерию синтеза белков непосредственно в синаптических окончаниях. К настоящему времени было выполнено большое количество работ, подтверждающих существование локального синтеза вблизи синапсов [64–68]. В частности, были получены множественные данные об мРНК, с которых транслируется белок в пресинапсах. Так, в результате сравнения транскриптомов и транслатомов нейрональной сомы (сомата), дендритов и аксонов (нейропил) Glock et al. [67] обнаружили различия в интенсивности трансляции для тысяч транскриптов соматических и синаптических областей. Исследователи также отметили, что многие каркасные и сигнальные белки демонстрировали повышенные уровни трансляции именно в нейропиле, и для более чем 800 мРНК основным местом трансляции были синаптические окончания аксонов.

На волне работ, уточняющих механизмы и пути регуляции локального пресинаптического синтеза белка [69, 70], были также проведены исследования, посвященные нарушениям белкового синтеза при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе БА. Например, исследование Cefaliello et al. [71], сравнивших белковый синтез в синапсосомах из мозга здоровых мышей и мышей, сверхэкспрессирующих мутантную форму белка-предшественника амилоида (APP), показало различие в результатах электрофореза между двумя группами. В частности, в синапсосомах больных мышей был обнаружен локальный синтез APP, а также, в отличие от здоровых животных, для них не было показано смещения интенсивности синтеза в сторону определенных белков после контекстуального кондиционирования страха. В исследовании Valeriola et al. [72], показавших влияние A β на пресинаптический синтез белка, была высказана идея, что белковый синтез в синаптических окончаниях может быть вовлечен в этиопатологию БА.

Похожая идея была также высказана в работе, посвященной изучению белка Shank3 [73]. В данном исследовании на синапсосомах полосатого тела мозга мышей были выявлены повышенные уровни рибосомальных белков, а также более интенсивный синтез белка в синапсе, что, как предполагают авторы, связано с ремоделированием постсинаптического протеома на фоне сверхэкспрессии Shank3. Среди возможных механизмов, приводящих к изменению белкового син-

теза при БА, были также отмечены те, которые запускаются на ранних стадиях заболевания и проходят бессимптомно, как, например, потеря активности Akt1 в результате окислительной модификации АФК [74] или изменения в транскриптомных профилях, приводящие к изменению плотности и морфологии дендритных шипиков на более поздних стадиях БА [75]. Таким образом, биосинтез белка в синаптических окончаниях выступает ключевым механизмом в реализации синаптической пластичности нейронов. Нарушения в синаптическом аппарате синтеза белков могут приводить к дисфункции синапсов, а также опосредовать этиопатогенез БА в целом.

На сегодняшний день появляется все больше данных, демонстрирующих участие микроРНК в функционировании синаптических окончаний, в том числе в синаптической пластичности, синаптогенезе, морфологии [76]. Особо следует отметить способность микроРНК регулировать синаптический синтез белка [77], что в данный момент является объектом внимания в исследованиях развития нейродегенеративных заболеваний [78–80].

Несмотря на то что роль синаптических микроРНК в патогенезе БА еще предстоит изучить, сделаны попытки оценить их функциональную активность в норме и при патологии. Так, Kumar et al. [78] провели масштабное исследование, в котором сравнивалась представленность цитозольных и синаптических микроРНК в аутопсийном головном мозге больных БА и мышей с наследственной формой заболевания. В результате сравнения синаптических микроРНК в образцах пациентов с БА и здоровых людей было показано, что различные уровни экспрессии характерны для 11 микроРНК, из которых 4 микроРНК сверхэкспрессированы в образцах с БА (miR-502-3p, miR-500a-3p, miR-877-5p, miR-664b-3p), а 7 микроРНК демонстрируют сниженную экспрессию (miR-3196, miR-6511b-5p, miR-4508, miR-1237-5p, miR-5001-5p, miR-4492, miR-4497) в сравнении с контролем. Особый интерес, по мнению исследователей, представляют miR-501-3p и miR-502-3p, которые, как было показано, могут модулировать функции ГАМКергических синапсов – тормозных синапсов, работа которых нарушена при БА [81].

Помимо вышеперечисленного, синапсосомы содержат и другие интересные компоненты, которые могут оказать существенное влияние на проявляемые ими терапевтические свойства.

Метаболическая ДНК мозга (МДМ) возникает в результате цитоплазматической обратной транскрипции и приобретает затем двухцепочечную конфигурацию, она не участвует в делении и поэтому была определена как «метаболическая». Свойства МДМ до сих пор до конца не изучены, однако она участвует в активации генов,

способствующих обучению и регуляции организма в ответ на внешние воздействия. Повышенное содержание МДМ в синаптосомах и положительная корреляция МДМ с митохондриями указывает на активное участие данных структур в процессах обучения, памяти и контроля циркадных ритмов [82–85]. Эта ДНК может предоставлять необходимый генетический материал для локализованного в синапсе синтеза белка, позволяющего быстро реагировать на синаптическую активность и облегчающего динамические изменения, связанные с синаптической пластичностью. Более того, МДМ в синаптосомах, нам кажется, может участвовать в поддержании и модуляции синаптических митохондрий, вносящих вклад в модификацию синаптических процессов. Точную роль и значение МДМ внутри синаптосом еще предстоит выяснить. Терапия с применением синаптосом в данном случае может влиять на восстановление общего баланса в синапсах при БА.

Долгоживущие белки. Уникальной характеристикой синаптосом является повышенное содержание долгоживущих белков [86]. Эти белки, как следует из названия, обладают увеличенным сроком жизни, сохраняясь внутри клеток в течение длительных периодов времени, у которых превышены типичные темпы оборота в клетках. В контексте синаптосом эти долгоживущие белки потенциально играют важную роль в синаптической функции и пластичности [87, 88]. Учитывая их долговечность, они могли бы стать своего рода молекулярной памятью, сохраняющей синаптические модификации с течением времени, тем самым способствуя сохранению синаптических изменений в долгосрочной перспективе, например, происходящих во время длительной потенциации или депрессии [89]. Эти белки могут также играть защитную роль, способствуя устойчивости синаптосом. Поскольку синапсы являются динамичными структурами, в условиях частого ремоделирования присутствие долгоживущих белков может усиливать синаптическую стабильность, сохраняя синаптическую целостность при постоянных изменениях. Еще один важный аспект, связанный с долгоживущими белками в синаптосомах, относится к их потенциальному влиянию на клеточную аутофагию. Аутофагия, ключевой клеточный процесс, ответственный за деградацию и переработку клеточных компонентов, играет важную роль в поддержании здоровья клеток и синаптических окончаний. В контексте долгоживущих белков присутствует хрупкий баланс. Хотя эти белки оказывают значительное влияние на синаптические функции и устойчивость формирования памяти, их длительное существование потенциально может нарушать процесс аутофагии. Перегрузка данными белками может приводить

к изменению функции белкового обмена и накоплению дисфункциональных белков. Такие нарушения динамического баланса белкового синтеза, функции и деградации могут иметь серьезные последствия, особенно при нейродегенеративных заболеваниях [90, 91].

Молекулы адгезии. Неотъемлемой частью состава синаптосом являются молекулы адгезии, которые играют ключевую роль в обеспечении синаптического сигнала и функции [92, 93]. Эти молекулы облегчают взаимодействие и взаимосвязь между клетками, способствуя структурной целостности синапсов и модулируя синаптическую пластичность. Известно, что изменения в молекулах синаптической адгезии вовлечены в патогенез БА. При БА происходит нарушение регуляции и дисфункция этих молекул, что способствует потере синапсов, дисфункции нейронов и когнитивным нарушениям, являющимся признаками заболевания [94, 95].

Кольцевые РНК (circRNAs) являются еще одним интригующим компонентом синаптосом. В отличие от линейных аналогов, circRNAs образуют ковалентно замкнутые структуры без терминальных концов, что наделяет их повышенной стабильностью и уникальными регуляторными возможностями. В нейробиологическом контексте circRNAs участвуют в разнообразных функциях нейронов, от синаптической пластичности до когнитивных процессов. Последние данные свидетельствуют о том, что эти молекулы могут играть решающую роль в регуляции экспрессии генов в нейронах, влияя на синаптическую активность и способствуя формированию памяти. При БА наблюдались изменения уровней и функций circRNAs, что указывает на их потенциальное участие в патогенезе заболевания. Нарушение регуляции экспрессии circRNAs может влиять на функциональность синапсов, способствовать дисфункции нейронов и в конечном итоге приводить к когнитивному дефициту, характерному для БА [96, 97]. В свете этих наблюдений наличие circRNAs внутри синаптосом может быть терапевтически выгодным [98, 99]. Введение синаптосом, содержащих здоровые функциональные circRNAs, потенциально могут восстанавливать нормальные уровни и функции circRNAs при БА.

Помимо использования в качестве самостоятельного терапевтического средства, существует возможность использования синаптосом в качестве средства целевой доставки (рис. 2). Учитывая присущее им родство к нейронам, синаптосомы можно использовать для транспорта и доставки различных агентов, направленных на характерные мишени БА, непосредственно в нейроны весьма специфичным образом. Этого можно достичь путем загрузки синаптосом целым рядом

терапевтических агентов – от низкомолекулярных лекарств [15, 100] до более крупных биомолекул, таких как пептиды и антитела [101], а также даже наночастицы [102]. С помощью различных методов загрузки эти агенты можно инкапсулировать внутрь синапсом или прикрепить к их поверхности, создавая «нагруженную лекарственными соединениями» синапсом. Благодаря присутствию сродству к нейронам, загруженные синапсом при введении в организм будут доставляться к нейронам и взаимодействовать с ними. Попав в целевой участок, синапсом смогут высвобождать свой терапевтический «груз», воздействуя непосредственно на пораженные нейроны. Такой целенаправленный подход к доставке не только повышает терапевтическую эффективность средств, направленных против БА, но также и сводит к минимуму нецелевые эффекты, улучшая общий профиль безопасности. Поэтому разработка и оптимизация методов модификации и загрузки синапсом различными агентами для лечения БА может стать перспективным способом доставки лекарств в терапии БА.

Уникальный внутренний состав, а также способность накапливать и метаболизировать различные вещества увеличивают потенциал использования синапсом в качестве универсального препарата для доставки веществ к нейронам, в том числе различных антиоксидантов, средств, направленных против БА, и других.

ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И БУДУЩИЕ НАПРАВЛЕНИЯ СИНАПСОМАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Существует несколько проблем, связанных с использованием синапсом в качестве терапевтических средств при БА. Вопросы выделения, очистки и стандартизации состава являются одними из наиболее важных для проведения доклинических и клинических исследований. Выделение и очистка синапсом может оказаться весьма сложным процессом, для которого необходимы специфические протоколы и условия для поддержания целостности и функций органелл. Существуют десятки протоколов выделения синапсом со своими преимуществами и недостатками, но не существует единого метода, который был бы оптимален для всех целей [18, 34].

Выбор подходящего источника для экстракции синапсом представляет собой серьезную проблему в контексте разработки лечебных стратегий на основе синапсом. Происхождение синапсом может во многом определять состав содержащихся в них нейротрансмиттеров, что, в свою очередь, будет влиять на их терапевти-



Рис. 2. Синапсом с ее уникальным составом и естественным сродством к нейронам может работать как «официант», разносящий необходимые нейронам соединения

ческое приложение. Каждая область мозга имеет уникальные синаптические характеристики и профили нейромедиаторов, что потенциально приводит к синапсом с различным составом и функциональными возможностями. Например, синапсом, извлеченные из гиппокампа, могут иметь другой состав нейротрансмиттеров по сравнению с синапсом, выделенными из областей коры. Несомненно, это обстоятельство будет влиять на терапевтические эффекты синапсом, особенно учитывая ключевую роль конкретных нейротрансмиттеров в синаптической пластичности, процессах обучения и памяти.

Таким образом, достижение полного понимания дифференциальных профилей нейромедиаторов в синапсом, полученных из различных областей мозга, имеет решающее значение. Более того, выбор источника синапсом также должен быть адаптирован в зависимости от конкретного нейродегенеративного заболевания. Например, для БА может потребоваться использование синапсом, происходящих из гиппокампа со своим специфическим составом нейромедиаторов. Исторически сложилось так, что отбор специфических субпопуляций синапсом представлял научный интерес. Примечательно, что в конце 1980-х и начале 1990-х гг. для решения этой проблемы были разработаны инновационные на тот момент методы. Одним из таких подходов стало использование иммуномагнитофореза – метода, позволяющего разделить определенные субпопуляции синапсом [103–105]. Данные методы можно усовершенствовать и адаптировать с использованием современных технологий для лучшего разделения субпопуляций синапсом с их последующим применением в терапевтических целях при нейродегенеративных заболеваниях.

Мы предполагаем, что в качестве источника синапсом можно рассматривать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые, благодаря их способности дифференцироваться в любой тип клеток, могут быть преобразованы в специфические нейроны, представляющие интерес. Полученные культуры нейронов далее могут служить источником для извлечения синапсом с определенным профилем нейротрансмиттеров в соответствии с поставленной целью [106].

Определение подходящей (оптимальной) дозы является одним из решающих условий при использовании синапсом. Дозировки, используемые в экспериментальных работах по трансплантации митохондрий, могут служить отправной точкой для определения доз в случае синапсом. Определение диапазона оптимальных доз, при которых достигается максимальный терапевтический эффект с одновременной минимизацией потенциальных побочных эффектов – сложная задача, требующая комплексных доклинических исследований.

Способ введения также является определяющим фактором терапевтического потенциала синапсом. В контексте доставки в головной мозг по-настоящему эффективным и удобным методом является интраназальное введение (ИВ). Так, по сравнению с периферическим и интрацеребровентрикулярным введением, ИВ предоставляет следующие преимущества: отсутствие фармакокинетических препятствий в виде метаболизма в печени, ферментативной деградации в желудочно-кишечном тракте, почечной фильтрации и необходимости преодолевать ГЭБ [107]; обширная адсорбирующая поверхность носовой полости, а также высокая проницаемость носового эпителия в связи с обилием кровеносных сосудов и неплотными межклеточными контактами; возможность прямого проникновения даже относительно крупных частиц (экзосом, митохондрий) из носовой полости в мозг через пути обонятельного и тройничного нервов, обеспечивающая более высокую биодоступность препарата [108]; неинвазивность процедуры, что делает возможным самостоятельное введение. Экспериментальных данных по интраназальному введению синапсом еще нет, однако существует немногочисленная, но интересная и актуальная литература по ИВ митохондрий, которая может служить отправной точкой для подбора подходов к синапсомальной терапии [109–115].

Несмотря на многообещающие перспективы применения синапсом, необходимо признать, что эта область все еще находится на начальной стадии исследования. Мы полагаем, что основной проблемой в настоящее время является отсутствие экспериментальных работ, направленных

на изучение их терапевтического потенциала, разработки методов определения стабильности синапсом, оценки их профиля безопасности, биораспределения и потенциальных побочных эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синапсомы представляют собой искусственно создаваемую мембранную структуру, включающую синаптическое окончание нейрона с элементами постсинапса. Мы считаем, что синапсомы могут проявлять терапевтическое действие в отношении нейродегенеративных заболеваний. Входящие в их состав синапсомальные митохондрии, синаптические пузырьки, содержащие нейротрансмиттеры, и аппарат синтеза белка говорят о заметной роли синаптических окончаний в формировании памяти и синаптической пластичности. Более того, специфические компоненты, входящие в их состав, еще больше усиливают терапевтический потенциал. Наличие метаболической ДНК мозга может обеспечивать самоподдержание синапсомальных митохондрий; долгоживущие белки в синапсомах, как предполагается, участвуют в долговременной памяти и синаптической пластичности; а синаптические молекулы клеточной адгезии необходимы для формирования и поддержания синаптических связей и обуславливают структурное восстановление. Такие отличительные качества синапсом, как присущая им предрасположенность к взаимодействию с нейронами, разнообразие функциональных элементов и возможность к модификациям, позволяют их рассматривать как уникальные, «природные» элементы. Кроме того, возможность изменять и конструировать синапсомы для доставки терапевтических агентов позволяет рассматривать перспективы их использования как многообещающий инновационный подход в лечении нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на уникальные свойства синапсом, экспериментальных работ по изучению их терапевтического потенциала очень мало. Поэтому одной из целей авторов данного обзора было привлечь внимание исследователей к этой интересной, перспективной и недостаточно изученной проблеме.

Ограничения работы. Исследование синапсом как потенциальных терапевтических средств в лечении нейродегенеративных заболеваний может стать новым и перспективным направлением биомедицинских исследований. В основе этого обзора лежит личная гипотеза авторов о том, что синапсомы можно рассматривать как самостоятельные терапевтические агенты. Эта идея представляет собой развитие концепции

использования синапсом для адресной доставки митохондрий в нервные клетки. Заметным ограничением работы в данном случае является отсутствие достаточного количества экспериментальных исследований: на текущий момент есть только одно экспериментальное подтверждение, полученное на модели *in vitro*. При этом цель данного обзора – пробудить интерес у научного сообщества к изучению и использованию экстраклеточных микро- и нановезикул из клеток мозга и синапсом в качестве терапевтических агентов.

Другим ограничением работы является нетрадиционная структура представленного обзора, так как в нем отсутствуют сведения о применении синапсом в классических исследованиях работы головного мозга. Использование синапсом для изучения различных заболеваний нервной системы известно давно, и в настоящее время существует большое количество обзорных статей по данной тематике. Однако авторы обзора преследовали иную цель и стремились рассмотреть синапсомы под другим углом, в частности, с точки зрения их уникального состава. В связи

с чем центральное место в представленном обзоре занимают последние сведения о важнейших, на наш взгляд, компонентах синапсом, которые могут обладать терапевтическим потенциалом в соответствии с современными представлениями об этиопатогенезе БА и, таким образом, заложить основу для инновационных подходов лечения данного заболевания.

Вклад авторов. А.С. Дашкова, В.И. Ковалев – концепция и написание оригинального текста; А.С. Дашкова – подготовка иллюстраций; А.В. Чаплыгина, Д.Ю. Жданова, Н.В. Бобкова – обсуждение и редактирование статьи; Н.В. Бобкова – руководство работой.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00485).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abubakar, M. B., Sanusi, K. O., Ugusman, A., Mohamed, W., Kamal, H., Ibrahim, N. H., Khoo, C. S., and Kumar, J. (2022) Alzheimer's disease: an update and insights into pathophysiology, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 1-16, <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.742408>.
2. (2023) Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's Dement.*, **19**, 1598-1695, <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.
3. Ibrahim, N. H., Yahaya, M. F., Mohamed, W., Teoh, S. L., Hui, C. K., and Kumar, J. (2020) Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: seeking clarity in a time of uncertainty, *Front. Pharmacol.*, **11**, 1-16, <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00261>.
4. Regmi, S., Liu, D. D., Shen, M., Kevadiya, B. D., Ganguly, A., Primavera, R., Chetty, S., Yarani, R., and Thakor, A. S. (2022) Mesenchymal stromal cells for the treatment of Alzheimer's disease: strategies and limitations, *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 1-20, <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.1011225>.
5. Cummings, J., Lee, G., Nahed, P., Kambar, M. E. Z. N., Zhong, K., Fonseca, J., and Taghva, K. (2022) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022, *Alzheimer's Dement.*, **8**, 1-24, <https://doi.org/10.1002/TRC2.12295>.
6. Lunn, J. S., Sakowski, S. A., Hur, J., and Feldman, E. L. (2011) Stem cell technology for neurodegenerative diseases, *Ann. Neurol.*, **70**, 353-361, <https://doi.org/10.1002/ana.22487>.
7. Nooshabadi, V. T., Mardpour, S., Yousefi-Ahmadipour, A., Allahverdi, A., Izadpanah, M., Daneshimehr, F., Ai, J., Banafshe, H. R., and Ebrahimi-Barough, S. (2018) The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: a new therapeutic option in regenerative medicine, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 8048-8073, <https://doi.org/10.1002/JCB.26726>.
8. Yari, H., Mikhailova, M. V., Mardasi, M., Jafarzadehgharehziaaddin, M., Shahrokh, S., Thangavelu, L., Ahmadi, H., Shomali, N., Yaghoubi, Y., Zamani, M., Akbari, M., and Alesaeidi, S. (2022) Emerging role of mesenchymal stromal cells (MSCs)-derived exosome in neurodegeneration-associated conditions: a groundbreaking cell-free approach, *Stem Cell Res. Ther.*, **13**, 423, <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03122-5>.
9. Zou, Y., Mu, D., Ma, X., Wang, D., Zhong, J., Gao, J., Yu, S., and Qiu, L. (2022) Review on the roles of specific cell-derived exosomes in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **16**, 936760, <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.936760>.
10. Wang, H., Huber, C.C., and Li, X.-P. (2023) Mesenchymal and neural stem cell-derived exosomes in treating Alzheimer's disease, *Bioengineering*, **10**, 1-14, <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020253>.
11. Elfawy, H. A., and Das, B. (2019) Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: etiologies and therapeutic strategies, *Life Sci.*, **218**, 165-184, <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.12.029>.

12. Macdonald, R., Barnes, K., Hastings, C., and Mortiboys, H. (2018) Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 891-909, <https://doi.org/10.1042/BST20170501>.
13. Nitzan, K., Benhamron, S., Valitsky, M., Kesner, E. E., Lichtenstein, M., Ben-Zvi, A., Ella, E., Segalstein, Y., Saada, A., Lorberboum-Galski, H., and Rosenmann, H. (2019) Mitochondrial transfer ameliorates cognitive deficits, neuronal loss, and gliosis in Alzheimer's disease mice, *J. Alzheimer's Dis.*, **72**, 587-604, <https://doi.org/10.3233/JAD-190853>.
14. Gollihue, J. L., Patel, S. P., and Rabchevsky, A. G. (2018) Mitochondrial transplantation strategies as potential therapeutics for central nervous system trauma, *Neural Regen. Res.*, **13**, 194-197, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.226382>.
15. Picone, P., Porcelli, G., Bavisotto, C. C., Nuzzo, D., Galizzi, G., Biagio, P. L. S., Bulone, D., and Di Carlo, M. (2021) Synaptosomes: new vesicles for neuronal mitochondrial transplantation, *J. Nanobiotechnol.*, **19**, 1-15, <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00748-6>.
16. Manickam, D. S. (2022) Delivery of mitochondria via extracellular vesicles – a new horizon in drug delivery, *J. Control. Release*, **343**, 400-407, <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.01.045>.
17. Whittaker, V. P. (1993) Thirty years of synaptosome research, *J. Neurocytol.*, **22**, 735-742, <https://doi.org/10.1007/BF01181319>.
18. Murphy, K. M. (2018) *Synaptosomes (Neuromethods 141)*, Springer US, New York, <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8739-9>.
19. Estable, C., Reissig, M., and De Robertis, E. (1954) Microscopic and submicroscopic structure of the synapsis in the ventral ganglion of the acoustic nerve, *Exp. Cell Res.*, **6**, 255-262, [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(54\)90172-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(54)90172-X).
20. Gray, E. G., and Whittaker, V. P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation, *J. Anat.*, **96**, 79.
21. Whittaker, V. P., Michaelson, I. A., and Kirkland, R. J. (1964) The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'), *Biochem. J.*, **90**, 293-303, <https://doi.org/10.1042/BJ0900293>.
22. Hardy, J. A., Dodd, P. R., Oakley, A. E., Kidd, A. M., Perry, R. H., and Edwardson, J. A. (1982) Use of post-mortem human synaptosomes for studies of metabolism and transmitter amino acid release, *Neurosci. Lett.*, **33**, 317-322, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90392-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90392-5).
23. Satoh, E., and Nakazato, Y. (1989) [3H]acetylcholine release and the change in cytosolic free calcium level induced by high K⁺ and ouabain in rat brain synaptosomes, *Neurosci. Lett.*, **107**, 284-288, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90832-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90832-X).
24. Tapia, R., Sitges, M., and Morales, E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes, *Brain Res.*, **361**, 373-382, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91307-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91307-1).
25. Gulyássi, P., Puska, G., Györfy, B. A., Todorov-Völgyi, K., Juhász, G., Drahos, L., and Kékesi, K. A. (2020) Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures, *Amino Acids*, **52**, 1529-1543, <https://doi.org/10.1007/S00726-020-02912-6>.
26. Niu, M., Cao, W., Wang, Y., Zhu, Q., Luo, J., Wang, B., Zheng, H., Weitz, D. A., and Zong, C. (2023) Droplet-based transcriptome profiling of individual synapses, *Nat. Biotechnol.*, **41**, 1332-1344, <https://doi.org/10.1038/S41587-022-01635-1>.
27. Ahmad, F., and Liu, P. (2020) Synaptosome as a tool in Alzheimer's disease research, *Brain Res.*, **1746**, 1-20, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2020.147009>.
28. Chiu, K. M., Lee, M. Y., Lu, C. W., Lin, T. Y., and Wang, S. J. (2023) Plantainoside D reduces depolarization-evoked glutamate release from rat cerebral cortical synaptosomes, *Molecules*, **28**, 1-15, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031313>.
29. Meftah, S., and Gan, J. (2023) Alzheimer's disease as a synaptopathy: evidence for dysfunction of synapses during disease progression, *Front. Synaptic Neurosci.*, **15**, 1-19, <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2023.1129036>.
30. Hsia, A. Y., Masliah, E., Mcconlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., and Mucke, L. (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3228-3233, <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.6.3228>.
31. Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Ann. Neurol.*, **30**, 572-580, <https://doi.org/10.1002/ANA.410300410>.
32. Picone, P. (2022) Nanobiotechnology: a new frontier for brain disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1-3, <https://doi.org/10.3390/IJMS23179603>.
33. Picone, P., and Nuzzo, D. (2023) Biofabrication of nanovesicles for brain diseases, *Neural Regen. Res.*, **18**, 525, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.346473>.
34. Györfy, B. A., Tóth, V., Török, G., Gulyássi, P., Kovács, R., Vadász, H., Micsonai, A., Tóth, M. E., Sántha, M., Homolya, L., Drahos, L., Juhász, G., Kékesi, K. A., and Kardos, J. (2020) Synaptic mitochondrial dysfunction and

- septin accumulation are linked to complement-mediated synapse loss in an Alzheimer's disease animal model, *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**, 5243-5258, <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03468-0>.
35. Quiroz-Baez, R., Flores-Domínguez, D., and Arias, C. (2013) Synaptic aging is associated with mitochondrial dysfunction, reduced antioxidant contents and increased vulnerability to amyloid- β toxicity, *Curr. Alzheimer Res.*, **10**, 324-331, <https://doi.org/10.2174/1567205011310030012>.
 36. Faria-Pereira, A., and Morais, V. A. (2022) Synapses: the brain's energy-demanding sites, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1-23, <https://doi.org/10.3390/IJMS23073627>.
 37. Thomas, C. I., Keine, C., Okayama, S., Satterfield, R., Musgrove, M., Guerrero-Given, D., Kamasawa, N., and Young, S. M. (2019) Presynaptic mitochondria volume and abundance increase during development of a high-fidelity synapse, *J. Neurosci.*, **39**, 7994-8012, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0363-19.2019>.
 38. Li, Z., Okamoto, K. I., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses, *Cell*, **119**, 873-887, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.003>.
 39. Sun, T., Qiao, H., Pan, P. Y., Chen, Y., and Sheng, Z. H. (2013) Motile axonal mitochondria contribute to the variability of presynaptic strength, *Cell Rep.*, **4**, 413-419, <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.06.040>.
 40. Justs, K. A., Lu, Z., Chouhan, A. K., Borycz, J. A., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A., and Macleod, G. T. (2022) Presynaptic mitochondrial volume and packing density scale with presynaptic power demand, *J. Neurosci.*, **42**, 954-967, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1236-21.2021>.
 41. Petersen, M. H., Willert, C. W., Andersen, J. V., Waagepetersen, H. S., Skotte, N. H., and Nørremølle, A. (2019) Functional differences between synaptic mitochondria from the striatum and the cerebral cortex, *Neuroscience*, **406**, 432-443, <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2019.02.033>.
 42. Wilhelm, B. G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Kröhnert, K., Schäfer, C., Rammner, B., Koo, S. J., Claßen, G. A., Krauss, M., Haucke, V., Urlaub, H., and Rizzoli, S. O. (2014) Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins, *Science*, **344**, 1023-1028, <https://doi.org/10.1126/science.1252884>.
 43. Stauch, K. L., Purnell, P. R., and Fox, H. S. (2014) Quantitative proteomics of synaptic and nonsynaptic mitochondria: insights for synaptic mitochondrial vulnerability, *J. Proteome Res.*, **13**, 2620-2636, <https://doi.org/10.1021/PR500295N>.
 44. Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Lunceford, A., Clarke, C. F., Moon, H., Chuang, J. H., and Seyfried, T. N. (2008) Lipidomic analysis and electron transport chain activities in C57BL/6J mouse brain mitochondria, *J. Neurochem.*, **106**, 299-312, <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05383.X>.
 45. Völgyi, K., Gulyássi, P., Háden, K., Kis, V., Badics, K., Kékesi, K. A., Simor, A., Györffy, B., Tóth, E. A., Lubec, G., Juhász, G., and Dobolyi, A. (2015) Synaptic mitochondria: a brain mitochondria cluster with a specific proteome, *J. Proteomics*, **120**, 142-157, <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2015.03.005>.
 46. Villa, R. F., Gorini, A., and Hoyer, S. (2006) Differentiated effect of ageing on the enzymes of Krebs' cycle, electron transfer complexes and glutamate metabolism of non-synaptic and intra-synaptic mitochondria from cerebral cortex, *J. Neural Transm.*, **113**, 1659-1670, <https://doi.org/10.1007/S00702-006-0569-4>.
 47. Brown, M. R., Sullivan, P. G., and Geddes, J. W. (2006) Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca^{2+} overload than nonsynaptic mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **281**, 11658-11668, <https://doi.org/10.1074/JBC.M510303200>.
 48. Davey, G. P., Peuchen, S., and Clark, J. B. (1998) Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration, *J. Biol. Chem.*, **273**, 12753-12757, <https://doi.org/10.1074/JBC.273.21.12753>.
 49. Perkins, G. A., Tjong, J., Brown, J. M., Poquiz, P. H., Scott, R. T., Kolson, D. R., Ellisman, M. H., and Spirou, G. A. (2010) The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism, *J. Neurosci.*, **30**, 1015-1026, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1517-09.2010>.
 50. Cserép, C., Pósai, B., Schwarcz, A. D., and Dénes, Á. (2018) Mitochondrial ultrastructure is coupled to synaptic performance at axonal release sites, *ENeuro*, **5**, 1-15, <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0390-17.2018>.
 51. Cardanho-Ramos, C., and Morais, V. A. (2021) Mitochondrial biogenesis in neurons: how and where, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1-11, <https://doi.org/10.3390/ijms222313059>.
 52. Van Laar, V. S., Arnold, B., Howlett, E. H., Calderon, M. J., St Croix, C. M., Greenamyre, J. T., Sanders, L. H., and Berman, S. B. (2018) Evidence for compartmentalized axonal mitochondrial biogenesis: mitochondrial DNA replication increases in distal axons as an early response to Parkinson's disease-relevant stress, *J. Neurosci.*, **38**, 7505-7515, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0541-18.2018>.
 53. Zaninello, M., and Bean, C. (2023) Highly specialized mechanisms for mitochondrial transport in neurons: from intracellular mobility to intercellular transfer of mitochondria, *Biomolecules*, **13**, 1-19, <https://doi.org/10.3390/biom13060938>.
 54. Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., and Yan, S. S. (2010) Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18670-18675, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1006586107/-DCSUPPLEMENTAL>.

55. Olesen, M. A., Torres, A. K., Jara, C., Murphy, M. P., and Tapia-Rojas, C. (2020) Premature synaptic mitochondrial dysfunction in the hippocampus during aging contributes to memory loss, *Redox Biol.*, **34**, 1-17, <https://doi.org/10.1016/j.REDOX.2020.101558>.
56. Keller, J. N., Lauderback, C. M., Butterfield, D. A., Kindy, M. S., Yu, J., and Markesbery, W. R. (2000) Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice, *J. Neurochem.*, **74**, 1579-1586, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741579.x>.
57. Mungarro-Menchaca, X., Morán, P. F. J., and Clorinda, A. (2002) beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine, *J. Neurosci. Res.*, **68**, 89-96, <https://doi.org/10.1002/JNR.10193>.
58. Pickett, E. K., Rose, J., McCrory, C., McKenzie, C.-A., King, D., Smith, C., Gillingwater, T. H., Henstridge, C. M., and Spires-Jones, T. L. (2018) Region-specific depletion of synaptic mitochondria in the brains of patients with Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.*, **136**, 747-757, <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1903-2>.
59. Wang, W., Zhao, F., Lu, Y., Siedlak, S. L., Fujioka, H., Feng, H., Perry, G., and Zhu, X. (2023) Damaged mitochondria coincide with presynaptic vesicle loss and abnormalities in Alzheimer's disease brain, *Acta Neuropathol. Commun.*, **11**, 54, <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01552-7>.
60. Lees, R. M., Johnson, J. D., and Ashby, M. C. (2020) Presynaptic boutons that contain mitochondria are more stable, *Front. Synaptic Neurosci.*, **11**, 1-13, <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2019.00037>.
61. Tao, K., Matsuki, N., and Koyama, R. (2014) AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent axon branching by recruiting mitochondria to axon, *Dev. Neurobiol.*, **74**, 557-573, <https://doi.org/10.1002/DNEU.22149>.
62. Borges, R., Gu, C., Machado, J. D., and Ewing, A. G. (2023) The dynamic nature of exocytosis from large secretory vesicles. A view from electrochemistry and imaging, *Cell Calcium*, **110**, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.CECA.2023.102699>.
63. Chakroborty, S., Hill, E. S., Christian, D. T., Helfrich, R., Riley, S., Schneider, C., Kapecki, N., Mustaly-Kalimi, S., Seiler, F. A., Peterson, D. A., West, A. R., Vertel, B. M., Frost, W. N., and Stutzmann, G. E. (2019) Reduced presynaptic vesicle stores mediate cellular and network plasticity defects in an early-stage mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.*, **14**, 1-22, <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0307-7>.
64. Slomnicki, L. P., Pietrzak, M., Vashishta, A., Jones, J., Lynch, N., Elliot, S., Poulos, E., Malicote, D., Morris, B. E., Hallgren, J., and Hetman, M. (2016) Requirement of neuronal ribosome synthesis for growth and maintenance of the dendritic tree, *J. Biol. Chem.*, **291**, 5721-5739, <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.682161>.
65. Holt, C. E., Martin, K. C., and Schuman, E. M. (2019) Local translation in neurons: visualization and function, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 557-566, <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0263-5>.
66. Hafner, A. S., Donlin-Asp, P. G., Leitch, B., Herzog, E., and Schuman, E. M. (2019) Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments, *Science*, **364**, 1-12, <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU3644>.
67. Glock, C., Biever, A., Tushev, G., Nassim-Assir, B., Kao, A., Bartnik, I., tom Dieck, S., and Schuman, E. M. (2021) The translome of neuronal cell bodies, dendrites, and axons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, 1-11, <https://doi.org/10.1073/PNAS.2113929118/-DCSUPPLEMENTAL>.
68. Cohen, L. D., Ziv, T., and Ziv, N. E. (2022) Synapse integrity and function: dependence on protein synthesis and identification of potential failure points, *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 1-30, <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.1038614>.
69. Biever, A., Glock, C., Tushev, G., Ciirdaeva, E., Dalmay, T., Langer, J. D., and Schuman, E. M. (2020) Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes, *Science*, **367**, 1-14, <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAY4991>.
70. Fusco, C. M., Desch, K., Dörrbaum, A. R., Wang, M., Staab, A., Chan, I. C. W., Vail, E., Villeri, V., Langer, J. D., and Schuman, E. M. (2021) Neuronal ribosomes exhibit dynamic and context-dependent exchange of ribosomal proteins, *Nat. Commun.*, **12**, 1-14, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26365-X>.
71. Cefaliello, C., Penna, E., Barbato, C., Ruberto, G. Di, Mollica, M. P., Trinchese, G., Cigliano, L., Borsello, T., Chun, J. T., Giuditta, A., Perrone-Capano, C., Miniaci, M. C., and Crispino, M. (2020) Deregulated local protein synthesis in the brain synaptosomes of a mouse model for Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 1529-1541, <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01835-Y>.
72. Baleriola, J., Walker, C. A., Jean, Y. Y., Crary, J. F., Troy, C. M., Nagy, P. L., and Hengst, U. (2014) Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions, *Cell*, **158**, 1159-1172, <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2014.07.001>.
73. Jin, C., Lee, Y., Kang, H., Jeong, K., Park, J., Zhang, Y., Kang, H. R., Ma, R., Seong, H., Kim, Y., Jung, H., Kim, J. Y., Kim, Y. K., and Han, K. (2021) Increased ribosomal protein levels and protein synthesis in the striatal synaptosome of Shank3-overexpressing transgenic mice, *Mol. Brain*, **14**, 1-5, <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00756-Z/>.
74. Ahmad, F., Singh, K., Das, D., Gowaikar, R., Shaw, E., Ramachandran, A., Rupanagudi, K. V., Kommaddi, R. P., Bennett, D. A., and Ravindranath, V. (2017) Reactive oxygen species-mediated loss of synaptic Akt1 signaling

- leads to deficient activity-dependent protein translation early in Alzheimer's disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **27**, 1269-1280, <https://doi.org/10.1089/ARS.2016.6860>.
75. Qu, X., Lin, L., Yi, W., Sun, C., Chen, Y., and Chen, Y. (2022) Early changes in transcriptomic profiles in synaptodendrosomes reveal aberrant synaptic functions in Alzheimer's disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1-19, <https://doi.org/10.3390/IJMS23168888>.
 76. Kumar, S., and Reddy, P. H. (2020) The role of synaptic microRNAs in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, **1866**, 1-28, <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165937>.
 77. Ye, Y., Xu, H., Su, X., and He, X. (2016) Role of MicroRNA in governing synaptic plasticity, *Neural Plast.*, **2016**, 1-13, <https://doi.org/10.1155/2016/4959523>.
 78. Kumar, S., Orlov, E., Gowda, P., Bose, C., Swerdlow, R. H., Lahiri, D. K., and Reddy, P. H. (2022) Synaptosome microRNAs regulate synapse functions in Alzheimer's disease, *NPJ Genomic Med.*, **7**, 1-15, <https://doi.org/10.1038/S41525-022-00319-8>.
 79. Kumar, S. (2023) Synaptosome microRNAs: emerging synapse players in aging and Alzheimer's disease, *Neural Regen. Res.*, **18**, 1275-1276, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.360172>.
 80. Samadian, M., Gholipour, M., Hajiesmaeili, M., Taheri, M., and Ghafouri-Fard, S. (2021) The eminent role of microRNAs in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 1-17, <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.641080>.
 81. Jiménez-Balado, J., and Eich, T. S. (2021) GABAergic dysfunction, neural network hyperactivity and memory impairments in human aging and Alzheimer's disease, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **116**, 146-159, <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2021.01.005>.
 82. Giuditta, A., Zucconi, G. G., and Sadile, A. (2023) Brain metabolic DNA: a long story and some conclusions, *Mol. Neurobiol.*, **60**, 228-234, <https://doi.org/10.1007/S12035-022-03030-Y>.
 83. Giuditta, A., and Rutigliano, B. (2018) Brain metabolic DNA in rat cytoplasm, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 7476-7486, <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0932-0>.
 84. Giuditta, A., and Casalino, J. (2020) Sequences of reverse transcribed brain DNA are modified by learning, *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 57, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00057>.
 85. Cefaliello, C., Prisco, M., Crispino, M., and Giuditta, A. (2019) DNA in squid synaptosomes, *Mol. Neurobiol.*, **56**, 56-60, <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1071-3>.
 86. Heo, S., Diering, G. H., Na, C. H., Nirujogi, R. S., Bachman, J. L., Pandey, A., and Haganir, R. L. (2018) Identification of long-lived synaptic proteins by proteomic analysis of synaptosome protein turnover, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E3827-E3836, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1720956115>.
 87. Bulovaite, E., Qiu, Z., Kratschke, M., Zgraj, A., Fricker, D. G., Tuck, E. J., Gokhale, R., Koniaris, B., Jami, S. A., Merino-Serrais, P., Husi, E., Mendive-Tapia, L., Vendrell, M., O'Dell, T. J., DeFelipe, J., Komiyama, N. H., Holtmaat, A., Fransén, E., and Grant, S. G. N. (2022) A brain atlas of synapse protein lifetime across the mouse lifespan, *Neuron*, **110**, 4057-4073.e8, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.09.009>.
 88. Krishna, S., Arrojo e Drigo, R., Capitanio, J. S., Ramachandra, R., Ellisman, M., and Hetzer, M. W. (2021) Identification of long-lived proteins in the mitochondria reveals increased stability of the electron transport chain, *Dev. Cell*, **56**, 2952-2965.e9, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.008>.
 89. Fornasiero, E. F., Mandad, S., Wildhagen, H., Alevra, M., Rammner, B., Keihani, S., Opazo, F., Urban, I., Ischebeck, T., Sakib, M. S., Fard, M. K., Kirli, K., Centeno, T. P., Vidal, R. O., Rahman, R. U., Benito, E., Fischer, A., Dennerlein, S., Rehling, P., Feussner, I., Bonn, S., Simons, M., Urlaub, H., and Rizzoli, S. O. (2018) Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions, *Nat. Commun.*, **9**, 1-17, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06519-0>.
 90. Silzel, J. W., Ben-Nissan, G., Tang, J., Sharon, M., and Julian, R. R. (2022) Influence of Asp isomerization on trypsin and trypsin-like proteolysis, *Anal. Chem.*, **94**, 15288-15296, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02585>.
 91. Gu, Z., Cao, H., Zuo, C., Huang, Y., Miao, J., Song, Y., Yang, Y., Zhu, L., and Wang, F. (2022) TFEB in Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to therapeutic implications, *Neurobiol. Dis.*, **173**, 105855, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105855>.
 92. Hale, W. D., Südhof, T. C., and Haganir, R. L. (2023) Engineered adhesion molecules drive synapse organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2215905120, <https://doi.org/10.1073/pnas.2215905120>.
 93. Costain, W. J., Rasquinha, I., Sandhu, J. K., Rippstein, P., Zurakowski, B., Slinn, J., MacManus, J. P., and Stanimirovic, D. B. (2008) Cerebral ischemia causes dysregulation of synaptic adhesion in mouse synaptosomes, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 99-110, <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600510>.
 94. Pfundstein, G., Nikonenko, A. G., and Sytnyk, V. (2022) Amyloid precursor protein (APP) and amyloid β (A β) interact with cell adhesion molecules: implications in Alzheimer's disease and normal physiology, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 969547, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.969547>.

95. Choquet, D., and Opazo, P. (2022) The role of AMPAR lateral diffusion in memory, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **125**, 76-83, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.01.009>.
96. Zajackowski, E. L., Zhao, Q., Liao, W.-S., Gong, H., Madugalle, S. U., Periyakaruppi, A., Leighton, L. J., Musgrove, M., Ren, H., Davies, J., Marshall, P. R., and Bredy, T. W. (2023) Localised Cdr1as activity is required for fear extinction memory, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **203**, 107777, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2023.107777>.
97. Shen, X., He, Y., and Ge, C. (2022) Role of circRNA in pathogenesis of Alzheimer's disease, *J. Cent. South Univ. Med. Sci.*, **47**, 960-966, <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210729>.
98. Curry-Hyde, A., Ueberham, U., Chen, B. J., Zipfel, I., Mills, J. D., Bochmann, J., Jendrek, R., Takenaka, K., Kirazov, L., Kirazov, E., Jünger, J., Brückner, M. K., Arendt, T., and Janitz, M. (2020) Analysis of the circular transcriptome in the synaptosomes of aged mice, *Neuroscience*, **449**, 202-213, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.009>.
99. Dell'Orco, M., Oliver, R. J., and Perrone-Bizzozero, N. (2020) HuD binds to and regulates circular RNAs derived from neuronal development- and synaptic plasticity-associated genes, *Front. Genet.*, **11**, 790, <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00790>.
100. McMahon, H. T., and Nicholls, D. G. (1990) Glutamine and aspartate loading of synaptosomes: a reevaluation of effects on calcium-dependent excitatory amino acid release, *J. Neurochem.*, **54**, 373-380, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb01883.x>.
101. Nath, A. R., Chen, R. H. C., and Stanley, E. F. (2014) Cryoloading: introducing large molecules into live synaptosomes, *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 4, <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00004>.
102. Budzinski, K. L., Sgro, A. E., Fujimoto, B. S., Gadd, J. C., Shuart, N. G., Gonen, T., Bajjaleih, S. M., and Chiu, D. T. (2011) Synaptosomes as a platform for loading nanoparticles into synaptic vesicles, *ACS Chem. Neurosci.*, **2**, 236-241, <https://doi.org/10.1021/cn200009n>.
103. Bradford, H. F., Docherty, M., Wu, J. Y., Cash, C. D., Ehret, M., Maitre, M., and Joh, T. H. (1989) The immunolysis, isolation, and properties of subpopulations of mammalian brain synaptosomes, *Neurochem. Res.*, **14**, 301-310, <https://doi.org/10.1007/BF01000031>.
104. Docherty, M., Bradford, H. F., Cash, C. D., Ehret, M., Maitre, M., and Joh, T. H. (1991) Isolation of monoaminergic synaptosomes from rat brain by immunomagnetophoresis, *J. Neurochem.*, **56**, 1569-1580, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02053.x>.
105. Hughes, P. D., Foley, P., Bradford, H. F., Ghatei, M., Khandanian, N., Bloom, S. R., and Wu, J. Y. (1993) The differential release of amino acids and neuropeptides from purified subpopulations of mammalian GABAergic and cholinergic cerebrocortical synaptosomes, *Neurochem. Res.*, **18**, 393-400, <https://doi.org/10.1007/BF00967242>.
106. Rajkumar, S., Böckers, T. M., and Catanese, A. (2023) Fast and efficient synaptosome isolation and post-synaptic density enrichment from hiPSC-motor neurons by biochemical sub-cellular fractionation, *STAR Protoc.*, **4**, 1-10, <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102061>.
107. Benedetti, M. S., Whomsley, R., Poggesi, I., Cawello, W., Mathy, F. X., Delporte, M. L., Papeleu, P., and Watelet, J. B. (2009) Drug metabolism and pharmacokinetics, *Drug Metab. Rev.*, **41**, 344-390, <https://doi.org/10.1080/10837450902891295>.
108. Crowe, T. P., and Hsu, W. H. (2022) Evaluation of recent intranasal drug delivery systems to the central nervous system, *Pharmaceutics*, **14**, 1-26, <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14030629>.
109. Alexander, J. F., Seua, A. V., Arroyo, L. D., Ray, P. R., Wangzhou, A., Heiß-Lückemann, L., Schedlowski, M., Price, T. J., Kavelaars, A., and Heijnen, C. J. (2021) Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits, *Theranostics*, **11**, 3109-3130, <https://doi.org/10.7150/thno.53474>.
110. Khatri, D. K., Preeti, K., Tonape, S., Bhattacharjee, S., Patel, M., Shah, S., Singh, P. K., Srivastava, S., Gugulothu, D., Vora, L., and Singh, S. B. (2023) Nanotechnological advances for nose to brain delivery of therapeutics to improve the Parkinson therapy, *Curr. Neuropharmacol.*, **21**, 493-516, <https://doi.org/10.2174/1570159X20666220507022701>.
111. Hosseini, L., Karimipour, M., Seyedaghamiri, F., Abolhasanpour, N., Sadigh-Eteghad, S., Mahmoudi, J., and Farhoudi, M. (2022) Intranasal administration of mitochondria alleviated cognitive impairments and mitochondrial dysfunction in the photothrombotic model of mPFC stroke in mice, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **31**, 106801, <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106801>.
112. Alexander, J. F., Mahalingam, R., Seua, A. V., Wu, S., Arroyo, L. D., Hörbelt, T., Schedlowski, M., Blanco, E., Kavelaars, A., and Heijnen, C. J. (2022) Targeting the meningeal compartment to resolve chemobrain and neuropathy via nasal delivery of functionalized mitochondria, *Adv. Healthc. Mater.*, **11**, e2102153, <https://doi.org/10.1002/adhm.202102153>.
113. Kim, K. H. (2023) Intranasal delivery of mitochondrial protein humanin rescues cell death and promotes mitochondrial function in Parkinson's disease, *Theranostics*, **13**, 3330-3345, <https://doi.org/10.7150/thno.84165>.
114. Vasileva, L., Gaynanova, G., Valeeva, F., Belyaev, G., Zueva, I., Bushmeleva, K., Sibgatullina, G., Samigullin, D., Vyshtakalyuk, A., Petrov, K., Zakharova, L., and Sinyashin, O. (2023) Mitochondria-targeted delivery strategy

- of dual-loaded liposomes for Alzheimer's disease therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1-24, <https://doi.org/10.3390/ijms241310494>.
115. Bobkova, N. V., Zhdanova, D. Y., Belosludtseva, N. V., Penkov, N. V., and Mironova, G. D. (2022) Intranasal administration of mitochondria improves spatial memory in olfactory bulbectomized mice, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **247**, 416-425, <https://doi.org/10.1177/15353702211056866>.

UNIQUE PROPERTIES OF SYNAPTOSOMES AND PROSPECTS FOR THEIR USE FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Review

A. S. Dashkova[#], V. I. Kovalev^{}, A. V. Chaplygina, D. Yu. Zhdanova, and N. V. Bobkova**

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center
"Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences",
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: kovalev@chemist.com*

Alzheimer's disease (AD) is a severe neurodegenerative disease that affects millions of people around the world. The increasing prevalence of AD correlates with increasing life expectancy and aging populations in developed countries. Since AD is a multifactorial disease and includes various pathological processes, such as: synaptic dysfunction, neuroinflammation, oxidative stress, protein misfolding, etc., an integrated approach aimed simultaneously at several targets may be effective and slow down the progression of the disease. Cell therapy and its further development in the form of transplantation of cellular vesicles and especially mitochondria are a very promising approach for the treatment of neurodegeneration. The use of synaptosomes, due to the uniqueness of their content, may become a new stage in the development of complex therapy for neurodegenerative diseases and AD in particular. This review discusses the preparation and composition of synaptosomes, as well as the possibilities and advantages of their use as transporters for the delivery of synaptic mitochondria and other biologically active substances to the brain.

Keywords: Alzheimer's disease, mitochondria, neurodegenerative diseases, memory, synaptosomes

ОСОБЕННОСТИ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ АСТРОЦИТОВ

Обзор

© 2024 А.М. Косенков*, С.А. Майоров, С.Г. Гайдин

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия;
электронная почта: kosenkov406@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.12.2023

После доработки 24.04.2024

Принята к публикации 25.04.2024

NMDA-рецептор астроцитов представляет собой гетеротетрамер, состоящий из 7 разных субъединиц. Экспрессия и свойства рецептора во многом определяются его субъединичным составом. Астроцитарные NMDA-рецепторы обладают своими функциональными особенностями – они слабо чувствительны к ионам магния и обладают низкой кальциевой проводимостью. Активация NMDA-рецепторов астроцитов играет важную роль в регуляции внутриклеточных процессов, таких как экспрессия генов и работа митохондрий. NMDA-рецепторы участвуют в кальциевой сигнализации астроцитов и могут активироваться как ионотропным, так и метаботропным путем. Астроцитарные NMDA-рецепторы участвуют в нейроглиальных взаимодействиях, влияя на синаптическую пластичность. Они также задействованы в астро-васкулярных взаимодействиях и играют роль в регуляции тонуса сосудов. NMDA-рецепторы астроцитов участвуют в патологических состояниях, таких как ишемия и гипераммониемия. Их блокирование предотвращает негативные изменения в астроцитах при этих патологиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астроциты, NMDA-рецепторы, нейроглиальные взаимодействия, нейропатологии.

DOI: 10.31857/S0320972524060069 EDN: XMERNL

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрансмиттерные рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA-рецепторы) широко распространены в центральной нервной системе и играют ключевую роль в процессах синаптической пластичности, обучения и памяти. В течение многих лет исследования были сосредоточены на изучении NMDA-рецепторов нейронов, в частности, их роли в возникновении долговременной потенциации и депрессии в гиппокампе и коре головного мозга. Однако в последние годы было установлено, что NMDA-рецепторы также экспрессируются глиальными клетками, в частности, астроцитами.

Экспрессия функционально активных NMDA-рецепторов на астроцитах была продемонстрирована с использованием различных подходов, включая электрофизиологию, кальциевый имиджинг и фармакологический анализ. Тем не менее физиологические свойства и функциональная роль NMDA-рецепторов астроцитов до конца не ясны и требуют дальнейшего всестороннего изучения.

Одной из проблем, с которой сталкиваются исследователи в данном направлении, является сложность отделить эффекты NMDA-рецепторов, экспрессируемых астроцитами, от нейрональных. В связи с этим большая часть информации о функциях NMDA-рецепторов астроцитов получена либо

Принятые сокращения: ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ЛПС – липополисахариды; МК-801 – диэтилпипин, блокатор пор рецептора NMDA; Т/Н – ток/напряжение; ЭР – эндоплазматический ретикулум; Аβ – бета-амилоид; AP-5 – антагонист глутамата; BDNF – нейротрофический фактор мозга; ERK – экстраклеточная сигнал-регулируемая киназа; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; NBQX – 2,3-диоксо-6-нитро-7-сульфамойлбензо[*f*]хиноксалин; NMDA-рецепторы – рецепторы N-метил-D-аспартата; nNOS – нейрональная NO-синтаза; NOS1 – синтаза оксида азота 1; TNF – фактор некроза опухоли; TTX – тетродотоксин.

* Адресат для корреспонденции.

с использованием астроцитарных культур, либо на изолированных астроцитах. Накопленные данные свидетельствуют о том, что NMDA-рецепторы астроцитов не только влияют на сами астроциты, но также играют важную роль во взаимодействии с нейронами, регуляции сосудистого тонуса в мозге и других процессах. Кроме того, эти рецепторы играют роль и при патологических состояниях, таких как гипераммониемия, ишемия и болезнь Альцгеймера.

Данный обзор охватывает всю историю изучения NMDA-рецепторов астроцитов от момента первых исследований, когда только предполагалось наличие данных рецепторов на глиальных клетках, до настоящего времени. Целью обзора является систематизация накопленных к данному моменту знаний об экспрессии, свойствах и функциях астроцитарных NMDA-рецепторов как в норме, так и при патологиях.

СТРУКТУРА NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

NMDA-рецептор относится к подтипу ионотропных глутаматных рецепторов, куда также входят AMPA- и каинатные рецепторы. NMDA-рецепторы – гетеротетрамеры, собирающиеся из комбинации 7 субъединиц, разделенных на 3 подсемейства: GluN1, GluN2 (A, B, C и D) и GluN3 (A и B) [1], которые кодируются генами *Grin1*, *Grin2* (a, b, c и d) и *Grin3* (a и b) соответственно. Структурное разнообразие NMDA-рецептора расширяется также за счет посттранскрипционного процессинга РНК GluN1-субъединицы, что дает 8 различных сплайс-вариантов. В составе NMDA-рецепторов всегда присутствуют 2 субъединицы GluN1 в комбинации с субъединицами GluN2 и/или GluN3.

NMDA-рецепторы отличаются от других лиганд-зависимых ионотропных рецепторов тем, что имеют потенциал-зависимую Mg^{2+} -блокировку; высокую кальциевую проводимость и для активации им необходимо связывание с коагонистом (глицин или D-серин). Свойства рецептора определяются его субъединичным составом и в особенности зависят от GluN2-субъединиц. Дигетеромерные рецепторы, содержащие GluN2A/GluN2B, имеют более высокую проводимость и проницаемость для Ca^{2+} , чувствительны к Mg^{2+} -блоку в сравнении с дигетеромерными рецепторами, содержащими GluN2C/GluN2D. Тригетеромерные рецепторы, имеющие в составе GluN3-субъединицу, имеют наименьшую чувствительность к Mg^{2+} -блоку. Чувствительность NMDA-рецепторов к Mg^{2+} -блоку зависит от варианта GluN2-субъединицы; они располагаются по чувствительности следующим образом (в порядке возрастания): GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D. Состав рецеп-

тора также определяет его чувствительность к протонам, полиаминам и цинку. Ионы цинка являются высокоспецифичными антагонистами GluN1-/GluN2A-содержащих рецепторов, а протоны преимущественно ингибируют GluN2B- или GluN2D-содержащие рецепторы. В свою очередь, экстраклеточные полиамины выступают в качестве позитивных аллостерических модуляторов – GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов. Полиамины связываются с N-концевым доменом, тем самым стабилизируют GluN1-/GluN2-димер, что приводит к потенциации активности рецептора, в том числе за счет повышения аффинности к коагонисту, глицину [2].

Таким образом, NMDA-рецепторы представляют собой структурно и функционально разнообразный класс глутаматных рецепторов, обладающих уникальными свойствами, такими как высокая проводимость по ионам кальция, потенциал-зависимая магниевая блокада и необходимость связывания коагониста для активации. Разнообразие субъединичного состава NMDA-рецепторов определяет их фармакологические, биофизические и регуляторные особенности. В частности, присутствие разных субъединиц GluN2 влияет на чувствительность рецепторов к ионам магния, протонам, цинку и полиаминам. Благодаря структурно-функциональной гетерогенности NMDA-рецепторы выполняют широкий спектр физиологических функций и играют ключевую роль в процессах синаптической пластичности, обучения и памяти.

ЭКСПРЕССИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ НА АСТРОЦИТАХ

NMDA-рецепторы преимущественно экспрессируются на постсинаптической мембране нейронов, но и на пресинаптической, где они, в частности, облегчают кратковременную пластичность [3]. Активация постсинаптических рецепторов играет важную роль в передаче сигнала и нейрональной пластичности. NMDA-рецепторы также экспрессируются и различными глиальными клетками, такими как олигодендроциты, микроглия и астроциты. Данный обзор посвящен именно астроцитарным NMDA-рецепторам. К настоящему моменту накопилось много работ, демонстрирующих экспрессию различных субъединиц NMDA-рецептора как на уровне РНК, так и на белковом уровне (таблица). Тем не менее есть и противоречивые данные о наличии функциональных рецепторов на астроцитах гиппокампа. Так, в работах Li et al. [4] и Zhang et al. [5] была установлена экспрессия субъединиц GluN1, GluN2A, GluN2B астроцитами на белковом уровне в смешанных

Экспрессия субъединиц NMDA-рецептора

Модель	Метод исследования	Экспрессия субъединиц	Источник
Первичные культуры кортикальных астроцитов мыши	ПЦР	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b, Grin2c, Grin2d, Grin3a, Grin3b</i>	[7]
	ИЦХ	положительная: GluN1	
	Вестерн-блот	положительная: GluN1	
Клеточная культура кортикальных астроцитов крыс	ПЦР	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b, Grin2c, Grin2d, Grin3a, Grin3b</i>	[8]
	ИЦХ	положительная: GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B	
Ткань мозга взрослых доноров (человек)	ПЦР	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b, Grin2c, Grin2d, Grin3a, Grin3b</i>	[9]
	ИЦХ	положительная: GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B	
Выделенные кортикальные GFAP-/EGFP-положительные клетки мыши	РВ-ПЦР	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b, Grin2c, Grin2d, Grin3a</i>	[10]
Клетки коры мыши	ПЦР одной клетки	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b, Grin2c, Grin3a</i>	[11]
		отрицательная: <i>Grin2d, Grin3b</i>	
Клеточные суспензии из кортикального слоя мыши, очищенные путем активируемой флуоресценцией сортировки клеток, астроциты	ПЦР одной клетки	положительная: <i>Grin1, Grin2B, Grin2C</i>	[12]
		отрицательная: <i>Grin2a, Grin2d, Grin3</i>	
Первичные культуры корковых астроцитов мыши	РВ-ПЦР	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b</i>	[13]
	ИЦХ	положительная: GluN1, GluN2B	
Первичные культуры корковых астроцитов крысы	РВ-ПЦР	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b</i>	[14]
	Вестерн-блот	положительная: GluN2A, GluN2B	
Срезы гиппокампа GFAP-GFP трансгенных мышей FVB/N	ПЦР одной клетки	положительная: <i>Grin1, Grin2a, Grin2b, Grin2c</i>	[5]
Первичные культуры корковых астроцитов крысы	ИЦХ	положительная: GluN2B	[15]
Первичные культуры корковых астроцитов крысы	ИЦХ	положительная: GluN2B	[16]
Смешанные культуры гиппокампа крысы	ИЦХ	положительная: GluN1, GluN2A, GluN2B	[17]
Гиппокамп взрослой крысы	ИГХ	отрицательная: GluN1, GluN2B	[6]

Примечание. ИЦХ – иммуноцитохимия; ИГХ – иммуногистохимия; РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок.

культурах гиппокампа и уровне РНК в срезах гиппокампа. Однако в работе Krebs et al. [6] субъединицы GluN1 и GluN2B не были обнаружены в срезах и культурах гиппокампа крысы. В связи с

этим в рамках данного обзора большее внимание будет уделено роли NMDA-рецепторов на кортикальных астроцитах, для которых доказана возможность экспрессии всех субъединиц.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ АСТРОЦИТОВ

Значительный массив данных об электрофизиологических свойствах астроцитарных NMDA-рецепторов был получен с использованием изолированных кортикальных астроцитов мыши [18–20]. Было показано, что NBQX (2,3-диоксо-6-нитро-7-сульфамойлбензо[f]хиноксалин, антагонист AMPA-рецепторов) подавляет первоначальный быстрый пик ответа на глутамат, а D-AP5 (конкурентный ингибитор NMDA-рецепторов) подавляет устойчивый компонент глутамат-индуцированных токов [18]. NMDA-индуцированные концентрационно-зависимые токи имели место в подавляющем большинстве астроцитов (47 из 54 проверенных астроцитов). При этом отношение ток/напряжение (Т/Н) было близко к линейному, что характерно для протоплазматических астроцитов. Пороговая концентрация NMDA составила 30 нМ, а EC_{50} = 0,34 мкМ. Кроме того, глицин и D-серин не только усиливали NMDA-токи в астроцитах, но и выступали в роли слабых агонистов NMDA-рецепторов в астроцитах, но не в нейронах. В нейронах D-серин выступал в роли коагониста, усиливая NMDA-токи [18, 20].

Важно отметить, что в астроцитах вызванные NMDA токи отличались от нейрональных. Во-первых, было показано, что проницаемость NMDA-рецепторов в астроцитах для кальция заметно ниже, чем в нейронах [19]. Во-вторых, вызываемые NMDA токи в нейронах были максимальными при мембранном потенциале, равном –40 мВ, а отношение Т/Н характеризовалось отрицательным наклоном проводимости между –80 и –40 мВ, что указывает на наличие магниевого блока при гиперполяризованном потенциале. В астроцитах, напротив, вызываемые NMDA токи практически линейно зависели от мембранного потенциала и практически не зависели от концентрации внеклеточного магния. Это указывает на слабую чувствительность или полное отсутствие магниевого блока [18]. Однако в более ранней работе, проведенной на мышинных кортикальных астроцитах в срезах, было показано, что, несмотря на то что при низкой концентрации магния во внеклеточном растворе (1,3 мМ $MgCl_2$), астроциты имеют практически линейное отношение ток/напряжение в ответ на NMDA; 4 мМ магния во внеклеточной среде частично подавляет ответ на NMDA в астроцитах, а 10 мМ – полностью подавляет [12]. Такое различие, как предполагают авторы, может быть связано с различием использованных моделей, поскольку диффузионные барьеры и косвенные эффекты могут вызывать значительные трудности при интерпретации полученных на срезах

данных. Тем не менее данная работа показывает наличие функционально активных NMDA-рецепторов на астроцитах в срезах, поскольку добавка NMDA производилась в присутствии коктейля ингибиторов потенциал-зависимых натриевых каналов и AMPA-рецепторов.

Приведенные выше данные касательно электрофизиологических свойств NMDA-рецепторов относятся к астроцитам, характеризующимся линейным отношением Т/Н, что характерно для протоплазматических астроцитов [12, 18]. NMDA-индуцированные токи в этих астроцитах имели практически линейное отношение Т/Н и потенциал реверсии близкий к 0 мВ [12, 18, 19]. Однако в работе Kondoh et al. [21] с использованием культур человеческих астроцитов, полученных из ткани белого вещества, окружающего метастазирующую опухоль мозга, было показано, что NMDA (1 мМ) может вызывать токи в астроцитах, характеризующиеся выходящим выпрямлением и потенциалом реверсии при 0 мВ. В данной работе также было показано, что внеклеточный магний (2 мМ) подавляет ответ на NMDA почти в 2 раза. Таким образом, отсутствие магниевого блока на NMDA-рецепторах астроцитов было показано только на изолированных астроцитах коры мыши. Астроциты в срезах и культурах имеют меньшую чувствительность к магнию, в сравнении с нейронами, но все же ингибируются при высокой концентрации магния. Однако, так как данные по культурам были получены на клетках человека, может иметь место видовое различие. Кроме того, в данной работе было показано, что глицин усиливает вызванные NMDA токи, и NMDA-рецепторы астроцитов имеют меньшую кальциевую проводимость, чем NMDA-рецепторы нейронов [21], что согласуется с другими работами [19].

Первые электрофизиологические данные, демонстрирующие наличие функциональных NMDA-рецепторов на астроцитах гиппокампа, появились только в 2008 году. В работе Serrano et al. [22] с использованием срезов гиппокампа мыши было показано, что астроциты гиппокампа отвечают кальциевым подъемом и возникновением входящих токов в ответ на добавку NMDA. При этом в астроцитах, имеющих различные отношения ток/напряжение, ответ на NMDA также различается. В данной работе сравнивались свойства NMDA-индуцированных токов в астроцитах, имеющих линейное отношение ток/напряжение, и в астроцитах, у которых Т/Н характеризуется выходящим выпрямлением, которые, как предполагают авторы, могут быть не астроцитами, а NG2-глией. В «линейных» астроцитах ответ на NMDA пролонгированный и развивается долго, в течение минут, в то время как у «выпрямляющих» астроцитов ответ быстрее и осцилляторный. Ингибиторный

анализ показал, что в линейных астроцитах ответ на аппликацию NMDA во многом зависит от нейрональной активности, поскольку он значительно подавлялся в присутствии ТТХ (тетродотоксин; ингибитор потенциал-зависимых натриевых каналов), а также ингибитора глутаматных транспортеров. Тем не менее в присутствии ТТХ ответ сохранялся, что подтверждает наличие функциональных NMDA-рецепторов непосредственно на астроцитах. В среде с низким содержанием кальция ответ снижался, что говорит о кальциевой проводимости данного рецептора. В свою очередь, в «выпрямляющих» астроцитах ответ на NMDA во многом был за счет прямого действия на NMDA-рецепторы астроцитов, поскольку ТТХ, ингибиторы глутаматных транспортеров, ингибиторы рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК(А) и ГАМК(Б)) не оказывали значительного влияния. При этом среда с низким содержанием кальция практически отменяла ответ на NMDA, что указывает на высокую кальциевую проводимость NMDA-рецепторов «выпрямляющих» астроцитов.

Таким образом, результаты электрофизиологических исследований свидетельствуют о присутствии функциональных NMDA-рецепторов на астроцитах головного мозга млекопитающих. При этом NMDA-рецепторы астроцитов обладают рядом отличительных свойств, по сравнению с нейрональными NMDA-рецепторами, включая более низкую проницаемость для кальция, слабую чувствительность или отсутствие магниевого блока, а также линейное отношение ток/напряжение NMDA-индуцированных токов в изолированных клетках.

КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ АСТРОЦИТОВ В ОТВЕТ НА АКТИВАЦИЮ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

Наличие функционально активных NMDA-рецепторов на астроцитах также было показано с помощью кальциевого имиджинга. В ответ на добавление NMDA кальциевый подъем регистрировался в изолированных астроцитах коры [19, 20], в срезах коры и гиппокампа мыши [11, 12, 22], культурах кортикальных астроцитов [7, 8, 14, 16, 23, 24], а также в астроцитах белого вещества на изолированном оптическом нерве [25]. В культурах астроцитов гиппокампа NMDA не вызывал кальциевый ответ [26]. В работах с использованием срезов и культур было показано, что ответ на NMDA более выражен в отростках астроцитов и возникает там раньше [11, 12]. При этом ответ возникает не во всех отростках. В остальных работах флуоресцентный сигнал снимался с тела кле-

ток, поэтому нельзя точно сказать имеет ли место такой ответ во всех астроцитах в разных экспериментальных моделях. Тем не менее ранее на срезах коры крысы было показано, что субъединицы GluN1 и GluN2A/B преимущественно содержатся на отростках астроцитов, а не на телах [27]. Также на срезах было показано, что ответ на NMDA может быть гетерогенным и наблюдаться не у всех астроцитов, и возникать, как правило, с небольшой задержкой (примерно 30 с) [11, 22].

На кортикальных астроцитарных культурах показано, что NMDA вызывает дозозависимое увеличение кальция в астроцитах. Ответ может возникать, начиная от 100 нМ [16]. Несмотря на то что в трех работах, проведенных на кортикальных астроцитарных культурах [8, 14, 16], скорость и форма ответа на NMDA варьировалась (что, возможно, связано с различной концентрацией NMDA), в них было показано, что кальциевый ответ сохраняется в безкальциевой среде у большинства астроцитов. Более того, эксперименты с использованием ингибитора саркоэндоплазматической АТФазы и районодиновых рецепторов показывают, что основным источником притока кальция является эндоплазматический ретикулум (ЭР) [8, 14]. Предполагается, что, помимо ионотропного действия NMDA-рецепторов астроцитов, рецепторы могут активироваться и по метаболитному пути, который приводит к мобилизации кальция из ЭР. Кроме того, полученные результаты также подтверждают электрофизиологические данные, согласно которым NMDA-рецепторы астроцитов имеют низкую кальциевую проводимость [19, 21], и в ответ на активацию NMDA-рецепторов подъем кальция в астроцитах возникает вследствие выхода кальция из ЭР и последующего депо-управляемого входа кальция из внеклеточного пространства.

Таким образом, данные, полученные с использованием кальциевого имиджинга, подтверждают наличие функциональных NMDA-рецепторов на астроцитах, проводящих кальций. По всей видимости, они преимущественно располагаются на отростках астроцитов. Кроме того, интересной особенностью астроцитарных NMDA-рецепторов является то, что они способны активироваться и по метаболитному пути, сопровождающемуся повышением внутриклеточного кальция из внутриклеточных депо. Для нейрональных NMDA-рецепторов также сообщалось, что они способны оказывать физиологические эффекты независимо от притока ионов через рецептор, которые также сопровождаются увеличением внутриклеточного кальция [28]. Таким образом, данная особенность NMDA-рецепторов заслуживает дальнейшего изучения в контексте функционирования как нейронов, так и астроцитов.

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ И СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ АСТРОЦИТОВ

Наиболее часто используемыми ингибиторами NMDA-рецептора являются AP-5 и МК-801. Данные ингибиторы являются не селективными в отношении субъединичного состава рецептора, однако различаются типом ингибирования. AP-5 является конкурентным ингибитором и блокирует сайт связывания глутамата, в то время как МК-801 является неконкурентным, блокирует пору рецептора, что препятствует току ионов через рецептор. Как было показано с использованием различных моделей, оба ингибитора эффективно подавляют токи, вызванные NMDA в астроцитах [12, 18]. Однако, в отличие от AP-5 [11, 16, 25], МК-801 не отменяет кальциевый ответ в астроцитах при аппликации NMDA, что отчасти подтверждает наличие метаболитного пути активации NMDA-рецепторов астроцитов, независимого от притока ионов через сам рецептор [8, 11, 16, 25, 29].

Существуют селективные в отношении различных субъединиц NMDA-рецептора ингибиторы – ифенпродил, мемантин и UBP141. В экспериментах, проведенных на изолированных кортикальных астроцитах, было показано, что ифенпродил (негативный аллостерический модулятор GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов) не влияет на токи, вызванные NMDA [20]. Однако теми же авторами ранее было показано, что ифенпродил снижал амплитуду токов, вызванных NMDA, примерно в 30% астроцитов [18]. Авторы связывают такое различие с различным возрастом мышей (28–56 дней и 17–22 дня соответственно). В другой работе с использованием крысиных кортикальных астроцитарных культур было показано, что ифенпродил отменяет NMDA-индуцированный кальциевый сигнал [16]. Точного ответа о причинах различного влияния ифенпродила в разных работах нет, это может быть связано с различием в модели, возрасте или виде животных. В целом, основные выводы касательно субъединичного состава NMDA-рецепторов основаны на работе Palygin и Pankratov [20], в которой была дана подробная фармакологическая и функциональная характеристика NMDA-рецепторов астроцитов коры. На основе чувствительности к различным ингибиторам и слабовыраженному магниевому блоку авторы предполагают, что астроциты должны экспрессировать тригетеромерные рецепторы, состоящие из GluN1-, GluN2C-/D- и GluN3-субъединиц. Данное предположение отчасти подтверждается данными иммуногистохимии, в которых подтверждено наличие GluN2C, GluN3A [11, 30, 31] в срезах коры. Однако с использованием метода *in situ* гибридизации было показано, что в телеэнцефалоне, в част-

ности, в гиппокампе и коре, мРНК, кодирующая GluN2C, почти эксклюзивно экспрессируется не нейрональными клетками, в то время как мРНК, кодирующая GluN2D, в основном экспрессируется нейронами [32]. Таким образом, в астроцитах тригетеромерные рецепторы, скорее всего, содержат именно GluN2C-субъединицу.

ФУНКЦИИ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ АСТРОЦИТОВ

Одной из первых работ, в которой упоминаются NMDA-рецепторы астроцитов, является работа Chan et al. [33], в которой показано, что блокатор NMDA-рецепторов МК-801 значительно снижает глутамат-индуцированное набухание астроцитов в первичной культуре кортикальных астроцитов. Однако, поскольку в то время не было доказательств, что данные рецепторы присутствуют на астроцитах, авторы предположили, что МК-801 оказывает свой эффект не через NMDA-рецепторы. Тем не менее в настоящий момент не найдено других мишеней для МК-801 и, следовательно, можно предполагать, что набухание астроцитов предотвращалось именно за счет блокирования NMDA-рецепторов. Позднее, с использованием схожей модели было показано, что МК-801, кетамин и фенциклидин (соединения, которые блокируют непосредственно пору NMDA-рецептора) вызывают дозозависимое снижение захвата глутамата астроцитами [34]. МК-801 также снижал захват ГАМК. При этом антагонисты сайта связывания глутамата AP-5 и CGS-19775 и антагонист глицинового сайта связывания HA-966 не влияли на захват глутамата. Кроме того, МК-801 при концентрации 10 мкМ и выше вызывал дозозависимую деполяризацию мембранного потенциала астроцитов, и при концентрации 1 мМ деполяризация составляла примерно 30 мВ (от –60 до –30 мВ). Помимо этого, МК-801 увеличивал отток аспартата, который является медленно метаболизирующимся аналогом глутамата, также являющегося субстратом глутаматных транспортеров. Авторы предполагают, что снижение захвата глутамата и ГАМК при добавлении МК-801 связано с падением мембранного потенциала, что нарушает ионные градиенты и работу глутаматных транспортеров. Longuemare et al. [34] также не связывают действие МК-801 непосредственно с блокированием NMDA-рецепторов астроцитов, поскольку считали, что данные рецепторы на астроцитах не экспрессируются. Тем не менее полученные в работе данные могут отчасти объяснять результаты работы Chan et al. [33], поскольку именно снижение захвата глутамата может объяснять предотвращение набухания астроцитов при действии МК-801. Таким образом, учитывая данные

результаты, можно сделать вывод, что одной из функций NMDA-рецепторов астроцитов является поддержание мембранного потенциала, при этом, по всей видимости, в данном случае связывание глутамата или глицина с самим рецептором не является необходимым условием.

Помимо поддержания мембранного потенциала, NMDA-рецепторы астроцитов также, возможно, обладают механочувствительностью. Для нейрональных NMDA-рецепторов уже давно известно, что они обладают механочувствительностью, реагируя на такие стимулы, как растяжение, увеличением ионной проводимости, в том числе и кальциевой проводимости [35, 36]. Касательно подобных свойств NMDA-рецепторов астроцитов, существует работа Maneshi et al. [37], в которой показано, что сдвиг потока жидкости в модели ЧМТ (черепномозговая травма) приводит к кальциевому подъему в культурах крысиных астроцитов. Кальциевый ответ в данном случае отменялся в присутствии МК-801, кетамина и мемантина, однако сохранялся при использовании AP-5 (антагонист глутамата) и ифенпродила (GluN2B-селективного ингибитора). Эти данные могут свидетельствовать об активации NMDA-рецепторов без участия глутамата. На основе результатов, полученных с использованием экспрессионной системы клеток яичника китайского хомячка (CHO), авторы предположили, что за механочувствительность NMDA-рецепторов отвечают субъединицы GluN1 и GluN2A. В случае нейрональных NMDA-рецепторов было показано, что за механочувствительность отвечает GluN2B-субъединица [38]. Таким образом, NMDA-рецепторы астроцитов способны чувствовать изменение давления тока жидкости, что приводит к кальциевому притоку через NMDA-рецепторы и, возможно, последующему выходу кальция из ЭР. Данные события могут происходить при травматических повреждениях мозга. Как было сказано ранее, активация NMDA-рецепторов может приводить к приток-независимой мобилизации кальция из ЭР, что указывает на потенциальный неканонический метаболитный путь активации этих рецепторов на астроцитах [8]. Позднее, этой же группой авторов было установлено, что NMDA-рецепторы чувствительны к pH внешней среды [39]. Оказалось, что закисление внеклеточной среды до значения pH = 6 приводит к приток-независимой NMDA-рецептор-опосредованной мобилизации кальция из ЭР. Также было установлено, что добавление агониста при pH = 6 приводит к падению потенциала митохондриальной мембраны ($m\Delta\psi$), которое сопровождается сближением митохондрий с ЭР и ядром, а также возникновением мостиков между плазматической мембраной и митохондриями. Активация NMDA-рецепторов в результате нейрональной

активности также влияет на трафик и позиционирование митохондрий в отростках астроцитов [40]. NMDA-зависимое повышение кальция приводит к снижению мобильности митохондрий и удержанию их в отростках вблизи синапсов. Данный процесс регулируется митохондриальной Rho-GTPазой Miro1. Таким образом, NMDA-рецепторы способны регулировать трафик митохондрий как в теле, так и отростках астроцитов в ответ на нейрональную активность, сопровождающуюся секрецией глутамата. Также этот процесс зависит от внеклеточного pH, снижение которого само по себе может активировать NMDA-рецепторы.

Таким образом, часть своего физиологического влияния на астроциты NMDA-рецепторы могут оказывать без непосредственного связывания с агонистом или в результате метаболитной активности. Кроме того, астроцитарные NMDA-рецепторы обладают механо- и pH-чувствительностью, что сопровождается мобилизацией кальция из ЭР в ответ на сдвиг потока жидкости и закисление внеклеточной среды соответственно.

ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ

Блокирование NMDA-рецептора влияет на экспрессию генов в астроцитах (рис. 1). На культурах кортикальных астроцитов было показано, что добавление ингибитора поры NMDA-рецептора МК-801 увеличивает экспрессию мРНК аминокотрансферазы кенурина II [41]. Аммоний также увеличивал количество мРНК данного фермента, при этом добавление МК-801 к аммонии еще сильнее его увеличивало. В свою очередь, добавление NMDA не оказывало влияния на экспрессию. В другой работе с использованием аналогичной модели было продемонстрировано, что добавление МК-801 или конкурентного антагониста NMDA-рецепторов AP-5 приводит к увеличению экспрессии Kir4.1 как на уровне РНК, так и на уровне белка [42]. В данном случае обработка астроцитов глутаматом или NMDA, наоборот, снижала экспрессию Kir4.1 как на белковом, так и на уровне РНК, которая отменялась в присутствии ингибиторов. При использовании культур гиппокампальных астроцитов было продемонстрировано, что МК-801 вызывает усиление экспрессии GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), BDNF (нейротрофический фактор мозга), TrkB (киназа рецептора тропомиозина B) и p75 на уровне РНК и белка [43]. Дальнейшие эксперименты показали, что усиление экспрессии BDNF в ответ на применение МК-801 значительно подавляется при совместном применении антагониста с NMDA, а также блокируется после предобработки с ингибитором PI3K (фосфоинотизид

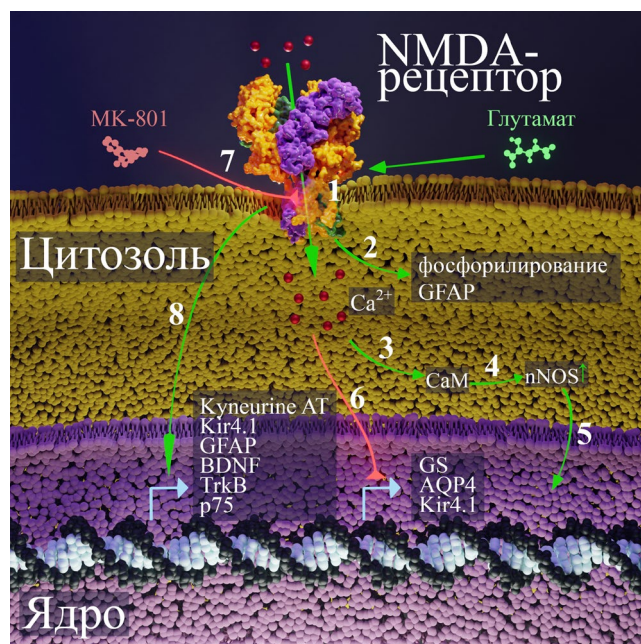


Рис. 1. Влияние ингибирования и активации NMDA-рецепторов астроцитов на внутриклеточные процессы. Активация NMDA-рецепторов глутаматом приводит к притоку кальция в клетку (1). Повышение внутриклеточного кальция приводит к фосфорилированию GFAP (2) и активации кальмодулина (3), который, в свою очередь, активирует nNOS (4), что сопровождается ее транслокацией в ядро (5). Также активация NMDA-рецепторов глутаматом сопровождается снижением экспрессии глутаминсинтазы, AQP4 и Kir4.1-каналов (6) как на генном, так и на белковом уровне. В свою очередь, ингибирование поры рецептора с помощью МК-801 (7), наоборот, повышает экспрессию аминотрансферазы кинуренина, Kir4.1-каналов, BDNF, GFAP, TrkB и p75 (8) как на генном, так и на белковом уровне

киназа) и ERK1/2 (экстраклеточная сигнал-регулируемая киназа), но не с ингибиторами p38 и JNK (Янус-киназа) [44]. Таким образом, учитывая данные работы, можно предполагать, что NMDA-рецепторы играют важную роль в регуляции генной экспрессии астроцитов даже при отсутствии агониста. Причины данного действия в настоящий момент точно не известны. По всей видимости, даже при отсутствии глутамата или при его небольшом количестве, которое может возникать вследствие его секреции самими астроцитами, NMDA-рецепторы играют важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза. Блокирование поры рецептора приводит к внутриклеточным изменениям (например, деполяризации, как было показано в работе Longuemare et al. [34]), что провоцирует активацию внутриклеточных каскадов, приводящих к изменению генной экспрессии.

Активация NMDA-рецепторов астроцитов также приводит к различным внутриклеточным изменениям (рис. 1). Добавление NMDA приводит к кальмодулин-зависимой активации нейрональ-

ной NO-синтазы (nNOS) астроцитов и транслокации nNOS в ядро. Донор NO также приводит к транслокации комплекса в ядро, при этом данный процесс отменяется МК-801 [15]. На культуре мышинных кортикальных астроцитов было показано, что длительное воздействие NMDA приводит к снижению экспрессии глутаминсинтазы, аквапорина 4 (AQP4), Kir4.1 на уровне РНК и белка, а также снижается активность глутаминсинтетазы [45]. В случае с Kir4.1 эти данные согласуются с более ранней работой Obara-Michlewska et al. [42], проведенной с использованием культур крысиных кортикальных астроцитов. Как и в случае с nNOS, снижение экспрессии является кальций-зависимым процессом, а также отменяется после сайленсинга GluN1-субъединицы. При использовании смешанных культур, полученных из мозжечка крыс, было продемонстрировано, что глутамат за счет активации NMDA-рецепторов вызывает кальций-зависимое фосфорилирование GFAP [46], однако в гиппокампе глутамат запускает данный процесс за счет активации метаботропного глутаматного рецептора (mGluR) второй группы [47]. Кроме того, в кортикальных астроцитах глутамат вызывает кальций-/натрий-зависимую секрецию гомоцистеиновой кислоты (эндогенный лиганд NMDA-рецепторов) за счет активации как ионотропных (включая NMDA), так и метаботропных рецепторов [48].

Таким образом, в астроцитах как ингибирование, так и активация NMDA-рецепторов приводит к различным эффектам, включающим изменения в экспрессии генов, таких как аминотрансфераза кенурина II, GFAP, BDNF, TrkB, p75, Kir4.1, а также к модификации внутриклеточных белков, таких как BDNF. При этом в случае активации рецепторов как глутаматом, так и NMDA ниже следующие эффекты являются кальций-зависимыми. Однако, как эти изменения влияют на функционирование самих астроцитов и на их взаимодействие с другими клетками мозга, еще предстоит выяснить.

РОЛЬ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ В НЕЙРО-АСТРОЦИТАРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

В 2006 году впервые появились доказательства, что астроциты не только экспрессируют NMDA-рецепторы, но и что их активация имеет место в условиях, приближенных к физиологическим. В работе Lalo et al. [18] с использованием срезов коры головного мозга было показано, что афферентная стимуляция нейронов слоя IV–VI вызывает токи в астроглиальных клетках слоя II. Возникающие в астроцитах токи были бифазными и длились 2–4 мс. Ингибитор NMDA-рецепторов

МК-801, но не NBQX (ингибитор AMPA-рецепторов), значительно снижал амплитуду первой быстрой фазы, в то время как вторая медленная фаза подавлялась блокатором глутаматных транспортеров DL-TBOA (DL-трео-бета-бензилоксиаспартат). В данной работе также показано (при использовании изолированных астроцитов), что экзогенно апплицируемый глутамат способен вызывать AMPA-рецептор-опосредованные токи в астроцитах. Важно отметить, что чувствительность NMDA-рецепторов к глутамату примерно в 20 раз выше в сравнении с AMPA-рецепторами. Эти данные могут объяснять отсутствие эффекта NBQX на вызванные стимуляцией токи в астроцитах. Как предполагают авторы, активация глутаматных рецепторов астроцитов происходит вследствие утечки глутамата из синаптической щели, где его концентрация может быть недостаточной для активации AMPA-рецепторов, но достаточной для активации NMDA-рецепторов. Это предположение подтверждается другими работами, в которых показано, что концентрация глутамата вне синаптической щели может составлять лишь 1–10 мкМ [49]. Авторы также показали на срезах, что в астроцитах возникают опосредованные NMDA- и AMPA-рецепторами быстрые спонтанные миниатюрные токи, записанные в присутствии ингибитора потенциал-зависимых каналов ТТХ и антагониста ГАМК(A)-рецепторов пикротоксина. Как предполагается, данные токи вызваны транзитным локальным повышением концентрации глутамата.

По всей видимости, утечка глутамата из синаптической щели является важной составляющей нейроглиальных взаимодействий. Высокочастотная стимуляция, которая должна сопровождаться утечкой глутамата, влияет на астроцитарную пластичность, а также гетеросинаптическую пластичность нейронов. Так, высокочастотная стимуляция синапсов при перфорантном пути вызывает в астроцитах NMDA-рецептор-зависимую долговременную потенцию, которая выражается в увеличении возбуждающего постсинаптического астроцитарного потенциала [5].

При использовании гиппокампальных смешанных культур было показано, что высокочастотная стимуляция нейрона приводит к пластичности не только в синапсе между стимулированным нейроном и в постсинаптическом нейроне (гомосинаптическая пластичность), но также и между данным постсинаптическим нейроном и другими иннервирующими его нейронами (гетеросинаптическая пластичность) [50]. Для гетеросинаптической пластичности не нужен кальций в постсинаптическом нейроне, поскольку после загрузки кальциевого хелатора ВАРТА в постсинаптический нейрон эффект не отменялся. Антагонист NMDA-рецепторов

АР-5 и флуороацетат (ингибитор цикла Кребса в астроцитах) влиял на гетеросинаптическую пластичность, но не влиял на гомосинаптическую. Эксперименты на срезах показали, что и в данных условиях для гетеросинаптической пластичности не нужен кальций в постсинаптическом нейроне. Однако гомосинаптическая долговременная потенция является кальций-зависимым процессом. Аппликация NMDA с глицином вызывает NMDA-рецептор- и кальций-зависимую деполяризацию астроцитов в срезах гиппокампа. В целом, эти данные указывают на важную роль активации астроцитарных NMDA-рецепторов и последующей кальций-зависимой деполяризации астроцитов в регуляции гетеросинаптической пластичности. Дальнейшие исследования этой группы авторов, проведенные на CA1 гиппокампальных нейронах взрослых мышей, подтвердили важную роль NMDA-рецепторов астроцитов, в частности, содержащих GluN2C-субъединицу, в регуляции эффективности синаптической передачи [51]. Было продемонстрировано, что NMDA-рецепторы, содержащие эту субъединицу, в основном экспрессируются астроцитами и что ингибирование именно этих рецепторов приводит к усилению эффективности синаптической передачи в слабых синапсах и ослаблению – в сильных, тем самым уменьшая диапазон разброса эффективности синаптической передачи между нейронами гиппокампа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация NMDA-рецепторов астроцитов преимущественно происходит вследствие утечки глутамата из синаптической щели при высокой активности нейронов. При этом активация NMDA-рецепторов в данных условиях влияет как на пластичность астроцитов, выражающуюся в увеличении постсинаптического астроцитарного потенциала, так и на гетеросинаптическую пластичность между нейронами.

РОЛЬ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ АСТРОЦИТОВ В АСТРО-ВАСКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

Помимо нейрональной и астроцитарной пластичности, NMDA-рецепторы астроцитов, по всей видимости, играют заметную роль и в регуляции диаметра артериол. С использованием срезов соматосенсорной коры мозга крыс [52] было показано, что высокочастотная стимуляция приводит к первоначальному подъему кальция в астроцитах (примерно 56% в исследуемой области) и последующему снижению кальция ниже начального значения и установлению нового состояния покоя. Подобные изменения имели место в основных, но не в тонких отростках астроцитов. Авторы установили, что за снижение уровня кальция

в астроцитах ответственны, в частности, метаболиты и NMDA-рецепторы. Однако ингибирование данных рецепторов не приводит к отмене изначального кальциевого ответа в астроцитах. Ингибиторы синтаза оксида азота 1 (NOS1; NO связан с NMDA-рецепторами) и тапсигаргин (ингибитор саркоэндоплазматической АТФазы (SERCA)) частично подавляли кальциевое снижение в сравнении с контролем. Авторы обнаружили, что падение кальция в ножках астроцитов после высокочастотной стимуляции связано с вазоконстрикцией артериол, которая отменяется в присутствии антагониста NMDA-рецепторов AP-5. Как пишут авторы, одним из потенциальных следствий снижения кальция может быть увеличение кальциевого ответа астроцитов на стимуляцию. Поскольку максимальное значение кальциевого ответа при повторяющихся стимуляциях не изменяется, увеличение амплитуды ответа происходит за счет базового снижения кальция. Второе следствие данного снижения – регуляция тонуса артериол, поскольку показано, что снижение кальция коррелирует со снижением диаметра артериол. При этом данный эффект не зависит от кальциевых транзиентов в астроцитах. Авторы предполагают, что снижение уровня кальция в ножках астроцитов может приводить к снижению секреции серина, который, как было показано, приводит к дилатации сосудов за счет связывания с NMDA-рецепторами на эндотелии сосудов [53]. Таким образом, полученные данные предполагают, что электрически вызванный паттерн нейрональной активности или естественный опыт могут регулировать базальный уровень цитозольного кальция в астроцитах через NMDA-рецепторы и тем самым влиять на диаметр артериол.

В целом, известно, что астроциты являются важной нейроваскулярной единицей за счет регуляции эндогенной продукции CO, который является потенциальным вазодилататором. В работе Parfenova et al. [54] исследовалась роль кортикальных астроцитов на вазодилатацию пиальных артериол у новорожденных свинок, и было показано, что астроциты находятся в тесном контакте с поверхностью пиальных артериол, а также проникают в них, что было показано как в срезах, так и на изолированных артериолах. В данной работе вклад астроцитов в вазодилатацию был подтвержден с помощью селективного астроцитарного токсина L-AAA. После обработки им расширение сосудов в ответ на ADP и глутамат не происходило. Так же сохранялся расширяющий ответ на гиперкапнию и брадикинин. Пиальные артериолы отвечают расширением на добавление глутамата, NMDA, AMPA и каиновой кислоты. При этом данный эффект отменялся или значительно снижался в присутствии L-AAA, что указывает

на то, что расширение в ответ на агонисты глутаматных рецепторов обусловлено именно астроцитами. Ранее авторами было показано, что астроцит-зависимый вазодилатирующий эффект обусловлен продукцией CO [55]. На свежееизолированных и культивируемых астроцитах коры было показано, что агонисты NMDA-, AMPA-/каинатных рецепторов быстро (в течение 1 ч) увеличивают продукцию CO. При этом предполагается, что гемоксигеназа катализирует образование CO. В культуре астроцитов и ингибитор рецепторов NMDA (хлоргидроксифенилглицин, CHPG), и ингибитор AMPA (NBQX) по отдельности отменяли стимулирующий эффект глутамата на продукцию CO. Также авторы с помощью микроскопии через черепное окно показали, что глутамат, NMDA и AMPA вызывают расширение пиальных артериол, при этом AP-5 и NBQX подавляют данный эффект как в случае глутамата, так и NMDA, и AMPA. Предполагают, что активация NMDA-рецепторов и AMPA-рецепторов на астроцитах связаны, и они оказывают эффект совместно, поэтому, исключив один из них, мы прерываем цепь событий.

В исследовании Lind et al. [56] с помощью двухфотонной микроскопии в вибриссной зоне коры мышей были зарегистрированы быстрые кальциевые сигналы в отростках и ножках астроцитов в ответ на стимуляцию. Было показано, что применение низкой дозы МК-801, блокатора NMDA-рецепторов, снижало амплитуду быстрых кальциевых сигналов в нейропиле и отростках астроцитов, но не в ножках. При этом ответ мозгового кровотока сохранялся. Эти данные свидетельствуют о том, что быстрые кальциевые изменения в ножках астроцитов участвуют в регуляции кровотока в ответ на синаптическую активность.

Таким образом, астроциты играют важную роль в регуляции тонуса сосуда, участвуя в вазодилатации, регуляции кровотока и контроле вазоконстрикции. Это достигается за счет взаимодействия NMDA-рецепторов и AMPA-рецепторов на астроцитах, а также продукции CO и секреции серина.

ПАТОЛОГИИ

Гипераммониемия. С использованием клеточных кортикальных культур астроцитов было продемонстрировано, что блокирование поры NMDA-рецептора с помощью МК-801 предотвращает: аммоний-индуцированное астроцитарное набухание [57], повышение внутриклеточного кальция, фосфорилирование и нитрирование тирозиновых остатков (в том числе продукцию нитрирующих интермедиатов и активацию NF-κB) [58], а также окисление РНК [59]. Кроме того, МК-801

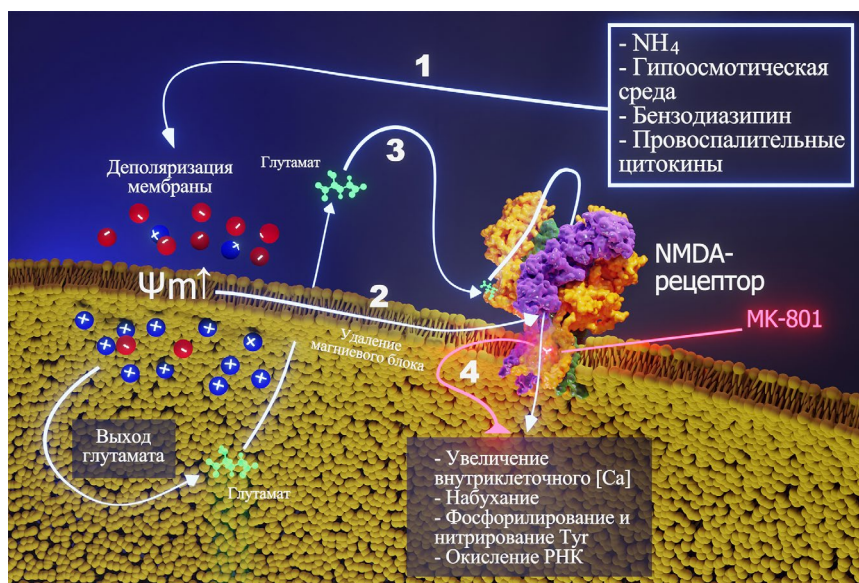


Рис. 2. Предполагаемая роль NMDA-рецепторов при гипераммониемии. 1 – Ионы аммония, воздействие гипоосмотической среды, бензодиазепины и провоспалительные цитокины вызывают деполяризацию астроцитов. 2 – Деполяризация снимает магниевый блок с NMDA-рецепторов, в результате чего происходит их активация с последующим каскадом реакций, приводящих к повышению внутриклеточного кальция, набуханию, фосфорилированию и нитрированию белков, а также окислению РНК. 3 – Мембранная деполяризация может опосредованно приводить к секреции глутамата, который, в свою очередь, активирует NMDA-рецепторы и опосредует нижеследующие эффекты. 4 – МК-801, в свою очередь, блокирует пору NMDA-рецепторов и предотвращает все эффекты, вызываемые аммонием и другими воздействиями

отменял схожие эффекты, индуцированные: гипоосмотической средой [60], бензодиазепинами [61], а также провоспалительными цитокинами, включая фактор некроза опухоли (TNF) и интерферон (IFN) [62]. В свою очередь, добавление NMDA само по себе приводило к набуханию астроцитов [57], а также вызывало схожий паттерн нитрирования тирозинов [58]. Все эти данные указывают на то, что NMDA-рецепторы играют ключевую роль на ранних этапах патогенетических изменений, происходящих в астроцитах при гипераммониемии (рис. 2). Однако причины активации NMDA-рецепторов в данных условиях остаются неизвестными. Согласно одной из гипотез, в данных условиях происходит секреция глутамата, что и приводит к активации NMDA-рецепторов. Однако существуют работы, в которых продемонстрировано, что как секреция, так и захват глутамата астроцитами являются NMDA-зависимыми процессами [34, 63]. Таким образом, накопление внеклеточного глутамата, скорее, является следствием, а не причиной активации NMDA-рецепторов астроцитов. Если это действительно так, то, возможно, в условиях гипераммониемии происходит глутамат-независимая активация NMDA-рецепторов. В таком случае в основе данного процесса может лежать деполяризация астроцитов. Было показано, что аммоний [64], гипоосмотическая среда [65], TNFα [66], а также агонисты бензодиазепиновых рецепторов периферического типа [67] могут вы-

зывать деполяризацию астроцитов. Деполяризация может приводить к снятию магниевых блоков с NMDA-рецепторов. В настоящий момент нет единого мнения касательно магниевой чувствительности NMDA-рецепторов. Однако в большинстве работ продемонстрировано отсутствие магниевых блоков, и, как следствие, токи через NMDA-рецепторы характеризуются линейным отношением ток/напряжение. Возможно, сам факт деполяризации усиливает токи, поскольку проводимость NMDA-рецепторов астроцитов, как и нейронов, возрастает по мере увеличения мембранного потенциала. В таком случае, учитывая также тот факт, что блокирование поры NMDA-рецепторов само по себе влияет на многие функции астроцитов, включая поддержание мембранного потенциала [34], регуляцию генной экспрессии [41, 42] и другие, можно предположить, что эти рецепторы на астроцитах имеют конститутивную активность, важную для поддержания нормального функционирования.

Однако нельзя исключать в данных условиях и секрецию глутамата, который также может оказывать значительное влияние на астроциты, в том числе и через NMDA-рецепторы. Его секреция происходит по крайней мере в условиях нейровоспаления, которое также является важным патогенетическим фактором при развитии печеночной энцефалопатии. В ряде работ было показано, что различные антагонисты NMDA-рецепторов, влияющие на связывание глутамата, отменяют

многие эффекты липополисахарида (ЛПС) – индуктора воспаления. Так, было показано, что ЛПС, а также NMDA и IL1 β подавляют индуцированный нейротрофическим фактором глиальной клеточной линии (GDNF) кальциевый ответ в кортикальных астроцитах, уменьшая как амплитуду, так и количество ответивших клеток [68]. Во всех случаях эффект отменялся, если добавка веществ производилась вместе с ифенпродилем – ингибитором GluN2B-содержащих рецепторов. Кроме того, ЛПС, а также ЛПС в комбинации с NMDA значительно снижали белковую экспрессию Na⁺/K⁺-АТФазы. Добавление ифенпродила вместе с воспалительными индукторами увеличивало экспрессию АТФазы выше контрольного уровня [68]. Важно отметить, что NMDA сам по себе вызывал кальциевый ответ в астроцитах, который отменялся в присутствии ифенпродила. В работе Gérard и Hansson [16] также при использовании культур кортикальных астроцитов было показано, что преинкубация астроцитов с ЛПС в течение 24 ч усиливает кальциевый ответ астроцитов на NMDA, а также увеличивает секрецию IL1 β . Данные эффекты отменялись, если ЛПС добавляли совместно либо с AP-5, либо с ифенпродилем. В еще одной работе также было показано, что ингибитор NMDA-рецепторов мемантин предотвращает индуцированное ЛПС и TNF α увеличение экспрессии провоспалительных хемокинов [69]. В данных случаях маловероятно, что антагонисты NMDA-рецептора отменяют именно воздействие ЛПС, тем более что многие его эффекты воспроизводились и при добавлении провоспалительных цитокинов, таких как IL1 или TNF. Антагонисты, скорее, отменяли действие секретируемых в ответ на ЛПС провоспалительных цитокинов. Как ранее было сказано, ингибирование поры NMDA-рецепторов с помощью МК-801 предотвращало действие IFN или TNF. Однако в данных случаях эффекты отменялись уже антагонистами, влияющими на связывание глутамата. Таким образом, в данных случаях, по всей видимости, имеет место секреция глутамата, которая, возможно, происходит в ответ на деполяризацию астроцитов. Как было показано, небольшая деполяризация астроцитов приводит к тому, что натрий-кальциевый обменник начинает работать в обратном направлении и закачивать кальций внутрь клетки, тем самым запуская кальций-зависимую секрецию глутамата [70]. Таким образом, возможно, в ответ на действие цитокинов происходит потенциал-/NMDA-зависимая секреция глутамата, который, в свою очередь, связывается с NMDA-рецепторами и влияет на кальциевые ответы и экспрессию генов.

Таким образом, NMDA-рецепторы играют важную роль в патогенезе гипераммониемии, и их активация может быть вызвана как глутамат-

зависимыми, так и глутамат-независимыми механизмами. Более полное понимание этих механизмов может способствовать разработке новых подходов к лечению гипераммониемии и связанных с ней неврологических расстройств.

Ишемия. С использованием культур кортикальных астроцитов было продемонстрировано, что в условиях ишемии значительно изменяется экспрессия GluN1-, GluN2A- и GluN2B-субъединиц NMDA-рецептора [13]. Сперва авторы измерили уровень мРНК данных субъединиц в течение 6-часовой ишемии. Увеличение экспрессии *Grin1* и *Grin2a* отмечается уже спустя 2 ч воздействия ишемии. В случае *Grin1* наибольшая экспрессия отмечалась спустя 2 ч и опускалась практически до начальных значений через 6 ч после начала воздействия. Экспрессия *Grin2b* была наибольшей через 4 ч и сохранялась на высоком уровне до окончания воздействия. В свою очередь, экспрессия *Grin2a* оставалась неизменной в первые 4 ч, а к концу воздействия – даже снижалась на 15–20%. Далее, авторы показали, что в течение 3 ч после 3-часовой ишемии не отмечается значительных изменений в экспрессии *Grin2a* и *Grin2b*, при этом экспрессия *Grin1* увеличивалась спустя 3 ч после прекращения ишемических условий. Кроме того, авторы с помощью вестерн-блот-анализа изучили изменения экспрессии NOS1 (NOS1 располагается ниже по сигнальному каскаду NMDA-рецептора) при ишемии. Было обнаружено, что происходит увеличение экспрессии NOS1, которое отменяется в присутствии МК-801. Эти данные говорят об активации NMDA-рецепторов астроцитов в условиях ишемии и запуске NMDA-рецептор-опосредованных сигнальных каскадов [13]. В отличие от кортикальных астроцитов, данные касательно экспрессии NMDA-рецепторов на астроцитах гиппокампа неоднозначны. В работе Krebs et al. [6] с использованием иммуногистохимии экспрессия GluN2B-субъединицы в области CA1 и основании гиппокампа детектировалась в нейронах, но не в астроцитах. Однако экспрессия GluN2 и GluN1 в астроцитах появлялась после ишемия-индуцированной клеточной гибели в этих регионах. В гиппокампальных культурах 5-минутная аноксия также приводила к экспрессии GluN2B и GluN1 в астроцитах спустя несколько дней. Формирование функционально активного рецептора подтверждалось данными кальциевого имиджинга, согласно которым NMDA вызывал кальциевый ответ в астроцитах, подвергшихся аноксии. Таким образом, как в кортикальных, так и в гиппокампальных астроцитах в результате ишемии происходит повышение экспрессии NMDA-рецепторов на астроцитах.

Повышение экспрессии NMDA-рецепторов на астроцитах в условиях ишемии может приводить

к разным последствиям, связанным с дополнительным притоком кальция в эти клетки. Одной из причин повышения кальция в условиях ишемии может быть активация NMDA-рецепторов продуктами деградации эластина (elastin-derived peptides (EDP)), которые присутствуют в здоровом мозге, но их концентрация может значительно повышаться при ишемии. В недавних работах было показано, что один из EDP, гексапептид VGVAPG, способен приводить к увеличению внутриклеточного кальция и повышению содержания активных форм кислорода (АФК) в мышинных астроцитах в культуре [71, 72]. Авторы показали, что как повышения кальция, так и АФК отменялись в присутствии ингибиторов NMDA-рецепторов, потенциал-зависимых кальциевых каналов и Src-киназы.

Таким образом, в условиях ишемии происходит увеличение экспрессии различных субъединиц NMDA-рецептора на астроцитах. Однако причины подобных изменений, как и последствия увеличения этих рецепторов на астроцитах, остаются не выясненными.

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей потерей памяти и когнитивными нарушениями. В настоящее время большое внимание уделяется изучению роли глияльных клеток, в частности астроцитов, в патогенезе БА. Одним из ключевых факторов, способствующих развитию БА, является нарушение гомеостаза глутамата, основного медиатора возбуждающих синапсов в ЦНС. В этом контексте особое значение приобретают NMDA-рецепторы, которые экспрессируются не только на нейронах, но и на астроцитах. Удивительно, что, в отличие от NMDA-рецепторов нейронов, активация которых известна как фактор, сопряженный с нейродегенерацией, активация астроцитарных NMDA-рецепторов, по-видимому, может оказывать защитное влияние на синапсы. В одном исследовании было показано, что использование блокаторов GluN2A и GluN2B, содержащих NMDA-рецепторы, усугубляет токсическое действие бета-амилоида (Аβ), выражающееся в значительном снижении количества таких синаптических белков, как PSD95 и синаптофизин, что было измерено с помощью иммуноцитохимических методов [17]. Кроме того, было показано, что предварительная обработка астроцитов с NMDA перед воздействием Аβ1-40 предотвращала снижение PSD-95 и синаптофизина, вызванное Аβ. Авторы также показали, что после обработки клеток бета-амилоидом в культуральной жидкости повышается концентрация фактора роста нервов β (β-NGF), при этом использование ингибитора NMDA-рецепторов отменяет повышение концентрации этого белка. Таким образом, авторы предполагают, что активация

NMDA-рецепторов астроцитов оказывает синаптопротекторный эффект именно за счет стимуляции секреции данного фактора роста, поскольку, как показывают ряд недавних исследований, он может защищать синапсы от токсического действия Аβ [73, 74]. В более позднем исследовании той же группы авторов с помощью селективного нокдауна GluN2A-субъединицы в астроцитах было подтверждено, что сниженный уровень астроцитарного GluN2A может противодействовать Аβ-индуцированному компенсаторно-защитному повышению NGF посредством регуляции pNF-κB, фурина и VAMP3, которые модулируют синтез, созревание и секрецию NGF соответственно [75].

Таким образом, исследования свидетельствуют о том, что астроцитарные NMDA-рецепторы могут играть важную роль в патогенезе БА, и их модуляция может представлять собой перспективное направление для разработки новых подходов к лечению этого заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

NMDA-рецепторы играют важную роль в ЦНС, и их экспрессия не ограничивается нейронами. Астроцитарные NMDA-рецепторы запускают различные внутриклеточные каскады, влияющие на экспрессию генов и работу митохондрий. Кроме того, эти NMDA-рецепторы вовлечены в нейроастроцитарные и астро-васкулярные взаимодействия, а также обладают механо- и pH-чувствительностью. Однако до полного понимания функций NMDA-рецепторов астроцитов еще далеко и остается много вопросов. Например, так и нет однозначного ответа касательно возможного метаболитного действия при активации данных рецепторов. Действительно ли этот путь активации реализуется в астроцитах, и если да, то от каких условий это зависит? Кроме того, есть основания полагать, что NMDA-рецепторы оказывают свое влияние на астроциты даже без связывания агониста. Возможно, их конститутивная активность сама по себе регулирует многие физиологические показатели. Таким образом, тема NMDA-рецепторов астроцитов в настоящий момент находится только на начальном этапе, где исследования в большинстве своем ограничиваются демонстрацией эффекта на астроциты в результате активации или ингибирования NMDA-рецепторов. Во многом это связано с тем, что в срезах или смешанных культурах сложно отделить эффекты астроцитарных NMDA-рецепторов от нейрональных, и поскольку нейрональным рецепторам уделяется больше внимания, ученые склонны интерпретировать полученные с использованием агонистов

и антагонистов NMDA-рецепторов эффекты с точки зрения их возможного влияния на нейроны. При этом возможные эффекты, опосредованные астроцитами, в таких экспериментах игнорируются. Однако, как показано в данном обзоре, как нейрональные, так и астроцитарные NMDA-рецепторы играют важную роль при многих физиологических и патологических процессах и требуют дальнейшего пристального изучения.

Вклад авторов. А.М. Косенков – написание основного текста статьи; С.Г. Гайдин – помощь в кон-

цептуализации материала; С.А. Майоров – оформление рисунков, редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00609-24-01 (№ 1022080100047-5-1.6.4 «Нейропротекторные препараты нового поколения»).

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. Karakas, E., and Furukawa, H. (2014) Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel, *Science*, **344**, 992-997, <https://doi.org/10.1126/science.1251915>.
2. Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., and Paoletti, P. (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines, *EMBO J.*, **30**, 3134-3146, <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.203>.
3. Lituma, P. J., Kwon, H.-B., Alviña, K., Luján, R., and Castillo, P. E. (2021) Presynaptic NMDA receptors facilitate short-term plasticity and BDNF release at hippocampal mossy fiber synapses, *eLife*, **10**, <https://doi.org/10.7554/eLife.66612>.
4. Li, L.-J., Hu, R., Lujan, B., Chen, J., Zhang, J.-J., Nakano, Y., Cui, T.-Y., Liao, M.-X., Chen, J.-C., Man, H.-Y., Feng, H., and Wan, Q. (2016) Glycine potentiates AMPA receptor function through metabotropic activation of GluN2A-containing NMDA receptors, *Front. Mol. Neurosci.*, **9**, 102, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00102>.
5. Zhang, X., Zhang, J., and Chen, C. (2009) Long-term potentiation at hippocampal perforant path-dentate astrocyte synapses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**, 326-330, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.005>.
6. Krebs, C., Fernandes, H. B., Sheldon, C., Raymond, L. A., and Baimbridge, K. G. (2003) Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia *in vivo* and anoxia *in vitro*, *J. Neurosci.*, **23**, 3364-3372, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03364.2003>.
7. Skowrońska, K., Kozłowska, H., and Albrecht, J. (2020) Neuron-derived factors negatively modulate ryanodine receptor-mediated calcium release in cultured mouse astrocytes, *Cell Calcium*, **92**, 102304, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102304>.
8. Montes de Oca Balderas, P., and Aguilera, P. (2015) A metabotropic-like flux-independent NMDA receptor regulates Ca^{2+} exit from endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane potential in cultured astrocytes, *PLoS One*, **10**, e0126314, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126314>.
9. Lee, M.-C., Ting, K. K., Adams, S., Brew, B. J., Chung, R., and Guillemain, G. J. (2010) Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes, *PLoS One*, **5**, e14123, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014123>.
10. Rusnakova, V., Honsa, P., Dzamba, D., Ståhlberg, A., Kubista, M., and Anderova, M. (2013) Heterogeneity of astrocytes: from development to injury – single cell gene expression, *PLoS One*, **8**, e69734, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069734>.
11. Dzamba, D., Honsa, P., Valny, M., Kriska, J., Valihrach, L., Novosadova, V., Kubista, M., and Anderova, M. (2015) Quantitative analysis of glutamate receptors in glial cells from the cortex of GFAP/EGFP mice following ischemic injury: focus on NMDA receptors, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **35**, 1187-1202, <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0212-8>.
12. Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., and Kirchhoff, F. (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors, *FASEB J.*, **15**, 1270-1272, <https://doi.org/10.1096/fj.00-0439fje>.
13. Zhou, Y., Li, H. L., Zhao, R., Yang, L. T., Dong, Y., Yue, X., Ma, Y. Y., Wang, Z., Chen, J., Cui, C. L., and Yu, A. C.-H. (2010) Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post-ischemia, *Neurochem. Res.*, **35**, 2124-2134, <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0325-x>.
14. Jimenez-Blasco, D., Santofimia-Castaño, P., Gonzalez, A., Almeida, A., and Bolaños, J. P. (2015) Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway, *Cell Death Differ.*, **22**, 1877-1889, <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.49>.
15. Jiang, J., Yan, M., Lv, Q., Cheng, C., Li, X., Guo, Z., Tao, T., and Shen, A. (2010) Inhibition of nitric oxide-induced nuclear localization of CAPON by NMDA receptor antagonist in cultured rat primary astrocytes, *Neurochem. Int.*, **56**, 561-568, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.12.019>.

16. Gérard, F., and Hansson, E. (2012) Inflammatory activation enhances NMDA-triggered Ca^{2+} signalling and IL-1 β secretion in primary cultures of rat astrocytes, *Brain Res.*, **1473**, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.032>.
17. Li, Y., Chang, L., Song, Y., Gao, X., Roselli, F., Liu, J., Zhou, W., Fang, Y., Ling, W., Li, H., Almeida, O. F. X., and Wu, Y. (2016) Astrocytic GluN2A and GluN2B oppose the synaptotoxic effects of amyloid- β 1-40 in hippocampal cells, *J. Alzheimers Dis.*, **54**, 135-148, <https://doi.org/10.3233/JAD-160297>.
18. Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A., and Verkhratsky, A. (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes, *J. Neurosci.*, **26**, 2673-2683, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006>.
19. Palygin, O., Lalo, U., Verkhratsky, A., and Pankratov, Y. (2010) Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca^{2+} signalling in cortical astrocytes, *Cell Calcium*, **48**, 225-231, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.004>.
20. Palygin, O., Lalo, U., and Pankratov, Y. (2011) Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes, *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 1755-1766, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01374.x>.
21. Kondoh, T., Nishizaki, T., Aihara, H., and Tamaki, N. (2001) NMDA-responsible, APV-insensitive receptor in cultured human astrocytes, *Life Sci.*, **68**, 1761-1767, [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)00971-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)00971-7).
22. Serrano, A., Robitaille, R., and Lacaille, J.-C. (2008) Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus, *Glia*, **56**, 1648-1663, <https://doi.org/10.1002/glia.20717>.
23. Zhang, Q., Hu, B., Sun, S., and Tong, E. (2003) Induction of increased intracellular calcium in astrocytes by glutamate through activating NMDA and AMPA receptors, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, **23**, 254-257, <https://doi.org/10.1007/bf02829506>.
24. Hu, B., Sun, S.-G., and Tong, E.-T. (2004) NMDA and AMPA receptors mediate intracellular calcium increase in rat cortical astrocytes, *Acta Pharmacol. Sin.*, **25**, 714-720.
25. Hamilton, N., Vayro, S., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., Robbins, J., Gorecki, D. C., and Butt, A. M. (2008) Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes, *Glia*, **56**, 734-749, <https://doi.org/10.1002/glia.20649>.
26. Gunnarson, E., Zelenina, M., Axehult, G., Song, Y., Bondar, A., Krieger, P., Brismar, H., Zelenin, S., and Aperia, A. (2008) Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability, *Glia*, **56**, 587-596, <https://doi.org/10.1002/glia.20627>.
27. Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., and Melone, M. (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes, *Glia*, **17**, 254-258, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199607\)17:3<254::AID-GLIA7>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199607)17:3<254::AID-GLIA7>3.0.CO;2-0).
28. Weiling, N. L., Lohman, A. W., Rakai, B. D., Ma, E. M. M., Bialecki, J., Maslieieva, V., Rilea, T., Bandet, M. V., Ikuta, N. T., Scott, L., Colicos, M. A., Teskey, G. C., Winship, I. R., and Thompson, R. J. (2016) Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity, *Nat. Neurosci.*, **19**, 432-442, <https://doi.org/10.1038/nn.4236>.
29. Kato, H., Narita, M., Miyatake, M., Yajima, Y., and Suzuki, T. (2006) Role of neuronal NR2B subunit-containing NMDA receptor-mediated Ca^{2+} influx and astrocytic activation in cultured mouse cortical neurons and astrocytes, *Synapse*, **59**, 10-17, <https://doi.org/10.1002/syn.20213>.
30. Karavanova, I., Vasudevan, K., Cheng, J., and Buonanno, A. (2007) Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice, *Mol. Cell Neurosci.*, **34**, 468-480, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.12.001>.
31. Ravikrishnan, A., Gandhi, P. J., Shelkar, G. P., Liu, J., Pavuluri, R., and Dravid, S. M. (2018) Region-specific expression of NMDA receptor GluN2C subunit in parvalbumin-positive neurons and astrocytes: analysis of GluN2C expression using a novel reporter model, *Neuroscience*, **380**, 49-62, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.011>.
32. Alsaad, H. A., DeKorver, N. W., Mao, Z., Dravid, S. M., Arikath, J., and Monaghan, D. T. (2019) In the telencephalon, GluN2C NMDA receptor subunit mRNA is predominately expressed in glial cells and GluN2D mRNA in interneurons, *Neurochem. Res.*, **44**, 61-77, <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2526-7>.
33. Chan, P. H., Chu, L., and Chen, S. (1990) Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary cell culture, *J. Neurosci. Res.*, **25**, 87-93, <https://doi.org/10.1002/jnr.490250111>.
34. Longuemare, M. C., Keung, E. C., Chun, S., Sharp, F. R., Chan, P. H., and Swanson, R. A. (1996) MK-801 reduces uptake and stimulates efflux of excitatory amino acids via membrane depolarization, *Am. J. Physiol.*, **270**, C1398-C1404, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.5.C1398>.
35. Belin, S., Maki, B. A., Catlin, J., Rein, B. A., and Popescu, G. K. (2022) Membrane stretch gates NMDA receptors, *J. Neurosci.*, **42**, 5672-5680, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0350-22.2022>.
36. Johnson, L. R., Battle, A. R., and Martinac, B. (2019) Remembering mechanosensitivity of NMDA receptors, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 533, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00533>.

37. Maneshi, M. M., Maki, B., Gnanasambandam, R., Belin, S., Popescu, G. K., Sachs, F., and Hua, S. Z. (2017) Mechanical stress activates NMDA receptors in the absence of agonists, *Sci. Rep.*, **7**, 39610, <https://doi.org/10.1038/srep39610>.
38. Singh, P., Doshi, S., Spaethling, J. M., Hockenberry, A. J., Patel, T. P., Geddes-Klein, D. M., Lynch, D. R., and Meaney, D. F. (2012) N-Methyl-D-aspartate receptor mechanosensitivity is governed by C terminus of NR2B subunit, *J. Biol. Chem.*, **287**, 4348, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253740>.
39. Montes de Oca Balderas, P., Matus Núñez, M., Picones, A., and Hernández-Cruz, A. (2020) NMDAR in cultured astrocytes: flux-independent pH sensor and flux-dependent regulator of mitochondria and plasma membrane-mitochondria bridging, *FASEB J.*, **34**, 16622-16644, <https://doi.org/10.1096/fj.202001300R>.
40. Stephen, T.-L., Higgs, N. F., Sheehan, D. F., Al Awabdh, S., López-Doménech, G., Arancibia-Carcamo, I. L., and Kittler, J. T. (2015) Miro1 regulates activity-driven positioning of mitochondria within astrocytic processes apposed to synapses to regulate intracellular calcium signaling, *J. Neurosci.*, **35**, 15996-16011, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2068-15.2015>.
41. Obara-Michlewska, M., Tuszyńska, P., and Albrecht, J. (2013) Ammonia upregulates kynurenine aminotransferase II mRNA expression in rat brain: a role for astrocytic NMDA receptors? *Metab. Brain Dis.*, **28**, 161-165, <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9353-3>.
42. Obara-Michlewska, M., Ruskiewicz, J., Zielińska, M., Verkhatsky, A., and Albrecht, J. (2015) Astroglial NMDA receptors inhibit expression of Kir4.1 channels in glutamate-overexposed astrocytes *in vitro* and in the brain of rats with acute liver failure, *Neurochem. Int.*, **88**, 20-25, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.006>.
43. Yu, W., Zhu, H., Wang, Y., Li, G., Wang, L., and Li, H. (2015) Reactive transformation and increased BDNF signaling by hippocampal astrocytes in response to MK-801, *PLoS One*, **10**, e0145651, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145651>.
44. Yu, W., Fang, H., Zhang, L., Hu, M., He, S., Li, H., and Zhu, H. (2021) Reversible changes in BDNF expression in MK-801-induced hippocampal astrocytes through NMDAR/PI3K/ERK signaling, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.672136>.
45. Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Czarnecka, A., Dąbrowska, K., Zielińska, M., and Albrecht, J. (2019) Persistent overexposure to N-methyl-D-aspartate (NMDA) calcium-dependently downregulates glutamine synthetase, aquaporin 4, and Kir4.1 channel in mouse cortical astrocytes, *Neurotox. Res.*, **35**, 271-280, <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9958-3>.
46. Kommers, T., Rodnight, R., Boeck, C., Vendite, D., Oliveira, D., Horn, J., Oppelt, D., and Wofchuk, S. (2002) Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein is stimulated by glutamate via NMDA receptors in cortical micro-slices and in mixed neuronal/glial cell cultures prepared from the cerebellum, *Dev. Brain Res.*, **137**, 139-148, [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(02\)00434-0](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00434-0).
47. Kommers, T., Rodnight, R., Oppelt, D., Oliveira, D., and Wofchuk, S. (1999) The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor, *Neuroreport*, **10**, <https://doi.org/10.1097/00001756-199907130-00023>.
48. Benz, B., Grima, G., and Do, K. Q. (2004) Glutamate-induced homocysteic acid release from astrocytes: possible implication in glia-neuron signaling, *Neuroscience*, **124**, 377-386, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.067>.
49. Pankratov, Y. V., and Krishtal, O. A. (2003) Distinct quantal features of AMPA and NMDA synaptic currents in hippocampal neurons: implication of glutamate spillover and receptor saturation, *Biophys. J.*, **85**, 3375-3387.
50. Letellier, M., Park, Y. K., Chater, T. E., Chipman, P. H., Gautam, S. G., Oshima-Takago, T., and Goda, Y. (2016) Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2685-E2694, <https://doi.org/10.1073/pnas.1523717113>.
51. Chipman, P. H., Fung, C. C. A., Pazo Fernandez, A., Sawant, A., Tedoldi, A., Kawai, A., Ghimire Gautam, S., Kurosawa, M., Abe, M., Sakimura, K., Fukai, T., and Goda, Y. (2021) Astrocyte GluN2C NMDA receptors control basal synaptic strengths of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the stratum radiatum, *Elife*, **10**, e70818, <https://doi.org/10.7554/eLife.70818>.
52. Mehina, E. M. F., Murphy-Royal, C., and Gordon, G. R. (2017) Steady-state free Ca²⁺ in astrocytes is decreased by experience and impacts arteriole tone, *J. Neurosci.*, **37**, 8150-8165, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0239-17.2017>.
53. Stobart, J. L. L., Lu, L., Anderson, H. D. I., Mori, H., and Anderson, C. M. (2013) Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3149-3154, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215929110>.
54. Parfenova, H., Tcheranova, D., Basuroy, S., Fedinec, A. L., Liu, J., and Leffler, C. W. (2012) Functional role of astrocyte glutamate receptors and carbon monoxide in cerebral vasodilation response to glutamate, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **302**, H2257-H2266, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01011.2011>.

55. Leffler, C., Parfenova, H., Fedinec, A., Basuroy, S., and Tcheranova, D. (2006) Contributions of astrocytes and CO to pial arteriolar dilation to glutamate in newborn pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**, H2897-H2904, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00722.2006>.
56. Lind, B. L., Jessen, S. B., Lønstrup, M., Joséphine, C., Bonvento, G., and Lauritzen, M. (2018) Fast Ca^{2+} responses in astrocyte end-feet and neurovascular coupling in mice, *Glia*, **66**, 348-358, <https://doi.org/10.1002/glia.23246>.
57. Lachmann, V., Görg, B., Bidmon, H. J., Keitel, V., and Häussinger, D. (2013) Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner, *Arch. Biochem. Biophys.*, **536**, 143-151, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.05.004>.
58. Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H. J., Herrmann, A., Butterworth, R. F., Zilles, K., and Häussinger, D. (2002) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes, *FASEB J.*, **16**, 739-741, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0862fje>.
59. Görg, B., Qvarckhava, N., Keitel, V., Bidmon, H. J., Selbach, O., Schliess, F., and Häussinger, D. (2008) Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain *in vivo*, *Hepatology*, **48**, 567-579, <https://doi.org/10.1002/hep.22345>.
60. Schliess, F., Foster, N., Görg, B., Reinehr, R., and Häussinger, D. (2004) Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes, *Glia*, **47**, 21-29, <https://doi.org/10.1002/glia.20019>.
61. Görg, B., Foster, N., Reinehr, R., Bidmon, H. J., Höngen, A., Häussinger, D., and Schliess, F. (2003) Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes, *Hepatology*, **37**, 334-342, <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50061>.
62. Görg, B., Bidmon, H. J., Keitel, V., Foster, N., Goerlich, R., Schliess, F., and Häussinger, D. (2006) Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **449**, 104-114, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.012>.
63. Ohara, K., Aoyama, M., Fujita, M., Sobue, K., and Asai, K. (2009) Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes, *Neurosci. Lett.*, **462**, 109-112, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.090>.
64. Allert, N., Köller, H., and Siebler, M. (1998) Ammonia-induced depolarization of cultured rat cortical astrocytes, *Brain Res.*, **782**, 261-270, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01288-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01288-2).
65. Häussinger, D., and Schliess, F. (2005) Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy, *Neurochem. Int.*, **47**, 64-70, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.04.008>.
66. Köller, H., Thiem, K., and Siebler, M. (1996) Tumour necrosis factor- α increases intracellular Ca^{2+} and induces a depolarization in cultured astroglial cells, *Brain*, **119** (Pt 6), 2021-2027, <https://doi.org/10.1093/brain/119.6.2021>.
67. Hertz, L., Zhao, Z., and Chen, Y. (2006) The astrocytic GABA(A)/benzodiazepine-like receptor: the Joker receptor for benzodiazepine-mimetic drugs? *Recent Pat. CNS Drug Discov.*, **1**, 93-103, <https://doi.org/10.2174/157488906775245273>.
68. Lundborg, C., Westerlund, A., Björklund, U., Biber, B., and Hansson, E. (2011) Ifenprodil restores GDNF-evoked Ca^{2+} signalling and Na^+/K^+ -ATPase expression in inflammation-pretreated astrocytes, *J. Neurochem.*, **119**, 686-696, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07465.x>.
69. Sühs, K.-W., Gudi, V., Eckermann, N., Fairless, R., Pul, R., Skripuletz, T., and Stangel, M. (2016) Cytokine regulation by modulation of the NMDA receptor on astrocytes, *Neurosci. Lett.*, **629**, 227-233, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.016>.
70. Paluzzi, S., Alloisio, S., Zappettini, S., Milanese, M., Raiteri, L., Nobile, M., and Bonanno, G. (2007) Adult astroglia is competent for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-operated exocytotic glutamate release triggered by mild depolarization, *J. Neurochem.*, **103**, 1196-1207, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04826.x>.
71. Szychowski, K. A., and Gmiński, J. (2019) Specific role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in elastin-derived VGVAPG peptide-dependent calcium homeostasis in mouse cortical astrocytes *in vitro*, *Sci. Rep.*, **9**, 20165, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56781-5>.
72. Szychowski, K. A., and Gmiński, J. (2019) The VGVAPG peptide regulates the production of nitric oxide synthases and reactive oxygen species in mouse astrocyte cells *in vitro*, *Neurochem. Res.*, **44**, 1127-1137, <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02746-z>.
73. Numakawa, T., and Kajihara, R. (2023) Neurotrophins and other growth factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Life (Basel)*, **13**, <https://doi.org/10.3390/life13030647>.
74. Amadoro, G., Latina, V., Balzamino, B. O., Squitti, R., Varano, M., Calissano, P., and Micera, A. (2021) Nerve growth factor-based therapy in Alzheimer's disease and age-related macular degeneration, *Front. Neurosci.*, **15**, 735928, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.735928>.
75. Du, Z., Song, Y., Chen, X., Zhang, W., Zhang, G., Li, H., Chang, L., and Wu, Y. (2021) Knockdown of astrocytic Grin2a aggravates β -amyloid-induced memory and cognitive deficits through regulating nerve growth factor, *Aging Cell*, **20**, <https://doi.org/10.1111/acel.13437>.

FEATURES OF ASTROCYTIC NMDA RECEPTORS

Review

A. M. Kosenkov*, S. A. Maiorov, and S. G. Gaidin

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center
“Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: kosenckov406@yandex.ru*

The astrocytic NMDA receptor is a heterotetramer consisting of 7 different subunits. Receptor expression and properties are largely determined by its subunit composition. Astrocytic NMDA receptors have their own functional features – they are weakly sensitive to magnesium ions and have low calcium permeability. Activation of astrocytic NMDA receptors plays an important role in regulating intracellular processes such as gene expression and mitochondrial function. NMDA receptors are involved in astrocytic calcium signaling and can be activated by both ionotropic and metabotropic pathways. Astrocytic NMDA receptors are involved in neuroglial interactions, affecting synaptic plasticity. They are also involved in astrovascular interactions and play a role in regulating vascular tone. Astrocytic NMDA receptors participate in pathological conditions such as ischemia and hyperammonemia. Their blockade prevents negative changes in astrocytes in these pathologies.

Keywords: astrocytes, NMDA receptors, neuroglial interactions, neuropathology

ПОРООБРАЗУЮЩИЕ БЕЛКИ VDAC ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ: ИХ РЕГУЛЯЦИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Обзор

© 2024 Н.В. Белослудцева^{1,2}, М.В. Дубинин², К.Н. Белослудцев^{2*}

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
192290 Пущино, Московская обл., Россия

² ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»,
424000 Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, Россия; электронная почта: bekonik@gmail.com

Поступила в редакцию 16.04.2024

После доработки 12.05.2024

Принята к публикации 27.05.2024

Потенциал-зависимые анионные каналы (VDAC – voltage-dependent anion channels) внешней мембраны митохондрий – семейство порообразующих β -баррельных белков (VDAC1–3), осуществляющих управляемую «фильтрацию» малых молекул и ионов между цитоплазмой и митохондриями. Возможность временных конформационных переходов между закрытым и открытым состояниями белков VDAC, а также их взаимодействие с целым рядом цитоплазматических и митохондриальных белков позволяет данным каналам не только регулировать мембранную проницаемость для основных метаболитов и ионов, но и участвовать в управлении жизненно важными внутриклеточными процессами и патологическими состояниями. Настоящая работа посвящена анализу современных данных о предполагаемой молекулярной структуре, механизмах регуляции и патофизиологической роли белков семейства VDAC, а также возможных будущих направлениях в этой области исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: VDAC, митохондрии, мембранный транспорт, клеточная гибель, рак, сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания.

DOI: 10.31857/S0320972524060075 EDN: XLYAVN

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная активность большинства клеток эукариот обеспечивается постоянным производством энергии митохондриями. Кроме производства энергии в форме молекул АТФ, эти органеллы вовлечены в целый ряд внутриклеточных процессов, включая продукцию активных форм кислорода, синтез метаболитов, передачу сигналов, поддержание ионного гомеостаза и регуляцию центральных метаболических путей. В свою очередь, эти процессы лежат в основе таких физиологических и патологических явлений, как термо-

генез, пролиферация клеток, клеточная смерть, воспаление, ишемическое повреждение, нейродегенерация и другие. Дисфункция митохондрий является ранним признаком большинства клеточных патологий и в ряде случаев рассматривается как основной патогенетический фактор [1–3].

Разнообразие функций, выполняемых митохондриями в клетках, обусловлено уникальной ультраструктурой этих органелл, в особенности наличием двух мембран, разграничивающих межмембранное пространство [1]. Отличительной особенностью внутренней митохондриальной мембраны является, среди прочего, её избирательная проницаемость для ионов и метаболитов. В отличие от неё, внешняя митохондриальная мембрана обеспечивает менее селективное, но управляемое перемещение различных малых гидрофильных молекул и ионов между цитоплазмой и межмембранным пространством митохондрий, модулируя их общую доступность для митохон-

Принятые сокращения: БАС – боковой амиотрофический склероз; МАМ – mitochondria-associated membranes, мембраны, ассоциированные с митохондриями; МРТ-пора – митохондриальная пора; SOD1 – супероксиддисмутаза 1.

* Адресат для корреспонденции.

дриальных переносчиков и ферментов. Такая первичная контролируемая «фильтрация» на уровне внешней мембраны обеспечивается семейством потенциал-зависимых анионных каналов (VDAC – voltage-dependent anion channels), построенных из антипараллельных амфипатических тяжей так называемых β -баррельных белков и имеющих вид бочки (баррель) [4–7]. VDAC, или пориновые каналы, были обнаружены в митохондриях *Paramecium aurelia* в 1976 г. [8]. Исследования показали, что эти белки являются доминирующими белками внешней митохондриальной мембраны (до 35%) и представляют собой порообразующие каналы, проницаемость которых для разных ионов и промежуточных метаболитов модулируется с помощью трансмембранного потенциала, что и дало название этим каналам [9]. Возможность временных конформационных переходов белков VDAC из закрытых состояний в открытое, а также их взаимодействие с целым рядом цитоплазматических и митохондриальных белков позволяет этим каналам не только управлять проницаемостью внешних мембран органелл для ключевых метаболитов и ионов, но и участвовать в регуляции жизненно важных процессов для клетки, начиная от выработки энергии и до момента клеточной гибели. В связи с этим неудивительно, что семейство белков VDAC рассматривается в качестве основных фармакологических мишеней для терапии связанных с митохондриями заболеваний, к которым можно отнести нейродегенеративные и сердечно-сосудистые патологии, различные виды онкологических заболеваний, сахарный диабет, аутоиммунные заболевания, воспаление и другие [4, 7, 10–13].

Настоящий обзор посвящён анализу современных представлений о молекулярной структуре и механизмах регуляции белков VDAC, а также их роли при физиологических и патологических состояниях клетки.

ИЗОФОРМЫ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ VDAC

Потенциал-зависимые анионные каналы или митохондриальные порины – это семейство β -баррельных белков внешней мембраны митохондрий, которые кодируются тремя разными генами, имеющими более чем 70%-ное сходство нуклеотидной последовательности в эукариотических клетках. Гены, кодирующие три изоформы белка человека, hVDAC1, hVDAC2 и hVDAC3, локализуются на пятой, десятой и восьмой хромосомах соответственно. Эволюционный анализ показывает, что эти изоформы появились в результате дупликации генов у позвоночных, причём *Vdac3* первым отделился от первичного *Vdac* и является старейшим из

трёх генов-паралогов [14–16]. Все три изоформы образуют практически идентичные селективные и потенциал-управляемые ионные каналы для нуклеотидов (ATP, ADP, AMP, NADH), анионных метаболитов (пируват, глутамат, сукцинат, малат) и липидов. Кроме этого, через пориновые каналы могут проходить неорганические ионы (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) и органические катионы [10, 17–21] (рис. 1). Большое количество белков VDAC во внешней мембране (10^3 – 10^4 /мкм²) и высокая скорость диффузии метаболитов (10^2 – 10^3 /мс) и ионов (10^6 ионов/мс) в митохондрии обеспечивает постоянный обмен веществами между цитоплазмой и органеллами [22]. Молекулярная масса трёх белковых изоформ колеблется от 30 до 35 кДа (VDAC1 и VDAC3 состоят из 280 аминокислотных остатков, VDAC2 – из 291), что предполагает высокую степень их гомологии [20]. Методами рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса и криоэлектронной микроскопии было показано, что VDAC1 и VDAC2 имеют «бочонкообразную» структуру, состоящую из 19 β -нитевых полипептидных цепей, в основном антипараллельных (за исключением β -слоев 1 и 19). N-Конец белков является α -спиральным и локализован внутри канала. Высококонсервативная последовательность в структуре белковой молекулы VDAC1, богатая остатками глицина (21Gly-Tyr-Gly-Phe-Gly25), соединяет N-концевой домен с первым β -слоем, что обеспечивает возможность движения N-концевого α -спирального участка в пору и из неё и, соответственно, управление воротным механизмом [23–26]. Трёхмерная структура VDAC3 пока не определена. Внутреннее пространство VDAC в открытом состоянии является водной порой диаметром 3–3,8 нм, через которую могут проникать соединения с массой до 5 кДа. Когда N-концевая спираль расположена внутри поры, её диаметр может сокращаться до 1,5 нм [22–25].

Три изоформы VDAC широко представлены во всех тканях млекопитающих, причём самый высокий уровень экспрессии пориновых белков наблюдается в скелетной мускулатуре [16, 27]. После терминации трансляции готовые белки доставляются к внешней мембране митохондрий, что обеспечивается наличием специфической сигнальной последовательности на N-конце. Стоит отметить, что при ряде патологий, сопровождающихся сверхэкспрессией пориновых каналов, направленный транспорт этих белков в клетках может нарушаться, вследствие чего они начинают встраиваться в цитоплазматические мембраны [28]. Методами иммуноблоттинга и ПЦР в реальном времени было показано, что в норме уровни экспрессии белков VDAC1 и VDAC2 сопоставимы, в то время как содержание белка VDAC3 в большинстве тканей и органов млекопитаю-

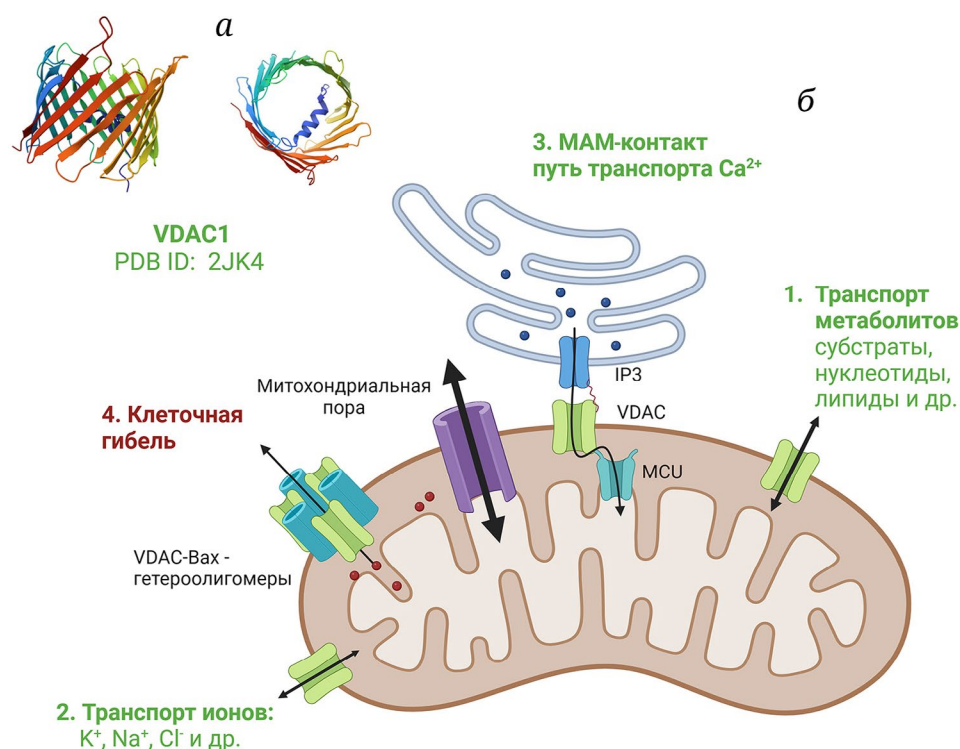


Рис. 1. Структура VDAC1 (PDB ID: 2JK4) (а) и его функциональная активность (б). В здоровой клетке VDAC осуществляет транспорт метаболитов и ионов через внешнюю мембрану, взаимодействуя с эндоплазматическим ретикулумом, участвует в регуляции концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. При патологических условиях VDAC является структурным компонентом митохондриальной поры (MPT-поры) или может участвовать в олигомеризации с проапоптотическими белками семейства Bcl2. Это может привести к митохондриальной дисфункции и клеточной гибели. Рисунок создан в сервисе Biorender.com

щих, за исключением семенников, существенно ниже [27]. Однако согласно данным атласов экспрессии (например, Expression Atlas EMBL-EBI), ген, кодирующий VDAC3, имеет достоверно более высокий уровень транскрипции во многих тканях по сравнению с генами, кодирующими две другие изоформы (рис. 2), что может быть связано с высокой активностью промотора гена VDAC3. Кроме того, промотор VDAC3 содержит полипиримидиновый участок, который считается специфической мишенью окислительного стресса [29]. Таким образом, количественное соотношение трёх изоформ VDAC в клетке регулируется за счёт разной степени стабильности их транскриптов, причём поддержание высокого уровня экспрессии VDAC3 необходимо для быстрого реагирования на меняющиеся внешние условия [30]. Подтверждением этого могут служить обнаруженные недавно особенности локализации трёх изоформ во внешней митохондриальной мембране. Показано, что hVDAC1 и hVDAC2 обычно колокализированы в одних и тех же относительно больших доменах ($300\text{--}900\text{ нм}^2$) внешней мембраны, в то время как hVDAC3 равномерно распределён по всей её площади [31]. Важно отметить также и различия в действии ряда факторов регуляции транскрипции, активность которых для промотора каждого гена

может меняться в зависимости от условий. Более подробные сведения об этом можно найти в работах De Pinto et al., Nepal et al. и Zinghirino et al. [5, 29, 32].

Наряду с обеспечением регулируемого обмена ионов и метаболитов между митохондриями

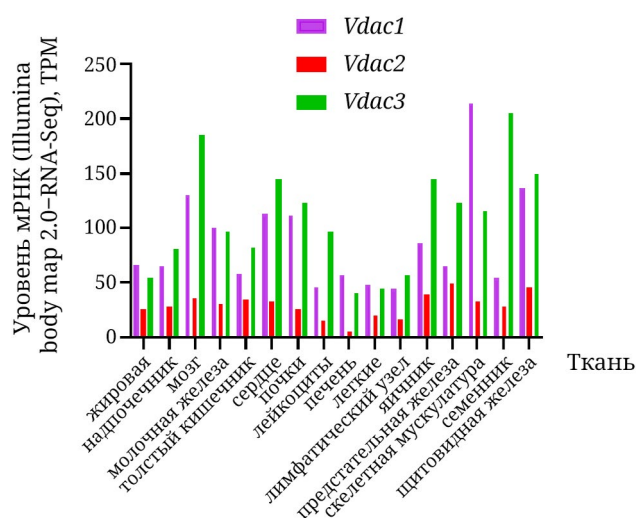


Рис. 2. Уровень экспрессии VDAC1–3 в тканях человека. Данные были получены из базы данных Illumina's Human BodyMap 2.0 project и скачаны с сайта <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-MTAB-513>

и остальной частью клетки пориновые каналы могут оказывать разнонаправленные и множественные влияния на целый ряд других внутриклеточных процессов. Так, VDAC1 рассматривается в качестве ключевого участника апоптоза, опосредованного митохондриями, тогда как VDAC2, наоборот, предотвращает развитие программируемой клеточной гибели [5, 27, 32, 33]. Вероятно, колокализация этих двух белков в одних и тех же субкомпартаментах внешней мембраны митохондрий регулирует баланс про- и антиапоптотических сигналов в клетке. Хотя в литературе отсутствуют данные о роли VDAC3 в инициации апоптоза, доказано участие этой изоформы в регуляции метаболизма активных форм кислорода и работы систем контроля качества митохондрий [5, 16].

РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ VDAC

Регуляция активности VDAC путём изменения трансмембранного потенциала. VDAC – это гидрофильная пора большого размера, вследствие чего для направленной регуляции её функциональной активности могут создаваться существенные препятствия. Однако возможность такой регуляции продемонстрирована в ряде электрофизиологических исследований с использованием искусственных мембран. Показано, что пропускная способность канала зависит от наличия разнообразных природных и синтетических лигандов, липидного окружения и трансмембранного потенциала. Изменение активности поринов в ответ на сдвиг трансмембранного потенциала позволило назвать данные каналы потенциал-зависимыми. Было обнаружено, что при встраивании VDAC1 в бислойную липидную мембрану (БЛМ) при низком мембранном потенциале (± 20 мВ) или в его отсутствие канал находится в состоянии высокой проводимости («открытое» состояние). В этом случае через порины осуществляется преимущественно свободный транспорт анионных метаболитов и одновалентных ионов. Увеличение или уменьшение величины трансмембранного потенциала на бислойной липидной мембране (в диапазоне с ± 20 до ± 40 мВ) приводит к подавлению проницаемости пориновых каналов для анионных метаболитов, нуклеотидов и одновалентных ионов [16, 34]. Параллельно с этим значительно (в 4–10 раз) увеличивается скорость транспорта ионов Ca^{2+} через мембраны [35]. Стоит отметить, что в экспериментах *in vitro* на искусственных мембранах можно наблюдать проводимость для соединений только в отношении VDAC1 и VDAC2 [36]. В то же время hVDAC3 характеризуется очень низкой проводимо-

стью (100 пС против 3,5–4 нС в 1 М KCl для VDAC1 и VDAC2) и отсутствием зависимости от изменения потенциала на мембране [37, 38].

Механизм регуляции проницаемости VDAC связан с конформационными изменениями белка, в частности, положения N-концевого домена, который выполняет роль «сенсора напряжения». Эти конформационные изменения приводят к уменьшению диаметра поры и изменению её селективности [38, 39].

Возможность регулирования активности VDAC в ответ на сдвиг трансмембранного потенциала предполагает, что этот механизм может реализовываться и в живой клетке. Действительно, переход от открытого (проницаемость для метаболитов) к закрытому (проницаемость преимущественно для ионов Ca^{2+}) состоянию может приводить к переходу от нормального функционирования митохондрий и клетки к повреждению органелл и клеточной гибели вследствие избыточного поступления Ca^{2+} в митохондриальный матрикс и открывания кальций-зависимой неселективной поры (mitochondrial permeability transition pore, МТП-поры). В теоретических работах Лемешко В.В. была предложена модель, которая указывает на наличие на внешней митохондриальной мембране потенциала, достигающего значения -50 мВ (отрицательного с цитозольной стороны мембраны) [6, 40]. При этом важно отметить, что конформационный переход VDAC из открытого в закрытые состояния в живой клетке может происходить не столько из-за сдвига величины мембранного потенциала, сколько вследствие изменения взаимодействия VDAC со множеством внутриклеточных белков (тубулином, α -синуклеином, гексокиназой и другими), а также малыми эндогенными регуляторными молекулами [10, 33, 34].

Белок-белковые взаимодействия, опосредующие открывание-закрывание VDAC. Потенциал-зависимые анионные каналы имеют одновременный доступ к строго разделённым в клетке цитоплазматическим и митохондриальным белкам и регуляторам, включая гликолитические ферменты, нейрональные белки и компоненты цитоскелета, что позволяет тонко регулировать их функцию в норме и при патологиях.

Наиболее подробно исследовано взаимодействие VDAC с белками тубулином и α -синуклеином, которое приводит к переходу VDAC в закрытое (заблокированное) состояние при низком значении мембранного потенциала. При добавлении наномолярных концентраций гетеродимера α/β -тубулина или α -синуклеина к БЛМ, содержащей встроенные порины, наблюдается частичное снижение проводимости каналов (на ~60% от проводимости открытого состояния) для анионных метаболитов и значительное увеличение прово-

димости каналов для Ca^{2+} [34]. Установлено, что это связано с наличием полианионного С-конца данных белков [34, 41, 42]. Проникая внутрь поринов, С-концевой участок как тубулина, так и α -синуклеина экранирует внутреннюю часть каналов. Поскольку полианионный С-конец α -синуклеина длиннее, чем у тубулина, регуляция с помощью этого белка зависит от того, какая часть молекулы α -синуклеина находится внутри поры в конкретный момент времени. Всё это приводит к нарушению обмена метаболитами и ионами Ca^{2+} между цитоплазмой и митохондриями, снижению митохондриального мембранного потенциала и подавлению окислительного фосфорилирования [34].

Блокирующее действие обоих белков обусловлено не только наличием полианионного С-конца, но и влиянием соответствующего липидного окружения (фосфатидилэтаноламина), которое за счёт электростатических и гидрофобных взаимодействий стабилизирует амфипатические белковые домены на поверхности мембраны и не позволяет полностью погрузиться в поровую структуру VDAC [43, 44]. Также важно отметить, что ингибирование проводимости VDAC-содержащих искусственных мембран наблюдалось при добавлении тубулина и α -синуклеина лишь с той стороны мембран, которая была заряжена отрицательно [45, 46]. Эти эффекты белков отличаются от таковых при изменении (увеличении) величины мембранного потенциала в любую сторону с 20 до 40 мВ по модулю [6, 34].

В ряде работ указывалось, что белки промежуточных филаментов десмин и виментин также могут взаимодействовать с VDAC и модулировать функциональную активность митохондрий [47, 48]. Взаимодействие происходит с участием N-концевого участка данных белков, в котором отсутствует полианионный сегмент, в связи с чем точный механизм регулирования активности VDAC остаётся неясным [49]. При этом в литературе встречаются противоречивые данные о действии данных белков на функционирование митохондрий – от стимулирования митохондриальной биоэнергетики до подавления клеточного дыхания и активации избыточного образования активных форм кислорода [47–50].

Взаимодействие тубулина и α -синуклеина с митохондриями и белками VDAC играет важную физиологическую роль. Так, регуляция проницаемости VDAC с помощью β -тубулина рассматривается в качестве одного из ключевых механизмов переключения клеточного метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз. Подобная метаболическая гибкость лежит в основе эффекта Варбурга и имеет большое значение для роста и размножения раковых клеток [11, 20, 34, 51]. Действительно, в опухолевых клетках широ-

ко экспрессируется β 3-тубулин, который является наиболее активным «закрывателем» VDAC [52]. Агрегаты α -синуклеина рассматриваются в качестве одной из основных причин дегенерации дофаминэргических нейронов при болезни Паркинсона [53]. В связи с этим возникновение и прогрессирование митохондриальной дисфункции при данном заболевании могут быть вызваны не только нарушением процессов селективного удаления этих органелл (митофагии), но и подавлением процесса окислительного фосфорилирования и индукции MPT-поры при непосредственном взаимодействии α -синуклеина с митохондриями и VDAC [54, 55].

Ещё одним цитоплазматическим белком, который вызывает закрытие пориновых каналов, является фермент гексокиназа [4, 20, 41, 56–61]. Изоферменты гексокиназы I и II являются ключевыми компонентами в лимитирующей первой стадии гликолитического пути, и их взаимодействие с VDAC может приводить к сдвигу энергетического обмена в сторону усиления гликолиза. Кроме того, связывание гексокиназы с VDAC вызывает подавление индукции клеточной смерти через ингибирование образования кальций-зависимой MPT-поры (преимущественно по пути некроза) или олигомеризации VDAC с белками семейства Bcl2 (по пути апоптоза) [56, 62, 63], что способствует росту опухолей. Важно отметить, что в раковых клетках наблюдается сверхэкспрессия митохондриально-связанной гексокиназы I и II [64].

Считается, что глутаминовая кислота в положении 73 (Glu73) полипептидной цепи VDAC является ключевой аминокислотой для обеспечения взаимодействия с гидрофобным N-концом гексокиназы [65, 66]. Установлено, что этот аминокислотный остаток также может играть роль в процессе олигомеризации и связывании пориновых каналов с различными молекулами, регулирующими в том числе их контактное взаимодействие с гексокиназой [66, 67].

Недавние работы показали, что открытие VDAC может модулироваться рядом других белков, в том числе митохондриальной креатинкиназой, TSPO (Translocator protein, транслокаторный белок 18 кДа, также известный как периферический бензодиазепиновый рецептор), p53, актином и другими [4, 68–71]. Регуляция активности VDAC также опосредуется через посттрансляционную модификацию белков в клетках. В частности, фосфорилирование VDAC по остаткам серина или треонина посредством протеинкиназы A (PKA), протеинкиназы C (PKC) и киназы гликогенсинтазы-3 β (GSK3 β) модулирует активность пориновых каналов и их взаимодействие с другими белками, в частности с β -тубулином [72]. Данные масс-спектрометрии показали, что в структуре VDAC

содержатся остатки цистеина, доступные для растворимых окислителей и, следовательно, чувствительные к дитиол-дисульфидному обмену [73]. В частности, было сделано предположение о ключевой роли цистеинов в составе VDAC3 при модуляции митохондриальных активных форм кислорода (АФК) [74]. Эти свойства указывают на VDAC-белки как на возможные окислительно-восстановительные биомаркеры в митохондриальном межмембранном пространстве.

Белок-белковые взаимодействия, опосредующие олигомеризацию VDAC. Способность белковых молекул VDAC к образованию олигомеров (при их взаимодействии друг с другом) или гетероолигомерных структур (с другими белками) во внешней митохондриальной мембране является ключевым патофизиологическим процессом.

В ответ на различные проапоптотические сигналы во внешней мембране митохондрий может происходить образование динамических больших олигомерных каналов (пор). Образование таких пор приводит к высвобождению из межмембранного пространства митохондрий (а также митохондриального матрикса при повреждении внутренней митохондриальной мембраны) целого ряда проапоптотических молекул, включая цитохром с, апоптоз-индуцирующий фактор (AIF, apoptosis inducing factor), Smac/Diablo и другие [10]. Появившись в цитоплазме клетки, цитохром с и Smac/Diablo запускают каспаз-зависимый каскад, а белок AIF – каспаз-независимый молекулярный каскад деградационных процессов, приводящих к гибели клетки.

Обнаружено, что VDAC1 может формировать в мембране димерные, тримерные и мультимерные структуры [4]. Предполагается, что ключевую роль в процессах димеризации молекулы имеют остатки глутаминовой кислоты (Glu73) и серина (Ser43) [75]. Исследования показали, что димеризация VDAC1 происходит при низких значениях pH и устраняется при замене глутаминовой кислоты (Glu73) на аланин или глутамин. Кроме того, процесс олигомеризации зависит от липидного окружения (в том числе присутствия холестерина в мембране у животных, а у растений и грибов – эргостерина) и взаимодействия с белком p53, участвующим в апоптозе [4, 66, 70]. Олигомеризация VDAC1 запускается широким спектром индукторов апоптотической гибели (в том числе стауроспорином, куркумином, As₂O₃, цисплатином, H₂O₂, фактором некроза опухоли TNF-α и т.д.) в различных клеточных линиях. Параллельно с этим происходит увеличение уровня экспрессии VDAC1 [4, 76]. Повышение экспрессии VDAC1 связывают с посттрансляционным фосфорилированием канала посредством GSK3β, увеличением концентрации цитоплазматического Ca²⁺

и активацией транскрипционных факторов [4, 10, 72, 76, 77].

Помимо олигомерных VDAC1-каналов, в индукции резкого повышения проницаемости внешней митохондриальной мембраны участвуют проапоптотические белки семейства Bcl2 (например, Bax, Bak, tBid). Семейство белков Bcl2 объединяет наличие характерного домена гомологии Bcl2 (BH), и, помимо проапоптотических белков (Bax, Bak, Bim, Bid, BAD), оно включает в себя и антиапоптотические белки (например, Bcl2, Bcl-XL). Белки Bcl2 локализованы преимущественно в цитозоле, однако при наличии определённых стимулов они могут перемещаться в митохондрии и участвовать в пермеабиллизации внешней мембраны [78]. Такие процессы могут происходить вследствие образования гомо- и гетероолигомерных комплексов Bax/Bak или гетероолигомерных каналов VDAC1/Bax.

Как уже упоминалось выше, белки VDAC1, экспрессия которых увеличивается при воздействиях апоптотических агентов, способны формировать олигомерные или гетероолигомерные (с Bax или Bak) мегаканалы [4, 79, 80]. Через такие мегаканалы может происходить выброс из митохондрий проапоптотических белков, а также митохондриальной ДНК. Поэтому регуляция функциональной активности VDAC1 рассматривается в настоящее время как перспективная терапевтическая стратегия для инициации или блокирования программируемой клеточной гибели при различных патологических состояниях.

Гораздо сложнее оказалось определить роль изоформы VDAC2 в развитии клеточной гибели. С одной стороны, было показано, что нокаут VDAC2 в мышинных эмбрионах либо является летальным, либо приводит к серьёзным нарушениям развития новорожденных животных [81]. В экспериментах на клеточных культурах были получены противоречивые результаты. Так, использование проапоптотических стимулов в культуре MEF (mouse embryonic fibroblast, эмбриональные фибробласты мыши) с нокаутом VDAC2 вызывало усиление клеточной гибели. Это может быть связано с тем, что VDAC2 специфически связывается с мономерными молекулами Bak и предотвращает образование больших мегаканалов [81]. С другой стороны, клетки с нокаутом VDAC2 были нечувствительными к tBid-индуцированной пермеабиллизации внешней мембраны и апоптозу. Авторы связали это с тем, что VDAC2 участвует в процессе встраивания проапоптотических белков Bak и Bax во внешнюю мембрану. При нарушении этого процесса не происходит закрепления этих белков в мембране с её последующей пермеабиллизацией. За встраивание Bak, вероятно, отвечает последовательность остатков аминокислот с 123 по 179 в молекуле VDAC (преимущественно Thr168 и Asp170) [82].

Интересно, что подавление экспрессии VDAC2 нарушало взаимодействие Bax и Bak с митохондриальными комплексами, содержащими VDAC, и подавляло Bax-, но не Bak-индуцированный апоптоз [83]. Таким образом, VDAC2 может быть и проапоптотическим белком, участвуя во встраивании Bak (Bax) во внешнюю митохондриальную мембрану, но в ряде случаев и ингибитором апоптоза в результате подавления образования в мембране больших пор с участием гетероолигомеров Bak (Bax)/VDAC1. Вероятно, характерное окружение может определять как про-, так и антиапоптотический эффект VDAC2. Интересно, что подобное предположение было высказано также и в отношении VDAC1. В частности, было показано, что VDAC1 способен образовывать гетероолигомерные структуры с Bax, молекулярная масса которых варьирует от 120 до 500 кДа. Однако эти структуры являются стабильными только в здоровых клетках, в то время как в апоптотических клетках происходит перегруппировка белков и образование олигомерных каналов с молекулярной массой 170 кДа, в сборке которых VDAC1 не участвует [84]. На основании этих данных авторы предположили, что в здоровых нейронах преждевременная сборка Bax-олигомерного канала ингибируется VDAC1 так же, как это происходит и в случае взаимодействия VDAC2 и Bak.

Межмембранные взаимодействия с участием VDAC, влияющие на внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} . Как было указано выше, изоформы VDAC являются ключевыми регуляторными компонентами системы транспорта ионов Ca^{2+} в митохондриях: при закрывании VDAC происходит многократное увеличение скорости транспорта ионов Ca^{2+} в митохондриальный матрикс. Более того, белки VDAC обладают Ca^{2+} -связывающим сайтом, который регулирует их активность, а VDAC-зависимый транспорт Ca^{2+} , в свою очередь, подавляется ионами La^{3+} и рутением красным [38, 85]. Таким образом, такие важные митохондриальные процессы, как функционирование Ca^{2+} -зависимых ферментов цикла Кребса (пируватдегидрогеназа, цитратдегидрогеназа и α -кетоглутарат дегидрогеназа), поддержание гомеостаза Ca^{2+} и открывание кальций-зависимой неселективной поры, напрямую зависят не только от систем Ca^{2+} -транспорта внутренней мембраны, но и от «первичных фильтров» митохондрий, белков внешней мембраны VDAC [86].

Быстрое поглощение Ca^{2+} митохондриями в клетке тесно сопряжено с выбросом этого иона из эндоплазматического ретикула и происходит под контролем специализированных структур – мембран, ассоциированных с митохондриями (МММ-контактов; МММ – mitochondria-associated membranes). Образование этих структур проис-

ходит в результате обратимого взаимодействия между белками мембран эндоплазматического ретикула и внешней мембраны митохондрий и играет важную роль в двунаправленной регуляции функций органелл, сигнализации и сохранении внутриклеточного гомеостаза в физиологических условиях и при развитии нейродегенеративных заболеваний (более подробно в обзорах Lu et al., Van Vliet et al. [87, 88]). МММ-Контакты (10–30 нм) являются высокодинамической, склонной к перестройкам структурой. Протеомный анализ выявил наличие примерно 1000–2000 различных белков, которые могут участвовать в построении и регуляции МММ-контактов (причём 70 из них рассматриваются как обязательные), что подчёркивает роль МММ как многофункциональной молекулярной платформы для сигнализации. Среди многообразия белков МММ-контактов за выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула отвечает рецептор IP_3 (рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата, IP_3R) или рианодиновый рецептор, а за транспорт этих ионов через внешнюю мембрану – белки VDAC. В МММ-контактах эти белки являются наиболее представленными, и их структурное и функциональное сопряжение обеспечивается шапероном GRP75 (glucose-regulated protein 75) [86–90]. Важно отметить, что изменение количества или плотности распределения МММ-контактов может привести к нарушению гомеостаза Ca^{2+} в митохондриях. Так, недавно нами было показано, что в скелетной мускулатуре дистрофин-дефицитных мышей линии C57BL/10ScSn-mdx (модель миодистрофии Дюшенна) наблюдается увеличение количества МММ-контактов, что сопряжено с более высоким содержанием ионов Ca^{2+} в митохондриях и снижением показателя митохондриальной Ca^{2+} -ёмкости [91].

Считается, что VDAC1 является основным белком, участвующим в образовании активного Ca^{2+} -транспортирующего комплекса с IP_3R в МММ-контактах в большинстве типов клеток и тканей [38, 92]. Тем не менее VDAC2 также участвует в формировании подобного комплекса [93]. Более того, эффективный транспорт ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах осуществляется в результате взаимодействия VDAC2 с RyR [94]. Роль VDAC3 в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} -сигналинга на сегодняшний день до конца не установлена. Как уже было упомянуто выше, эта изоформа слабо регулируется конформационным переходом между состояниями открывания-закрывания и, следовательно, не меняет скорость потока ионов Ca^{2+} через митохондриальные мембраны. Предполагается, что это связано с потерей аминокислотного остатка Glu73 [38].

После поступления Ca^{2+} через VDAC в межмембранное пространство митохондрий этот ион

транспортируется в матрикс посредством Ca^{2+} -унипортера – многокомпонентного белкового комплекса, включающего каналные субъединицы MCU (и его доминант-негативной формы MCUB), а также регуляторные субъединицы MICU1 и MICU2, EMRE, MCUR1 и другие [86]. Показано, что белки MCU и VDAC1 могут формировать комплекс, который участвует в транспорте ионов Ca^{2+} в митохондриальный матрикс [95]. Авторы предположили, что ингибирование активности MCU или разрушение такого комплекса может являться стратегией для терапии заболеваний нервной системы. Однако механизм взаимодействия VDAC с субъединицей MCU до конца не установлен.

Немаловажная роль VDAC связана с таким патологическим явлением, как открывание MPT-поры в результате избыточного накопления Ca^{2+} в митохондриях. Как известно, при накоплении ионов Ca^{2+} в митохондриальном матриксе во внутренней мембране органелл может происходить формирование большого неселективного канала (поры) (более подробно в обзорах Halestrap et al., Belosludtsev et al., Carraro et al. и Bernardi et al. [63, 86, 96, 97]). Этот процесс приводит к нарушению процесса митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, коллапсу мембранного потенциала, рассеиванию ионных градиентов на внутренней мембране и, в конечном счёте, набуханию матрикса с возможным последующим разрушением органелл. На сегодняшний день в качестве основных компонентов, формирующих пору канала во внутренней мембране митохондрий, рассматривают АТФ-синтазу (в разных конфигурациях) и транслокатор адениновых нуклеотидов (ADP/АТФ-транслокатор). Регуляторным белком, обеспечивающим открывание MPT-поры, является пептидил-пролил *цис-транс* изомеразы – циклофилин D [63, 86]. В изолированных митохондриях VDAC не требуется для образования MPT-поры [63]. Вместе с тем VDAC важен для образования Ca^{2+} -зависимой MPT в живой клетке, поскольку обеспечивает основной путь поступления ионов Ca^{2+} в митохондрии. В физиологических условиях GSK3 β , PKA и другие протеинкиназы, способные фосфорилировать VDAC, снижают порог открывания MPT-поры для разных индукторов, в то время как перевод этих протеинкиназ в фосфорилированную форму подавляет открывание MPT-поры и снижает риск тяжёлых патологий, связанных с гипоксическим повреждением тканей.

Малые молекулы, регулирующие активность VDAC. Изучение электрофизиологических характеристик VDAC и его роли в митохондриях и клетках в первую очередь связано с определением влияния на канал малых молекул. При этом большинство известных лигандов при взаимодействии с белками VDAC способны снижать их канальную

активность, проявляя при этом различную активность в отношении индукции апоптоза.

Низкомолекулярное соединение эрастин является единственным известным «открывателем» VDAC и способно предотвращать взаимодействие VDAC с тубулином [98]. Эрастин преимущественно взаимодействует с изоформами VDAC2 и VDAC3 [99]. Считается, что такая активация приводит к гиперполяризации митохондрий и повышенной продукции в органеллах АФК [10, 100, 101]. Это является одной из причин того, что эрастин способен инициировать программируемую окислительную некротическую гибель клеток, связанную с железом-зависимым перекисным окислением липидов (ферроптоз) [102].

Одной из ключевых мишеней в белковой молекуле VDAC для различных ингибиторов является аминокислотный остаток Glu73(72) [66]. Считается, что по этому сайту происходит взаимодействие, например, с рутением красным, который может не только блокировать VDAC1, но и конкурировать с гексокиназой за сайт взаимодействия в этом белке [10, 66]. Рутений красный часто рассматривается и в качестве блокатора апоптоза при действии различных проапоптотических стимулов. Замена Glu73 на Gln73 подавляет ингибирование рутением красным как проводимости VDAC1, так и апоптотической клеточной гибели [65, 66, 103, 104]. Таким образом, рутений красный, с одной стороны, блокирует VDAC-каналы, тем самым увеличивая их проводимость для ионов Ca^{2+} , а с другой стороны, предотвращает поглощение ионов Ca^{2+} в матрикс, ингибируя митохондриальный кальциевый унипортер MCU [66, 86].

Целый ряд агентов, способных индуцировать апоптоз, вызывает увеличение уровня экспрессии белка VDAC1. К этим агентам относятся, например, миостатин и цисплатин. Считается, что повышение экспрессии VDAC1 стимулирует процесс олигомеризации данного белка, что может являться причиной апоптотической клеточной гибели (подробнее в обзоре Magri et al. [10]).

С другой стороны, известен ряд соединений, способных подавлять олигомеризацию VDAC и тем самым оказывать антиапоптотическое действие. К таким соединениям можно отнести VBIT-4 (voltage-dependent anion channel 1 oligomerization inhibitor), DIDS (4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid, 4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновая кислота) и олесоксим (TRO19622) [10, 105–110].

Согласно литературным данным, существует широкий спектр агентов, способных влиять на активность как изолированного VDAC, встроенного в бислойную липидную мембрану, так и митохондрий и клеток. К числу таких агентов относятся полианион Кёнига, DCCD, этанол, фосфоротионатный

Молекулы, способные регулировать активность VDAC-каналов

Название	Действие на VDAC	Действие на клетку и организм	Ссылка
Эрастин	«открыватель» VDAC, нарушает взаимодействие VDAC с тубулином	индуктор ферроптоза, противораковое действие	[98, 99, 102]
VBIT-4	ингибитор олигомеризации VDAC, ингибитор проводимости VDAC	ингибитор апоптоза, протекторный эффект при сахарном диабете, болезни Альцгеймера, боковом амиотрофическом склерозе (БАС), гиперальдостеронизме	[105–107]
Олесоксим	ингибитор VDAC, ингибитор олигомеризации VDAC	ингибитор клеточной гибели, протекторный эффект при БАС, остром повреждении почек	[108, 109]
DIDS	ингибитор олигомеризации VDAC	ингибитор апоптоза, индуктор апоптоза, нейропротекторное и нейротоксическое действие	[110]
Полианион Кёнига	ингибитор VDAC	индуктор апоптоза, противораковое действие	[10, 119]
Этанол	ингибитор VDAC	индуктор апоптоза, противораковое действие	[114–116]
Аспирин	нарушает взаимодействие VDAC с гексокиназой	индуктор апоптоза, противораковое действие	[111]
3-Бромопируват	нарушает взаимодействие VDAC с гексокиназой	индуктор апоптоза, противораковое действие	[112]
Клотримазол	нарушает взаимодействие VDAC с гексокиназой	индуктор апоптоза, противораковое действие	[113]
G3139	ингибитор VDAC, нарушает взаимодействие с белками Bcl2	индуктор апоптоза, противораковое действие	[117, 118]
Рутений красный	ингибитор VDAC	ингибитор апоптоза	[103, 104]
SC18	ингибитор VDAC	индуктор клеточной гибели, противораковое действие	[120]

антисмысловой олигонуклеотид G3139, 3-бромопальмитат и др. (таблица) [111–120]. Вместе с тем у этих соединений в клетке достаточно много других мишеней, в результате взаимодействия с которыми может изменяться как функционирование митохондрий, так и происходить развитие клеточной гибели. Поэтому говорить об использовании этих малых молекул как внутриклеточных модуляторов VDAC-каналов можно лишь с большой степенью допущения.

РОЛЬ VDAC ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

VDAC и канцерогенез. Уровень и конформационное состояние белков VDAC, определяющие цитозольное соотношение ATP/ADP путём регуляции потока субстратов, играют важнейшую роль

в переключении клеток на пролиферативный фенотип Варбурга, свойственный раковым клеткам. В частности, открытое состояние VDAC способствует максимальному потоку метаболитов для оптимальной функции митохондрий, тогда как закрытое состояние VDAC сводит к минимуму скорость митохондриального метаболизма и обеспечивает фенотип Варбурга в условиях накопления предшественников биосинтеза макромолекул, необходимых для пролиферации опухолевых клеток [4, 10, 11, 20]. При этом считается, что стимуляция митохондриального метаболизма, в том числе посредством модуляции открытой конформации VDAC, приводит к усилению окисления физиологических субстратов и генерации АТФ, но также и к увеличению образования АФК с последующим развитием окислительного стресса и устранением фенотипа Варбурга (рис. 3).

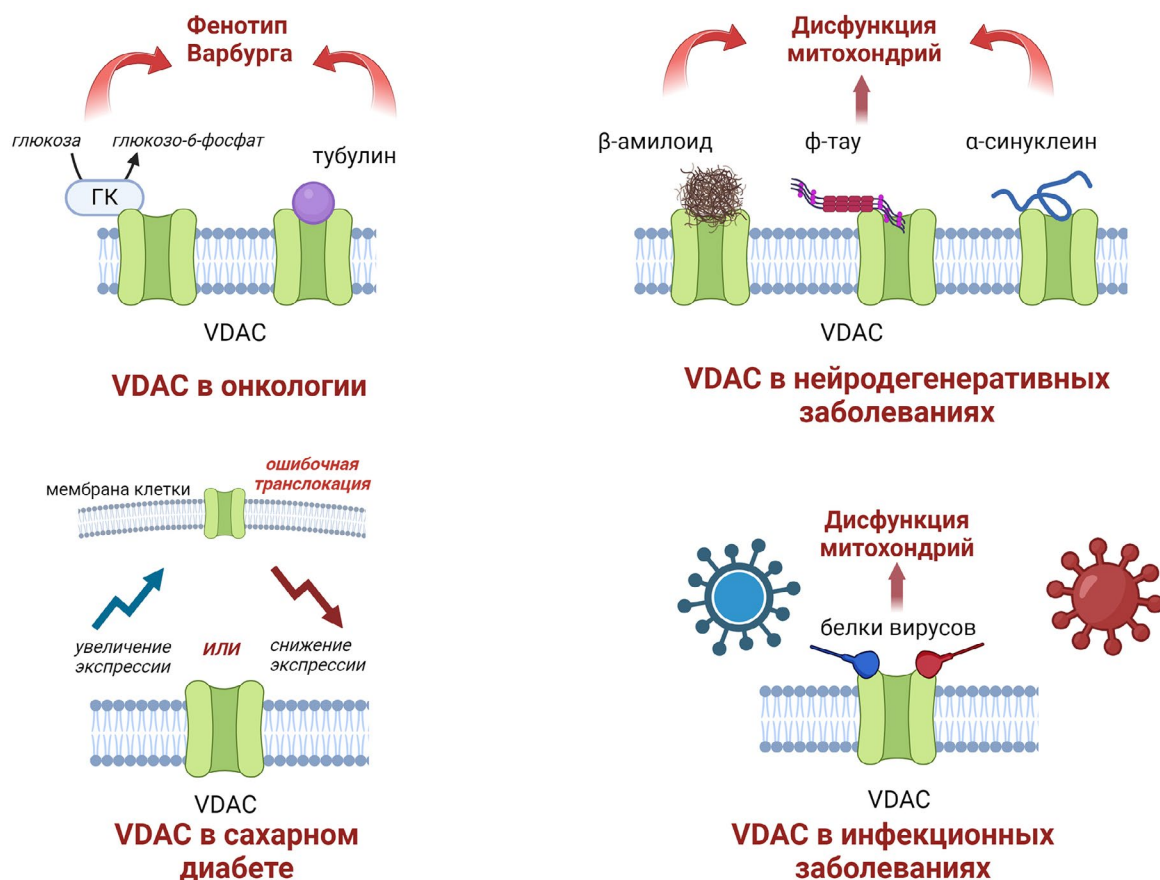


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая участие VDAC в развитии патологических процессов: онкология, нейродегенеративные заболевания, сахарный диабет и инфекционные заболевания. Пояснения в тексте. Рисунок создан в сервисе Biorender.com

Известно, что изоформы VDAC могут являться прогностическими биомаркерами разных типов рака человека [4, 10, 121, 122]. В частности, рак лёгких, молочной железы и печени сопровождается увеличением уровня VDAC1, а высокая экспрессия VDAC1 тесно связана с более низкой частотой выживаемости у пациентов [121, 123]. Предполагается, что VDAC1 может действовать как онкоген, связанный с онкогенезом и прогрессированием опухоли. Сверхэкспрессия VDAC1 в раковых клетках может вызывать его взаимодействие с гексокиназой, что будет приводить к связыванию митохондриального ATP с глюкозой и развитию эффекта Варбурга. Это взаимодействие может предотвращать связывание VDAC с проапоптотическими факторами, в частности, с белком Bax [124]. VDAC1 может взаимодействовать и с антиапоптотическими белками, сверхэкспрессируемыми при раке, такими как Bcl2, Bcl-XL и гексокиназа, и блокировать высвобождение цитохрома c из митохондрий, что предотвращает апоптоз раковых клеток [4, 10, 11, 20]. В частности, были обнаружены антираковые эффекты ряда агентов, способных разрушать комплекс гексокиназа–VDAC1 (клотримазол или 3-бромпируват) [112, 113].

Сверхэкспрессия VDAC1 также приводит к подавлению активации NK-клеток, способных вызывать гибель соседних клеток, несущих поверхностные маркеры, связанные с онкогенной трансформацией, что способствует онкогенезу [125]. Показано, что митохондриальный фактор деления (MFF), связывающийся с VDAC1 и регулирующий его конформационное состояние, может быть сверхэкспрессирован при немелкоклеточном раке лёгких, при этом разрушение комплекса MFF–VDAC1 с помощью MFF-миметиков приводит к деполяризации митохондрий и запускает клеточную гибель в различных типах раковых клеток, включая меланому [126]. МикроРНК-7 снижает экспрессию VDAC1, что приводит к ингибированию пролиферации и метастазирования гепатоцеллюлярной карциномы [127]. Напротив, активация VDAC1 при снижении экспрессии микроРНК-320a вызывает пролиферацию и инвазию немелкоклеточного рака лёгких [128]. Как было указано выше, блокирование эрастином или эрастиноподобными соединениями ингибирующего действия тубулина на функционирование VDAC приводит к усилению митохондриального метаболизма и способствует окислительному стрессу, а также

сопровождается угнетением гликолиза [100, 129]. Такой подход может быть использован как для индукции гибели раковых клеток вследствие блокирования поступления строительного материала, необходимого для пролиферации клеток, так и для индукции в митохондриях окислительного взрыва (ROS burst), ведущего к повреждениям и гибели раковых клеток. Так, сочетание модуляции окислительного стресса и эффекта Варбурга под действием эрастиноподобных соединений вызывало гибель клеток в различных линиях гепатокарциномы человека и замедляло рост опухоли в модели ксенотрансплантата клеток гепатокарциномы Nuh7 [129, 130]. Недавно было показано, что NADH способен связываться с NADH-связывающим карманом различных изоформ VDAC и закрывать канал [131]; при этом малая молекула SC18, способная связываться с карманом для NADH, поддерживает VDAC в открытой конфигурации, что вызывает митохондриальную дисфункцию и снижает пролиферацию клеток гепатокарциномы человека [120]. Важно отметить, что эффект SC18 не зависел от изоформы VDAC. С другой стороны, необходимо учитывать, что гетерогенность раковых клеток может обуславливать и непредсказуемые эффекты такого VDAC-опосредованного переключения митохондриального метаболизма, и поэтому этот вопрос ещё требует тщательного исследования.

VDAC и нейродегенеративные заболевания. VDAC вовлечён в развитие целого ряда нейродегенеративных заболеваний, что обусловлено его «стыковкой» и специфическим взаимодействием с неправильно свёрнутыми и агрегированными белками, которое приводит к изменению канальной проводимости и способствует прогрессированию митохондриальной дисфункции [4, 10, 12]. В частности, такая картина наблюдается в случае болезни Альцгеймера, когда накопление в цитоплазме β -амилоидного пептида и гиперфосфорилированного тау-белка приводит к усилению их взаимодействия с митохондриальным VDAC1, уровень которого существенно повышен при данном заболевании [132]. Это сопровождается снижением проводимости VDAC1 и угнетением функции органелл в клетках. Модулирующее влияние β -амилоида на проводимость VDAC1 показано также в *in vitro* экспериментах с использованием БЛМ [133]. Взаимодействие β -амилоида и VDAC1 было показано в клеточных культурах нейробластомы SH-SY5Y, причём фосфорилирование VDAC1 способствовало выходу проапоптотических молекул из митохондрий этих клеток и усиливало нейротоксическое действие β -амилоида [134]. Снижение уровня VDAC1 в модели на основе VDAC1 $\pm$ мышей может защищать клетки головного мозга от дегенеративных из-

менений путём сохранения митохондриальной функции [135].

Подобное связывание VDAC1 с неправильно свёрнутыми формами белков, сопровождающееся нарушениями митохондриального гомеостаза, было обнаружено также при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) – прогрессирующем мульти-системном заболевании, характеризующемся мышечным параличом, отражающим дегенерацию моторных нейронов [136, 137]. Агрегация мутантного белка супероксиддисмутазы 1 (SOD1) считается одной из основных причин развития наследственной формы БАС [134]. Предполагается, что мутантный белок SOD1 самостоятельно или совместно с другими внутриклеточными компонентами образует олигомеры для дальнейшего формирования агрегатов высокой молекулярной массы. В модели БАС на основе трансгенных крыс SOD1*G93A было обнаружено, что мутантный белок SOD1 специфически связывается с VDAC1 и подавляет транспорт ADP в митохондрии, выделенные из спинного мозга [138]. Недавние исследования детально охарактеризовали связывание неправильно свёрнутого SOD1 с N-концевым доменом VDAC1 [136]. Кроме того, в клетках линии NSC-34, экспрессирующих мутантный белок SOD1, были обнаружены посттрансляционные модификации остатков VDAC1, что указывает на изменения в структуре канала VDAC1 и, следовательно, в биоэнергетическом метаболизме мотонейронов при БАС [72]. Ингибитор олигомеризации VDAC олесоксим задерживал развитие гибели мотонейронов при БАС у мышей, однако при клинических испытаниях на людях с поздней стадией БАС был неэффективен [139, 140].

Взаимодействие VDAC и аномально агрегированных белков α -синуклеина может способствовать возникновению и прогрессированию болезни Паркинсона. α -Синуклеин преимущественно локализуется в пресинаптических окончаниях в различных отделах головного мозга и является основным компонентом телец Леви при болезни Паркинсона. Было показано, что накопление и агрегация α -синуклеина вносит значительный вклад в нейротоксичность и является ведущей причиной деградации дофаминергических нейронов мозга [53, 141]. Известно, что мономерный α -синуклеин может транспортироваться через белки всех трёх изоформ VDAC и достигать внутренней мембраны митохондрий. Накопление α -синуклеина во внутренней мембране митохондрий приводит к митохондриальной дисфункции, увеличению продукции АФК этими органеллами и митофагии [46, 142]. Также обнаружено, что сверхэкспрессия α -синуклеина в чёрной субстанции головного мозга крыс приводит к увеличению его взаимодействия с VDAC1 и способствует

открыванию МРТ-поры, вызывая последующую дегенерацию и гибель дофаминергических нейронов [54, 55]. Кроме того, было показано, что накопление α -синуклеина в нейронах чёрной субстанции пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, вызывает снижение экспрессии VDAC1, что может обуславливать нарушение гомеостаза кальция, способствуя митохондриальной дисфункции и клеточной гибели [143].

VDAC и сахарный диабет. Показано, что развитие сахарного диабета сопровождается изменением содержания VDAC1 в митохондриях, что может быть одним из патогенетических факторов при данной патологии [4, 12, 28, 144]. Однако изменение уровня экспрессии митохондриального VDAC1 носит тканеспецифичный характер [28, 144–148]. Установлено, что в бета-клетках поджелудочной железы при гипергликемии наблюдается ошибочная транслокация этого белка в цитоплазматическую мембрану, что способствует значительному уменьшению пула АТФ и нарушению секреции инсулина [28]. Предположено, что повышенная экспрессия VDAC1 приводит к апоптотической гибели эндотелиальных клеток коронарной артерии мышей в модели сахарного диабета [144]. Недавно было установлено [149], что в митохондриях скелетных мышц потомков самок японских макаков, получавших диету западного типа (диета с высоким содержанием углеводов и насыщенных жирных кислот), происходит перепрограммирование метаболизма, которое характеризуется в том числе снижением количества белков VDAC и дыхательного комплекса I, и это коррелирует со снижением биомаркеров окислительного стресса. Авторы высказали предположение о том, что снижение количества этих белков может быть адаптивной реакцией к развитию диабета на раннем этапе жизни животных, направленной на уменьшение избыточно образующихся АФК. Важно отметить, что подавление олигомеризации VDAC с помощью нового ингибитора VBIT-4 способствовало устранению митохондриальной дисфункции при индукции гипергликемии в эндотелиальных клетках, а также ослабляло развитие экспериментального диабета у мышей [28, 148]. Нокдаун гена VDAC1 в фибробластах кожи человека способствовал подавлению негативных последствий гипергликемического стресса [148]. Таким образом, генетическая или фармакологическая модуляция VDAC1 может подавлять негативное влияние хронического высокого уровня глюкозы на функции митохондрий в разных клетках.

VDAC и инфекционные заболевания. Известно, что VDAC является молекулярной мишенью для вирусов и играет важную роль в развитии митохондриальной дисфункции, сопутствующей инфекционным заболеваниям [4, 12]. Вирусы спо-

собны влиять на экспрессию VDAC и непосредственно взаимодействовать с данными белками. Так, белок X вируса гепатита В (HBx) способен взаимодействовать с VDAC3, что сопровождается митохондриальной деполяризацией [150]. Показано, что VDAC1 взаимодействует с белком ORF3 вируса гепатита Е [151]. Известно также о взаимодействии белка R вируса иммунодефицита человека (HIV-1) с VDAC1, которое запускает апоптоз инфицированных Т-лимфоцитов [152]. Кроме того, белок PB1-F2 вируса гриппа А, взаимодействуя с ANT3 и VDAC1, приводит к индукции МРТ-поры, деполяризации митохондрий и выходу из них цитохрома с. Предполагается, что обусловленная белком PB1-F2 гибель клеток, прежде всего иммунных, через митохондриальную дисфункцию способствует патогенности вируса гриппа [153]. Ряд исследований также выявил взаимодействие между VDAC1 и Е-белком вируса Денге [154], VP5-белком вируса инфекционной бурсальной болезни [155] и некоторыми другими вирусными белками, которые также увеличивают экспрессию VDAC1, вызывают развитие инфекционного процесса и клеточную гибель. Вирус SARS-CoV-2, ответственный за пандемию COVID-19, также вызывал увеличение уровня экспрессии VDAC1 и развитие митохондриальной дисфункции в Т-лимфоцитах [12, 156]. При этом апоптоз Т-лимфоцитов блокировался ингибитором VBIT-4 [156].

На сегодняшний день роль митохондриальных белков VDAC1–3 в качестве критически важных координирующих центров, обеспечивающих двустороннюю регуляцию процессов на границе с цитозолем и интеграцию митохондрий в метаболические пути в норме и при патологиях, становится всё более очевидной. Данные свидетельствуют о том, что патофизиологическая функция белков VDAC зависит от их структурной гибкости, которая позволяет реагировать на различные стимулы путём конформационных переключений и обусловлена взаимодействием с многочисленными, строго компартментализованными белками митохондриального межмембранного пространства и цитозоля. Определение трёхмерной структуры, а также обнаружение дифференциации функциональных свойств трёх изоформ VDAC стали важными открытиями, которые стимулировали поиск регуляторных молекул эндогенного и экзогенного происхождения. При этом применение имеющихся природных и синтетических регуляторов VDAC наталкивается на целый ряд сложностей, связанных с их низкой специфичностью и отсутствием известного механизма действия. Решение этих проблем может помочь исследователям проложить путь к реализации давно назревшей задачи: фармакологической регуляции белков VDAC как перспективных молекулярных мишеней

для терапии патологических состояний, связанных с митохондриальной дисфункцией и метаболическим репрограммированием.

Вклад авторов. К.Н. Белослудцев – концепция; Н.В. Белослудцева, М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев – написание рукописи; Н.В. Белослудцева, К.Н. Белослудцев – редактирование текста; М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев – подготовка рисунков.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00120-П).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания проведённых авторами исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jenkins, B. C., Neikirk, K., Katti, P., Claypool, S. M., Kirabo, A., McReynolds, M. R., and Hinton, A. Jr. (2024) Mitochondria in disease: changes in shapes and dynamics, *Trends Biochem. Sci.*, **49**, 346-360, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2024.01.011>.
- Spinelli, J. B., and Haigis, M. C. (2018) The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 745-754, <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>.
- Xia, D., Liu, Y., Wu, P., and Wei, D. (2023) Current advances of mitochondrial dysfunction and cardiovascular disease and promising therapeutic strategies, *Am. J. Pathol.*, **193**, 1485-1500, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2023.06.013>.
- Shoshan-Barmatz, V., Shteinfein-Kuzmine, A., and Verma, A. (2020) VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases, *Biomolecules*, **10**, 1485, <https://doi.org/10.3390/biom10111485>.
- De Pinto, V. (2021) Renaissance of VDAC: new insights on a protein family at the interface between mitochondria and cytosol, *Biomolecules*, **11**, 107, <https://doi.org/10.3390/biom11010107>.
- Lemeshko, V. V. (2023) VDAC as a voltage-dependent mitochondrial gatekeeper under physiological conditions, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1865**, 184175, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184175>.
- Varughese, J. T., Buchanan, S. K., and Pitt, A. S. (2021) The role of voltage-dependent anion channel in mitochondrial dysfunction and human disease, *Cells*, **10**, 1737, <https://doi.org/10.3390/cells10071737>.
- Schein, S. J., Colombini, M., and Finkelstein, A. (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria, *J. Membr. Biol.*, **30**, 99-120, <https://doi.org/10.1007/BF01869662>.
- Fuchs, P., Rugen, N., Carrie, C., Elsässer, M., Finkemeier, I., Giese, J., Hildebrandt, T. M., Kühn, K., Maurino, V. G., Ruberti, C., Schallenberg-Rüdinger, M., Steinbeck, J., Braun, H. P., Eubel, H., Meyer, E. H., Müller-Schüssele, S. J., and Schwarzländer, M. (2020) Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics, *Plant J.*, **101**, 420-441, <https://doi.org/10.1111/tpj.14534>.
- Magri, A., Reina, S., and De Pinto, V. (2018) VDAC1 as pharmacological target in cancer and neurodegeneration: focus on its role in apoptosis, *Front. Chem.*, **6**, 108, <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00108>.
- Maldonado, E. N., and Lemasters, J. J. (2012) Warburg revisited: regulation of mitochondrial metabolism by voltage-dependent anion channels in cancer cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **342**, 637-641, <https://doi.org/10.1124/jpet.112.192153>.
- Shoshan-Barmatz, V., Anand, U., Nahon-Crystal, E., Di Carlo, M., and Shteinfein-Kuzmine, A. (2021) Adverse effects of metformin from diabetes to COVID-19, cancer, neurodegenerative diseases, and aging: is VDAC1 a common target? *Front. Physiol.*, **12**, 730048, <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730048>.
- Han, W., Du, C., Zhu, Y., Ran, L., Wang, Y., Xiong, J., Wu, Y., Lan, Q., Wang, Y., Wang, L., Wang, J., Yang, K., and Zhao, J. (2022) Targeting myocardial mitochondria-STING-polyamine axis prevents cardiac hypertrophy in chronic kidney disease, *JACC Basic Transl. Sci.*, **7**, 820-840, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.03.006>.
- Sampson, M. J., Lovell, R. S., and Craigen, W. J. (1997) The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function, *J. Biol. Chem.*, **272**, 18966-18973, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18966>.
- Young, M. J., Bay, D. C., Hausner, G., and Court, D. A. (2007) The evolutionary history of mitochondrial porins, *BMC Evol. Biol.*, **7**, 31, <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-31>.
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., and De Pinto, V. (2012) VDAC isoforms in mammals, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1466-1476, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>.
- Benz, R. (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**, 167-196, [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)90004-3).
- Hodge, T., and Colombini, M. (1997) Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels, *J. Membr. Biol.*, **157**, 271-279, <https://doi.org/10.1007/s002329900235>.

19. Rostovtseva, T., and Colombini, M. (1997) VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function, *Biophys. J.*, **72**, 1954-1962, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78841-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78841-6).
20. Heslop, K. A., Milesi, V., and Maldonado, E. N. (2021) VDAC modulation of cancer metabolism: advances and therapeutic challenges, *Front Physiol.*, **12**, 742839, <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.742839>.
21. Mannella, C. A. (2021) VDAC-A primal perspective, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1685, <https://doi.org/10.3390/ijms22041685>.
22. Jahn, H., Bartoš, L., Dearden, G. I., Dittman, J. S., Holthuis, J. C. M., Vácha, R., and Menon, A. K. (2023) Phospholipids are imported into mitochondria by VDAC, a dimeric beta barrel scramblase, *Nat. Commun.*, **14**, 8115, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43570-y>.
23. Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., and Zeth, K. (2008) Structure of the human voltage-dependent anion channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15370-15375, <https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105>.
24. Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M., and Wagner, G. (2008) Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles, *Science*, **321**, 1206-1210, <https://doi.org/10.1126/science.1161302>.
25. Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J. P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P., and Abramson, J. (2008) The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17742-17747, <https://doi.org/10.1073/pnas.0809634105>.
26. Schredelseker, J., Paz, A., López, C. J., Altenbach, C., Leung, C. S., Drexler, M. K., Chen, J. N., Hubbell, W. L., and Abramson, J. (2014) High resolution structure and double electron-electron resonance of the zebrafish voltage-dependent anion channel 2 reveal an oligomeric population, *J. Biol. Chem.*, **289**, 12566-12577, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497438>.
27. Naghdi, S., and Hajnóczky, G. (2016) VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2503-2514, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.020>.
28. Zhang, E., Mohammed Al-Amily, I., Mohammed, S., Luan, C., Asplund, O., Ahmed, M., Ye, Y., Ben-Hail, D., Soni, A., Vishnu, N., Bompada, P., De Marinis, Y., Groop, L., Shoshan-Barmatz, V., Renström, E., Wollheim, C. B., and Salehi, A. (2019) Preserving insulin secretion in diabetes by inhibiting VDAC1 overexpression and surface translocation in β cells, *Cell Metab.*, **29**, 64-77.e6, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.008>.
29. Nepal, C., Hadzhiev, Y., Balwierz, P., Tarifeño-Saldivia, E., Cardenas, R., Wragg, J. W., Suzuki, A. M., Carninci, P., Peers, B., Lenhard, B., Andersen, J. B., and Müller, F. (2020) Dual-initiation promoters with intertwined canonical and TCT/TOP transcription start sites diversify transcript processing, *Nat. Commun.*, **11**, 168, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13687-0>.
30. Zinghirino, F., Pappalardo, X. G., Messina, A., Guarino, F., and De Pinto, V. (2020) Is the secret of VDAC isoforms in their gene regulation? Characterization of human VDAC genes expression profile, promoter activity, and transcriptional regulators, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7388, <https://doi.org/10.3390/ijms21197388>.
31. Neumann, D., Bückers, J., Kastrup, L., Hell, S. W., and Jakobs, S. (2010) Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms, *PMC Biophys.*, **3**, 4, <https://doi.org/10.1186/1757-5036-3-4>.
32. Zinghirino, F., Pappalardo, X. G., Messina, A., Nicosia, G., De Pinto, V., and Guarino, F. (2021) VDAC genes expression and regulation in mammals, *Front. Physiol.*, **12**, 708695, <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.708695>.
33. Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E. N., and Krelin, Y. (2017) VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress, *Cell Stress*, **1**, 11-36, <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.104>.
34. Rostovtseva, T. K., Bezrukov, S. M., and Hoogerheide, D. P. (2021) Regulation of mitochondrial respiration by VDAC is enhanced by membrane-bound inhibitors with disordered polyanionic C-terminal domains, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7358, <https://doi.org/10.3390/ijms22147358>.
35. Tan, W., and Colombini, M. (2007) VDAC closure increases calcium ion flux, *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2510-2515, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.002>.
36. Xu, X., Decker, W., Sampson, M. J., Craigen, W. J., and Colombini, M. (1999) Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability, *J. Membr. Biol.*, **170**, 89-102, <https://doi.org/10.1007/s002329900540>.
37. Checchetto, V., Reina, S., Magri, A., Szabo, I., and De Pinto, V. (2014) Recombinant human voltage dependent anion selective channel isoform 3 (hVDAC3) forms pores with a very small conductance, *Cell Physiol. Biochem.*, **34**, 842-853, <https://doi.org/10.1159/000363047>.
38. Sander, P., Gudermann, T., and Schredelseker, J. (2021) A calcium guard in the outer membrane: is VDAC a regulated gatekeeper of mitochondrial calcium uptake? *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 946, <https://doi.org/10.3390/ijms22020946>.
39. Shuvo, S. R., Ferens, F. G., and Court, D. A. (2016) The N-terminus of VDAC: Structure, mutational analysis, and a potential role in regulating barrel shape, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 1350-1361, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.017>.

40. Lemesenko, V. V. (2021) Electrical control of the cell energy metabolism at the level of mitochondrial outer membrane, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1863**, 183493, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183493>.
41. Roll-Mecak, A. (2015) Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions? *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **37**, 11-19, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.026>.
42. Jiang, Z., Heinrich, F., McGlinchey, R. P., Gruschus, J. M., and Lee, J. C. (2017) Segmental deuteration of α -synuclein for neutron reflectometry on tethered bilayers, *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**, 29-34, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b02304>.
43. Hoogerheide, D. P., Noskov, S. Y., Jacobs, D., Bergdoll, L., Silin, V., Worcester, D. L., Abramson, J., Nanda, H., Rostovtseva, T. K., and Bezrukov, S. M. (2017) Structural features and lipid binding domain of tubulin on biomimetic mitochondrial membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E3622-E3631, <https://doi.org/10.1073/pnas.1619806114>.
44. Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Chen, M. Y., and Bezrukov, S. M. (2012) Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel, *J. Biol. Chem.*, **287**, 29589-29598, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378778>.
45. Rostovtseva, T. K., and Bezrukov, S. M. (2012) VDAC inhibition by tubulin and its physiological implications, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1526-1535, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.004>.
46. Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Protchenko, O., Hoogerheide, D. P., Yap, T. L., Philpott, C. C., Lee, J. C., and Bezrukov, S. M. (2015) α -Synuclein shows high affinity interaction with voltage-dependent anion channel, suggesting mechanisms of mitochondrial regulation and toxicity in Parkinson's disease, *J. Biol. Chem.*, **290**, 18467-18477, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641746>.
47. Guzun, R., Gonzalez-Granillo, M., Karu-Varikmaa, M., Grichine, A., Usson, Y., Kaambre, T., Guerrero-Roesch, K., Kuznetsov, A., Schlattner, U., and Saks, V. (2012) Regulation of respiration in muscle cells *in vivo* by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within mitochondrial interactosome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1545-1554, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.034>.
48. Mado, K., Chekulayev, V., Shevchuk, I., Puurand, M., Tepp, K., and Kaambre, T. (2019) On the role of tubulin, plectin, desmin, and vimentin in the regulation of mitochondrial energy fluxes in muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **316**, C657-C667, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2018>.
49. Dayal, A. A., Medvedeva, N. V., Nekrasova, T. M., Duhalin, S. D., Surin, A. K., Minin, A. A. (2020) Desmin interacts directly with mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8122, <https://doi.org/10.3390/ijms21218122>.
50. Chernovyanenko, I. S., Matveeva, E. A., Gelfand, V. I., Goldman, R. D., and Minin, A. A. (2015) Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments, *FASEB J.*, **29**, 820-827, <https://doi.org/10.1096/fj.14-259903>.
51. Mathupala, S. P., Ko, Y. H., and Pedersen, P. L. (2010) The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1225-1230, <https://doi.org/10.1016/j.bbmbio.2010.03.025>.
52. Mariani, M., Karki, R., Spennato, M., Pandya, D., He, S., Andreoli, M., Fiedler, P., and Ferlini, C. (2015) Class III β -tubulin in normal and cancer tissues, *Gene*, **563**, 109-114, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.061>.
53. Goedert, M., Jakes, R., and Spillantini, M. G. (2017) The synucleinopathies: twenty years on, *J. Parkinsons Dis.*, **7**, S51-S69, <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>.
54. Reeve, A. K., Ludtmann, M. H., Angelova, P. R., Simcox, E. M., Horrocks, M. H., Klenerman, D., Gandhi, S., Turnbull, D. M., and Abramov, A. Y. (2015) Aggregated α -synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons, *Cell Death Dis.*, **6**, e1820, <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.166>.
55. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Horrocks, M. H., Choi, M. L., Rodrigues, M., Baev, A. Y., Berezhnov, A. V., Yao, Z., Little, D., Banushi, B., Al-Menhali, A. S., Ranasinghe, R. T., Whiten, D. R., Yapom, R., Dolt, K. S., Devine, M. J., Gissen, P., Kunath, T., Jaganjac, M., Pavlov, E. V., Klenerman, D., Abramov, A. Y., and Gandhi, S. (2018) α -Synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease, *Nat. Commun.*, **9**, 2293, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>.
56. Pastorino, J. G., Shulga, N., and Hoek, J. B. (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **277**, 7610-7618, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109950200>.
57. Abu-Hamad, S., Zaid, H., Israelson, A., Nahon, E., Shoshan-Barmatz, V. (2008) Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding, *J. Biol. Chem.*, **283**, 13482-13490, <https://doi.org/10.1074/jbc.M708216200>.
58. Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., and Shoshan-Barmatz, V. (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death, *Biochem. J.*, **377**, 347-355, <https://doi.org/10.1042/BJ20031465>.
59. Arbel, N., Ben-Hail, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2012) Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein, *J. Biol. Chem.*, **287**, 23152-23161, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345918>.

60. Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Lakunina, V. A., Kirpiy, A. A., and Kudryavtseva, A. V. (2013) Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**, 1221-1233, <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.833607>.
61. Al Jamal, J. A. (2005) Involvement of porin N,N-dicyclohexylcarbodiimide-reactive domain in hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane, *Protein J.*, **24**, 1-8, <https://doi.org/10.1007/s10930-004-0600-2>.
62. Juhaszova, M., Wang, S., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Gleichmann, M., Mattson, M. P., and Sollott, S. J. (2008) The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1123**, 197-212, <https://doi.org/10.1196/annals.1420.023>.
63. Halestrap, A. P., and Richardson, A. P. (2015) The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **78**, 129-141, <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2014.08.018>.
64. Guo, D., Meng, Y., Jiang, X., and Lu, Z. (2023) Hexokinases in cancer and other pathologies, *Cell Insight*, **2**, 100077, <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2023.100077>.
65. Zaid, H., Abu-Hamad, S., Israelson, A., Nathan, I., and Shoshan-Barmatz, V. (2005) The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death, *Cell Death Differ.*, **12**, 751-760, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401599>.
66. Rister, A. B., Gudermann, T., Schredelseker, J. (2022) E as in enigma: the mysterious role of the voltage-dependent anion channel glutamate E73, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 269, <https://doi.org/10.3390/ijms24010269>.
67. Nakashima, R. A. (1989) Hexokinase-binding properties of the mitochondrial VDAC protein: inhibition by DCCD and location of putative DCCD-binding sites, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **21**, 461-470, <https://doi.org/10.1007/BF00762518>.
68. Dolder, M., Wendt, S., and Wallimann, T. (2001) Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage, *Biol. Signals Recept.*, **10**, 93-111, <https://doi.org/10.1159/000046878>.
69. Gliozzi, M., Scarano, F., Musolino, V., Carresi, C., Scicchitano, M., Ruga, S., Zito, M. C., Nucera, S., Bosco, F., Maiuolo, J., Macrì, R., Guarnieri, L., Mollace, R., Coppoletta, A. R., Nicita, C., Tavernese, A., Palma, E., Muscoli, C., and Mollace, V. (2020) Role of TSPO/VDAC1 upregulation and matrix metalloproteinase-2 localization in the dysfunctional myocardium of hyperglycaemic rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7432, <https://doi.org/10.3390/ijms21207432>.
70. Wolff, S., Erster, S., Palacios, G., and Moll, U. M. (2008) p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity, *Cell Res.*, **18**, 733-744, <https://doi.org/10.1038/cr.2008.62>.
71. Sasaki, S., Yui, N., and Noda, Y. (2014) Actin directly interacts with different membrane channel proteins and influences channel activities: AQP2 as a model, *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 514-520, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.004>.
72. Pittalà, M. G. G., Conti Nibali, S., Reina, S., Cunsolo, V., Di Francesco, A., De Pinto, V., Messina, A., Foti, S., and Saletti, R. (2021) VDACS post-translational modifications discovery by mass spectrometry: impact on their hub function, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12833, <https://doi.org/10.3390/ijms222312833>.
73. Najbauer, E. E., Becker, S., Giller, K., Zweckstetter, M., Lange, A., Steinem, C., de Groot, B. L., Griesinger, C., and Andreas, L. B. (2021) Structure, gating and interactions of the voltage-dependent anion channel, *Eur. Biophys. J.*, **50**, 159-172, <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01515-7>.
74. Reina, S., and Checchetto, V. (2022) Voltage-dependent anion selective channel 3: unraveling structural and functional features of the least known porin isoform, *Front. Physiol.*, **12**, 784867, <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.784867>.
75. Bergdoll, L. A., Lerch, M. T., Patrick, J. W., Belardo, K., Altenbach, C., Bisignano, P., Laganowsky, A., Grabe, M., Hubbell, W. L., and Abramson, J. (2018) Protonation state of glutamate 73 regulates the formation of a specific dimeric association of mVDAC1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E172-E179, <https://doi.org/10.1073/pnas.1715464115>.
76. Keinan, N., Tyomkin, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2010) Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis, *Mol. Cell Biol.*, **30**, 5698-5709, <https://doi.org/10.1128/MCB.00165-10>.
77. Shoshan-Barmatz, V., Mizrachi, D., and Keinan, N. (2013) Oligomerization of the mitochondrial protein VDAC1: from structure to function and cancer therapy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **117**, 303-334, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386931-9.00011-8>.
78. Czabotar, P. E., and Garcia-Saez, A. J. (2023) Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **24**, 732-748, <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00629-4>.
79. Vyssokikh, M. Y., Zorova, L., Zorov, D., Heimlich, G., Jürgensmeier, J. J., and Brdiczka, D. (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect, *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 93-96, <https://doi.org/10.1023/A:1020383108620>.
80. Yan, J., Liu, W., Feng, F., and Chen, L. (2020) VDAC oligomer pores: A mechanism in disease triggered by mtDNA release, *Cell Biol. Int.*, **44**, 2178-2181, <https://doi.org/10.1002/cbin.11427>.

81. Cheng, E. H., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J., and Korsmeyer, S. J. (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis, *Science*, **301**, 513-517, <https://doi.org/10.1126/science.1083995>.
82. Naghdi, S., Várnai, P., and Hajnóczky, G. (2015) Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E5590-9, <https://doi.org/10.1073/pnas.1510574112>.
83. Chin, H. S., Li, M. X., Tan, I. K. L., Ninnis, R. L., Reljic, B., Scicluna, K., Dagley, L. F., Sandow, J. J., Kelly, G. L., Samson, A. L., Chappaz, S., Khaw, S. L., Chang, C., Morokoff, A., Brinkmann, K., Webb, A., Hockings, C., Hall, C. M., Kueh, A. J., Ryan, M. T., Kluck, R. M., Bouillet, P., Herold, M. J., Gray, D. H. D., Huang, D. C. S., van Delft, M. F., and Dewson, G. (2018) VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development, *Nat. Commun.*, **9**, 4976, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>.
84. Huckabee, D. B., and Jekabsons, M. B. (2011) Identification of Bax-voltage-dependent anion channel 1 complexes in digitonin-solubilized cerebellar granule neurons, *J. Neurochem.*, **119**, 1137-1150, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07499.x>.
85. Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001) Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function, *Biochem. J.*, **358**, 147-155, <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580147>.
86. Belosludtsev, K. N., Dubinin, M. V., Belosludtseva, N. V., and Mironova, G. D. (2019) Mitochondrial Ca²⁺ transport: mechanisms, molecular structures, and role in cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 593-607, <https://doi.org/10.1134/S0006297919060026>.
87. Lu, B., Chen, X., Ma, Y., Gui, M., Yao, L., Li, J., Wang, M., Zhou, X., and Fu, D. (2024) So close, yet so far away: the relationship between MAM and cardiac disease, *Front. Cardiovasc. Med.*, **11**, 1353533, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1353533>.
88. Van Vliet, A. R., Verfaillie, T., and Agostinis, P. (2014) New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 2253-2262, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.009>.
89. Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszyński, J., Wieckowski, M. R., and Pinton, P. (2015) Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications, *Antioxid. Redox Signal.*, **22**, 995-1019, <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6223>.
90. Poston, C. N., Krishnan, S. C., and Bazemore-Walker, C. R. (2013) In depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM), *J. Proteomics*, **79**, 219-230, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.018>.
91. Dubinin, M. V., Mikheeva, I. B., Stepanova, A. E., Igoshkina, A. D., Cherepanova, A. A., Semenova, A. A., Sharapov, V. A., Kireev, I. I., and Belosludtsev, K. N. (2024) Mitochondrial transplantation therapy ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mouse model, *Biomolecules*, **14**, 316, <https://doi.org/10.3390/biom14030316>.
92. Rosencrans, W. M., Rajendran, M., Bezrukov, S. M., and Rostovtseva, T. K. (2021) VDAC regulation of mitochondrial calcium flux: from channel biophysics to disease, *Cell Calcium*, **94**, 102356, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102356>.
93. Harada, T., Sada, R., Osugi, Y., Matsumoto, S., Matsuda, T., Hayashi-Nishino, M., Nagai, T., Harada, A., and Kikuchi, A. (2020) Palmitoylated CKAP4 regulates mitochondrial functions through an interaction with VDAC2 at ER-mitochondria contact sites. *J. Cell Sci.*, **133**, jcs249045, <https://doi.org/10.1242/jcs.249045>.
94. Min, C. K., Yeom, D. R., Lee, K. E., Kwon, H. K., Kang, M., Kim, Y. S., Park, Z. Y., Jeon, H., and Kim, D. H. (2012) Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca²⁺ transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart, *Biochem. J.*, **447**, 371-379, <https://doi.org/10.1042/BJ20120705>.
95. Liao, Y., Hao, Y., Chen, H., He, Q., Yuan, Z., and Cheng, J. (2015) Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress-induced cell death, *Protein Cell*, **6**, 434-442, <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0144-6>.
96. Carraro, M., and Bernardi, P. (2023) The mitochondrial permeability transition pore in Ca²⁺ homeostasis, *Cell Calcium*, **111**, 102719, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2023.102719>.
97. Bernardi, P., Gerle, C., Halestrap, A. P., Jonas, E. A., Karch, J., Mnatsakanyan, N., Pavlov, E., Sheu, S. S., and Soukas, A. A. (2023) Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions, *Cell Death Differ.*, **30**, 1869-1885, <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>.
98. Fang, D., and Maldonado, E. N. (2018) VDAC regulation: a mitochondrial target to stop cell proliferation, *Adv. Cancer Res.*, **138**, 41-69, <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.002>.
99. Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A. J., Yang, W. S., Fridman, D. J., Wolpaw, A. J., Smukste, I., Peltier, J. M., Boniface, J. J., Smith, R., Lessnick, S. L., Sahasrabudhe, S., and Stockwell, B. R. (2007) RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels, *Nature*, **447**, 864-868, <https://doi.org/10.1038/nature05859>.
100. Maldonado, E. N., Sheldon, K. L., DeHart, D. N., Patnaik, J., Manevich, Y., Townsend, D. M., Bezrukov, S. M., Rostovtseva, T. K., and Lemasters, J. J. (2013) Voltage-dependent anion channels modulate mitochondrial

- metabolism in cancer cells: regulation by free tubulin and erastin, *J. Biol. Chem.*, **288**, 11920-11929, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433847>.
101. Heslop, K. A., Rovini, A., Hunt, E. G., Fang, D., Morris, M. E., Christie, C. F., Gooz, M. B., DeHart, D. N., Dang, Y., Lemasters, J. J., and Maldonado, E. N. (2020) JNK activation and translocation to mitochondria mediates mitochondrial dysfunction and cell death induced by VDAC opening and sorafenib in hepatocarcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, **171**, 113728, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113728>.
 102. Zhao, Y., Li, Y., Zhang, R., Wang, F., Wang, T., and Jiao, Y. (2020) The role of erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy, *Onco Targets Ther.*, **13**, 5429-5441, <https://doi.org/10.2147/OTT.S254995>.
 103. Anghileri, L. J. (1975) The *in vivo* inhibition of tumor growth by rutheniumred: its relationship with the metabolism of calcium in the tumor, *Z. Krebsforsch Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **83**, 213-217, <https://doi.org/10.1007/BF00304090>.
 104. Israelson, A., Zaid, H., Abu-Hamad, S., Nahon, E., and Shoshan-Barmatz, V. (2008) Mapping the ruthenium red-binding site of the voltage-dependent anion channel-1, *Cell Calcium*, **43**, 196-204, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.006>.
 105. Ben-Hail, D., Begas-Shvartz, R., Shalev, M., Shteinfefer-Kuzmine, A., Gruzman, A., Reina, S., De Pinto, V., and Shoshan-Barmatz, V. (2016) Novel compounds targeting the mitochondrial protein VDAC1 inhibit apoptosis and protect against mitochondrial dysfunction, *J. Biol. Chem.*, **291**, 24986-25003, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744284>.
 106. Verma, A., Shteinfefer-Kuzmine, A., Kamenetsky, N., Pittala, S., Paul, A., Nahon Crystal, E., Ouro, A., Chalifa-Caspi, V., Pandey, S. K., Monsonogo, A., Vardi, N., Knafo, S., and Shoshan-Barmatz, V. (2022) Targeting the overexpressed mitochondrial protein VDAC1 in a mouse model of Alzheimer's disease protects against mitochondrial dysfunction and mitigates brain pathology, *Transl. Neurodegener.*, **11**, 58, <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00329-7>.
 107. Belosludtsev, K. N., Ilzorkina, A. I., Matveeva, L. A., Chulkov, A. V., Semenova, A. A., Dubinin, M. V., and Belosludtseva, N. V. (2024) Effect of VBIT-4 on the functional activity of isolated mitochondria and cell viability, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1866**, 184329, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2024.184329>.
 108. Nagakannan, P., Islam, M. I., Karimi-Abdolrezaee, S., and Eftekharpour, E. (2019) Inhibition of VDAC1 protects against glutamate-induced oxytosis and mitochondrial fragmentation in hippocampal HT22 cells, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **39**, 73-85, <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0634-1>.
 109. Zakyranova, G. F., Gilmutdinov, A. I., Tsentsevitsky, A. N., and Petrov, A. M. (2020) Olesoxime, a cholesterol-like neuroprotectant restrains synaptic vesicle exocytosis in the mice motor nerve terminals: possible role of VDACS, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1865**, 158739, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158739>.
 110. Bordet, T., Berna, P., Abitbol, J. L., and Pruss, R. M. (2010) Olesoxime (TRO19622): A novel mitochondrial-targeted neuroprotective compound, *Pharmaceuticals (Basel)*, **3**, 345-368, <https://doi.org/10.3390/ph3020345>.
 111. Tewari, D., Majumdar, D., Vallabhaneni, S., and Bera, A. K. (2017) Aspirin induces cell death by directly modulating mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC), *Sci. Rep.*, **7**, 45184, <https://doi.org/10.1038/srep45184>.
 112. Penso, J., and Beitner, R. (1998) Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase from mitochondria of melanoma cells, *Eur. J. Pharmacol.*, **342**, 113-117, [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01507-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01507-0).
 113. Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., Israelson, A., Zaslavsky, Z., Bravman, T., Bronner, V., Notcovich, A., Shoshan-Barmatz, V., and Flescher, E. (2008) Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase, *Oncogene*, **27**, 4636-4643, <https://doi.org/10.1038/onc.2008.108>.
 114. Holmuhamedov, E., and Lemasters, J. J. (2009) Ethanol exposure decreases mitochondrial outer membrane permeability in cultured rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **481**, 226-233, <https://doi.org/10.1016/j.jabb.008.10.036>.
 115. Teplova, V. V., Belosludtsev, K. N., Belosludtseva, N. V., and Kholmukhamedov, E. L. (2010) Mitochondria and hepatotoxicity of ethanol [in Russian], *Biofizika*, **55**, 1038-1047.
 116. Lemasters, J. J., Holmuhamedov, E. L., Czerny, C., Zhong, Z., and Maldonado, E. N. (2012) Regulation of mitochondrial function by voltage dependent anion channels in ethanol metabolism and the Warburg effect, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1536-1544, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.034>.
 117. Tan, W., Loke, Y. H., Stein, C. A., Miller, P., and Colombini, M. (2007) Phosphorothioate oligonucleotides block the VDAC channel, *Biophys. J.*, **93**, 1184-1191, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.105379>.
 118. Lai, J. C., Tan, W., Benimetskaya, L., Miller, P., Colombini, M., and Stein, C. A. (2006) A pharmacologic target of G3139 in melanoma cells may be the mitochondrial VDAC, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7494-7499, <https://doi.org/10.1073/pnas.0602217103>.
 119. Mannella, C. A., and Guo, X. W. (1990) Interaction between the VDAC channel and a polyanionic effector. An electron microscopic study, *Biophys. J.*, **57**, 23-31, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82503-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82503-0).
 120. Heslop, K. A., Burger, P., Kappler, C., Solanki, A. K., Gooz, M., Peterson, Y. K., Mills, C., Benton, T., Duncan, S. A., Woster, P. M., and Maldonado, E. N. (2022) Small molecules targeting the NADH-binding pocket of VDAC

- modulate mitochondrial metabolism in hepatocarcinoma cells, *Biomed. Pharmacother.*, **150**, 112928, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112928>.
121. Józwiak, P., Ciesielski, P., Forma, E., Kozal, K., Wójcik-Krowiranda, K., Cwonda, Ł., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., and Krześlak, A. (2020) Expression of voltage-dependent anion channels in endometrial cancer and its potential prognostic significance, *Tumour Biol.*, **42**, 1010428320951057, <https://doi.org/10.1177/1010428320951057>.
122. Wersäll, O. C., Löfstedt, L., Govorov, I., Mints, M., Gabrielson, M., and Shoshan, M. (2021) PGC1 α and VDAC1 expression in endometrial cancer, *Mol. Clin. Oncol.*, **14**, 42, <https://doi.org/10.3892/mco.2020.2203>.
123. Yang, G., Zhou, D., Li, J., Wang, W., Zhong, W., Fan, W., Yu, M., and Cheng, H. (2019) VDAC1 is regulated by BRD4 and contributes to JQ1 resistance in breast cancer, *Oncol. Lett.*, **18**, 2340-2347, <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10534>.
124. Vyssokikh, M. Y., and Brdiczka, D. (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis, *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 389-404.
125. Fang, Y., Liu, J., Zhang, Q., She, C., Zheng, R., Zhang, R., Chen, Z., Chen, C., and Wu, J. (2022) Overexpressed VDAC1 in breast cancer as a novel prognostic biomarker and correlates with immune infiltrates, *World J. Surg. Oncol.*, **20**, 211, <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02667-2>.
126. Seo, J. H., Chae, Y. C., Kossenkova, A. V., Lee, Y. G., Tang, H. Y., Agarwal, E., Gabrilovich, D. I., Languino, L. R., Speicher, D. W., Shastrula, P. K., Storaci, A. M., Ferrero, S., Gaudioso, G., Caroli, M., Tosi, D., Giroda, M., Vaira, V., Rebecca, V. W., Herlyn, M., Xiao, M., Fingerman, D., Martorella, A., Skordalakes, E., and Altieri, D. C. (2019) MFF regulation of mitochondrial cell death is a therapeutic target in cancer, *Cancer Res.*, **79**, 6215-6226, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1982>.
127. Wang, F., Qiang, Y., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, Y., Shao, X., Yin, L., Chen, J., and Chen, Z. (2016) MicroRNA-7 down-regulates the oncogene VDAC1 to influence hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis, *Tumour Biol.*, **37**, 10235-10246, <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4836-1>.
128. Zhang, G., Jiang, G., Wang, C., Zhong, K., Zhang, J., Xue, Q., Li, X., Jin, H., and Li, B. (2016) Decreased expression of microRNA-320a promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by increasing VDAC1 expression, *Oncotarget*, **7**, 49470-49480, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9943>.
129. DeHart, D. N., Lemasters, J. J., and Maldonado, E. N. (2018) Erastin-like anti-warburg agents prevent mitochondrial depolarization induced by free tubulin and decrease lactate formation in cancer cells, *SLAS Discov.*, **23**, 23-33, <https://doi.org/10.1177/2472555217731556>.
130. DeHart, D. N., Fang, D., Heslop, K., Li, L., Lemasters, J. J., and Maldonado, E. N. (2018) Opening of voltage dependent anion channels promotes reactive oxygen species generation, mitochondrial dysfunction and cell death in cancer cells, *Biochem. Pharmacol.*, **148**, 155-162, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.022>.
131. Böhm, R., Amodeo, G. F., Murlidaran, S., Chavali, S., Wagner, G., Winterhalter, M., Brannigan, G., and Hiller, S. (2020) The structural basis for low conductance in the membrane protein VDAC upon β -NADH binding and voltage gating, *Structure*, **28**, 206-214.e4, <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.11.015>.
132. Manczak, M., and Reddy, P. H. (2012) Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 5131-5146, <https://doi.org/10.1093/hmg/dd3360>.
133. Smilansky, A., Dangoor, L., Nakdimon, I., Ben-Hail, D., Mizrachi, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2015) The voltage-dependent anion channel 1 mediates amyloid β toxicity and represents a potential target for Alzheimer's disease therapy, *J. Biol. Chem.*, **290**, 30670-30683, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691493>.
134. Magri, A., and Messina, A. (2017) Interactions of VDAC with proteins involved in neurodegenerative aggregation: an opportunity for advancement on therapeutic molecules, *Curr. Med. Chem.*, **24**, 4470-4487, <https://doi.org/10.2174/0929867324666170601073920>.
135. Manczak, M., Sheiko, T., Craigen, W. J., and Reddy, P. H. (2013) Reduced VDAC1 protects against Alzheimer's disease, mitochondria, and synaptic deficiencies, *J. Alzheimers Dis.*, **37**, 679-690, <https://doi.org/10.3233/JAD-130761>.
136. Shteinfer-Kuzmine, A., Argueti, S., Gupta, R., Shvil, N., Abu-Hamad, S., Gropper, Y., Hoeber, J., Magri, A., Messina, A., Kozlova, E. N., Shoshan-Barmatz, V., and Israelson, A. (2019) A VDAC1-derived N-terminal peptide inhibits mutant SOD1-VDAC1 interactions and toxicity in the SOD1 model of ALS, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 346, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00346>.
137. Belosludtseva, N. V., Matveeva, L. A., Belosludtsev, K. N. (2023) Mitochondrial dyshomeostasis as an early hallmark and a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 16833, <https://doi.org/10.3390/ijms242316833>.
138. Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., Cleveland, D. W. (2010) Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS, *Neuron*, **67**, 575-587, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.019>.

139. Sunyach, C., Michaud, M., Arnoux, T., Bernard-Marissal, N., Aebischer, J., Latyszenok, V., Gouarné, C., Raoul, C., Pruss, R. M., Bordet, T., and Pettmann, B. (2012) Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model, *Neuropharmacology*, **62**, 2346-2352, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.013>.
140. Lenglet, T., Lacomblez, L., Abitbol, J. L., Ludolph, A., Mora, J. S., Robberecht, W., Shaw, P. J., Pruss, R. M., Cuvier, V., and Meininger, V. (2014) Mitotarget study group. A phase II-III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis, *Eur. J. Neurol.*, **21**, 529-536, <https://doi.org/10.1111/ene.12344>.
141. Abramov, A. Y., Berezhnov, A. V., Fedotova, E. I., Zinchenko, V. P., and Dolgacheva, L. P. (2017) Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 1025-1033, <https://doi.org/10.1042/BST20170024>.
142. Martínez, J. H., Fuentes, F., Vanasco, V., Alvarez, S., Alaimo, A., Cassina, A., Coluccio Leskow, F., and Velazquez, F. (2018) Alpha-synuclein mitochondrial interaction leads to irreversible translocation and complex I impairment, *Arch Biochem Biophys.*, **651**, 1-12, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.04.018>.
143. Chu, Y., Goldman, J. G., Kelly, L., He, Y., Waliczek, T., and Kordower, J. H. (2014) Abnormal alpha-synuclein reduces nigral voltage-dependent anion channel 1 in sporadic and experimental Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **69**, 1-14, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.003>.
144. Sasaki, K., Donthamsetty, R., Heldak, M., Cho, Y. E., Scott, B. T., and Makino, A. (2012) VDAC: Old protein with new roles in diabetes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, C1055-C1060, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00087.2012>.
145. Ahmed, M., Muhammed, S. J., Kessler, B., and Salehi, A. (2010) Mitochondrial proteome analysis reveals altered expression of voltage dependent anion channels in pancreatic β -cells exposed to high glucose, *Islets*, **2**, 283-292, <https://doi.org/10.4161/isl.2.5.12639>.
146. Gong, D., Chen, X., Middleditch, M., Huang, L., Vazhoor Amarsingh, G., Reddy, S., Lu, J., Zhang, S., Ruggiero, K., Phillips, A. R., and Cooper, G. J. (2009) Quantitative proteomic profiling identifies new renal targets of copper(II)-selective chelation in the reversal of diabetic nephropathy in rats, *Proteomics*, **9**, 4309-4320, <https://doi.org/10.1002/pmic.200900285>.
147. Lumini-Oliveira, J., Magalhães, J., Pereira, C. V., Moreira, A. C., Oliveira, P. J., and Ascensão, A. (2011) Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia, *Mitochondrion*, **11**, 54-63, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.005>.
148. Belosludtsev, K. N., Serov, D. A., Ilzorkina, A. I., Starinets, V. S., Dubinin, M. V., Talanov, E. Y., Karagyaur, M. N., Primak, A. L., and Belosludtseva, N. V. (2023) Pharmacological and genetic suppression of VDAC1 alleviates the development of mitochondrial dysfunction in endothelial and fibroblast cell cultures upon hyperglycemic conditions, *Antioxidants*, **12**, 1459, <https://doi.org/10.3390/antiox12071459>.
149. Greyslak, K. T., Hetrick, B., Bergman, B. C., Dean, T. A., Wesolowski, S. R., Gannon, M., Schenk, S., Sullivan, E. L., Aagaard, K. M., Kievit, P., Chicco, A. J., Friedman, J. E., and McCurdy, C. E. (2023) A maternal western-style diet impairs skeletal muscle lipid metabolism in adolescent Japanese macaques, *Diabetes*, **72**, 1766-1780, <https://doi.org/10.2337/db23-0289>.
150. Rahmani, Z., Huh, K. W., Lasher, R., and Siddiqui, A. (2000) Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential, *J. Virol.*, **74**, 2840-2846, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2840-2846.2000>.
151. Moin, S. M., Panteva, M., and Jameel, S. (2007) The hepatitis E virus Orf3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death, *J. Biol. Chem.*, **282**, 21124-21133, <https://doi.org/10.1074/jbc.M701696200>.
152. Qiao, H., and McMillan, J. R. (2007) Gelsolin segment 5 inhibits HIV-induced T-cell apoptosis via Vpr-binding to VDAC, *FEBS Lett.*, **581**, 535-540, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.057>.
153. Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., and Palese, P. (2005) Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1, *PLoS Pathog.*, **1**, e4, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010004>.
154. Jitobaom, K., Tongluan, N., and Smith, D. R. (2016) Involvement of voltage-dependent anion channel (VDAC) in dengue infection, *Sci. Rep.*, **6**, 35753, <https://doi.org/10.1038/srep35753>.
155. Han, C., Zeng, X., Yao, S., Gao, L., Zhang, L., Qi, X., Duan, Y., Yang, B., Gao, Y., Liu, C., Zhang, Y., Wang, Y., and Wang, X. (2017) Voltage-dependent anion channel 1 interacts with ribonucleoprotein complexes to enhance infectious bursal disease virus polymerase activity, *J. Virol.*, **91**, e00584-17, <https://doi.org/10.1128/JVI.00584-17>.
156. Thompson, E. A., Cascino, K., Ordonez, A. A., Zhou, W., Vaghasia, A., Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., Sun, I. H., Wang, R., Rosenberg, A. Z., Delannoy, M., Rothman, R., Fenstermacher, K., Sauer, L., Shaw-Saliba, K., Bloch, E. M., Redd, A. D., Tobian, A. A. R., Horton, M., Smith, K., Pekosz, A., D'Alessio, F. R., Yegnasubramanian, S., Ji, H., Cox, A. L., and Powell, J. D. (2021) Metabolic programs define dysfunctional immune responses in severe COVID-19 patients, *Cell Rep.*, **34**, 108863, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108863>.

**PORE-FORMING VDAC PROTEINS
OF THE OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANE:
REGULATION AND PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE**

Review

N. V. Belosludtseva^{1,2}, M. V. Dubinin², and K. N. Belosludtsev^{2*}

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
192290 Pushchino, Russia*

² *Mari State University, 424001 Yoshkar-Ola, Russia; e-mail: bekonik@gmail.com*

Voltage-dependent anion channels of the outer membrane of mitochondria are a family of pore-forming β -barrel proteins (VDAC1-3), which carry out controlled “filtration” of small molecules and ions between the cytoplasm and mitochondria. The possibility of temporary conformational transitions between the closed and open states of VDAC proteins, as well as their interaction with a number of cytoplasmic and mitochondrial proteins, allows these channels not only to regulate membrane permeability for major metabolites and ions, but also to participate in the control of vital intracellular processes and pathological conditions. This work is devoted to the analysis of novel data obtained on the putative molecular structure, regulatory mechanisms, and pathophysiological role of VDAC family proteins, as well as possible future directions in this area of research.

Keywords: VDAC, mitochondria, membrane transport, cell death, cancer, diabetes mellitus, neurodegenerative diseases

ФОРМИРОВАНИЕ АМИЛОИДОПОДОБНЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ β -СТРУКТУРНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ ПОРИНА OmpF НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *Yersinia pseudotuberculosis*

© 2024 О.Д. Новикова^{1*}, Т.В. Рыбинская¹, Е.А. Зелепуга¹, В.Н. Уверский²,
Н.Ю. Ким¹, Е.А. Чингизова¹, Е.С. Менчинская¹, В.А. Хоменко¹,
Д.К. Чистюлин¹, О.Ю. Портнягина^{1*}

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова,
690022 Владивосток, Россия; электронная почта: novolga_05@mail.ru; odd64@mail.ru

² Университет Южной Флориды, Медицинский колледж Морсани,
кафедра молекулярной медицины, 33620 Тампа, Флорида, США

Поступила в редакцию 26.10.2023

После доработки 14.03.2024

Принята к публикации 31.03.2024

В работе приведены результаты исследования *in vitro* и *in silico* процесса образования амилоидоподобных структур в жестких денатурирующих условиях неспецифическим порином OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) – мембранным белком, имеющим конформацию β -бочонка. Показано, что для получения амилоидоподобных агрегатов порина необходима предварительная дестабилизация его структуры в буферном растворе с кислым значением pH при повышенной температуре с последующей длительной инкубацией при комнатной температуре. После нагревания при 95 °C в растворе с pH 4,5 в молекуле порина на уровне третичной и вторичной структуры белка наблюдаются существенные конформационные перестройки, которые сопровождаются увеличением содержания суммарной β -структуры и резким уменьшением величины характеристической вязкости раствора белка. Последующее длительное выдерживание полученного нестабильного интермедиата YpOmpF при комнатной температуре приводит к формированию разнообразных по форме и размерам агрегатов порина, связывающих теофлавин Т (специфический флуоресцентный краситель для обнаружения амилоидоподобных белковых структур). Показано, что, по сравнению с исходным белком, ранние промежуточные продукты амилоидогенного пути порина, олигомеры, обладают повышенной токсичностью по отношению к клеткам нейробластомы мыши Neuro-2aCCCL-131TM. Результаты компьютерного моделирования и анализа изменения собственной флуоресценции при агрегации белка позволяют предположить, что при образовании амилоидоподобных агрегатов изменения в структуре YpOmpF затрагивают не только участки с внутренне неупорядоченной структурой, соответствующие наружным петлям порина, но и основной каркас молекулы, имеющий жесткую пространственную структуру, присущую β -бочонку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: порин OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, мембранный белок, амилоидогенез, пространственная структура, цитотоксическая активность, компьютерное моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972524060081 EDN: XLJZYQ

ВВЕДЕНИЕ

Образование амилоидов можно рассматривать как одну из разновидностей формирования

ненативного конформационного состояния белковой молекулы под действием условий, в которых нативная структура нарушается [1–3]. В результате исследований стало понятно, что решающее

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; мол. м. – молекулярная масса; НМ – наружная мембрана; RP и RP_del – рекомбинантные полноструктурный и мутантные белки порина OmpF с делециями некоторых наружных петель соответственно; ThT – теофлавин Т; YpOmpF – порин OmpF *Y. pseudotuberculosis*; YpOmpFm и YpOmpFt – мономер и тример порина OmpF соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

значение для образования амилоидов может иметь формирование популяции белка в определенном денатурированном состоянии, способном к переходу в амилоидоподобную конформацию с повышенным содержанием кросс- β -структуры [4]. Известно, что неправильная укладка белков является причиной образования патологических агрегатов и может приводить к развитию некоторых заболеваний, прежде всего, нейродегенеративных, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабета второго типа и других [5, 6]. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе «губительной судьбы белков», может помочь в разработке стратегии для преодоления этой проблемы.

В литературе описана также способность целого ряда белков, не связанных с заболеваниями, формировать амилоидные фибриллы [7, 8]. Известно, что различные патогенные виды бактерий широко используют амилоидную форму белка для взаимодействия с эукариотическими организмами [9]. Амилоиды бактерий образуют слои внеклеточного белка со свойствами адгезинов, регулируют активность токсинов и факторов вирулентности, а также являются матрицами биопленок, а прионы дрожжей помогают при адаптации к различным условиям окружающей среды [10, 11]. Это наводит на мысль, что указанные организмы могут осуществлять различные жизненно важные функции только с помощью амилоидов, обладающих уникальными свойствами, отсутствующими у «обычных» белковых молекул. При этом бактерии представляют собой простейшую клеточную модель, с помощью которой можно исследовать процесс амилоидогенеза.

Таким образом, процесс образования амилоидоподобных агрегатов белков представляет интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. Понимание факторов, которые регулируют склонность белков к амилоидогенезу, а также выявление особенностей структуры белковой молекулы, определяющих это свойство, являются важными фундаментальными вопросами физики белка. Значительное число исследователей сходится во мнении, что при изучении процесса формирования амилоидных структур невозможно обойтись без кинетического анализа процесса и характеристики возможных конформационных состояний белка и соответствующих им олигомерных структур, образующихся в ходе агрегации [12–14]. В литературе описаны искусственные системы для направленного и/или пошагового получения таких структур от первичных амилоидоподобных агрегатов до фибрилл [15–17].

С определенного времени все большее экспериментальное подтверждение приобретает мнение о том, что все β -структурные белки способны к образованию амилоидоподобных агрегатов [18].

Основой для конформационных превращений белков этого типа является наличие в их аминокислотной последовательности так называемых амилоидогенных участков, соответствующих гибким фрагментам полипептидной цепи с повышенной способностью к конформационным изменениям [19]. Именно существование таких внутренне неупорядоченных областей, обладающих явными преимуществами перед свернутыми доменами по способности к образованию разнообразных связей, обеспечивает β -белкам конформационную пластичность и, как следствие, мультифункциональность [20, 21]. Подобными свойствами обладают неспецифические порины наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий, которые являются типичными β -структурными мембранными белками, образующими сеть водонаполненных пор, предназначенных для неспецифической диффузии растворимых питательных веществ и метаболитов [22]. В количественном отношении порообразующие белки являются преобладающими среди белков НМ, в нативных мембранах они существуют в виде гомотримеров, структура мономерных звеньев которых стабилизирована многочисленными взаимодействиями различной природы: гидрофобными, ионными и водородными связями [23]. Отличительной особенностью поринов, с одной стороны, является высокая стабильность, которая присуща основному элементу их пространственной организации, β -бочонку, а с другой – способность легко образовывать различные конформационные интермедиаты в зависимости от условий среды, т.е. конформационная пластичность.

В последнее десятилетие значительное число работ многих авторов было посвящено изучению особенностей конформационно-функциональной активности поринов, сопряженной с их динамическим «поведением», в том числе с образованием поливалентных электростатических взаимодействий на поверхности липидных бислоев и внутри поринового канала при изменении различных факторов окружающей среды [24–27]. Кроме того, обнаружено, что такие бактериальные порины, как OmpA и OmpC, в определенных условиях *in vitro* могут формировать амилоидные и амилоидоподобные агрегаты [28]. Особый интерес в этом плане, несомненно, представляет вопрос, какие элементы структуры поринов способствуют процессу превращения его в типичные амилоиды.

Конкретный интерес авторов данного исследования лежит в области неспецифических поринов грамотрицательных бактерий рода *Yersinia* – патогенов, вызывающих у человека острую кишечную инфекцию, которая, в свою очередь, приводит не только к развитию осложненных и рецидиви-

рующих состояний, но и является триггером ряда аутоиммунных заболеваний.

В результате исследования структурных пре-вращений поринов иерсиний под действием денатурирующих факторов (рН среды, температуры, мочевины) было обнаружено, что пространственная структура конформационных интермедиатов этих белков, образующихся в разных условиях, существенно отличается [29–31]. Такое поведение характерно для белков, содержащих в своей последовательности участки внутренне неупорядоченной структуры. С целью выявления в аминокислотных последовательностях поринов OmpF таких конформационно гибких областей, а также определения участков их локализации был проведен анализ первичной структуры поринов иерсиний, обитающих в различных природных нишах (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia ruckeri*), выполненный с помощью Веб-ресурсов, таких как d2p2 (<http://d2p2.pro/>) [32] и ODiNPRED [33], предназначенных для прогнозирования локализации упорядоченных и неупорядоченных участков в последовательности белков на основании анализа биоинформатических и экспериментальных данных. В результате было установлено, что значительное количество участков с внутренне неупорядоченной структурой находится в области наружных петель поринов, напротив, β -тяжи таких участков не содержат, но существенно различаются по степени своей конформационной гибкости [34].

Целью настоящей работы является характеристика амилоидоподобных агрегатов β -структурных мембранных белков, полученных в различных условиях, на примере порина OmpF NM *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование бактериальных клеток.

В работе использовали клетки *Y. pseudotuberculosis* (серовар IV, штамм 598), полученные из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (г. Владивосток). Бактерии культивировали при 4–6 °C в течение 6 суток на среде LB при перемешивании.

Выделение и очистка белка. Изолированный порин OmpF из *Y. pseudotuberculosis* получали из высушенной ацетоном микробной массы путем последовательной обработки 2%-ным Triton X-100, ДНКзой («Sigma-Aldrich», США) и 0,5%-ным саркозилатом натрия при 4 °C в течение 12 ч, как описано в работе Новиковой и др. [35]. Для получения комплекса пептидогликан (ПГ)–порин полученный после центрифугирования (100 000 об./мин) осадок экстрагировали 2%-ным Ds-Na при 50 °C.

Изолированный порин в тримерной форме получали при температуре 37 °C в результате диссоциации комплекса ПГ–белок, суспендированного в буфере А (30 mM Tris-HCl, pH 7,4), содержащем 0,5 M NaCl и 1% Ds-Na. Электрофоретически гомогенную фракцию тримеров белка получали после очистки на колонке (1,5 × 70,0 см) с сефакирилом S-200 («GE Healthcare», Швеция), уравновешенной буфером А, содержащим 0,25% Ds-Na.

Получение агрегатов OmpF *Y. pseudotuberculosis*. К 200 мкл исходного раствора белка (0,75 мг/мл) в буфере А добавляли 50 мкл 0,05 M фосфатно-цитратного буфера (pH 3,5), значение pH полученного раствора составляло 4,5. Полученный раствор инкубировали при постоянной температуре 42 °C в течение 2–4 недель или при 95 °C в течение 3–5 ч.

Аналитические методы. Электрофорез в градиентном ПААГ (9–12%) в присутствии Ds-Na проводили в Tris-глициновом буфере, согласно ранее опубликованным данным [36]. Белки, разделенные в геле, окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250 в 3,5%-ной хлорной кислоте [37].

Определение вязкости растворов полипептидов выполняли на вискозиметре Убеллоде (температура – 20,0 ± 0,1 °C, диаметр капилляра – 0,4 и 0,3 мм) в 30 mM Tris-HCl-буфере (pH 7,4), содержащем 0,2 M NaCl и 1% Ds-Na.

Определение молекулярной массы белка. Сравнительный анализ мол. м. образцов мономеров порина YpOmpFm и YpOmpFm_10 кДа (по объему элюирования) с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-150 в присутствии гуанидин гидрохлорида проводили, как описано ранее [38].

Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (ВП-МАЛДИ-МС). Эксперименты по времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии проводили на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF («Bruker Daltonics», Германия), оснащенном детектором высоких масс HMD-1 («CovalX AG», Швейцария), в линейном режиме с регистрацией положительных ионов. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор 3,5-диметокси-4-гидроксикоричной (синапиновой) кислоты (10 мг/мл) в смеси ацетонитрил/0,25%-ная ТФУ (1/1, v/v). Для получения масс-спектров порина белок из раствора детергента осаждали 9-кратным объемом ацетона, осадок промывали водой и суспендировали в воде, затем наносили на мишень, высушивали и добавляли матрицу.

Оптические методы. Концентрацию белка в растворе определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм. Удельный коэффициент поглощения $A^{0,1\%}/1$ см принимали равным 1,27 (значение молярной экстинкции порина определено экспериментально) [39]. УФ-Спектры регистри-

ровали при 20 °C на спектрофотометре UV-Visible UV-1601PC («Shimadzu», Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрополяриметре Chirascanplus CD spectropolarimeter («Applied Photophysics Ltd», Великобритания) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм для пептидной и 1 см для ароматической областей спектра. Эллиптичность $[\theta]$ в пептидной области спектра считали, как эллиптичность среднего остатка, принимая его мол. м. равной 110 Да, и содержание белка, равным 100%, в единицах град · см²/дмоль по формуле:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{набл}} \times S \times 110 / (10 \times c \times l),$$

где S – чувствительность шкалы прибора, c – концентрация белка (мг/мл), l – длина оптического пути в мм. В ароматической области спектра эллиптичность считали, как молярную эллиптичность $[\theta]_m$ с мол. м. мономера порина (YrOmpFm), равной 36,7 кДа (определено по данным аминокислотного анализа), и тримера порина (YrOmpFt), равной 110,1 кДа. Калибровку спектрополяриметра проводили по 0,06%-ному водному раствору аммониевой соли 10-сульфоната-*D*-камфорной кислоты. Отношение эллиптичностей полос при 191 и 290 нм составляло 2,05. Все спектральные измерения растворов прогретых образцов порина проводили после охлаждения до 25 °C. Расчет содержания элементов вторичной структуры проводили, используя пакет программ CDPPro [40].

Спектры собственной флуоресценции белка порина измеряли в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофлуориметре RF-5301PC («Shimadzu», Япония). В спектры флуоресценции вводили поправку на спектральную чувствительность прибора, рассчитанную по спектру излучения родамина В. Из поправленных спектров вычитали полосу Рамановского комбинационного рассеяния буферного раствора. Флуоресценцию возбуждали светом с длинами волн 280 и 296 нм. Спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии составляла 5 нм.

Флуоресценция комплексов белков с тиофлавином Т (ThT). Образцы белков перед экспериментом переводили в буфер Б (10 mM фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) без Ds-Na с помощью центрифужных концентраторов AmiconUltra, 30 кДа («Merck», США). 10 мкл раствора белка помещали в лунку 96-луночного планшета («Corning Costar», США), добавляли 300 мкл рабочего раствора ThT (исходный (25 mM) раствор ThT, разбавленный в 15 000 раз), инкубировали при перемешивании в темноте 1 мин и регистрировали интенсивность флуоресценции комплексов порин-ThT при длине волны возбуждения 412 нм

(ширина щели – 5 нм) и испускания – 450 нм (ширина щели – 10 нм) на спектрофотометре Multi-Mode Microplatereader Sinergy 5 («BioTek Instruments Inc.», США).

Флуоресцентная микроскопия. 10 мкл образца белка смешивали с 0,5 мкл 25 mM раствора ThT в буферном растворе Б, помещали на предметное стекло и визуализировали окрашенные агрегаты с помощью микроскопа LSM510 META («Zeiss», Германия).

Биологическая активность. Цитотоксическую активность исследуемых образцов YrOmpF определяли на клеточной линии мышечной нейробластомы Neuro-2aCCL-131™ («ATCC», США). Клетки (1×10^4 клеток на лунку) инкубировали в 96-луночной планшете в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч при 37 °C для адгезии. После этого в клетки добавляли исследуемые белки в концентрации 1–160 мкг/мл в буфере Б (pH 7,4) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 24 ч, после чего удаляли супернатант и добавляли чистую среду. Затем в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT) (5 мг/мл) («Sigma-Aldrich») и инкубировали 4 ч, после чего добавляли раствор Ds-Na-HCl (1 г Ds-Na/10 мл ddH₂O/17 мкл 6N HCl) и продолжали инкубировать при 37 °C в течение 18 ч. Оптическую плотность преобразованного красителя формазана измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan FC («ThermoScientific», Канада) при длине волны 570 нм. Цитотоксическую активность поринов выражали как эффективную концентрацию (ЭК₅₀), при которой метаболическая активность клеток ингибируется на 50%. Все эксперименты повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали буферный раствор Б.

Молекулярное моделирование. Модель пространственной структуры мономера YrOmpF (UniProtA0A0U1QUP9) построена методом гомологичного моделирования с помощью программы MOE 2019.01 CCG [41] на основании кристаллической структуры порина OmpF из *Escherichia coli* (PDBID 2OMF), как это было описано ранее [42]. Стартовая система для симуляции включала модель мономера порина YrOmpF и была сольватирована 10 249 молекулами воды в 10 mM NaCl. Затем система была протонирована в силовом поле Amber14:ENT при pH 7,0 и 4,5 с помощью специализированного программного пакета MOE 2019.01 CCG [41]. Симуляцию полноатомной молекулярной динамики (МД) проводили при постоянном давлении (1 атм) и температуре (300 K) с шагом по времени 2 фс. Полноатомное силовое поле Amber14:ENT использовали для белков [43], TIP3P – для воды [44]. Молекулы растворителя считались жесткими. Все симуляции МД, включая

нагрев, а также шаги по минимизации энергии, были выполнены с помощью программного пакета МОЕ 2019.01 ССГ [41] с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Дальневосточный вычислительный ресурс» ДВО РАН (Владивосток).

Анализ предрасположенности различных участков порина YrOmpF к внутренней разупорядоченности проводили с помощью различных предсказательных программ: PONDR® VLS2 [45, 46], PONDR® VL3 [47], PONDR® VLXT [48], PONDR® FIT [49], IUPred-Long и IUPred-Short [50]. Веб-приложение Rapid Intrinsic Disorder Analysis Online (RIDA) использовали для суммирования результатов, полученных с помощью каждой предсказательной программы [51]. Использование нескольких программ для предсказания внутренней разупорядоченности является общепризнанным подходом, который обусловлен разной чувствительностью разных алгоритмов по отношению к внутренней разупорядоченности белков. Это связано с тем, что разные алгоритмы используют разные атрибуты (такие как аминокислотный состав, гидрофобность и т.д.) и модели для расчета показателя внутренней разупорядоченности для каждого аминокислотного остатка в белке. Поэтому каждый алгоритм имеет свои преимущества и ограничения и может быть использован для выявления некоторых специфических особенностей внутренней разупорядоченности. По сути, это похоже на применение мультипараметрического подхода в экспериментальном анализе структуры белка. Например, PONDR® VLS2 является одним из наиболее точных автономных алгоритмов для предсказания внутренней разупорядоченности белков [45, 46], PONDR® VL3 обладает высокой точностью обнаружения длинных неупорядоченных участков [47], PONDR® VLXT не является самым точным алгоритмом, но обладает высокой чувствительностью к локальным особенностям аминокислотных последовательностей, которые часто связаны с центрами белок-белковых взаимодействий на основе внутренней разупорядоченности [48], PONDR® FIT представляет собой метапредиктор, который несколько более точен, чем каждый из его составляющих алгоритмов (таких как PONDR® VLS2, PONDR® VLXT, PONDR® VL3, IUPred, FoldIndex, IUPred и TopIDP) [49], тогда как IUPred использует подход попарной оценки энергии для поиска внутренне неупорядоченных остатков, образующих короткие или длинные неупорядоченные участки (IUPred_short и IUPred_long соответственно) [50].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее авторами статьи было показано, что порины НМ граммотрицательных бактерий рода

Yersinia чрезвычайно устойчивы к действию детергентов при повышенной температуре, в то же время они легко образуют множество конформационных интермедиатов, пространственная структура которых определяется природой детергента, используемого для солюбилизации этих белков, не только на уровне третичной структуры, но и на уровне более стабильной вторичной структуры [29, 31]. Для исследования возможности формирования *in vitro* амилоидных структур порообразующим белком YrOmpF мы использовали изолированный тример порина (YrOmpF) и рекомбинантные белки (RP и RP_del6). Образец изолированного YrOmpF был получен из НМ бактерий при последовательной экстракции растворами детергентов. При проведении электрофореза в градиентном ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии Ds-Na YrOmpF имеют кажущуюся мол. м. 105–110 кДа. При нагревании порина выше температуры необратимой денатурации, которая для YrOmpF составляет 70 °С, образуется денатурированный теплом мономер (YrOmpFm), который имеет электрофоретическую подвижность, соответствующую кажущейся мол. м. 40 кДа [35]. Рекомбинантные порины OmpF, полноструктурный (RP) и мутантные белки с делециями некоторых наружных петель (RP_del), были получены нами ранее путем гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* [29, 52].

Поскольку белок в нестабильной конформации наиболее подвержен структурным перестройкам, при выборе условий обработки образцов порина, в частности pH среды инкубации, мы руководствовались полученными нами ранее данными о конформационных переходах YrOmpF при pH-титровании [30]. Было показано, что конформационные превращения порина из псевдотуберкулезного микроба под действием pH могут быть описаны трехступенчатой моделью: (1) разрушение ассоциатов порина с образованием нативоподобных тримеров белка → (2) независимые изменения в отдельных структурных доменах порина с последующей диссоциацией тримера на мономеры → (3) образование мономерных интермедиатов порина с разрыхленной структурой различной степени [30]. С помощью метода КД конформационное состояние YrOmpF при pH 4,5 было определено как переходное. Отмечено было уменьшение жесткости молекулярной структуры YrOmpF в этих условиях, что является результатом структурных перестроек, индуцированных протонированием карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот и, как следствие, разрыва внутримолекулярных водородных связей с гидроксильными группами (например, тирозина), которые имеют решающее значение для структурной стабилизации белка [30]. Данный конформацион-

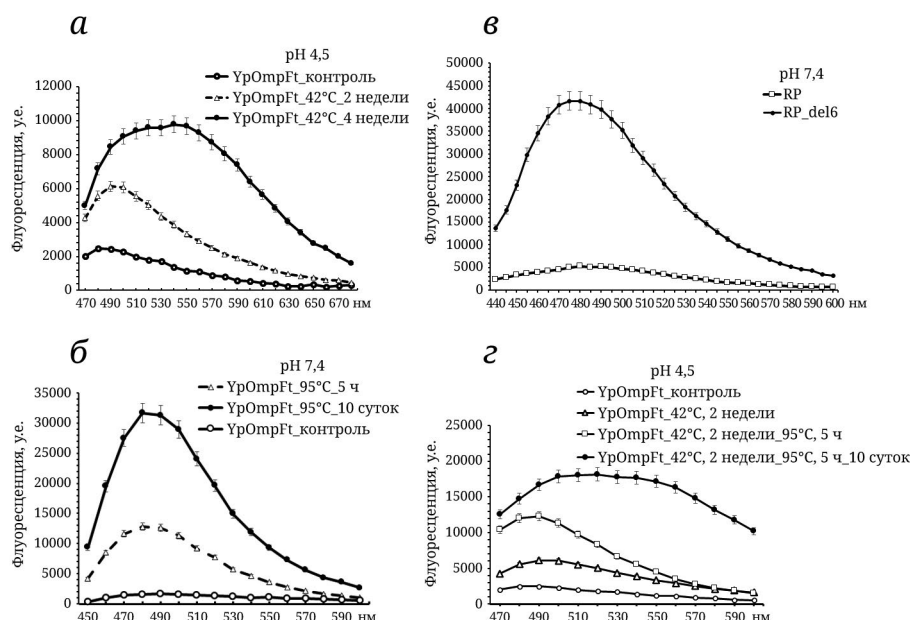


Рис. 1. Спектры флуоресценции комплекса тиюфлавина Т с поринами. а – YrOmpFt после инкубации в фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 4,5) в течение 2-х и 4-х недель при 42 °С. б – YrOmpFt после прогрева при 95 °С в течение 5 ч в Tris-HCl-буфере (pH 7,4) и последующей экспозиции при 25 °С в течение 10 суток. в – Реконбинантные порины, полноструктурный (RP) и мутантный с делецией наружной петли 6 (RP_del6), образцы хранились в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,4) в присутствии 0,01%-ного Zw 3-14 при 4 °С в течение 6 месяцев. г – YrOmpFt после инкубации в фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 4,5) в течение 2-х недель при 42 °С, затем прогрева при 95 °С в течение 5 ч и последующей экспозиции образца при 25 °С в течение 10 суток. Флуоресценцию возбуждали при 412 нм. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов

ный интермедиат порина характеризовался также наименьшим количеством регулярной β -структуры и наибольшим количеством как β -изгибов, так и неупорядоченной структуры. Согласно литературным данным, это является дополнительным свидетельством нестабильности молекулы порина в этих условиях, поскольку структурная стабильность β -тяжей зависит именно от конформации связывающих их сегментов [53]. Интересно отметить, что конформационным изменениям в прионных белках, связанным с образованием их фибриллярных нейротоксических форм, предшествует увеличение в структуре белка количества β -изгибов [54]. Кроме того, для этого конформационного состояния порина оказалось характерным наибольшее количество фрагментов β -структуры с минимальной длиной, предположительно, за счет увеличения количества межмолекулярных β -связей, образующихся при формировании ассоциатов белка [30].

При выборе температуры обработки образцов мы ориентировались на литературные данные, согласно которым амилоидоподобные превращения белка могут происходить как при температуре, способствующей первоначальной дестабилизации пространственной структуры белка (42 °С) [55, 56], так и при температуре, близкой к температуре теплового денатурационного перехода [57].

Учитывая сказанное выше, в эксперименте для получения агрегатов YrOmpF образцы белка подвергали трем типам обработки: (1) выдерживали при пермиссивной температуре (42 °С) в буфере при pH 4,5, имитирующем кислую среду лизосом (pH 3,6–4,8); (2) выдерживали при повышенной температуре (95 °С) в буфере с нейтральным значением pH среды (7,4) и (3) выдерживали в жестких денатурирующих условиях (pH 4,5; 95 °С). Мы также варьировали длительность инкубации: от 5 ч до нескольких недель. Для детекции образования амилоидов использовали специфический краситель тиюфлавин Т, чувствительный к амилоидоподобным структурам [58], и спектроскопию КД для характеристики изменений вторичной структуры белка. Морфологию продуктов обработки YrOmpF в различных условиях изучали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Обработка белка по типу (1) была выбрана с учетом данных литературы о том, что для понимания биохимических механизмов образования амилоидных фибрилл полезно изучение превращений потенциально амилоидогенных белков в физиологических условиях, имитирующих кислую среду лизосом [55]. При этом были приняты во внимание данные о том, что сопровождаемая денатурацией диссоциация олигомеров некоторых белков до мономеров, полностью утративших природную

Содержание элементов вторичной структуры (%)* в образце YrOmpFt после обработки белка в различных условиях

№	Образец	α -Спираль	β -Структура	β -Изгиб	Неупорядоченная структура
1	YrOmpFt_контроль	22,1	21,0	22,5	34,4
2	YrOmpFt_42 °C_2 недели, pH 4,5	19,2	24,8	21,9	34,1
3	YrOmpFt_42 °C_4 недели, pH 4,5	19,3	24,2	21,7	34,8
4	YrOmpFt_42 °C_2 недели, 95 °C_5 ч, pH 4,5	4,8	41,9	21,9	31,4
5	YrOmpFt_42 °C_2 недели, 95 °C_5 ч, 10 суток, pH 4,5	3,4	44,8	20,6	31,2
6	YrOmpFt_95 °C_5 ч, pH 7,4	6,4	38,6	22,0	33,1
7	YrOmpFt_95 °C_5 ч, 10 суток, pH 7,4	4,1	42,0	21,5	32,4
8	RP	19,5	28,6	20,4	31,5
9	RP_del6	5,1	40,5	21,6	32,8

Примечание. * $\pm$ стандартное отклонение для всех элементов вторичной структуры белка не превышает 0,7%. Все спектральные измерения проводили после охлаждения растворов до 25 °C.

пространственную организацию при pH ниже 3,6, может привести к значительному снижению скорости образования фибрилл [57].

Как следует из данных КД (таблица), обработка YrOmpFt по типу (1) не привела к каким-либо изменениям в соотношении элементов регулярной вторичной структуры белка даже к концу срока наблюдения (4 недели). Тем не менее, судя по спектрам флуоресценции комплексов порина с ThT (рис. 1, а), отсутствие существенных изменений на уровне вторичной структуры белка не исключает появления в его молекуле участков структуры, имеющих способность специфически взаимодействовать с красителем. Так, через 2 недели наблюдалось 3-кратное увеличение интенсивности флуоресценции комплекса порин–краситель, что может свидетельствовать о наличии в образце денатурированного белка. Через 4 недели было обнаружено не только более значительное (в 5 раз) увеличение интенсивности флуоресценции красителя, но и сдвиг максимума флуоресценции в длинноволновую область спектра (рис. 1, а).

Полученные данные свидетельствовали о возможной перестройке пространственной организации молекулы YrOmpFt и начале процесса формирования амилоидоподобных агрегатов. Действительно, как показали результаты флуоресцентной микроскопии, после инкубации в кислой среде в мягких условиях (при 42 °C в течение 4-х недель) в исследуемом образце порина были обнаружены окрашиваемые ThT-структуры.

Однако, как видно из данных, представленных на рис. 2, а, они представляли собой аморфные агрегаты, не имеющие ничего общего с морфологией типичных амилоидоподобных структур. Учитывая размер полученных агрегатов, мы предположили, что они являются агрегатами ранних промежуточных продуктов амилоидогенного пути – олигомеров.

Целью второго этапа исследования, обработки по типу (2), стало выяснение влияния собственно повышенной температуры на процесс формирования амилоидов исследуемым белком. Инкубацию YrOmpFt проводили при температуре 95 °C в течение 5 ч в буфере со значением pH, близким к нейтральному (pH 7,4). Согласно данным КД, обработка в этих условиях приводила к существенному увеличению относительного содержания суммарной β -структуры (таблица). Как видно из данных, представленных на рис. 1, б, сразу после прогрева при 95 °C YrOmpFt обнаруживал способность связываться с ThT. Интенсивность флуоресценции комплекса порин–краситель, по сравнению с контролем, увеличивалась в 7,7 раза, а после инкубации прогретого образца белка в течение 10 суток при комнатной температуре – в 18,8 раза. Методом микроскопии в исследуемом образце были обнаружены целые скопления окрашиваемых ThT агрегатов белка (рис. 2, б). Очевидно, высокотемпературная обработка белка при нейтральных значениях pH инициирует формирование агрегатов порина, связывающих специфический

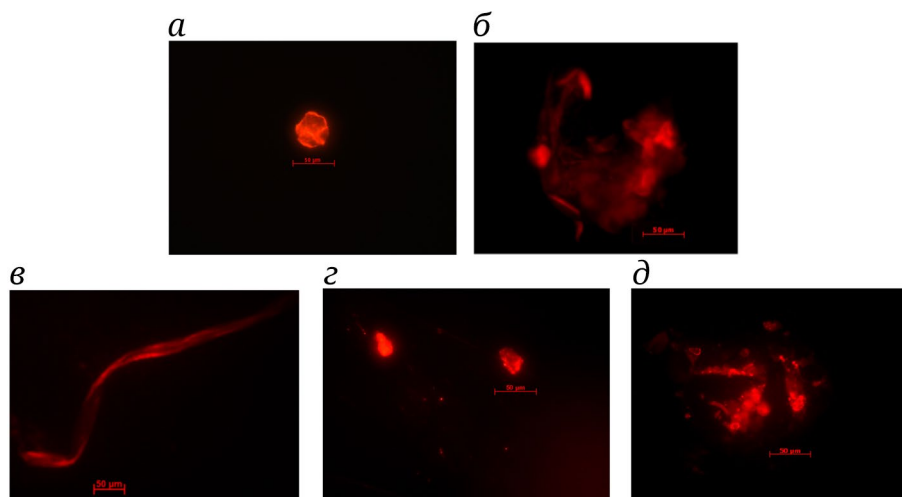


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия окрашенных тиюфлавином Т агрегатов. *а* – YrOmpFt после инкубации в фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 4,5) в течение 4-х недель при 42 °С. *б* – YrOmpFt после прогрева при 95 °С в течение 5 ч в Tris-HCl-буфере (pH 7,4) с последующей выдержкой образца при 25 °С в течение 10 суток. *в* – Рекombинантный мутантный порин с делецией наружной петли 6 (RP_del6), образец хранился в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,4) в присутствии 0,01%-ного Zw 3-14 при 4 °С в течение 6 месяцев. *г* – YrOmpFt после инкубации в фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 4,5) в течение 2-х недель при 42 °С и прогрева при 95 °С в течение 5 ч. *д* – YrOmpFt после инкубации в условиях, указанных для панели (*г*) и последующей выдержки при 25 °С в течение 10 суток. Изображения получены с помощью микроскопа AXIO Imager. A1 (Zeiss); объектив – ECPlan-NEOFLUAR 40 × 0,75. Масштаб: 50 мкм

краситель, а последующая инкубация YrOmpFt в растворе приводит к накоплению количества амилоидоподобных участков в структуре белка и образованию кластеров таких агрегатов. Полученные результаты позволяют предположить, что при нейтральных значениях pH длительная инкубация белка в растворе способствует формированию амилоидоподобных структур порина в большей степени, нежели повышенная температура.

Для подтверждения этого предположения использовали два образца рекомбинантных поринов YrOmpF: полноструктурный рекомбинантный тример белка (RP) и мутантный тример с делецией петли L6 (RP_del6). Образцы RP и RP_del6 в течение 6 месяцев хранились при температуре +5 °С в 30 mM Tris-HCl (pH 7,5), содержащем 0,01% амфифильного детергента цвиттергента 3-14 (Zw 3-14).

Как видно из данных, представленных на рис. 1, *в*, способность интенсивно связывать специфический краситель проявил только рекомбинантный порин RP_del6 с неполной структурой. Изучение морфологии образовавшихся агрегатов этого белка с помощью флуоресцентной микроскопии свидетельствовало о присутствии в исследуемых образцах характерных фибриллярных структур (рис. 2, *в*). Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что формированию амилоидоподобных агрегатов способствует любая дестабилизация структуры белка, происходящая за счет отсутствия элементов структуры, например, карбоксильного конца молекулы

белка [59], или даже наличие единичных мутаций [60]. Что касается полноструктурного рекомбинантного порина, в отличие от RP_del6, при длительном хранении в его молекуле не наблюдалось структурных перестроек (таблица), и этот образец белка не проявил способности связываться с тиюфлавином Т. Таким образом, можно утверждать, что порины не относятся к белкам, которые способны взаимодействовать со специфическим красителем в нативном, развернутом или частично свернутом состояниях, подобно ацетилхолинэстеразе и сывороточным альбуминам [61].

Сочетанное действие кислого значения pH среды (4,5) и повышенной температуры (95 °С) при обработке порина по типу (3) и последующая инкубация белка в растворе в течение 10 суток привели к существенному изменению соотношения элементов регулярной вторичной структуры белка. Как следует из данных анализа спектров КД (таблица), в молекуле YrOmpFt, обработанного в этих условиях, наблюдается перераспределение элементов регулярной вторичной структуры с увеличением содержания суммарной β -структуры: оно увеличилось более чем в 2 раза, а количество α -спиральных участков резко уменьшилось (в 6,5 раза).

В спектре комплекса ThТ и образца YrOmpFt, полученного при обработке по типу (3) с последующей выдержкой в течение 10 суток, наблюдалось смещение максимума флуоресценции в длинноволновую область при значительном увеличении интенсивности его флуоресценции по сравнению с контролем (рис. 1, *г*). С помощью флуоресцентной

микроскопии в полученном образце YpOmpFt были обнаружены разнообразные агрегаты, в том числе удлинённой формы, интенсивно связывающие краситель, однако типичных фибриллярных структур не наблюдалось (рис. 2, д).

Результаты недавних исследований [62, 63] позволили предположить, что токсичность амилоидогенных белков по отношению к эукариотическим клеткам связана именно с префибриллярными олигомерными интермедиатами, которые возникают на ранних стадиях формирования фибрилл. Так, было показано, что префибриллярные агрегаты апомиоглобина W7FW14F проявляют цитотоксическую активность по отношению к фибробластам эмбрионов мыши (NIH/3T3) [64]. Мы исследовали цитотоксическую активность агрегатов YpOmpFt, полученных в результате прогрева в течение 2-х и 4-х недель по отношению к культуре клеток нейробластомы мыши Neuro-2aCCL-131TM. Основанием для выбора этой клеточной линии в качестве модели послужили имеющиеся в литературе сведения о том, что порин OmpF *E. coli* в эксперименте *in vivo* вызывает нейродегенерацию клеток коры головного мозга мышей, действуя как амилоид [65]. Клетки нейробластомы инкубировали с различными концентрациями исследуемого белка в течение 24 ч. Полученные данные свидетельствовали о том, что прогрев YpOmpFt в течение 2-х и 4-х недель при 42 °C и pH 4,5 приводит к увеличению его цитотоксической активности (рис. 3). Как видно из данных, представленных на рис. 3, концентрация образцов белка, при которых наблюдалась гибель 50% клеток (ЭК₅₀), для образцов YpOmpF_2 и YpOmpF_4 была существенно меньше по сравнению с таковой для исходного белка. Таким образом, вероятно, в достаточно мягких условиях из тримера порина OmpF псевдотуберкулезного микроба действительно формируются промежуточные олигомерные агрегаты, обладающие более высокой токсичностью по отношению к клеткам млекопитающих по сравнению с исходным белком.

Известно, что протофибриллы и зрелые фибриллы лизоцима человека вызывают лизис и агрегацию эритроцитов, более того, гемолитическая активность агрегатов возрастает по мере их «старения» [66]. В случае амилоидоподобных агрегатов YpOmpFt мы не наблюдали ни увеличения гемолитической активности, ни способности встраиваться в искусственную бислойную мембрану (данные не приведены). Это относилось как к олигомерам, образующимся в мягких условиях на ранних стадиях инкубации, так и к полученным в значительно более жестких условиях агрегатам белка. В связи с этим можно предположить, что механизм цитотоксической активности амилоидоподобных агрегатов порина YpOmpF

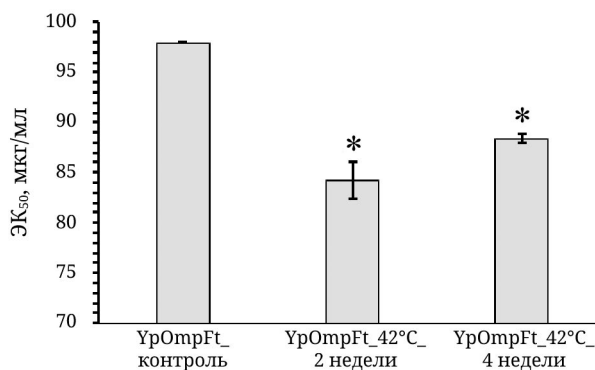


Рис. 3. Цитотоксичность YpOmpFt по отношению к культуре клеток млекопитающих (нейробластома мыши Neuro-2aCCL-131TM («ATCC», США)). Цитотоксическую активность выражали как эффективную концентрацию (ЭК₅₀), при которой метаболическая активность клеток ингибируется на 50%. Долю мертвых клеток нормализовали в каждом случае относительно отрицательного контроля (фосфатно-солевой буфер). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов; достоверность различий между опытными и контрольной группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (* $p \leq 0,05$)

не связан с нарушением целостности мембраны эукариотической клетки.

В результате проведенных экспериментов мы сделали вывод о том, что все три фактора (предварительная дестабилизация структуры белка в буфере с кислым значением pH, повышенная температура и длительность инкубации) необходимы для образования, вследствие перестройки структуры порина, разнообразных по форме агрегатов, окрашиваемых ThT.

Более подробно мы охарактеризовали свойства нестабильного белкового интермедиата YpOmpFt, получаемого при обработке по типу (3), который образует небольшие по размеру агрегаты (рис. 2, з). Он имел значительные изменения в пространственной структуре белка (таблица), и дальнейшая выдержка именно этого образца порина приводила, согласно данным КД, к структурированию белковых молекул и формированию агрегатов, предположительно, протофибрилл, интенсивно связывающих ThT (рис. 1, г; рис. 2, д).

Оказалось, что после обработки YpOmpFt в этих условиях наблюдалось резкое увеличение электрофоретической подвижности белка. С помощью электрофореза в градиентном ПААГ в присутствии Ds-Na установлено, что значение кажущейся мол. м. полученного интермедиата приближалось к 10 кДа (рис. 4, а; дорожка 1). Поскольку температура 95 °C превышает температуру необратимой денатурации порина, она заведомо приводит к разрушению тримерной структуры белка и образованию денатурированного мономера YpOmpFm. Но, как уже отмечалось выше,

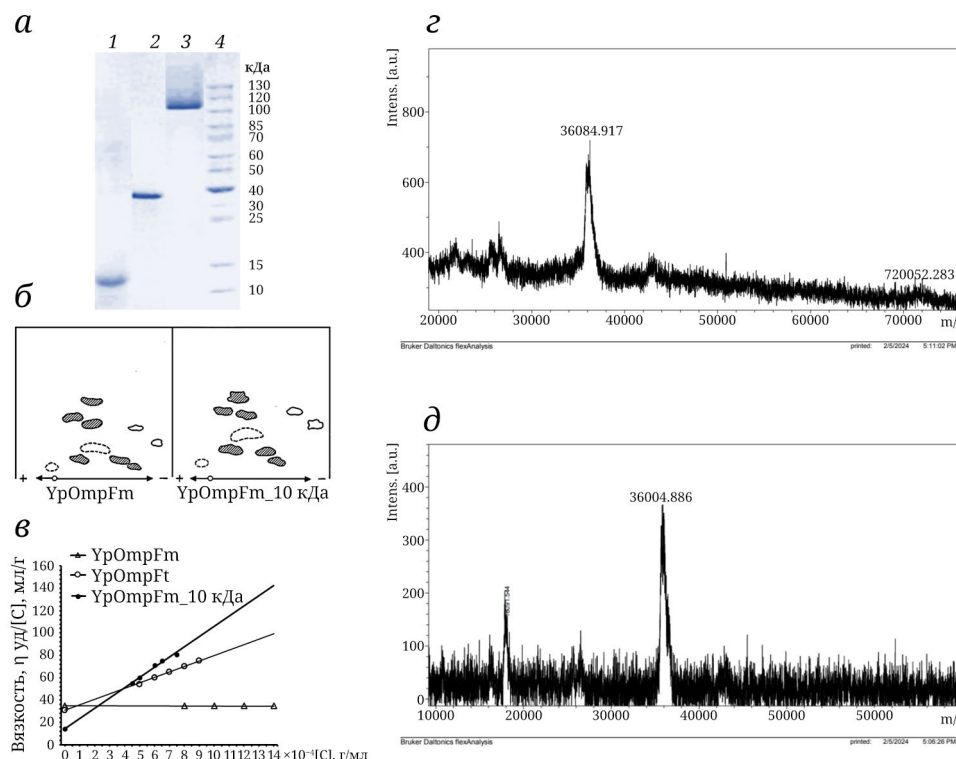


Рис. 4. Физико-химическая характеристика различных молекулярных форм порина из *Y. pseudotuberculosis*. *а* – Электрофореграмма различных молекулярных форм порина из *Y. pseudotuberculosis*: 1 – YrOmpFm_10 кДа, денатурированный тример порина, после обработки при pH 4,5 в течение 5 ч при 95 °C с последующей выдержкой при 25 °C в течение 10 суток; 2 – YrOmpFm; 3 – YrOmpFt; 4 – белки-маркеры. *б* – Пептидные карты продуктов триптического гидролиза денатурированного теплом мономера, YrOmpFm и полипептида YrOmpFm_10 кДа. *в* – Определение характеристической вязкости различных молекулярных форм порина OmpF из *Y. pseudotuberculosis*. *г* – ВП-МАЛДИ-спектры YrOmpFt и полипептида YrOmpFm_10 кДа

YrOmpFm имеет кажущуюся мол. м., равную 40 кДа, поэтому, в соответствии с данными электрофореза в ПААГ в присутствии Ds-Na, мы обозначили полученный интермедиат исследуемого порина как YrOmpFm_10 кДа.

Аномальное увеличение электрофоретической подвижности полипептида YrOmpFm_10 кДа связано, скорее всего, с изменениями в пространственной структуре порина, сопровождаемыми увеличением содержания β-структуры в молекуле белка. Очевидно, вследствие этого к белку присоединяется большее, по сравнению с исходным образцом белка, количество Ds-Na, что приводит к значительному увеличению его электрофоретической подвижности в условиях электрофореза.

Высказанное предположение об изменении конформации порина и, как следствие, формы белковой молекулы были подтверждены с помощью метода вискозиметрии. Как видно из данных, представленных на рис. 4, в, переход порина из термолабильной формы белка YrOmpFt в денатурированный теплом мономер YrOmpFm сопровождается незначительным изменением величины характеристической вязкости: от 31 до 35 мл/г. Эти данные свидетельствуют о перестройках на уров-

не третичной структуре порина, что согласуется с данными Schnaitman [67], который показал, что денатурация мембранных белков под действием Ds-Na и нагревания ведет к увеличению значений этой величины от 28–31 мл/г до 33,5–35 мл/г. В случае полипептида YrOmpFm_10 кДа обнаруживается резкое (в 2,5 раза) уменьшение величины характеристической вязкости: в растворе Ds-Na она составляет 14 мл/г.

Отсутствие разрыва полипептидной цепи порина в результате обработки в жестких условиях было подтверждено различными методами. По данным гель-хроматографии на сефадексе G-150 в присутствии гуанидин гидрохлорида, объемы элюирования (и соответственно молекулярные массы) YrOmpFm и YrOmpFm_10 кДа в полностью развернутой конформации были одинаковы. Потеря третичной и вторичной структуры белка была достигнута (согласно данным спектроскопии КД) в результате нагревания в растворе 6 М гуанидин гидрохлорида и выдержке в течение ночи. Результаты масс-спектрометрического анализа также свидетельствовали о том, что и в исходном тримере порина, и в образце YrOmpFm_10 кДа присутствуют сигналы практически одинаковых

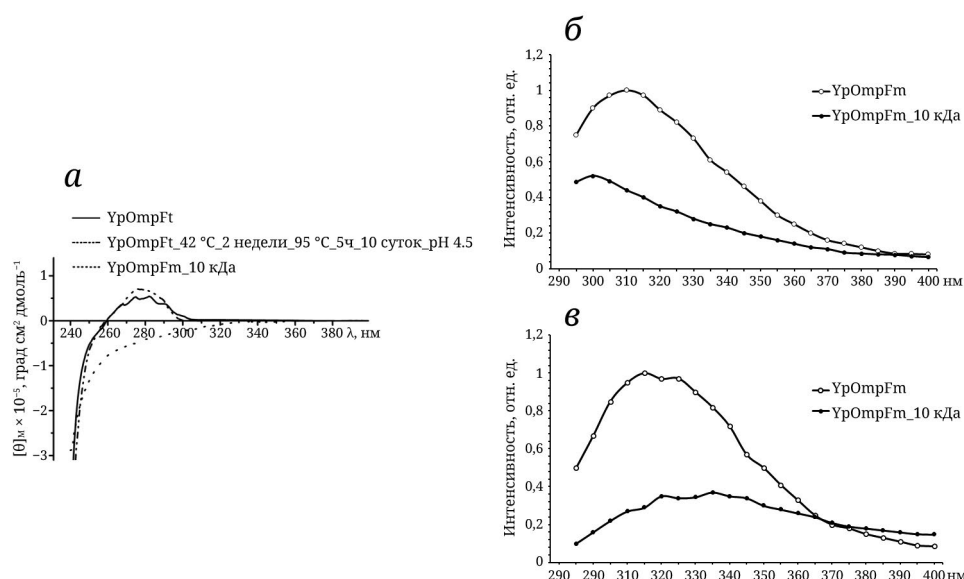


Рис. 5. Характеристика пространственной структуры различных молекулярных форм порина OmpF *Y. pseudotuberculosis*. а – Спектры КД в ароматической области. Спектры собственной белковой флуоресценции образцов порина YrOmpFt и YrOmpFm_10 кДа при возбуждении 280 нм (б) и 296 нм (в)

по величине m/z (36 085 и 36 005 соответственно) однозарядных ионов белка (рис. 4, г и д).

С помощью *N*-концевого анализа было установлено, что *N*-концевыми аминокислотами обоих полипептидов (YrOmpFm и YrOmpFm_10 кДа) являются остатки аланина. Сравнение триптических гидролизатов указанных полипептидов также свидетельствовало об их идентичности (рис. 4, б). Таким образом, разрыва пептидных связей в процессе обработки в вышеприведенных условиях не происходит. Следует заметить, что разрыв полипептидной цепи с образованием 4-х полипептидов с аланином на *N*-конце маловероятен, так как в аминокислотной последовательности порина YrOmpF подобных участков не обнаружено [68].

Полученные данные, свидетельствующие о значительных конформационных перестройках молекулы порина в образце YrOmpFm_10 кДа, были подтверждены с помощью оптической спектроскопии. Так, при рассмотрении спектров КД белков в ароматической области (рис. 5, а) и спектров собственной флуоресценции белка (рис. 5, б и в) были обнаружены изменения в пространственной структуре YrOmpFm_10 кДа по сравнению с исходным порином. Как следует из данных, представленных на рис. 5, а, молекула исходного образца порина имеет достаточно жесткую третичную структуру, однако в кислой среде (pH 4,5) после нагревания при 95 °C в течение 5 ч происходит потеря этой жесткости и переход в ненативную разрыхленную конформацию.

Этот интермедиат белка характеризуется также значительными изменениями в микроокружении ароматических флуорофоров, остатков тиро-

зина и триптофана – оптических маркеров белка (рис. 5, б и в). Об этом свидетельствует сравнительный анализ спектров собственной белковой флуоресценции исходного образца белка YrOmpFt и интермедиата YrOmpFm_10 кДа, в спектре которого наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции при обеих длинах волн возбуждения и смещение максимумов спектров суммарного излучения белка и триптофановой флуоресценции. Коротковолновое положение максимума суммарной флуоресценции YrOmpFm_10 кДа указывает на увеличение вклада тирозина в эмиссию белка. Очевидно, при изменении конформации белка в этих условиях происходит либо уменьшение эффективности передачи энергии флуоресценции тирозинового хромофора к триптофановому, либо хромофоры остатков триптофана попадают в более тушащее микроокружение. В спектре триптофановой флуоресценции, судя по длинноволновому максимуму спектра, значительно увеличивается вклад триптофанового хромофора, находящегося на поверхности белка в контакте с молекулами связанной воды [69, 70].

Результаты проведенной нами симуляции МД мономера порина в водном окружении при pH 7,4 и 4,5 показали, что в кислой среде наблюдается изменение конформации порина, приводящее к изменению свойств его молекулярной поверхности. Это выражается в увеличении площади Ван-дер-Ваальсовой поверхности с 15 770,0 до 17 810,2 Å², площади гидрофильной поверхности – с 4934,7 до 7089,0 Å², а также в незначительном уменьшении величин дипольного и гидрофобного моментов. Кроме того, обнаружено существенное

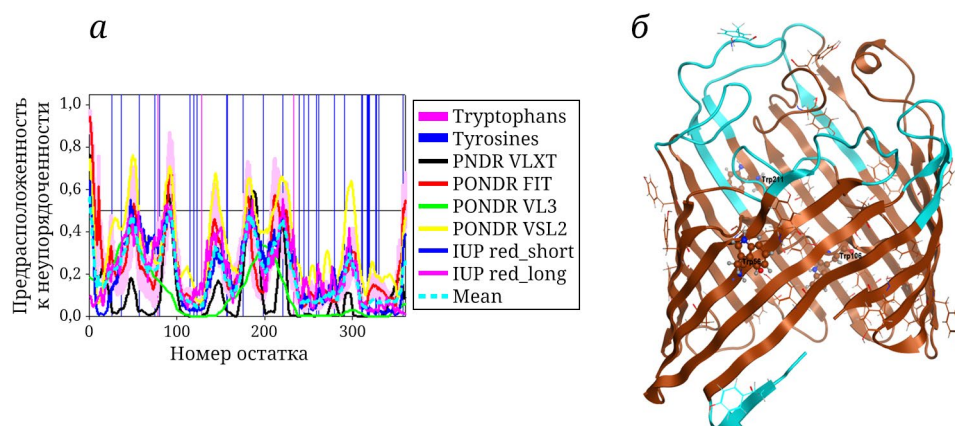


Рис. 6. Модель пространственной структуры и анализ предрасположенности порина OmpF *Y. pseudotuberculosis* (IB серовара O-серотипа, штамм IP 31758; UniProtIDA0A0U1QUP9) к внутренней разупорядоченности. *а* – Результаты анализа аминокислотной последовательности порина YrOmpF, полученные с помощью биоинформатических инструментов. Высокие значения вероятности внутренней разупорядоченности (>0,5) на графике соответствуют участкам аминокислотной последовательности с внутренне неупорядоченной структурой, тогда как значения вероятности внутренней разупорядоченности от 0,15 до 0,5 присущи участкам аминокислотной последовательности с повышенной структурной гибкостью. Кривые различных цветов соответствуют расчетам, сделанным различными предсказательными программами: PONDRL VLS2 [45, 46], PONDRL VL3 [47], PONDRL VLXT [48], PONDRL FIT [49], IUPred-Long и IUPred-Short [50]. Веб-приложение Rapid Insorder Analysis Online (RIDAO) использовали для суммирования результатов, полученных с помощью каждой предсказательной программы [51]. *б* – Теоретическая модель порина YrOmpF представлена в виде ленточной диаграммы и окрашена в соответствии с предрасположенностью данных участков структуры к внутренней неупорядоченности: коричневым цветом отмечены упорядоченные участки, структурно-пластичные – голубым. Остатки Trp приведены в шаро-стержневом представлении, а остатки Tyr – в стержневом представлении. Последовательности поринов OmpF из штаммов *Y. pseudotuberculosis* 1b IP 31758, UniProtIDA0A0U1QUP9 и 1b 598 идентичны

уменьшение значения Z-потенциала ($Z_{\text{пот}}$) молекулы порина с 27,67 мВ в нейтральной до 10,43 мВ – в кислой среде. Известно, что для молекул с $Z_{\text{пот}}$ больше 30 мВ характерно более стабильное состояние в растворе, напротив, молекулы с низким $Z_{\text{пот}}$ проявляют склонность к коагуляции и/или агрегации [71]. Результаты молекулярного моделирования, свидетельствующие об увеличении гидрофильной поверхности молекулы YrOmpF, согласуются с данными оптической спектроскопии о существенном изменении доступности остатков тирозина и триптофана растворителю при изменении pH раствора. Кроме того, они подтверждают полученные ранее данные по взаимодействию интермедиата YrOmpFt при pH 4,5 с гидрофобными положительно заряженными акцепторами флуоресценции (диметиламинохалконом (ДМХ) и 1-N-фенилнафтиламином (ФНА)), а также с флуоресцентным зондом пиреном, которые свидетельствуют об увеличении доступности гидрофильных сайтов белка, по сравнению с исходной конформацией порина, которую он имеет в слабощелочной среде [30]. Что же касается изменения формы молекулы порина в кислой среде, в ходе МД мы наблюдали незначительное увеличение таких характеристик белка, как гидродинамический радиус (A) и Ван-дер-Ваальсов объем молекулы (A^3), однако эти изменения не превышали 5% по сравнению с молекулой исходного порина. Очевидно,

продолжительности МД (350 нс) недостаточно, чтобы наблюдать полномасштабные изменения в конформации белка.

Пользуясь рядом предсказательных программ, ссылки на которые приведены в разделе «Материалы и методы», мы провели анализ предрасположенности различных участков порина YrOmpF к внутренней разупорядоченности (рис. 6, *а*). Чем ниже средний балл внутренней разупорядоченности, тем меньше склонность данного аминокислотного остатка быть включенным в область последовательности с внутренней разупорядоченностью. Из данных, приведенных на рис. 6, *а*, следует, что молекула порина состоит в основном из стабильных, хорошо структурированных, не склонных к разупорядоченности участков. Согласно теоретической модели YrOmpF, остатки тирозина и триптофана локализованы преимущественно в этих участках молекулы порина (рис. 6, *б*).

Как видно из данных, представленных на рис. 6, почти все тирозины и триптофаны расположены в пределах областей, которые, по предсказаниям, в основном упорядочены. На основании полученных результатов можно утверждать, что конформационная пластичность неспецифических поринов осуществляется не только за счет повышенной гибкости переменных участков внешних петель (где преимущественно находятся участки с внутренне неупорядоченной струк-

турой), но и затрагивает область достаточно жесткого остова молекулы, вернее, его участки (отдельные β -тяжи), которые принято считать конформационно стабильными.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что инкубация раствора порина OmpF из НМ *Y. pseudotuberculosis* в кислой среде при 95 °C приводит к значительным изменениям его конформации на уровне третичной и вторичной структуры белка. Последующая выдержка раствора этого нестабильного интермедиата порина в течение длительного времени способствует формированию агрегатов, интенсивно связывающих ThT. Однако типичных фибрилл в ходе наших исследований обнаружено не было. Отмеченное нами спонтанное образование амилоидоподобных агрегатов при длительном хранении образцов порина в растворах детергентов при нейтральном pH требует дополнительного исследования. Результаты проведенного *in vitro* и *in silico* исследования являются экспериментальным доказательством того, что неспецифические порыны бактерий, являющиеся типичными мембранными белками с конформацией β -бочонка, в жестких денатурирующих условиях формируют конформационные интермедиаты [72], обладающие свойствами амилоидоподобных структур. При этом существенные изменения в пространствен-

ной структуре поринов затрагивают не только участки с внутренне неупорядоченной структурой, но и структуру основного каркаса молекулы – жесткого β -бочонка.

Вклад авторов. О.Д. Новикова, О.Ю. Портнягина – руководство работой; Т.В. Рыбинская, О.Д. Новикова, Е.А. Зелепуга, Н.Ю. Ким., Е.А. Чингизова, Е.С. Менчинская, В.А. Хоменко, Д.К. Чистюлин, О.Ю. Портнягина – проведение экспериментов; О.Д. Новикова, О.Ю. Портнягина, Е.А. Зелепуга, В.Н. Уверский – обсуждение результатов исследования; О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова – написание рукописи; В.Н. Уверский, О.Д. Новикова – концепция и редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы статьи выражают благодарность директору ТИБОХ ДВО РАН д.х.н. Дмитренко П.С. за помощь в проведении эксперимента с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований, ЯМР- и масс-спектрометрии (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature*, **426**, 884-890, <https://doi.org/10.1038/nature02261>.
2. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333-366, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
3. Ramirez-Alvarado, M., Merkel, J. S., and Regan, L. (2000) A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8979-8984, <https://doi.org/10.1073/pnas.15009179>.
4. Smith, D. P., Jones, S., Serpell, L. C., Sunde, M., and Radford, S. E. (2003) A systematic investigation into the effect of protein destabilization on beta 2-microglobulin amyloid formation, *J. Mol. Biol.*, **330**, 943-954, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00687-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00687-9).
5. Sigurdsson, E. M., Wisniewski, T., and Frangione, B. (2002) Infectivity of amyloid diseases, *Trends Mol. Med.*, **8**, 411-413, [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02403-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02403-6).
6. Salahuddin, P., Fatima, M. T., Uversky, V. N., Khan, R. H., Islam, Z., and Furkan, M. (2021) The role of amyloids in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Int. J. Biol. Macromol.*, **190**, 44-55, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.197>.
7. Litvinovich, S. V., Brew, S. A., Aota, S., Akiyama, S. K., Haudenschild, C., and Ingham, K. C. (1998) Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module, *J. Mol. Biol.*, **280**, 245-258, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1863>.
8. Gross, M., Wilkins, D. K., Pitkeathly, M. C., Chung, E. W., Higham, C., Clark, A., and Dobson, C. M. (1999) Formation of amyloid fibrils by peptides derived from the bacterial cold shock protein CspB, *Protein Sci.*, **8**, 1350-1357, <https://doi.org/10.1110/ps.8.6.1350>.
9. Marcoleta, A., Wien, F., Arluison, V., Lagos, R., and Giraldo, R. (2019) Bacterial amyloids, *eLS*, 1-9, <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028401>.
10. Kosolapova, A. O., Antonets, K. S., Belousov, M. V., and Nizhnikov, A. A. (2020) Biological functions of prokaryotic amyloids in interspecies interactions: facts and assumptions, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7240, <https://doi.org/10.3390/ijms21197240>.

11. Molina-García, L., Gasset-Rosa, F., Moreno-del Álamo, M., de la Espina, S., and Giraldo, R. (2018) Addressing intracellular amyloidosis in bacteria with RepA-WH1, a prion-like protein, *Methods Mol. Biol.*, **1779**, 289-311, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8_18.
12. Bhattacharya, M., Jain, N., and Mukhopadhyay, S. (2011) Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin, *J. Phys. Chem. B*, **115**, 14, 4195-4205, <https://doi.org/10.1021/jp111528c>.
13. McParland, V. J., Kalverda, A. P., Homans, S. W., and Radford, S. E. (2002) Structural properties of an amyloid precursor of beta (2)-microglobulin, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 326-331. <https://doi.org/10.1038/nsb791>.
14. Gopalswamy, M., Kumar, A., Adler, J., Baumann, M., Henze, M., Kumar, S. T., Fändrich, M., Scheidt, H. A., Huster, D., and Balbach, J. (2015) Structural characterization of amyloid fibrils from the human parathyroid hormone, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 249-257, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.020>.
15. Bellesia, G., and Shea, J.-E. (2009) Diversity of kinetic pathways in amyloid fibril formation, *J. Chem. Phys.*, **131**, 111102, <https://doi.org/10.1063/1.3216103>.
16. Friedman, R., and Caflish, A. (2011) Surfactant effects on amyloid aggregation kinetics, *J. Mol. Biol.*, **414**, 303-312, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.10.011>.
17. Grigolato, F., and Arosio, P. (2021) The role of surfaces on amyloid formation, *Biophys. Chem.*, **270**, 106533, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106533>.
18. Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., and Dobson, C. M. (1999) Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3590-3594, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3590>.
19. Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2014) Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 553-584, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-164947>.
20. Cornish, J., Chamberlain, S. G., Owen, D., and Mott, H. R. (2020) Intrinsically disordered proteins and membranes: a marriage of convenience for cell signalling? *Biochem. Soc. Trans.*, **48**, 2669-2689, <https://doi.org/10.1042/BST20200467>.
21. Uversky, V. N. (2019) Protein intrinsic disorder and structure-function continuum, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **166**, 1-17, <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.05.003>.
22. Delcour, A. H. (2003) Solute uptake through general porins, *Front. Biosci. Landmark*, **8**, 1055-1071, <https://doi.org/10.2741/1132>.
23. Haltia T., and Freire, E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 295-322, [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)00161-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)00161-6).
24. Pogozheva, I. D., Tristram-Nagle, S., Mosberg, H., and Lomize, A. L. (2013) Structural adaptations of proteins to different biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 2592-2608, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.023>.
25. Ziervogel, B. K., and Roux, B. (2013) The binding of antibiotics in OmpFporin, *Structure*, **21**, 76-87, <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.10.014>.
26. Bajaj, H., Acosta-Gutierrez, S., Bodrenko, I., Mallocci, G., Scorciapino, M. A., Winterhalte, M., and Ceccarelli, M. (2017) Bacterial outer membrane porins as electrostatic nanosieves: Exploring transport rules of small polar molecules, *ACS Nano*, **11**, 5465-5473, <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08613>.
27. Chistyulin, D. K., Zelepuga, E. A., Novikov, V. L., Balaneva, N. N., Glazunov, V. P., Chingizova, E. A., Khomenko, V. A., and Novikova, O. D. (2023) Molecular model of norfloxacin translocation through *Yersinia pseudotuberculosis* porin OmpF channel: electrophysiological and molecular modeling study, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **17**, S20-S38, <https://doi.org/10.1134/S1990747823070024>.
28. Danoff, E. J., and Fleming, K. G. (2015) Aqueous, unfolded OmpA forms amyloid-like fibrils upon self-association, *PLoS One*, **10**, e0132301, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132301>.
29. Khomenko, V. A., Portnyagina, O. Y., Novikova, O. D., Isaeva, M. P., Kim, N. Y., Likhatskaia, G. N., Vostrikova, O. P., and Solov'eva, T. F. (2008) Isolation and characterization of recombinant OmpF-like porin from the *Yersinia pseudotuberculosis* outer membrane, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **34**, 162-168, <https://doi.org/10.1134/s1068162008020040>.
30. Novikova, O. D., Kim, N. Y., Luk'yanov, P. A., Likhatskaya, G. N., Emel'yanenko, V. I., and Solov'eva, T. F. (2007) Effects of pH on structural and functional properties of porin from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. II. Characterization of pH-induced conformational intermediates of yersinin, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **1**, 154-162, <https://doi.org/10.1134/S1990747807020080>.
31. Novikova, O. D., Chistyulin, D. K., Khomenko, V. A., Sidorin, E. V., Kim, N. Y., Sanina, N. M., Portnyagina, O. Y., Solov'eva, T. F., Uversky, V. N., and Shnyrov, V. L. (2017) Peculiarities of thermal denaturation of OmpF porin from *Yersinia ruckeri*, *Mol. Bio. Syst.*, **13**, 1854-1862, <https://doi.org/10.1039/c7mb00239d>.
32. Oates, M. E., Romero, P., Ishida, T., Ghalwash, M., Mizianty, M. J., Xue, B., Dosztányi, S., Uversky, V. N., Obradovic, Z., Kurgan, L., Dunker, A. K., and Gough, J. (2012) D²P²: database of disordered protein predictions, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D508-D516, <https://doi.org/10.1093/nar/gks1226>.
33. Dass, R., Mulder, F. A., and Nielsen, J. T. (2020) ODinPred: comprehensive prediction of protein order and disorder, *Sci. Rep.*, **10**, 1-16, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71716-1>.

34. Novikova, O. D., Uversky, V. N., and Zelepuga, E. A. (2021) Non-specific porins of Gram-negative bacteria as proteins containing intrinsically disordered regions with amyloidogenic potential, *Progr. Molec. Biol. Transl. Sci.*, **183**, 75-99, <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.06.012>.
35. Новикова О. Д., Федореева Л. И., Хоменко В. А., Портнягина О. Ю., Ермак И. М., Лихацкая Г. Н., Мороз С. В., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. (1993) Влияние способа экстракции порообразующего белка из *Yersinia pseudotuberculosis* на его макромолекулярную организацию, *Биоорган. химия*, **19**, 536-547.
36. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
37. Гааль О., Медьеша Г. А., Верецкеи Л. (1982) *Электрофорез при разделении биологических макромолекул*, Мир, Москва.
38. Остерман Л. А. (1985) *Хроматография белков и нуклеиновых кислот*, Наука, Москва.
39. Ким Н. Ю., Новикова О. Д., Хоменко В. А., Лихацкая Г. Н., Вострикова О. П., Емельяненко В. И., Кузнецова С. М., Соловьева Т. Ф. (2007). Влияние pH на структуру и функциональную активность порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. 1. Функционально значимые конформационные переходы иерарсинина, *Биол. мембраны*, **24**, 150-158.
40. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal. Biochem*, **287**, 252-260, <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4880>.
41. Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01; ChemicalComputingGroupULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2019, URL: <https://www.chemcomp.com/Products.htm>
42. Likhatskaya, G. N., Solov'eva, T. F., Novikova, O. D., Issaeva, M. P., Gusev, K. V., Kryzhko, I. B., Trifonov, E. V., and Nurminski, E. A. (2005) Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **23**, 163-174, <https://doi.org/10.1080/07391102.2005.1050705>.
43. Case, D. A., Babin, V., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., Darden, T. A., and Duke, R. E. (2014) *AMBER 14*, University of California, San Francisco.
44. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, **79**, 926-935, <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
45. Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., and Dunker, A. K. (2005) Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder, *Proteins*, **61**, 176-182, <https://doi.org/10.1002/prot.20735>.
46. Peng, K., Radivojac, P., Vucetic, S., Dunker, A. K., and Obradovic, Z. (2006) Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder, *BMC Bioinformatics*, **7**, 208, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-208>.
47. Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C. J., Dunker, A. K., and Obradovic, Z. (2005) Optimizing long intrinsic disorder predictors with protein evolutionary information, *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **3**, 35-60, <https://doi.org/10.1142/s0219720005000886>.
48. Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., and Dunker, A. K. (2001) Sequence complexity of disordered protein, *Proteins*, **42**, 38-48, [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<38:aid-prot50>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<38:aid-prot50>3.0.co;2-3).
49. Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2010) PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 996-1010, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.011>.
50. Mészáros, B., Erdős, G., and Dosztányi, Z. (2018) IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding, *Nucleic Acids Res.*, **46** (W1), W329-W337, <https://doi.org/10.1093/nar/gky384>.
51. Dayhoff, G. W., and Uversky, V. N. (2022) Rapid prediction and analysis of protein intrinsic disorder, *Protein Sci.*, **31**, e4496, <https://doi.org/10.1002/pro.4496>.
52. Sidorova, O. V., Khomenko, V. A., Portnyagina, O. Y., Likhatskaya, G. N., Vakorina, T. I., Kim, N. Y., Chistyulin, D. K., Solov'eva, T. F., and Novikova, O. D. (2014) Mutant OmpF porins of *Yersinia pseudotuberculosis* with deletions of external loops: structure-functional and immunochemical properties, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **445**, 428-432, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.018>.
53. Chehin, R., Iloro, I., Marcos, M. J., Villar, E., Shnyrov, V. L., and Arrondo, J. L. R. (1999) Thermal and pH-induced conformational changes of α -sheet protein monitored by infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **38**, 1525-1530, <https://doi.org/10.1021/bi981567j>.
54. Kazlauskaitė, J., Young, A., Gardner, C. E., Macpherson, J. V., Venien-Bryan, C., and Pinheiro, T. J. (2005) An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 292-305, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.172>.
55. Colon, W., and Kelly, J. W. (1992) Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation *in vitro*, *Biochemistry*, **31**, 8654-8660, <https://doi.org/10.1021/bi952501g>.

56. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 15-22, <https://doi.org/10.1038/nchembio.131>.
57. Sikkink, L. A., and Ramirez-Alvarado, M. (2008) Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain, *Biophys.Chem.*, **135**, 25-31, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.02.019.43>.
58. Сулацкая А. И., Кузнецова И. М. (2010) Взаимодействие тиофлавина Т с амилоидными фибриллами как инструмент для изучения их структуры, *Цитология*, **52**, 955-959.
59. Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli, A., Walsh, P., Lundström, P., Zarrine-Afsar, A., and Kay, L. E. (2012) Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation, *Science*, **336**, 362-366, <https://doi.org/10.1126/science.1214203>.
60. Катина Н. С., Ильина Н. Б., Кашпаров И. А., Балобанов В. А., Васильев В. Д., Бычкова В. Е. (2011) Мутантные формы апомиоглобина с одиночными заменами в положении Val10 способны образовывать амилоидные структуры при пермиссивной температуре, *Биохимия*, **76**, 680-691.
61. Мельникова Н. М., Сулацкий М. И., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Сулацкая А. И. (2022) Структурный полиморфизм амилоидных фибрилл на основе лизоцима, *Цитология*, **64**, 86-95. <https://doi.org/10.31857/S0041377122010060>.
62. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases, *Nature*, **416**, 507-511, <https://doi.org/10.1038/416507a>.
63. Verma, M., Vats, A., and Taneja, V. (2015) Toxic species in amyloid disorders: oligomers or mature fibrils, *Ann. Indian Acad. Neurol.*, **18**, 138-145, <https://doi.org/10.4103/0972-2327.144284>.
64. Sirangelo, I., Malmo, C., Iannuzzi, C., Mezzogiorno, A., Bianco, M. R., Papa, M., and Irace, G. (2004) Fibrillogenesis and cytotoxic activity of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 13183-13189, <https://doi.org/10.1074/jbc.M308207200>.
65. Sahaya, R. J. J., Chinnappan, S. T., Singaravel, R., and Ignacimuthu, S. (2016) Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid, *Biotechnol. Lett.*, **38**, 689-700, <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2025-8>.
66. An, T.T., Feng, S., and Zeng, C. M. (2017) Oxidized epigallocatechin gallate inhibited lysozyme fibrillation more strongly than the native form, *Redox Biol.*, **11**, 315-321, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.016>.
67. Schnaitman, C. A. (1973) Outer membrane proteins of *Escherichia coli*: II. Heterogeneity of major outer membrane polypeptides, *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 553-560, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90674-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90674-7).
68. Гузев К. В., Исаева М. П., Новикова О. Д., Соловьева Т. Ф., Рассказов В. А. (2005) Молекулярная характеристика OmpF-подобных поринов патогенных *Yersinia*, *Биохимия*, **70**, 1338-1345.
69. Лакович Дж. (1986) Основы флуоресцентной спектроскопии, Мир, Москва.
70. Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 263-279, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1973.tb06422.x>.
71. Hunter, R. J. (1981) Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications, *Academic Press*, N.Y.
72. Uversky, V. N. (2009) Intrinsically disordered proteins and their environment: effects of strong denaturants, temperature, pH, counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding, *Protein J.*, **28**, 305-325, <https://doi.org/10.1007/s10930-009-9201-4>.

FORMATION OF AMYLOID-LIKE CONFORMATIONAL STATES OF β -STRUCTURED MEMBRANE PROTEINS ON THE EXAMPLE OF THE OmpF PORIN FROM THE *Yersinia pseudotuberculosis* OUTER MEMBRANE

O. D. Novikova¹, T. V. Rybinskaya¹, E. A. Zelepuga¹, V. N. Uversky², N. Yu. Kim¹,
E. A. Chingizova¹, E. S. Menchinskaya¹, V. A. Khomenko¹,
D. K. Chistyulin¹, and O. Yu. Portnyagina^{1*}

¹ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences., 690021 Vladivostok, Russia;
e-mail: novolga_05@mail.ru; odd64@mail.ru

² Department of Molecular Medicine, Morsani College of Medicine, University of South Florida,
33620 Tampa, FL, USA

The work presents the results of an *in vitro* and *in silico* study of the formation of amyloid-like structures under harsh denaturing conditions by the nonspecific OmpF porin of *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF), a membrane protein with a β -barrel conformation. It has been shown that in order to obtain amyloid-like porin aggregates, preliminary destabilization of its structure in a buffer solution with an acidic pH value at elevated temperature, followed by long-term incubation at room temperature is necessary. After heating at 95 °C in a solution with pH 4.5, significant conformational rearrangements are observed in the porin molecule at the level of the tertiary and secondary structure of the protein, which are accompanied by an increase in the content of the total β -structure and a sharp decrease in the value of the characteristic viscosity of the protein solution. Subsequent long-term exposure of the resulting unstable intermediate YpOmpF at room temperature leads to the formation of porin aggregates of various shapes and sizes that bind thioflavin T, a specific fluorescent dye for the detection of amyloid-like protein structures. Compared to the initial protein, early intermediates of the amyloidogenic porin pathway, oligomers, have been shown to have increased toxicity to Neuro-2aCCL-131™ mouse neuroblastoma cells. The results of computer modeling and analysis of changes in intrinsic fluorescence during protein aggregation suggest that during the formation of amyloid-like aggregates, changes in the structure of YpOmpF affect not only areas with an internally disordered structure corresponding to the external loops of the porin, but also the main framework of the molecule, which has a rigid spatial structure inherent to β -barrel.

Keywords: OmpF porin, *Yersinia pseudotuberculosis*, membrane protein, amyloidogenesis, spatial structure, cytotoxic activity, computer modeling

ДИЗАЙН, *in silico* ОЦЕНКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ: ПРИМЕНЕНИЕ К ТИРОЗИНКИНАЗЕ Bcr-Abl

© 2024 Е.В. Королева¹, А.Л. Ермолинская¹, Ж.В. Игнатович¹,
Ю.В. Корноушенко², О.В. Панибрат², В.И. Поткин³, А.М. Андрианов^{2*}

¹ Институт химии новых материалов НАН Беларуси, 220141 Минск, Беларусь

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
220141 Минск, Беларусь; электронная почта: alexande.andriano@yandex.ru

³ Институт физико-органической химии НАН Беларуси, 220072 Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 27.12.2023

После доработки 07.05.2024

Принята к публикации 11.05.2024

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый за последние два десятилетия в лечении хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), в настоящее время по-прежнему имеется неудовлетворенная потребность в эффективных и безопасных лекарственных средствах для терапии пациентов с резистентностью и непереносимостью к используемым в клинике препаратам. В данной работе проведен дизайн 2-ариламинопиримидиновых амидов изоксазол-3-карбоновой кислоты, выполнена *in silico* оценка ингибиторного потенциала этих соединений против тирозинкиназы Bcr-Abl и определена их противоопухолевая активность на моделях клеток линий K562 (ХМЛ), HL-60 (острый промиелоцитарный лейкоз) и HeLa (карцинома шейки матки). В результате совместного анализа расчетных и экспериментальных данных выявлены три соединения, активные по отношению к клеткам линий K562 и HL-60. Обнаружено соединение-лидер, демонстрирующее эффективное ингибирование роста этих клеток, что подтверждается низкими значениями IC_{50} , равными $2,8 \pm 0,8$ мкМ (K562) и $3,5 \pm 0,2$ мкМ (HL-60). Полученные результаты свидетельствуют о том, что найденные соединения формируют перспективные базовые структуры для создания новых противоопухолевых препаратов, способных ингибировать каталитическую активность тирозинкиназы Bcr-Abl путем блокирования АТР-связывающего центра фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тирозинкиназа Bcr-Abl, ингибиторы тирозинкиназы Bcr-Abl, компьютерный дизайн лекарств, молекулярный докинг, молекулярная динамика, биомедицинское тестирование, противоопухолевая активность.

DOI: 10.31857/S0320972524060099 EDN: XLIAIQ

ВВЕДЕНИЕ

Гибридный ген *BCR-ABL1*, образующийся в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22 (филадельфийская хромосома), кодирует тирозинкиназу Bcr-Abl с аномально высокой активностью, которая регулирует сигналы, ответственные за клеточный рост, активацию, дифференцировку, адгезию и апоптоз [1, 2]. Тирозинкиназа Bcr-Abl играет ключевую роль в пато-

генезе хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), характеризующегося быстрым неконтролируемым ростом миелоидных клеток в периферической крови и костном мозге, и в 20–50% случаев является причиной острого В-лимфобластного лейкоза взрослых [3–5]. Первый препарат для лечения пациентов с ХМЛ, иматиниб, одобренный в 2001 году Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA; <https://www.fda.gov/>; по состоянию на 28.02.2024), селективно взаимодействует с АТР-связывающей полостью тирозинкиназы Bcr-Abl [6–8]. Связывание иматиниба с каталитическим центром белка приводит к ингибированию его активности *in vitro* и *in vivo*, подавлению

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; RMSD – среднеквадратичное отклонение.

* Адресат для корреспонденции.

пролиферации и апоптозу в клетках, экспрессирующих тирозинкиназу Bcr-Abl при Ph-позитивном ХМЛ [9–11]. В результате терапии иматинибом у больных с ХМЛ через 2 года после начала лечения наблюдается полный цитогенный ответ с состоянием стойкой ремиссии в течение длительного времени [9–11]. Иматиниб является также эффективным лекарственным средством для лечения острого лимфоцитарного лейкоза с филадельфийской хромосомой, некоторых типов стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта, гиперэозинофильного синдрома, хронического эозинофильного лейкоза, системного мастоцитоза и миелодиспластического синдрома [5]. Однако, несмотря на значительный прогресс, достигнутый при лечении ХМЛ иматинибом, у части пациентов развивается резистентность к этому препарату, что приводит к повышению уровня тирозинкиназы Bcr-Abl [12–15]. Одной из основных причин этого является мутация T315I в гене *ABL*, которая нарушает важные взаимодействия иматиниба с целевым белком [12–15].

За последние два десятилетия с момента открытия иматиниба были разработаны и одобрены FDA для лечения ХМЛ ингибиторы тирозинкиназы Bcr-Abl второго и третьего поколения, среди которых в первую очередь следует отметить нилотиниб, дазатиниб, бозутиниб и понатиниб, взаимодействующие с АТФ-связывающим центром фермента, а также аллостерический ингибитор с альтернативным механизмом действия – асциминиб [16–20]. Все эти противоопухолевые агенты проявляют повышенную ингибиторную активность, по сравнению с иматинибом, и эффективны во многих случаях, когда возникает резистентность к этому препарату [16–20]. Их применение позволило значительно увеличить продолжительность жизни пациентов с ХМЛ, а также с некоторыми стромальными опухолями желудочно-кишечного тракта [16–20]. Однако, наряду с терапевтическим эффектом, лечение этими препаратами может сопровождаться рядом гематологических и негематологических побочных эффектов, связанных с их относительно высокой токсичностью [12, 19, 20]. Кроме того, мутации, возникающие в АТФ-связывающей полости тирозинкиназы Bcr-Abl, могут вызывать резистентность к используемым препаратам, оставляя пациентам ограниченные возможности лечения [13, 14, 16, 19, 20]. На сегодняшний день мутация T315I является главной причиной развития первичной и вторичной резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназы Bcr-Abl у пациентов с хронической фазой ХМЛ [14, 18]. В связи с этим в настоящее время проводятся многочисленные исследования по разработке противоопухолевых агентов, эффективных для лечения больных ХМЛ с мутацией T315I в гене *ABL*.

Подробная информация об этих исследованиях представлена в недавних обзорных статьях [12, 14, 18], свидетельствующих о том, что работы по созданию новых эффективных препаратов против ХМЛ, которые могут преодолевать приобретаемую в ходе лечения резистентность, по-прежнему являются чрезвычайно актуальными.

Современный дизайн лекарственных препаратов все больше ориентируется на разработку многоцелевых ингибиторов, содержащих два и более фармакофора из разных органических веществ, что усиливает активность соединений-предшественников и даже приводит к новым видам биологической активности за счет появления дополнительных взаимодействий с целевым белком [21]. В соответствии с этой терапевтической стратегией в настоящей работе осуществлен дизайн производных 2-ариламинопиримидина – основного фармакофора иматиниба [11, 20], содержащих фрагмент 5-арилзамещенного изоксазола – азольного соединения, присутствующего в структурах многих противоопухолевых агентов с различными механизмами действия [22]. Методами молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД) проведена оценка потенциала ингибиторной активности этих соединений по отношению к тирозинкиназе Bcr-Abl и ее мутантной форме T315I и выполнено их тестирование на противоопухолевую активность с использованием моделей опухолевых клеток *in vitro*. В результате проведенных исследований идентифицированы три соединения, перспективные для разработки новых кандидатов в лекарственные средства для терапии пациентов с ХМЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Теоретическая часть. Дизайн потенциальных ингибиторов тирозинкиназы Bcr-Abl. Способность соединений 2-ариламинопиримидинового ряда блокировать процесс канцерогенеза путем ингибирования протеинкиназ обусловила использование пиримидинового гетероцикла в качестве ключевого фармакофора многих соединений, на основе которых разработаны эффективные противораковые лекарства [11, 15, 20, 23, 24]. Дизайн гибридных молекул осуществляли путем объединения 2-ариламинопиримидинового фармакофора с фрагментом 5-арилзамещенного изоксазола, используя различные комбинации метильных заместителей в кислотном и аминном остатках амида. В структурах целевых амидов присутствовали два фармакофорных фрагмента – 2-аминопиримидин в аминном остатке и изоксазол в кислотном остатке, связанные между собой через фениламидный линкер. При этом кислотные и аминные остатки

в амиде соединяли амидным линкером, способным образовывать водородные связи в активном центре тирозинкиназы Bcr-Abl. В результате были сконструированы пять химерных молекул, различающихся положением метильных заместителей в кислотном остатке и аминоксодержащем остатке. Согласно данным работы Schönherr и Cernak [25], варьирование положений метильных заместителей в структурах биоактивных молекул может оказывать существенное влияние на их ингибиторную активность и в отдельных случаях приводит к ее увеличению более чем на 2 порядка. Эти данные обусловили использование в настоящем исследовании стратегии «магического метильного эффекта» [25] для дизайна потенциальных ингибиторов тирозинкиназы Bcr-Abl на основе химерных молекул, объединяющих ключевые фармакофоры разных противоопухолевых агентов, нацеленных на разные терапевтические мишени.

Для генерации двумерных структур молекул использовали программный пакет ChemDraw 18.0 (<https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw>; по состоянию на 28.02.2024), а затем с помощью программы Open Babel 2.4.1 [26] рассчитывали их трехмерные структуры с последующей оптимизацией геометрии и минимизацией энергии в силовом поле UFF [27]. Физико-химические параметры соединений рассчитывали с помощью веб-сервера SwissADME [28]. Для оценки липофильности молекул использовали среднее арифметическое значений LogP, вычисленных для каждого лиганда с привлечением методов XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT и iLOGP [28].

Оценку потенциальной ингибиторной активности сконструированных соединений против тирозинкиназы Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I} проводили с помощью методов молекулярного докинга и молекулярной динамики.

Молекулярный докинг. Подготовку соединений для молекулярного докинга осуществляли с помощью программного пакета MGLTools [29]. Молекулярный докинг проводили с использованием программы AutoDock Vina 1.1.2 [30] в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Трехмерные структуры тирозинкиназы Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I} заимствовали из Банка данных белков (<https://www.rcsb.org>; PDB ID: 3KFA и 3OY3 соответственно; по состоянию на 28.02.2024). Ячейку для докинга конструировали с использованием программных средств AutoDockTools 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>; по состоянию на 28.02.2024). Для этого с помощью программного пакета UCSF Chimera 1.15 [31] структуру нативной тирозинкиназы накладывали на структуру ее мутантной формы T315I, совмещали их по атомам C^α и подбирали размеры ячейки таким образом, чтобы она полностью включала АТФ-связывающую по-

лость фермента. В результате построенная ячейка имела следующие параметры: $\Delta X = 31 \text{ \AA}$, $\Delta Y = 23 \text{ \AA}$, $\Delta Z = 23 \text{ \AA}$ с центром при $X = 18 \text{ \AA}$, $Y = 8 \text{ \AA}$, $Z = 6 \text{ \AA}$ в системе координат тирозинкиназы Bcr-Abl с мутацией T315I. Параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 100 [30].

Значения свободной энергии связывания лигандов с тирозинкиназой Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I} рассчитывали с помощью классической оценочной функции AutoDock Vina 1.1.2 [30] и двух функций машинного обучения – RF-Score-4 [32] и NNScore 2.0 [33]. Межмолекулярные взаимодействия в статических моделях комплексов лигандов с ферментом идентифицировали с помощью программы BINANA 1.3 [34]. Структуры комплексов лиганд/Bcr-Abl визуализировали средствами программного пакета UCSF Chimera 1.15 [31].

Молекулярную динамику комплексов сконструированных соединений с тирозинкиназой Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I} выполняли в программном пакете Amber18 с использованием силовых полей Amber ff14SB (киназа Bcr-Abl) и GAFF (лиганды) [35]. Для задания парциальных зарядов атомов (модель AM1-BCC) использовали модуль Antechamber программного пакета AmberTools18 [35]. Атомы водорода добавляли с помощью программы tleap пакета AmberTools18 [35]. Комплексы лиганд/Bcr-Abl помещали в кубическую ячейку, заполняли растворителем (модель воды TIP3P [35]) и добавляли ионы Na⁺ и Cl⁻ до значения ионной силы, равного 0,15 М. Систему минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (500 шагов), нагревали от 0 К до 300 К в течение 50 пс в рамках статистического ансамбля NVT и термостата Ланжевена, а затем уравнивали в течение 50 пс и давлении 1,0 атм (ансамбль NPT, баростат Берендсена). На заключительном шаге систему уравнивали в течение 0,5 нс при постоянном объеме и проводили молекулярную динамику длительностью 200 нс в изобарно-изотермических условиях при температуре 300 К и давлении 1 атм.

Анализ молекулярно-динамических траекторий комплексов лиганд/Bcr-Abl. Средние значения энергии связывания для динамических моделей комплексов лиганд/Bcr-Abl рассчитывали с помощью метода MM/GBSA [36–38] в программном пакете AMBER18 [35]. При расчете свободной энергии первые 50 нс МД-моделирования отводили на релаксацию системы и не учитывали при анализе МД-траекторий. Энергию связывания вычисляли для 150 комплексов МД-траектории, разделенных интервалом 1 нс. Для расчета полярной составляющей энергии сольватации использовали континуальную модель растворителя Пуассона–Больцмана с ионной силой 0,15 М.

Неполярные компоненты свободной энергии гидратации вычисляли на основе расчетов площади поверхности, доступной растворителю [35]. Энтропийную компоненту свободной энергии Гиббса рассчитывали с использованием программного модуля Nmode [35]. Анализ МД-траекторий выполняли с помощью программного модуля CPPTRAJ пакета AmberTools18 [35]. Для положительного контроля в расчетах МД использовали комплексы тирозинкиназы Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I} с иматинибом и понатинибом, построенные методом молекулярного докинга. Кроме того, для анализа конформационной стабильности комплексов лиганд/Bcr-Abl проводили МД-расчеты нативной тирозинкиназы и ее мутантной формы T315I в свободном состоянии. При этом в качестве стартовых моделей использовали кристаллические структуры фермента (PDB ID: 3KFA и 3OY3).

Экспериментальная часть. Тестирование на противоопухолевую активность. Соединения, синтезированные по методике, описанной нами ранее [39], тестировали на противоопухолевую активность с использованием моделей клеточных линий K562 (хронический миелоидный лейкоз), HL-60 (острый промиелоцитарный лейкоз) и HeLa (карцинома шейки матки). Для анализа использовали тест на жизнеспособность, основанный на свойстве митохондрий живых клеток в процессе аэробного дыхания восстанавливать резазурин до резорурфина, флуоресцирующего в щелочной среде желто-красным цветом [40].

Клеточные линии K562, HL-60 и HeLa были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; центр коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных»; <https://incras-ckp.ru>). Клетки линий K562 и HL-60 выращивали в питательной среде RPMI 1640 («Sigma-Aldrich», США), а HeLa – в питательной среде DMEM. В обоих случаях в среду добавляли 10% фетальной бычьей сыворотки и смесь антибиотиков пенициллина (100 ед./мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и антимикотика амфотерицина (25 мкг/мл) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки помещали в 96-луночный планшет («Sarstedt», Германия) в концентрации 10⁴ клеток на лунку в 100 мкл среды и добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0, 25,0 и 50,0 мкМ. Для этого исходные растворы (20 мМ) соединений в ДМСО последовательно разводили инкубационной средой до конечных концентраций и добавляли к контролю 0,5% ДМСО. После 72 ч культивирования клеток с исследуемыми соединениями в стандартных условиях в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 20 мкл резазурина в концентрации 250 мкМ. Через 3 ч экспозиции при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ клетки восстанавливали синий

резазурин до розового резорурфина. Количество восстановленного продукта измеряли по флуоресценции при длине волны возбуждения 530–570 нм и длине волны испускания 590 нм на планшетном анализаторе Tecan Infinite M200 («Tecan», Австрия). Жизнеспособность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность, \%} = \frac{\text{ФЛ опытных лунок}}{\text{ФЛ контр. лунок}} \times 100\%, \quad (1)$$

где ФЛ – флуоресценция.

Концентрация препарата, которая вызывает 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток (IC₅₀), рассчитывали графически по дозозависимой кривой в программе MS Excel. Все эксперименты проводили в трех независимых повторях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных молекулярного докинга показал, что комплексы сконструированных соединений (рис. 1) с тирозинкиназой Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I} проявляют низкие значения свободной энергии связывания (табл. 1). Из данных табл. 1 следует, что эти значения сопоставимы с величинами, рассчитанными с использованием идентичного вычислительного протокола для контрольных ингибиторов, и близки к экспериментальному значению $-11,0 \pm 0,3$ ккал/моль, полученному для комплекса иматиниба с нативной тирозинкиназой Bcr-Abl в работе Agafonov et al. [41]. Важно отметить, что различия между экспериментальным значением энергии связывания и величинами, предсказанными для этого комплекса с помощью трех разных оценочных функций, составляют 0,1 ккал/моль (AutoDock Vina 1.1.2, RFScore 4) и 1,1 ккал/моль (NNScore 2.0) (табл. 1). Эти результаты, указывающие на высокий потенциал ингибиторной активности сконструированных молекул против тирозинкиназы Bcr-Abl и ее мутантной формы T315I, в целом согласуются с выводами, сделанными на основе анализа динамических моделей комплексов лиганд/Bcr-Abl. Данные МД показали (табл. 2), что с учетом величин стандартных отклонений, средние значения свободной энергии связывания анализируемых соединений с ферментом сопоставимы с величинами, предсказанными для иматиниба, но уступают при этом понатинибу – ингибитору тирозинкиназы Bcr-Abl третьего поколения, широко используемому в клинике для терапии ХМЛ [18, 19]. Исключение составляет соединение IV, которое показало гораздо более низкое сродство к обоим терапевтическим мишеням по сравнению с контрольными ингибиторами (табл. 2). Анализ средних значений свободной энергии

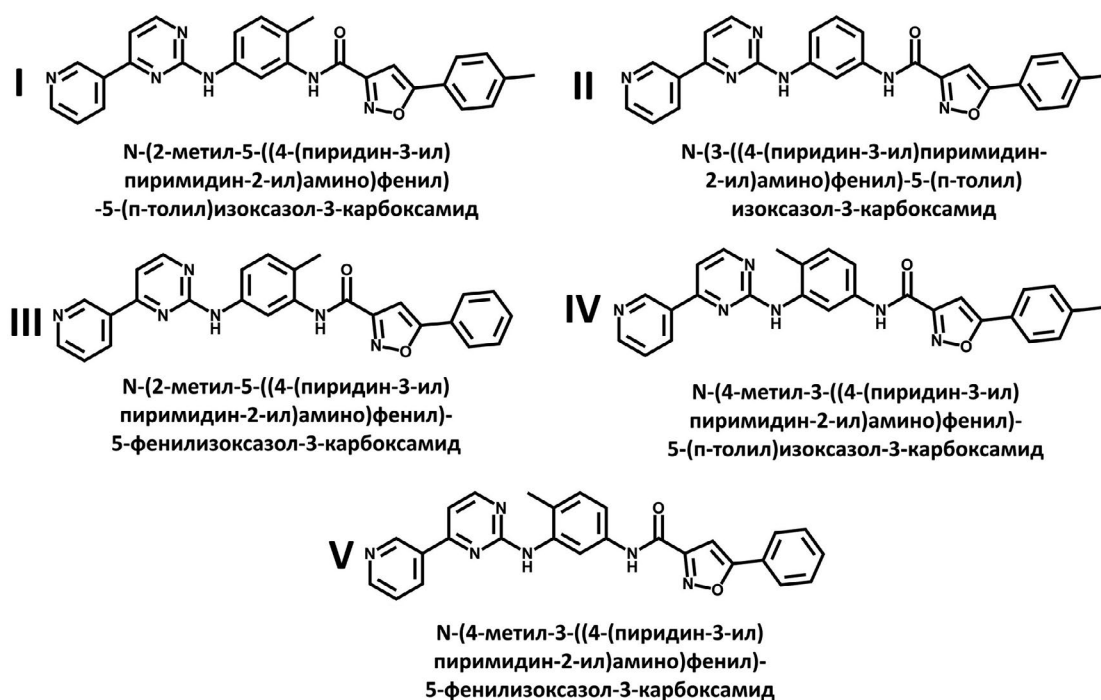


Рис. 1. Химические структуры сконструированных соединений

Таблица 1. Значения свободной энергии связывания ΔG , рассчитанные для статических моделей комплексов лиганд/Bcr-Abl и лиганд/Bcr-Abl^{T315I} с помощью оценочных функций AutoDock Vina 1.1.2, RFScore 4 и NNScore 2.0

Лиганд	ΔG_{Vina} , ккал/моль		$\Delta G_{\text{RFScore4}}$, ккал/моль		$\Delta G_{\text{NNScore2.0}}$, ккал/моль	
	Bcr-Abl	Bcr-Abl ^{T315I}	Bcr-Abl	Bcr-Abl ^{T315I}	Bcr-Abl	Bcr-Abl ^{T315I}
I	-12,5	-10,9	-11,4	-11,3	-11,0	-11,3
II	-11,8	-10,8	-11,4	-11,1	-12,6	-9,8
III	-12,2	-11,0	-11,4	-11,3	-0,6	-11,2
IV	-11,4	-10,6	-11,1	-11,2	-11,4	-10,9
V	-11,8	-10,7	-11,3	-11,5	-11,1	-10,4
Иматиниб	-10,9	-9,3	-11,1	-11,1	-12,1	-9,5
Понатиниб	-12,0	-12,2	-11,4	-11,3	-12,2	-12,3

связывания и стандартных отклонений (табл. 2) дает основание предположить, что комплексы сконструированных соединений с тирозинкиназой Bcr-Abl и ее мутантной формой T315I относительно стабильны в течение МД-расчетов. Это предположение подтверждают данные о временных зависимостях среднеквадратичных отклонений (RMSD, Root-Mean-Square Deviations) координат атомов динамических структур комплексов от их стартовых моделей, построенных методом молекулярного докинга (рис. 2). Согласно приведенным на рис. 2 графикам зависимости RMSD от времени, средним значениям этих величин и стандартным

отклонениям, анализируемые комплексы не подвергаются значительным структурным преобразованиям на МД-траекториях. Так, для нативной тирозинкиназы Bcr-Abl средние значения RMSD и стандартные отклонения, равные $3,8 \pm 0,5 \text{ \AA}$ (соединение I), $2,8 \pm 0,6 \text{ \AA}$ (соединение II), $3,2 \pm 0,6 \text{ \AA}$ (соединение III), $3,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$ (соединение IV) и $3,2 \pm 0,8 \text{ \AA}$ (соединение V), сопоставимы с величинами $3,0 \pm 0,6 \text{ \AA}$ и $2,4 \pm 0,4 \text{ \AA}$, полученными для иматиниба и понатиниба соответственно (рис. 2).

В случае мутантной формы фермента средние значения RMSD и стандартные отклонения для соединений I–V равны $2,5 \pm 0,4 \text{ \AA}$ (соединение I),

Таблица 2. Средние значения свободной энергии связывания $\langle \Delta G \rangle$ и соответствующие им стандартные отклонения ΔG_{STD} , рассчитанные для динамических моделей комплексов лиганд/Vcr-Abl и лиганд/Vcr-Abl^{T315I}

Лиганд	$\langle \Delta H \rangle$, ккал/моль	ΔH_{STD} , ккал/моль	$\langle T\Delta S \rangle$, ккал/моль	$(T\Delta S)_{\text{STD}}$, ккал/моль	$\langle \Delta G \rangle$, ккал/моль	ΔG_{STD} , ккал/моль
Тирозинкиназа Vcr-Abl						
I	-46,4	3,2	-23,2	6,5	-23,3	7,3
II	-47,3	3,3	-25,9	7,6	-21,4	8,1
III	-43,8	4,4	-25,0	6,6	-18,9	8,1
IV	-34,1	2,9	-24,8	5,3	-9,3	6,0
V	-47,3	4,4	-24,5	6,9	-22,7	8,4
Иматиниб	-50,0	4,8	-26,6	6,9	-23,4	8,2
Понатиниб	-55,1	3,2	-26,1	6,8	-29,0	7,1
Тирозинкиназа Vcr-Abl ^{T315I}						
I	-41,5	3,5	-27,2	5,5	-14,3	6,5
II	-47,2	4,9	-25,2	6,0	-22,0	8,0
III	-29,5	3,2	-21,4	6,3	-8,1	7,2
IV	-26,0	2,7	-23,4	5,2	-2,6	5,9
V	-33,8	3,4	-27,1	7,6	-6,7	8,6
Иматиниб	-39,4	3,5	-25,9	5,7	-13,6	6,9
Понатиниб	-53,3	3,7	-26,7	6,5	-26,7	7,0

$2,8 \pm 0,5 \text{ \AA}$ (соединение II), $2,7 \pm 0,5 \text{ \AA}$ (соединение III), $3,1 \pm 0,7 \text{ \AA}$ (соединение IV) и $3,0 \pm 0,8 \text{ \AA}$ (соединение V) и близки к величинам, рассчитанным для иматиниба ($2,8 \pm 0,6 \text{ \AA}$) и понатиниба ($2,9 \pm 0,9 \text{ \AA}$). В то же время для тирозинкиназы Vcr-Abl и Vcr-Abl^{T315I} в свободном состоянии эти значения, составляющие соответственно $3,4 \pm 0,6 \text{ \AA}$ и $2,6 \pm 0,6 \text{ \AA}$, сопоставимы с величинами, рассчитанными для анализируемых соединений в комплексах с ферментом (рис. 2). Эти данные, свидетельствующие об относительной конформационной стабильности комплексов лиганд/Vcr-Abl, подтверждают результаты анализа тепловых карт RMSD (рис. 3), которые позволяют оценивать по всей МД-траектории сходства и различия между динамическими структурами в терминах RMSD. Для комплексов сконструированных и контрольных соединений с тирозинкиназой Vcr-Abl и ее мутантной формой T315I средние значения RMSD, вычисленные путем сравнения каждой последующей динамической структуры с предыдущей, варьируют в интервале от $0,78 \pm 0,07 \text{ \AA}$ до $0,82 \pm 0,07 \text{ \AA}$.

Дополнительным свидетельством относительной устойчивости комплексов на МД-траекториях являются данные о временных зависимостях значений свободной энергии связывания, которые, несмотря на значительные флуктуации в отдельные промежутки времени, не проявляют тенденции к увеличению в исследованном временном интервале (рис. 4). Тем не менее необходимо отметить, что в ряде случаев наблюдается кратковременное существенное снижение сродства лигандов к активному центру тирозинкиназы Vcr-Abl, однако это не приводит к распаду комплексов, что подтверждают величины энергии связывания на заключительных кадрах МД-траекторий (рис. 4), а также их визуальный анализ.

В табл. 3 приведены физико-химические параметры сконструированных соединений, традиционно используемые при отборе молекул, потенциально эффективных при пероральном применении. Из анализа данных табл. 3 следует, что эти параметры полностью удовлетворяют требованиям, предъявляемым к лекарству-кандидату «правилом пяти» Lipinski [42, 43], которые обеспе-

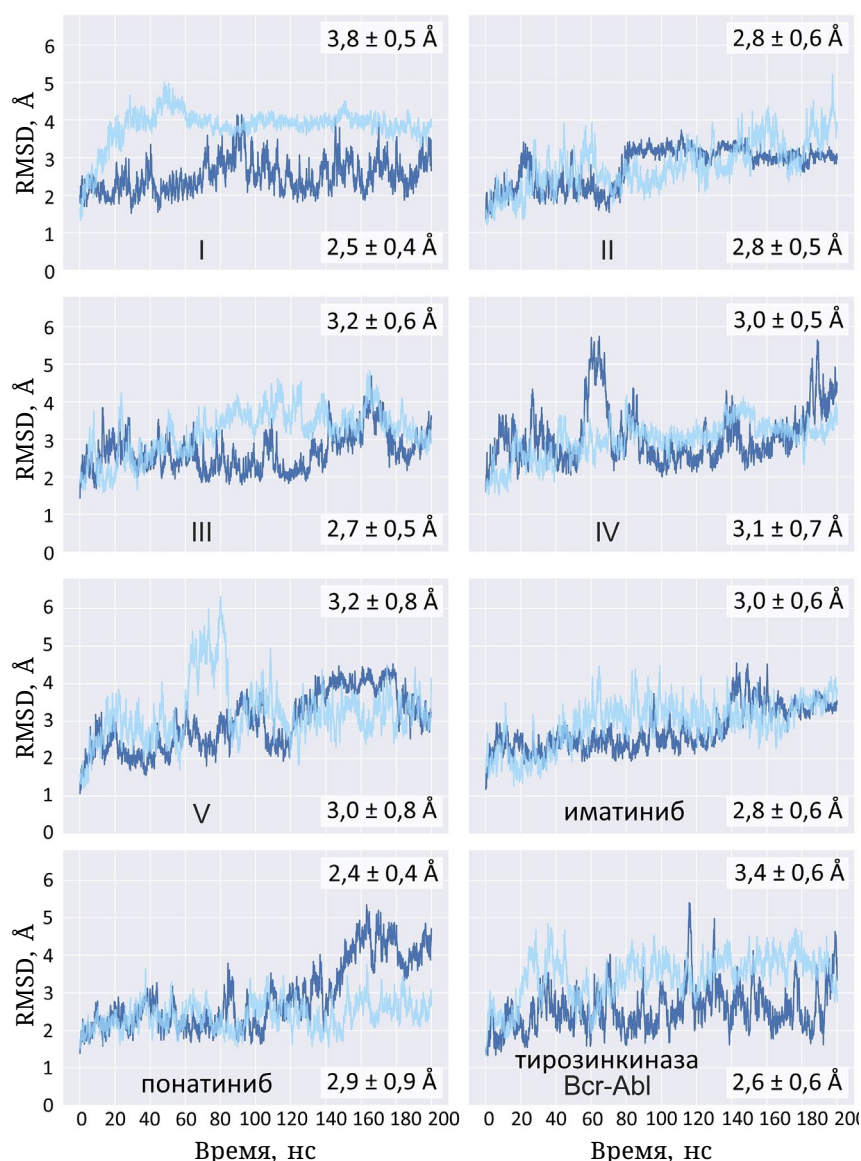


Рис. 2. Временные зависимости значений RMSD (Å), рассчитанных между динамическими и стартовыми структурами комплексов соединений I–V с тирозинкиназой Bcr-Abl (голубая линия) и Bcr-Abl^{T315I} (синяя линия). В правом верхнем углу указаны средние значения RMSD и стандартные отклонения для нативного фермента, а в правом нижнем – для его мутантной формы. Приведены также соответствующие данные для контрольных соединений и фермента в свободном состоянии

чивают такие важные характеристики, как всасывание, распределение, метаболизм и экскреция.

Кроме того, по данным компьютерного прогнозирования, проведенного с помощью веб-сервера открытого доступа ProTox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/), рассматриваемые соединения обладают низкой цитотоксичностью и относятся к четвертому классу острой пероральной токсичности, характеризующемуся значениями полулетальной дозы $300 \text{ мг/кг} < \text{LD}_{50} \leq 2000 \text{ мг/кг}$ [44].

Таким образом, *in silico* оценка сконструированных соединений показала, что, наряду с потенциальной ингибиторной активностью по отношению к тирозинкиназе Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I}, эти молекулы имеют приемлемые фармакокине-

тические и токсикологические характеристики. Тем не менее среди сконструированных соединений следует выделить лиганд IV, для которого, как было отмечено выше, не наблюдалось соответствия между данными молекулярного докинга и молекулярной динамики. Однако при анализе полученных результатов необходимо иметь в виду, что все вычислительные подходы к моделированию структуры комплексов белков с лигандами и к оценке энергии межмолекулярных взаимодействий связаны с различными приближениями, необходимыми для решения задачи, что не всегда приводит к удовлетворительной корреляции между расчетными и экспериментальными данными [45, 46]. Поэтому все сконструированные

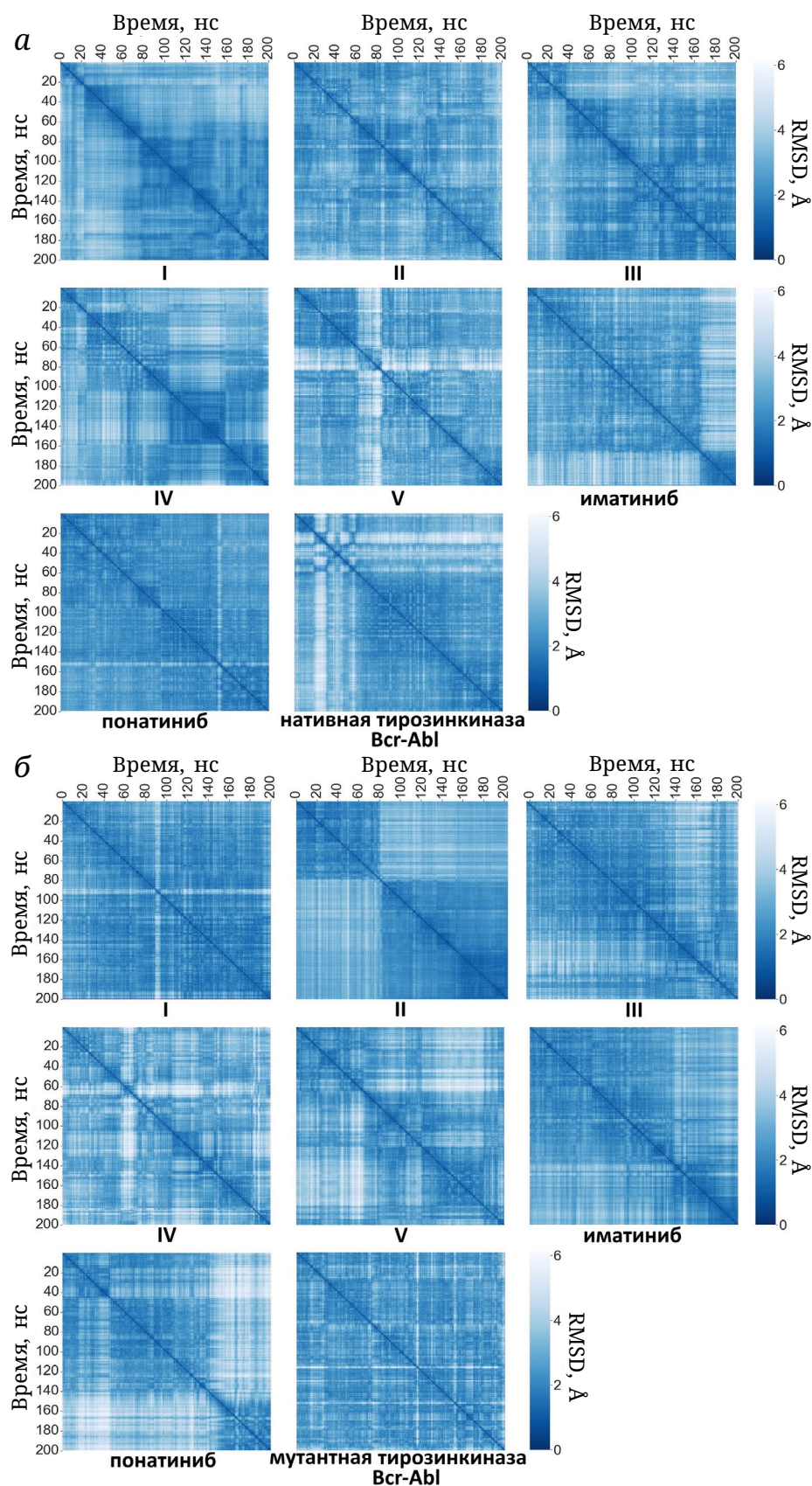


Рис. 3. Тепловые карты RMSD, полученные для комплексов тирозинкиназы Bcr-Abl (a) и ее мутантной формой T315I (б) с соединениями I–V, контрольными ингибиторами и фермента в свободном состоянии в разное время моделирования МД. Значения RMSD рассчитывали для атомов основной цепи тирозинкиназы. Время измеряется по осям абсцисс и ординат. Значение RMSD между структурами комплексов в моменты времени t_1 и t_2 находится на пересечении значений t_1 по оси абсцисс и t_2 по оси ординат

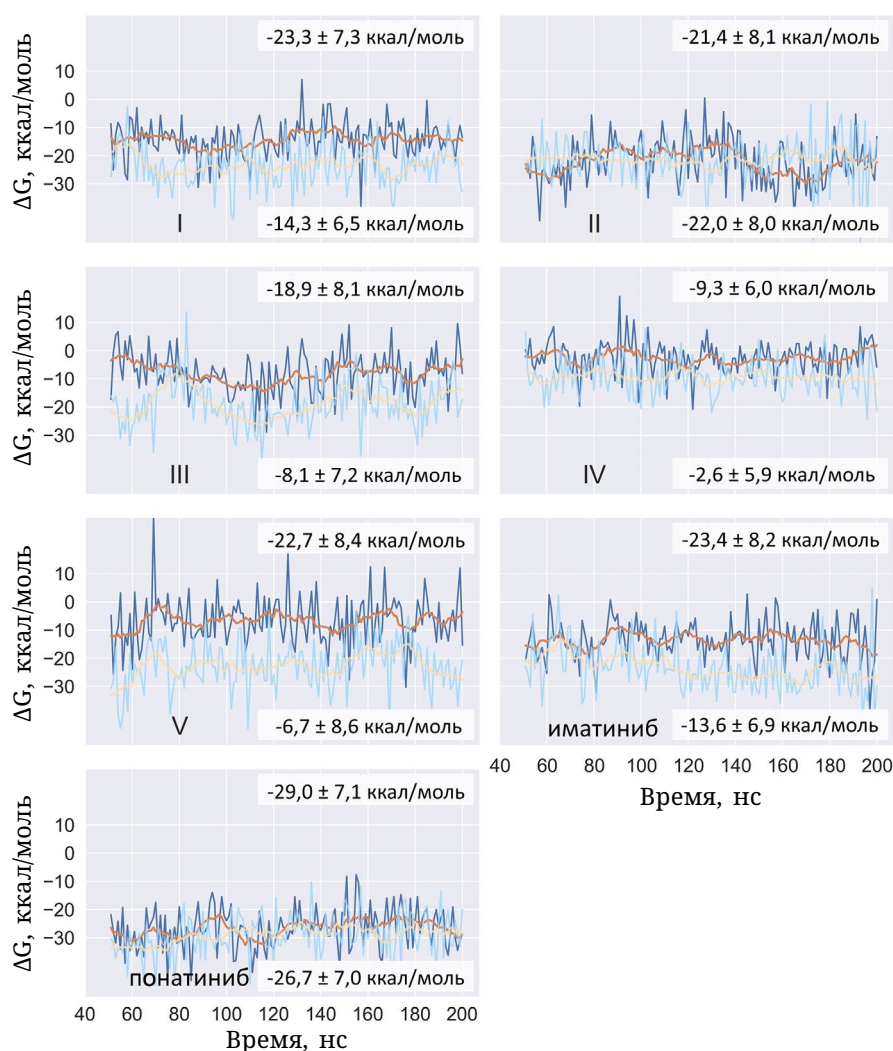


Рис. 4. Временные зависимости свободной энергии связывания для комплексов соединений I–V с тирозинкиназой Bcr-Abl (голубая линия) и Bcr-Abl^{T315I} (синяя линия). С помощью оранжевой и желтой линий показано простое скользящее среднее с размером окна 20 нс. Сверху и снизу приведены средние значения свободной энергии связывания и соответствующие им стандартные отклонения, рассчитанные соответственно для нативной и мутантной тирозинкиназы Bcr-Abl. Приведены также соответствующие данные для контрольных соединений

Таблица 3. Физико-химические параметры сконструированных соединений и контрольных ингибиторов иматиниба и понатиниба

Лиганд	Химическая формула	Молекулярная масса (Да)	LogP	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи
I	C ₂₇ H ₂₂ N ₆ O ₂	462,5	4,2	2	6
II	C ₂₆ H ₂₀ N ₆ O ₂	448,5	4,0	2	6
III	C ₂₆ H ₂₀ N ₆ O ₂	448,5	3,9	2	6
IV	C ₂₇ H ₂₂ N ₆ O ₂	462,5	4,3	2	6
V	C ₂₆ H ₂₀ N ₆ O ₂	448,5	3,8	2	6
Иматиниб	C ₂₉ H ₃₁ N ₇ O	493,6	3,4	2	6
Понатиниб	C ₂₉ H ₂₇ F ₃ N ₆ O	532,6	4,3	1	8

Таблица 4. Противоопухолевая активность соединений *in vitro*

Соединение	Клеточная линия		
	K562	HL-60	HeLa
	IC ₅₀ (мкМ)		
I	2,8 ± 0,8	3,5 ± 0,2	> 50,0
II	14,4 ± 3,5	4,5 ± 2,8	> 50,0
III	> 50,0	11,3 ± 3,0	> 50,0
III*	17,4 ± 3,0	14,5 ± 1,3	> 50,0
IV	> 50,0	47,6 ± 2,1	> 50,0
V	> 50,0	> 50,0	> 50,0

Примечание. III* – Солевая форма соединения III в виде метансульфоната.

in silico соединения, включая лиганд IV, были синтезированы и исследованы на противоопухолевую активность *in vitro*.

На рис. 5 показаны графики зависимости жизнеспособности клеток линий K562, HL-60 и HeLa от концентрации лигандов, а в табл. 4 приведены данные о противоопухолевой активности этих соединений, представленные в величинах IC₅₀. Из анализа этих данных видно, что соединения I–III ингибируют рост клеток крови линий K562 и HL-60, однако не оказывают существенного воздействия на жизнеспособность эпителиальных клеток линии HeLa. В то же время соединение IV демонстрирует противоопухолевую активность только против клеток линии HL-60, а соединение V неактивно во всех рассматриваемых случаях (табл. 4). Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что соединение III оказалось неактивным по отношению к клеткам линий K562 и HeLa, но в виде метансульфоната эта молекула проявила ингибиторную активность против клеток K562 (табл. 4; рис. 5). В ряду проявивших противоопухолевую активность молекул следует особо выделить соединение I, эффективно подавляющее рост клеток линий K562 и HL-60, что подтверждается низкими значениями IC₅₀, равными 2,8 ± 0,8 мкМ и 3,5 ± 0,2 мкМ соответственно (табл. 4; рис. 5).

Очевидно, что, несмотря на установленную противоопухолевую активность соединений I–III по отношению к клеткам ХМЛ K562, полученные данные не доказывают способность этих молекул к специфическим взаимодействиям с тирозинкиназой Bcr-Abl, предсказанную методами молекулярного моделирования. Более того, согласно этим данным, соединения I–III ингибируют рост

клеток острого промиелоцитарного лейкоза HL-60, экспрессирующих онкогенный фузионный белок PML-RARalpha, который играет важную роль в патогенезе данного онкологического заболевания крови [47]. Это дает основание предполагать, что соединения I–III представляют собой мультитаргетные ингибиторы опухолевого роста, что, вероятно, может быть обусловлено одновременным присутствием в их составе фрагментов 2-ариламинопиримидина и изоксазола, производные которых, как было отмечено выше, часто встречаются в структурах молекул, ингибирующих пролиферацию различных типов опухолевых клеток [20, 22].

Следует отметить, что наблюдаемые различия в противоопухолевой активности соединений I–III по отношению к лейкозным клеткам крови K562, HL-60 и опухолевым клеткам эпителия шейки матки HeLa (табл. 4) могут быть обусловлены разной степенью комплементарности их структур структурам активных центров белков, экспрессируемых этими клетками и ответственных за опухолевый рост. Кроме того, эти клеточные линии выделены из различных видов опухолей и характеризуются различной экспрессией как поверхностных, так и внутриклеточных белков, а также реализуемыми сигнальными путями, что может служить еще одной причиной обнаруженной специфичности действия соединений I–III против опухолевых клеток крови K562 и HL-60. Безусловно, эти предположения, сделанные на основе результатов тестирования сконструированных гибридных молекул на моделях опухолевых клеток, должны быть проверены в экспериментах по исследованию механизма их действия с использованием *in vitro* моделей потенциальных белковых мишеней.

На рис. 6 приведены комплексы тирозинкиназы Bcr-Abl и ее мутантной формы T315I с соединениями I–III, которые, согласно полученным экспериментальным данным (табл. 4), обладают противоопухолевой активностью по отношению к миелоидным клеткам крови человека K562. Анализ данных рис. 6 и табл. 5 показывает, что эти соединения образуют широкую сеть межмолекулярных контактов, ответственных за стабилизацию комплексов лиганд/Bcr-Abl. В частности, соединение I формирует водородные связи с остатками M318 и D381 нативного фермента, играющими важную роль для проявления его каталитической активности [48–52]. Примечательно, что эти консервативные гидрофильные остатки участвуют в образовании водородных связей с иматинибом и нилотинибом, а также с рядом других известных ингибиторов тирозинкиназы Bcr-Abl [52]. Кроме водородных связей, соединение I образует 54 контакта Ван-дер-Ваальса с остатками белка, включая такие функционально значимые аминокислоты, как K271, E286, T315 и D381 (табл. 5; рис. 6) [48–52].

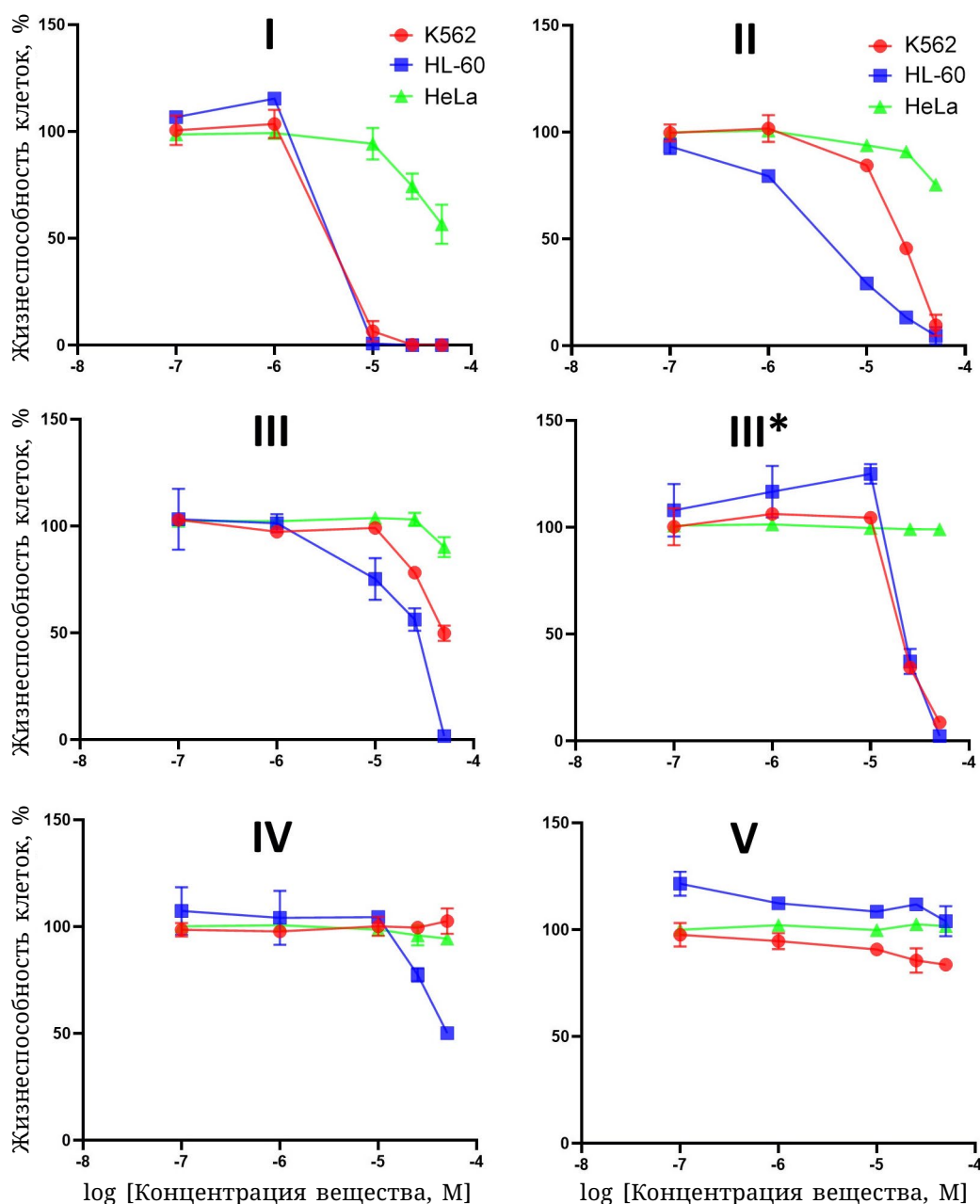


Рис. 5. Зависимости жизнеспособности клеток (% от контроля) от концентрации исследуемых соединений (log концентрации [моль/литр]). III* – Солевая форма соединения III в виде метансульфоната

Как и в случае тирозинкиназы Bcr-Abl, при связывании с ее мутантной формой это соединение формирует многочисленные межмолекулярные взаимодействия, образуя водородную связь с остатком D381 и 36 контактов Ван-дер-Ваальса (табл. 5; рис. 6). Соединения II и III проявляют аналогичный механизм связывания с ферментом, основу которого формируют водородные связи и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (табл. 5; рис. 6). Из анализа данных о межмолекулярных взаимодействиях, реализующихся в интерфейсе комплексов лиганд/Bcr-Abl, также следует, что важная роль в связывании принадлежит изокса-

зольному фрагменту, который участвует в образовании прямых межатомных контактов лигандов с тирозинкиназой Bcr-Abl. При этом атом кислорода изоксазольного кольца соединений I–III формирует водородные связи с аминогруппой основной цепи остатка M318 нативной тирозинкиназы (табл. 5; рис. 6). В случае мутантного фермента атомы кислорода и азота изоксазольного кольца соединений I и III соответственно образуют водородные связи с аминогруппой основной цепи остатка D381 (табл. 5; рис. 6). Полученные данные позволяют предполагать, что совместный вклад в стабилизацию комплексов лиганд/Bcr-Abl

Таблица 5. Межмолекулярные взаимодействия в структурных комплексах соединений I–III с тирозинкиназой Bcr-Abl и Bcr-Abl^{T315I}, построенных методом молекулярного докинга

Лиганд	Водородные связи ¹	Ван-дер-Ваальсовы контакты ²	Катион–π- взаимодействие ³ , Т-стэкинг ⁴
Тирозинкиназа Bcr-Abl			
I	O...*HN[M318] N...*HN[D381]	L248(10), A269(3), K271(1), E286(7), V289(2), M290(6), I293(1), V299(5), T315(3), F317(1), F359(1), L370(4), A380(3), D381(1), F382(6)	–
II	O...*HN[M318] N...*HN[D381]	L248(11), A269(3), E286(5), V289(2), M290(6), I293(2), V299(4), T315(2), F317(1), F359(2), L370(4), A380(3), D381(1), F382(6)	–
III	O...*HN[M318] N...*HN[D381]	L248(7), A269(3), K271(4), E286(5), V289(2), M290(2), V299(1), I313(2), T315(3), F317(1), F359(2), L370(2), A380(2), D381(3), F382(5)	–
Тирозинкиназа Bcr-Abl ^{T315I}			
I	O...*HN[D381]	A269(2), K271(1), E282(2), K285(4), E286(3), V289(3), M290(5), I293(3), L298(1), V299(2), I315(3), L354(4), F382(3)	H361 (катион-π)
II	NH...**O[E286]	L248(7), G249(2), Y253(1), A269(4), K271(1), V289(1), M290(3), I293(2), V299(3), I313(3), I315(5), L354(2), H361(1), L370(4), A380(2), D381(2), F382(6)	H361 (катион-π) Y253 (Т-стэкинг) F382 (Т-стэкинг)
III	N...*HN[D381]	A269(3), K271(1), E282(2), E286(3), V289(1), M290(4), I293(2), V299(1), I313(1), I315(6), D381(2), F382(3)	H361 (катион-π)

Примечания: 1 – Первыми указаны доноры или акцепторы водородной связи, принадлежащие молекуле лиганда, а вторыми – соответствующие атомы или функциональные группы остатков тирозинкиназы, приведенных в квадратных скобках в однобуквенном коде. Символом * отмечены атомы основной цепи белка; символом ** – атомы боковой цепи. 2 – Аминокислотные остатки тирозинкиназы, формирующие Ван-дер-Ваальсовы контакты с лигандами. В круглых скобках указано число контактов. 3 – Аминокислотные остатки тирозинкиназы, участвующие в катион-π-взаимодействиях с лигандами. 4 – Аминокислотные остатки тирозинкиназы, образующие Т-стэкинг с π-сопряженными системами лигандов.

фармакофорных фрагментов 2-ариламинопиримидина и изоксазола способен обеспечить высокий потенциал ингибиторной активности сконструированных химерных молекул против тирозинкиназы Bcr-Abl и ее мутантной формы T315I.

Таким образом, совместный анализ данных молекулярного моделирования и биомедицинского тестирования *in vitro* позволил идентифицировать 3 амида замещенной изоксазол-3-карбоновой кислоты с фармакофорным фрагментом 2-ариламинопиримидина (соединения I–III; рис. 1), проявляющих ингибиторную активность против клеток линий K562 и HL-60 (табл. 4). При этом соединение I показало наибольшую эффективность нейтрализации этих клеток, и поэтому может рассматриваться в качестве приоритетной базовой структуры в исследованиях по созданию новых эффективных противоопухолевых средств. Эти исследования включают оптимизацию структур соединений-лидеров методами QSAR [53, 54], направленную на получение их аналогов с улучшенной противоопухолевой активностью и

приемлемыми фармакологическими свойствами, химический синтез лигандов и биомедицинские испытания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе осуществлен дизайн пяти 2-ариламинопиримидиновых амидов изоксазол-3-карбоновой кислоты, проведена *in silico* оценка потенциальной ингибиторной активности этих соединений по отношению к тирозинкиназе Bcr-Abl и ее мутантной форме T315I, выполнен их синтез и тестирование на моделях опухолевых клеток *in vitro*. В результате совместного анализа расчетных и экспериментальных данных идентифицированы три соединения (лиганды I–III; рис. 1), проявляющие ингибиторную активность против миелоидных клеток линий K562 и HL-60. Показано, что соединение I проявляет наибольшую эффективность ингибирования роста этих клеток. Полученные данные позволяют предпо-

Нативная тирозинкиназа Bcr-Abl

Мутантная тирозинкиназа Bcr-Abl

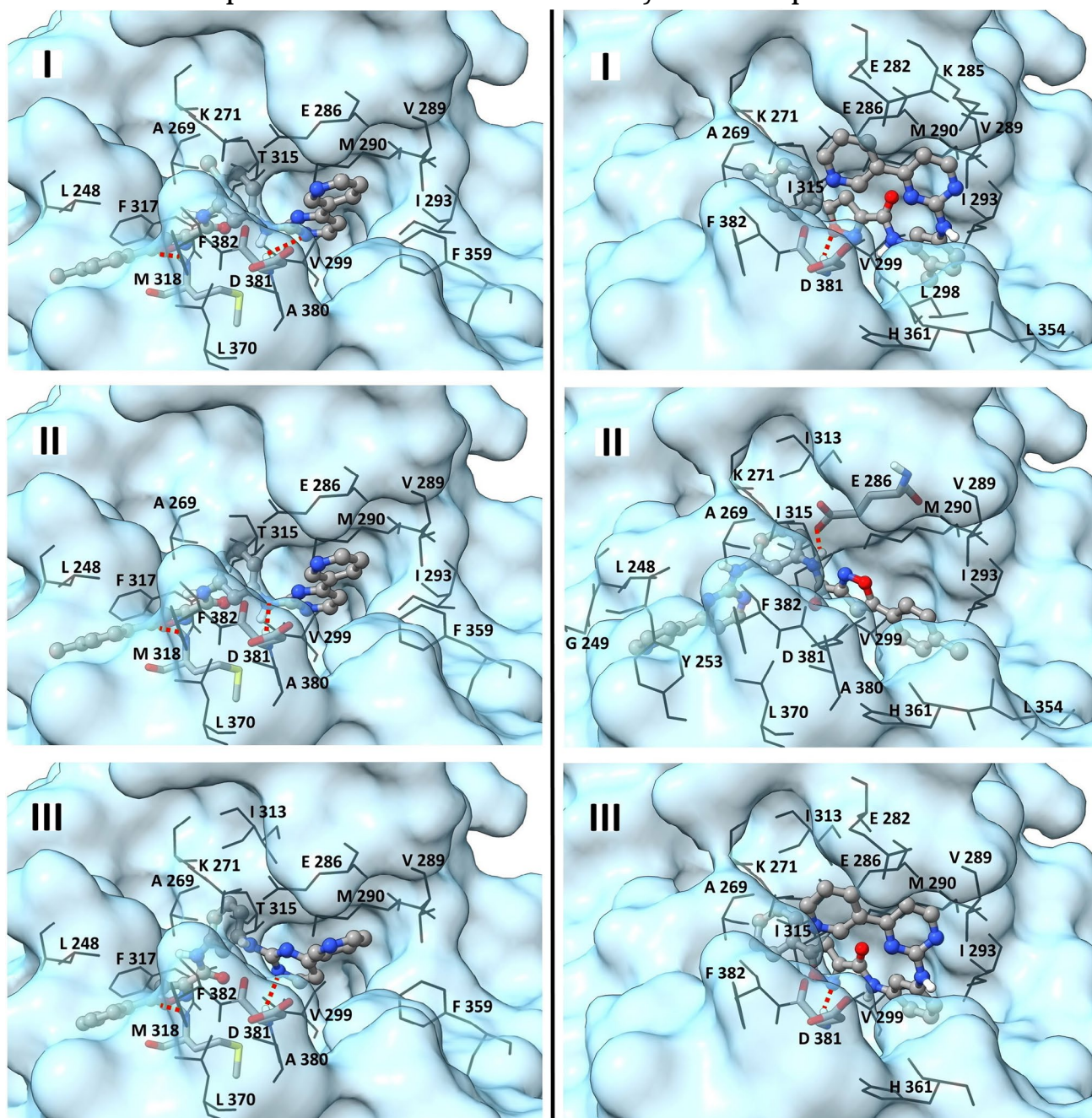


Рис. 6. Комплексы соединений I–III с нативной и мутантной тирозинкиназой Bcr-Abl, построенные методом молекулярного докинга. Соединения представлены моделью «шарик-палочка-шарик». Отмечены остатки фермента, образующие межатомные контакты с лигандами. Остатки, участвующие в водородных связях, обозначены палочковой моделью. Водородные связи показаны красными пунктирными линиями. Проволочная модель использована для обозначения остатков тирозинкиназы Bcr-Abl, образующих контакты Ван-дер-Ваальса

ложить, что идентифицированные соединения могут служить основой для разработки новых эффективных лекарственных препаратов, способных ингибировать каталитическую активность тирозинкиназы Bcr-Abl путем блокирования АТР-связывающей полости фермента. Кроме того, соединения I–III могут быть использованы для создания многоцелевых ингибиторов протеинкиназ, что подтверждается многочисленными исследования-

ми [11, 15, 20, 23, 24, 55], согласно которым производные 2-ариламинопиримидина обладают высоким потенциалом в качестве кандидатов для разработки эффективных противоопухолевых агентов с различными механизмами действия. Наконец, эти молекулы могут рассматриваться в качестве перспективных базовых структур для разработки эффективных ингибиторов других онкогенных белков-мишеней. На это предположение

указывают полученные нами данные об их противоопухолевой активности по отношению к линии клеток острого промиелоцитарного лейкоза (табл. 4), характеризующегося образованием аномального онкогенного фузионного белка PML-RARalpha [47]. В связи с этим одно из дальнейших направлений развития настоящей работы предполагает исследование механизма действия идентифицированных соединений на *in vitro* моделях потенциальных белковых мишеней.

Вклад авторов. Королева Е.В., Игнатович Ж.В. и Поткин В.И. выполнили дизайн соединений, спланировали и руководили экспериментами по их синтезу; Андрианов А.М. и Корноушенко Ю.В. провели вычислительные исследования и проанализировали данные компьютерного модели-

рования; Ермолинская А.Л. синтезировала соединения; Панибрат О.В. выполнила тестирование соединений на противоопухолевую активность; Андрианов А.М. написал первоначальный вариант рукописи; Андрианов А.М., Корноушенко Ю.В., Королева Е.В. и Поткин В.И. отредактировали рукопись. Все авторы прочитали и одобрили статью.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025» Республики Беларусь (грант № 3.04.1).

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. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J., and Witte, O. N. (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products, *Science*, **247**, 1079-1082, <https://doi.org/10.1126/science.2408149>.
2. Deininger, M. W., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2000) BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia, *Cancer Res.*, **60**, 2049-2055.
3. Quintás-Cardama, A., and Cortes, J. (2009) Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia, *Blood*, **113**, 1619-1630, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144790>.
4. Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome, *N. Eng. J. Med.*, **344**, 1038-1042, <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441402>.
5. Ottmann, O. G., and Wassmann, B. (2002) Imatinib in the treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: current status and evolving concepts, *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, **15**, 757-769, <https://doi.org/10.1053/beha.2002.0233>.
6. Buchdunger, E., O'Reilly, T., and Wood, J. (2002) Pharmacology of imatinib (STI571), *Eur. J. Cancer*, **38**, S28-S36, [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)80600-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)80600-1).
7. Peng, B., Lloyd, P., and Schran, H. (2005) Clinical pharmacokinetics of imatinib, *Clin. Pharmacokinet.*, **44**, 879-894, <https://doi.org/10.2165/00003088-200544090-00001>.
8. Druker, B. J. (2004) Imatinib as a paradigm of targeted therapies, *Adv. Cancer Res.*, **91**, 1-30, [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(04\)91001-9](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(04)91001-9).
9. Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., Druker, B., Goldman, J., O'Brien, S. G., Russell, N., Fischer, T., Ottmann, O., Cony-Makhoul, P., Facon, T., Stone, R., Miller, C., Tallman, M., Brown, R., Schuster, M., Loughran, T., Gratwohl, A., Mandelli, F., Saglio, G., Lazzarino, M., Russo, D., Baccarani, M., Morra, E., and International STI571 CML Study Group (2002) Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N. Eng. J. Med.*, **346**, 645-652, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011573>.
10. Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. N., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R. A., and IRIS Investigators (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia, *N. Eng. J. Med.*, **355**, 2408-2417, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062867>.
11. Hochhaus, A., Larson, R. A., Guilhot, F., Radich, J. P., Branford, S., Hughes, T. P., Baccarani, M., Deininger, M. W., Cervantes, F., Fujihara, S., Ortmann, C.-E., Menssen, H. D., Kantarjian, H., O'Brien, S. G., Druker, B. J., and IRIS Investigators (2017) Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia, *N. Eng. J. Med.*, **376**, 917-927, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609324>.

12. Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., and Vasantha, R. H. P. (2018) Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions, *Mol. Cancer*, **17**, 1-20, <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>.
13. Patel, A. B., O'Hare, T., and Deininger, M. W. (2017) Mechanisms of resistance to ABL kinase inhibition in chronic myeloid leukemia and the development of next generation ABL kinase inhibitors, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **31**, 589-612, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.04.007>.
14. Liu, J., Zhang, Y., Huang, H., Lei, X., Tang, G., Cao, X., and Peng, J. (2021) Recent advances in Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors for overriding T315I mutation, *Chem. Biol. Drug Des.*, **97**, 649-664, <https://doi.org/10.1111/cbdd.13801>.
15. Koroleva, E. V., Ignatovich, Z. I., Sinyutich, Y. V., and Gusak, K. N. (2016) Aminopyrimidine derivatives as protein kinases inhibitors. Molecular design, synthesis, and biologic activity, *Russ. J. Org. Chem.*, **52**, 139-177, <https://doi.org/10.1134/S1070428016020019>.
16. Roskoski, R. Jr (2022) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2023 update, *Pharmacol. Res.*, 106552, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106552>.
17. Cortes, J., and Lang, F. (2021) Third-line therapy for chronic myeloid leukemia: current status and future directions, *J. Hematol. Oncol.*, **14**, 1-18, <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01055-9>.
18. Senapati, J., Sasaki, K., Issa, G. C., Lipton, J. H., Radich, J. P., Jabbour, E., and Kantarjian, H. M. (2023) Management of chronic myeloid leukemia in 2023—common ground and common sense, *Blood Cancer J.*, **13**, 58, <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00823-9>.
19. Tan, F. H., Putoczki, T. L., Stylli, S. S., and Luwor, R. B. (2019) Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies, *Onco Targets Ther.*, **12**, 635-645, <https://doi.org/10.2147/OTT.S189391>.
20. Ferguson, F. M., and Gray, N. S. (2018) Kinase inhibitors: the road ahead, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 353-377, <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.21>.
21. Proschak, E., Stark, H., and Merk, D. (2018) Polypharmacology by design: a medicinal chemist's perspective on multitargeting compounds, *J. Med. Chem.*, **62**, 420-444, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00760>.
22. Arya, G. C., Kaur, K., and Jaitak, V. (2021) Isoxazole derivatives as anticancer agent: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, *Eur. J. Med. Chem.*, **221**, 113511, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113511>.
23. Köstler, W. J., and Zielinski, C. C. (2015) Targeting Receptor Tyrosine Kinases in Cancer, in *Receptor Tyrosine Kinases: Structure, Functions and Role in Human Disease*, New York, Spring, pp. 78-225.
24. Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccarini, M. (2011) Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities, *Oncogene*, **30**, 3477-3488, <https://doi.org/10.1038/onc.2011.160>.
25. Schönherr, H., and Cernak, T. (2013) Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 12256-12267, <https://doi.org/10.1002/anie.201303207>.
26. O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., and Hutchison, G. R. (2011) Open Babel: An open chemical toolbox, *J. Cheminform.*, **3**, 1-14, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.
27. Rappé, A. K., Casewit, C. J., Colwell, K. S., Goddard, W. A., III, and Skiff, W. M. (1992) UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10024-10035, <https://doi.org/10.1021/ja00051a040>.
28. Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V. (2017) SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.*, **7**, 42717, <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
29. Center for Computational Structural Biology. MGL Tools. URL: <https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>, Accessed October 21, 2023.
30. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
31. 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, <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
32. Shen, C., Hu, Y., Wang, Z., Zhang, X., Zhong, H., Wang, G., Yao, X., Xu, L., Cao, D., and Hou, T. (2021) Can machine learning consistently improve the scoring power of classical scoring functions? Insights into the role of machine learning in scoring functions, *Brief. Bioinf.*, **22**, 497-514, <https://doi.org/10.1093/bib/bbz173>.
33. Durrant, J. D., and McCammon, J. A. (2011) NNScore 2.0: A neural-network receptor–ligand scoring function, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 2897-2903, <https://doi.org/10.1021/ci2003889>.
34. Durrant, J. D., and McCammon, J. A. (2011) BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization, *J. Mol. Graph. Model.*, **29**, 888-893, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.01.004>.

35. Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E. III, Cruzeiro, V. W. D., Darden, T. A., Duke, R. E., Ghoreishi, D., Gilson, M. K., and Kollman, P. A. (2018) *AMBER 2018*, University of California.
36. Genheden, S., and Ryde, U. (2015) The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinity, *Expert Opin. Drug. Discov.*, **10**, 449-461, <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
37. Xu, L., Sun, H., Li, Y., Wang, J., and Hou, T. (2013) Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 3. The impact of force fields and ligand charge models, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 8408-8421, <https://doi.org/10.1021/jp404160y>.
38. Sun, H., Li, Y., Tian, S., Xu, L., and Hou, T. (2014) Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 4. Accuracies of MM/PBSA and MM/GBSA methodologies evaluated by various simulation protocols using PDB-bind data set, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 16719-16729, <https://doi.org/10.1039/c4cp01388c>.
39. Ignatovich, Z. V., Ermolinskaya, A. L., Kletskov, A. V., Potkin, V. I., and Koroleva, E. V. (2018) Synthesis of new amides of isoxazole-and isothiazole-substituted carboxylic acids containing an arylaminopyrimidine fragment, *Russ. J. Org. Chem.*, **54**, 1218-1222, <https://doi.org/10.1134/S107042801808016X>.
40. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., and Pijnenborg, R. (2007) The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells, *Hum. Reprod.*, **22**, 1304-1309, <https://doi.org/10.1093/humrep/dem011>.
41. Agafonov, R.V., Wilson, C., Otten, R., Buosi, V., and Kern, D. (2014) Energetic dissection of Gleevec's selectivity toward human tyrosine kinases, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 848-853, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2891>.
42. Lipinski, C. A. (2004) Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today Technol.*, **1**, 337-341, <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
43. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 3-26, [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
44. Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., and Preissner, R. (2018) ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals, *Nucleic Acids Res.*, **46(W1)**, W257-W263, <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>.
45. Hassan Baig, M., Ahmad, K., Roy, S., Mohammad Ashraf, J., Adil, M., Siddiqui, M. H., Khan, S., Kamal, M. A., Provaznik, I., and Choi, I. (2016) Computer aided drug design: success and limitations, *Curr. Pharm. Des.*, **22**, 572-581, <https://doi.org/10.2174/1381612822666151125000550>.
46. Desai, P. V. (2016) The integration of computational chemistry during drug discovery to drive decisions: are we there yet? *Future Med. Chem.*, **8**, 1717-1720, <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0161>.
47. Jimenez, J. J., Chale, R. S., Abad, A. C., and Schally, A. V. (2020) Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. *Oncotarget*, **11**, 992-1003, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27513>.
48. Parcha, P., Sarvagalla, S., Madhuri, B., Pajaniradje, S., Baskaran, V., Coumar, M. S., and Rajasekaran, B. (2017) Identification of natural inhibitors of Bcr-Abl for the treatment of chronic myeloid leukemia, *Chem. Biol. Drug Des.*, **90**, 596-608, <https://doi.org/10.1111/cbdd.12983>.
49. Reddy, E. P., and Aggarwal, A. K. (2012) The ins and outs of bcr-abl inhibition, *Genes Cancer*, **3**, 447-454, <https://doi.org/10.1177/1947601912462126>.
50. Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., and Mestan, J. (2005) Molecular interactions between the highly selective pan-Bcr-Abl inhibitor, AMN107, and the tyrosine kinase domain of Abl, *Blood*, **106**, 3365, <https://doi.org/10.1182/blood.V106.11.3365.3365>.
51. Sohraby, F., Bagheri, M., Aliyar, M., and Aryapour, H. (2017) *In silico* drug repurposing of FDA-approved drugs to predict new inhibitors for drug resistant T315I mutant and wild-type BCR-ABL1: a virtual screening and molecular dynamics study, *J. Mol. Graph. Model.*, **74**, 234-240, <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2017.04.005>.
52. İş, Y. S. (2021) Elucidation of ligand/protein interactions between BCR-ABL tyrosine kinase and some commercial anticancer drugs via DFT methods, *J. Comput. Biophys. Chem.*, **20**, 433-447, <https://doi.org/10.1142/S273741652150023X>.
53. Hsu, H. H., Hsu, Y. C., Chang, L. J., and Yang, J. M. (2017) An integrated approach with new strategies for QSAR models and lead optimization, *BMC Genom.*, **18 (Suppl 2)**, 104, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3503-2>.
54. Fu, L., Yang, Z. Y., Yang, Z. J., Yin, M. Z., Lu, A. P., Chen, X., Liu, S., Hou, T. J., and Cao, D. S. (2021) QSAR-assisted-MMPA to expand chemical transformation space for lead optimization, *Brief. Bioinform.*, **22**, bbaa374, <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa374>.
55. Ayaz, M. S., Bhupal, R., Sharma, P., Sahu, A., Singh, P., Gupta, G. D., and Asati, V. (2023) Recent updates on structural aspects of ALK inhibitors as an anticancer agent, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **23**, 900-921, <https://doi.org/10.2174/1871520623666230110114620>.

DESIGN, *in silico* EVALUATION, AND DETERMINATION OF ANTITUMOR ACTIVITY OF POTENTIAL INHIBITORS AGAINST PROTEIN KINASES: APPLICATION TO Bcr-Abl TYROSINE KINASE

E. V. Koroleva¹, A. L. Ermolinskaya¹, Zh. V. Ignatovich¹, Y. V. Kornoushenko²,
O. V. Panibrat², V. I. Potkin³, and A. M. Andrianov^{2*}

¹ Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus,
220141 Minsk, Republic of Belarus

² Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
220141 Minsk, Republic of Belarus; e-mail: alexande.andriano@yandex.ru

³ Institute of Physical-Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
220072 Minsk, Republic of Belarus

Despite significant progress made over the past two decades in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), there is currently still an unmet need for effective and safe drugs to treat patients with resistance and intolerance to clinically used drugs. In this work, 2-arylamino-pyrimidine amides of isoxazole-3-carboxylic acid were designed followed by *in silico* assessment of the inhibitory potential of these compounds against Bcr-Abl tyrosine kinase and determination of their antitumor activity on cell models of the K562 (chronic myeloid leukemia), HL-60 (acute promyelocytic leukemia), and HeLa (cervical cancer) lines. As a result of the joint analysis of computational and experimental data, three compounds exhibiting antitumor activity against cells of the K562 and HL-60 lines were identified. A lead compound demonstrating effective inhibition of the growth of these cells was found, as evidenced by the low values of IC_{50} equal to $2.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$ (K562) and $3.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ (HL-60). The results obtained indicate that the identified compounds form good scaffolds for the design of novel, effective and safe anticancer drugs able to inhibit the catalytic activity of Bcr-Abl kinase by blocking the ATP-binding site of the enzyme.

Keywords: Bcr-Abl tyrosine kinase, Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors, computer-aided drug design, molecular docking, molecular dynamics, biomedical assays, antitumor activity

КЛЮЧЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗА 2 И МОНОАМИНОКСИДАЗА А В МОЗГЕ КРЫС, СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ПО РЕАКЦИИ НА ЧЕЛОВЕКА: ВЛИЯНИЕ БЕНЗОПЕНТАТИЕПИНА ТС-2153

© 2024 В.С. Москалюк^{1*}, Р.В. Кожемякина¹, Т.М. Хоменко², К.П. Волчо²,
Н.Ф. Салахутдинов², А.В. Куликов¹, В.С. Науменко¹, Е.А. Куликова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; v.moskaliuk@alumni.nsu.ru

²Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 23.01.2024

После доработки 25.03.2024

Принята к публикации 27.03.2024

В Институте цитологии и генетики СО РАН на протяжении более 85 поколений ведётся селекция серых крыс-пасюков на агрессивное поведение по отношению к человеку (агрессивные) или его отсутствие (ручные). Агрессивные крысы являются интересной моделью для исследования агрессии, вызванной страхом. Показано, что бензопентатиепин ТС-2153 снижает агрессию у агрессивных крыс и влияет на серотониновую систему, играющую существенную роль в регуляции агрессивного поведения. Целью данной работы было исследование влияния ТС-2153 на активность и экспрессию ключевых ферментов серотониновой системы – триптофангидроксилазы 2 (ТПГ2) и моноаминоксидазы А (МАОА) – в мозге агрессивных и ручных крыс. Агрессивным и ручным самцам серых крыс однократно внутрибрюшинно вводили ТС-2153 в дозировках 10 или 20 мг/кг или растворитель и исследовали уровни белков ТПГ2 и МАОА, их ферментативную активность, а также экспрессию генов, их кодирующих. У агрессивных крыс по сравнению с ручными наблюдался повышенный уровень экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге, а также повышение уровня белка ТПГ2 в гиппокампе и уровней белков ТПГ2 и МАОА в гипоталамусе. Ферментативная активность моноаминоксидазы (МАО) была выше в среднем мозге и гиппокампе крыс агрессивной линии, в то время как активность ТПГ2 между двумя генотипами не различалась. Однократное введение ТС-2153 снизило активность ТПГ2 в гипоталамусе и МАО в среднем мозге крыс обеих линий. ТС-2153 повлиял на уровень белка МАОА в гипоталамусе, повысив его у агрессивных и снизив у ручных крыс. Таким образом, в данной работе показаны существенные различия в экспрессии и активности ключевых ферментов серотониновой системы в мозге серых крыс, селекционируемых по реакции на человека, а влияние бензопентатиепина ТС-2153 на эти ферменты может указывать на механизмы антиагрессивного действия этого вещества.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: защитно-оборонительная агрессия, доместикация, моноаминоксидаза А, триптофангидроксилаза 2, серотонин, ТС-2153, крысы, мозг.

DOI: 10.31857/S0320972524060104 EDN: XLGLPH

ВВЕДЕНИЕ

Агрессивное поведение является важной эволюционной адаптацией, которая служит инструментом борьбы за ресурсы, территорию, половых партнёров. В регуляции агрессии участвуют многие гормоны и медиаторы, однако особая роль в механизмах данного поведения отводится

серотонину. Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) является одним из важнейших медиаторов головного мозга. Серотониновые нейроны, тела которых находятся в ядрах шва среднего мозга, взаимодействуют почти со всеми отделами центральной нервной системы. Серотонин влияет на многие физиологические системы организма, настроение, ряд форм поведения [1].

Принятые сокращения: МАО – моноаминоксидаза; МАОА – моноаминоксидаза А; ТПГ2 – триптофангидроксилаза 2; ТС-2153 – гидрохлорид 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин.

* Адресат для корреспонденции.

Ключевыми ферментами серотониновой системы являются триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) (КФ 1.14.16.4, триптофан 5-монооксигеназа), которая катализирует лимитирующую стадию синтеза медиатора – присоединение ОН-группы в 5-м положении триптофана, и моноаминоксидаза А (МАОА) (КФ 1.4.3.4), которая окисляет его до 5-гидроксинадолуксусного альдегида. Известна связь этих ферментов с агрессивным поведением. Так, многочисленные исследования выявили положительную корреляцию межсамцовой агрессии с экспрессией и активностью ТПГ2 [2–6]. При изучении мышей десяти различных генотипов было показано, что животные с пониженной активностью ТПГ2 в мозге характеризовались менее выраженным проявлением межсамцовой агрессии [3]. Исследование полиморфизма, влияющего на активность ТПГ2, показало сцепление этого показателя с высокой интенсивностью межсамцовой агрессии [4]. Ингибитор ТПГ2 пара-хлорфенилаланин снижал интенсивность межсамцовой агрессии у мышей линии C57BL/6 [2]. В исследованиях на человеке наблюдалась схожая тенденция: снижение уровня агрессии у людей с малоактивными аллелями гена *TPH2* [7, 8]. Однако некоторыми исследователями была показана обратная корреляция между ТПГ2 и агрессией. Так, мыши с нокаутом по этому гену (*Tph2*^{-/-}) проявляли повышенную агрессию по сравнению с животными дикого типа в тесте резидент-интродукер [9]. Более того, крысы с нокаутом по *Tph2* проявляли себя более агрессивно при социальных взаимодействиях [10].

Недостаток МАОА приводит к повышенной межсамцовой агрессии у мышей [11, 12]. Животные с генетическим нокаутом по гену *Maoa* более склонны к ответной агрессии, чаще вступают в драку и имеют меньший латентный период первой атаки [12, 13], а фармакологическое ингибирование данного фермента на пренатальной стадии у мышей и крыс приводит к повышенной склонности к агрессии во взрослом возрасте [14, 15]. У людей недостаток МАОА также вызывает повышенное проявление агрессивного поведения [16], а сниженная ферментативная активность МАОА ассоциирована с проявлением враждебности и злости [17] и агрессивными чертами [18].

Для изучения механизмов определённого типа поведения широко используются генетические селекционные модели животных. Одной из таких моделей, созданной для изучения агрессии, вызванной страхом, и доместикиции, являются крысы, селекционируемые в Институте цитологии и генетики в Новосибирске. Отбор ведётся в двух направлениях: на высокий уровень агрессии по отношению к человеку (агрессивные крысы) и её полное отсутствие (ручные крысы). Полученные линии, помимо прочего, демонстрируют

различия в серотониновой системе: по общему уровню этого медиатора и его метаболита в мозге [19, 20], по экспрессии и активности серотониновых рецепторов [20–25], по экспрессии гена транспортера серотонина [26]. У агрессивных крыс по сравнению с ручными на 24-м поколении селекции наблюдалось снижение активности ТПГ2 в среднем мозге [20]. В то же время активность МАОА не различалась между двумя линиями 35–36 поколений [27].

На данной модели недавно было показано, что бензопентатиепин ТС-2153 снижал уровень агрессии у агрессивной линии крыс [28]. Также это вещество показало ряд других полезных эффектов на поведение, в частности анксиолитическое [28, 29], антикаталептическое [30] и антидепрессантное действия [31]. Более того, известно, что ТС-2153 влияет на серотониновую систему: как на общий уровень серотонина и его метаболита [32], так и на экспрессию и функциональную активность серотониновых рецепторов [22, 31, 33].

В то же время влияние ТС-2153 на экспрессию ТПГ2 и МАОА у агрессивных и ручных крыс ранее не было изучено. Более того, уровни данных белков и экспрессия генов, их кодирующих, не изучались у этих животных. Таким образом, целью этой работы было исследование влияния однократного введения ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ2 и МАОА в мозге агрессивных и ручных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Эксперименты проводили на самцах аутбредных линий серых крыс (*Rattus norvegicus*) возрастом 4–5 месяцев и весом 300–350 г, селекционированных на протяжении более 85 поколений в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) на высокий уровень агрессии по отношению к человеку (агрессивные, 24 животных) или её полное отсутствие (ручные, 24 животных) [34, 35].

Животные содержались в группах по 4 особи в металлических клетках размером 50 × 33 × 20 см в стандартных лабораторных условиях со световым циклом «12 ч день, 12 ч ночь» и свободным доступом к пище и воде. Исследование проводилось на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН (проект RFMEFI62119X0023).

Фармакологическое воздействие. В работе использовали вещество ТС-2153 (гидрохлорид 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин), синтезированное в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова

Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров, использованных в работе

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров	Т отжига, °С	Длина ампликона, п.н.
<i>Polr2a</i>	F: 5'-TTGTCGGGCAGCAGAACGTG-3' R: 5'-CAATGAGACCTTCTCGTCCCTCCC-3'	63	186
<i>Maooa</i>	F: 5'-GAAATTACCCACACCTTCTTAGAG-3' R: 5'-CACTTCTTTTCACATGCGATG-3'	60	178
<i>Tph2</i>	F: 5'-CCCAGGCAGATGACCATTTCAG-3' R: 5'-GGAATTGTGTGAGGAATGTTGGC-3'	64	146

СО РАН (Новосибирск, Россия). Вещество разводили в 0,05%-ном Tween-20 (v/v), 0,05%-ном ДМСО (v/v) и 0,9%-ном NaCl (m/v) [31] и вводили однократно внутривенно (в/в) в объёме 100 мкл на 100 г веса животного в дозах 10 и 20 мг/кг.

Схема эксперимента. 24 агрессивных и 24 ручных крысы были разделены на три группы по 8 животных в каждой. Контрольным животным вводили растворитель. Две другие группы получали в/в вещество TC-2153 в дозировках 10 мг/кг или 20 мг/кг. Через пять часов после инъекции растворителя или препарата животных выводили из эксперимента путём декапитации. Дозировки и время были выбраны согласно полученным ранее данным о влиянии TC-2153 на поведение и серотониновую систему [29–33, 36]. Выделенные структуры мозга (средний мозг, гиппокамп и гипоталамус) замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С до проведения молекулярных исследований.

Структуру мозга гомогенизировали в 300 мкл буфера Tris-HCl (50 mM, pH 7,6) при 4 °С с помощью механического гомогенизатора (Z359971, «Sigma-Aldrich», США), аликвоты гомогената использовались для хроматографии и общего выделения РНК и белка.

Определение уровня экспрессии генов. Общую РНК выделяли из 60 мкл гомогената с помощью реагента TRIzol Reagent («Life Technologies», США) в соответствии с инструкцией производителя и ранее описанным протоколом [28]. С полученной общей РНК синтезировалась комплементарная ДНК (кДНК), измерение экспрессии генов проводилось путём детекции флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green I (R-402 Master mix, «Syntol», Москва, Россия). Используемые праймеры представлены в таблице. В качестве внешнего стандарта использовалась геномная ДНК, выделенная из гепатоцитов самца крысы линии Wistar, концентрацией 0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 нг/мкл [37–39]. Экспрессия генов рассчитывалась как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*), выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Определение количества белка с помощью Вестерн-блот анализа. Уровень белков ТПГ2 и МАОА определяли с помощью Вестерн-блот анализа по ранее описанной методике [28]. Белок разделяли с помощью SDS-PAGE гель-электрофореза (20 мкг белка на дорожку), используя 10%-ный разделяющий гель. Для детекции целевого белка были использованы поликлональные антитела кролика к белку ТПГ2 (1 : 1000, ab184505, «Abcam», Великобритания) и моноклональные антитела кролика к белку МАОА (1 : 500, ab126751, «Abcam»). В качестве внутреннего контроля были использованы поликлональные антитела кролика к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе, GAPDH (1 : 2000, ab9485, «Abcam»). Экспрессию белка выражали в относительных единицах, нормировали на экспрессию белка GAPDH. Белок ТПГ2 детектировали на 56 кДа, МАОА – на 60 кДа и GAPDH – на 37 кДа.

Определение активности моноаминоксидазы (МАО). Активность МАО определялась по ранее описанной методике [40] с помощью модульной системы хроматографического анализа («Shimadzu Corporation», США), оснащённой градиентным насосом (LC-20AD) с вакуумным дегазатором (DGU-20A5R), блоком для автоматизированного ввода пробы с петлёй объёмом 100 мкл (SIL-20A) и электрохимическим детектором (750 mV, DECADE II, «Antec», Нидерланды). Концентрация субстрата (5-HT) в реакционной смеси – 0,15 mM. Данная методика измеряет суммарную активность МАОА и МАОБ (моноаминоксидазы Б). Активность МАО рассчитывали как количество синтезированного 5-гидроксииндолуксусного альдегида (нмоль) за одну минуту, нормированное на количество общего белка в пробе, измеренное с помощью метода Бредфорда («Bio-Rad», США) и спектрофотометра Multiscan («Thermo Fisher Scientific», США).

Определение активности триптофангидроксилазы 2. Активность ТПГ2 определялась по ранее описанной методике [41] с помощью описанной выше модульной системы хроматографического анализа. Концентрация субстрата (L-триптофан) в реакционной смеси – 0,4 mM. Активность ТПГ2 рассчитывали как количество синтезированного 5-гидрокси-триптофана (пмоль) за одну минуту,

нормированное на количество общего белка в пробе.

Статистическая обработка данных. Изменения экспрессии генов, уровней белков и активности ферментов проверялись на нормальность распределения и равенство дисперсий с помощью тестов Лиллиефорса и Барлетта. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего и были проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с независимыми факторами «генотип» и «препарат». При обнаружении значимого эффекта разница между группами была проанализирована с помощью *post hoc* анализа по Фишеру. Граница статистической значимости была установлена на уровне $p < 0,05$. Значительно отличающиеся от остальной выборки значения исключались после оценки методом Диксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние однократного введения ТС-2153 на активность ТПГ2 *in vitro* в мозге у агрессивных и ручных крыс. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не показал различий между агрессивными и ручными крысами по активности ТПГ2 *in vitro* в среднем мозге ($F_{1,41} < 1$), гиппокампе ($F_{1,40} < 1$) и гипоталамусе ($F_{1,38} < 1$) (рис. 1). Нами было обнаружено влияние однократного введения ТС-2153 на этот показатель в гипоталамусе ($F_{2,38} = 5,38$, $p < 0,01$), но не в среднем мозге ($F_{2,41} = 2,05$, $p > 0,05$) и гиппокампе ($F_{2,40} = 2,1$, $p > 0,05$). Так, ТС-2153 снизил активность ТПГ2 в гипоталамусе как агрессивных, так и ручных крыс ($p < 0,05$). Эффекта взаимодействия факторов «генотип» и «препарат» не наблюдалось ни в одной из исследованных нами структур (средний мозг: $F_{2,41} < 1$; гиппокамп: $F_{2,40} < 1$; гипоталамус: $F_{2,38} < 1$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на экспрессию гена *Trh2* в среднем мозге у агрессивных и ручных крыс. Исследование экспрессии гена *Trh2* в среднем мозге методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показало повышенный уровень мРНК данного гена у агрессивных крыс по сравнению с ручными (эффект генотипа: $F_{1,34} = 13,31$, $p < 0,001$). В то же время не было обнаружено влияния однократного введения ТС-2153 ($F_{2,34} < 1$) и взаимодействия факторов «препарат» и «генотип» ($F_{2,34} < 1$) на данный показатель (рис. 2).

Влияние однократного введения ТС-2153 на уровень белка ТПГ2 в мозге у агрессивных и ручных крыс. Значительный эффект влияния генотипа на уровень белка ТПГ2 наблюдался в гиппокампе ($F_{1,41} = 16,45$, $p < 0,001$) (рис. 3, б) и гипоталамусе ($F_{1,37} = 7,01$, $p < 0,05$) (рис. 3, в), но не в среднем мозге ($F_{1,35} = 1,55$, $p > 0,05$) (рис. 3, а). Уровень экспрессии этого белка был повышен в гиппокампе и гипоталамусе агрессивных крыс по сравнению с ручными. Ни в одной из исследованных структур не было обнаружено эффекта однократного введения ТС-2153 (средний мозг: $F_{2,35} = 1,26$, $p > 0,05$; гиппокамп: $F_{2,41} < 1$; гипоталамус: $F_{2,37} < 1$) и эффекта взаимодействия «генотипа» и «препарата» (средний мозг: $F_{2,35} < 1$; гиппокамп: $F_{2,41} = 1,68$, $p > 0,05$; гипоталамус: $F_{2,37} = 1,26$, $p > 0,05$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на активность МАО *in vitro* в мозге у агрессивных и ручных крыс. Нами было обнаружено значительное повышение активности МАО в среднем мозге ($F_{1,41} = 11,73$, $p < 0,01$) (рис. 4, а) и гиппокампе ($F_{1,41} = 9,61$, $p < 0,01$) (рис. 4, б) агрессивных крыс по сравнению с ручными. В гипоталамусе не было выявлено межлинейных различий ($F_{1,42} = 3,15$, $p > 0,05$) (рис. 4, в). Более того, ТС-2153 оказал влияние на данный показатель в среднем мозге крыс ($F_{2,41} = 4,19$, $p < 0,05$), значительно снизив актив-

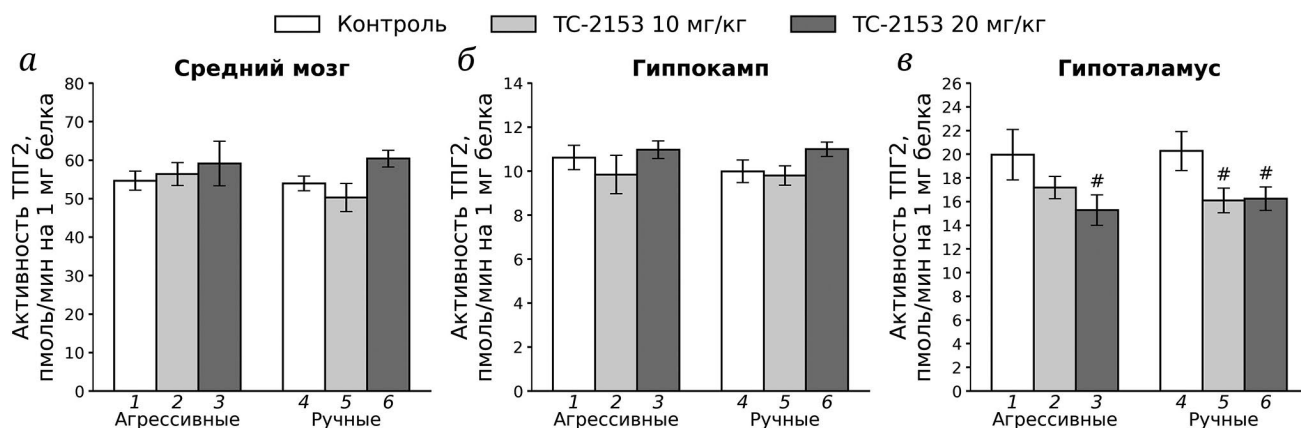


Рис. 1. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на активность ТПГ2 (пмоль/мин на 1 мг белка) *in vitro* в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. # $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой (7–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

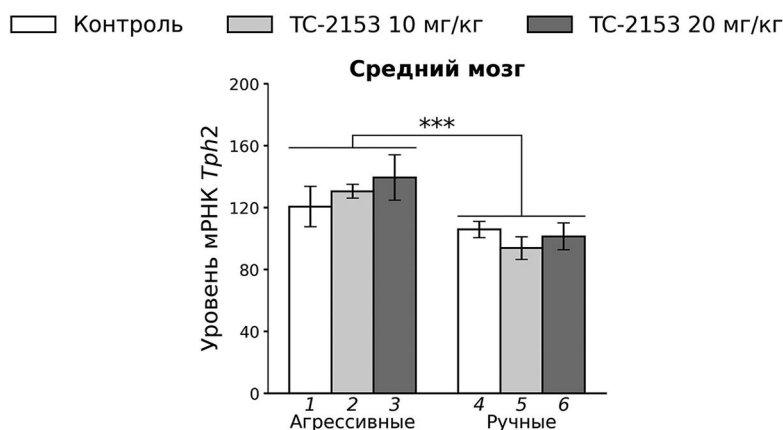


Рис. 2. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень мРНК гена *Trh2* в среднем мозге у агрессивных и ручных крыс. Уровень экспрессии рассчитывался как количество копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a*. *** $p < 0,001$ – эффект генотипа (6–7 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

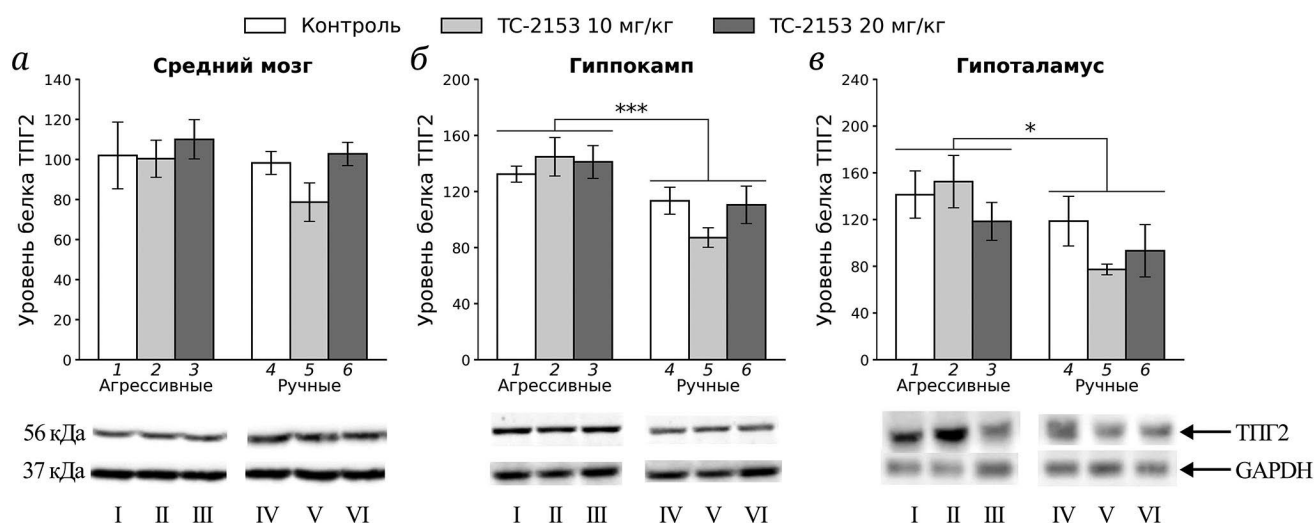


Рис. 3. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень белка ТПГ2 в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. Уровень белка представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – эффект генотипа (5–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг. Часть результатов иммуноблота на мембране, использованных для подсчёта уровня белка ТПГ2: I – агрессивные, контроль; II – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; III – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; IV – ручные, контроль; V – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; VI – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

ность MAO у ручных животных ($p < 0,05$), в то время как снижение её активности у агрессивных крыс не было статистически значимым ($p = 0,07$). В гиппокампе ($F_{2,41} < 1$) и гипоталамусе ($F_{2,42} = 1,24$, $p > 0,05$) дисперсионный анализ не показал влияния препарата. Также не наблюдалось значимого эффекта взаимодействия факторов «генотип» и «препарат» (средний мозг: $F_{2,41} = 2,22$, $p > 0,05$; гиппокамп: $F_{2,41} < 1$; гипоталамус: $F_{2,42} = 1,97$, $p > 0,05$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на экспрессию гена *Maoa* в мозге у агрессивных и ручных крыс. Экспрессия гена *Maoa* не различа-

лась у агрессивных и ручных крыс ни в одной из исследованных структур (средний мозг: $F_{1,35} = 1,17$, $p > 0,05$; гиппокамп: $F_{1,31} < 1$; гипоталамус: $F_{1,34} < 1$) (рис. 5). Эффекта однократного введения ТС-2153 не было обнаружено ни в среднем мозге ($F_{2,35} = 1,72$, $p > 0,05$), ни в гиппокампе ($F_{2,31} = 1,54$, $p > 0,05$), ни в гипоталамусе ($F_{2,34} < 1$). Эффект взаимодействия факторов «генотип» и «препарат» также не был статистически значимым (средний мозг: $F_{2,35} < 1$; гиппокамп: $F_{2,31} < 1$; гипоталамус: $F_{2,34} < 1$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на уровень белка MAOA в мозге у агрессивных

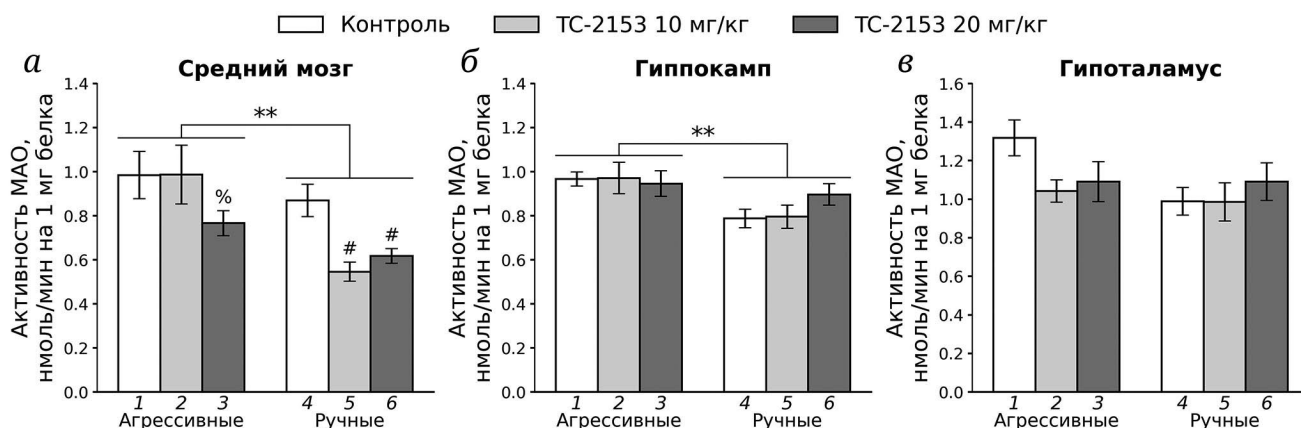


Рис. 4. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на активность МАО (нмоль/мин на 1 мг белка) *in vitro* в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. ** $p < 0,01$ – эффект генотипа, # $p < 0,05$, % $p = 0,07$ в сравнении с контрольной группой (7–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

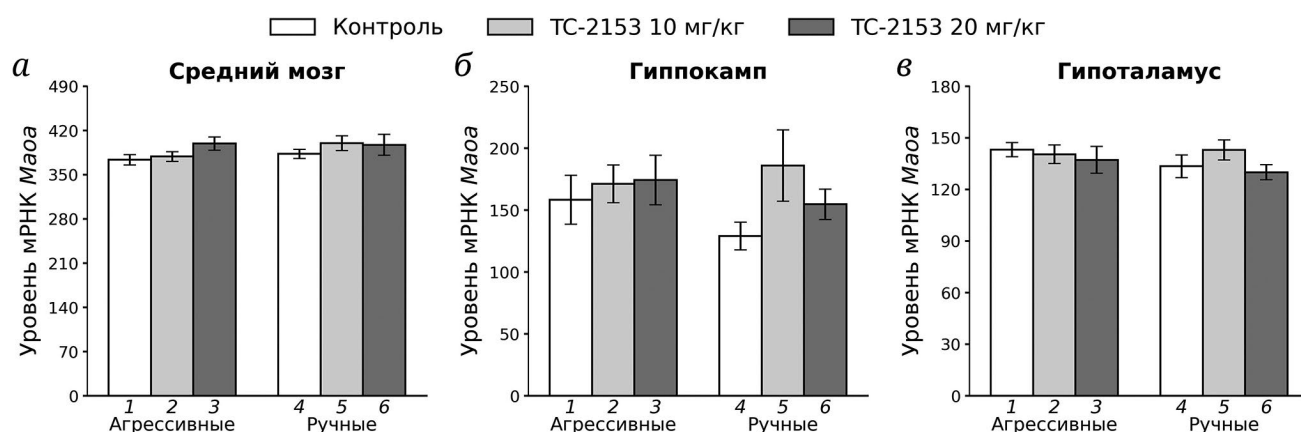


Рис. 5. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень мРНК гена *Maoa* в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. Уровень экспрессии рассчитывался как количество копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a* (5–7 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

и ручных крыс. Уровень белка МАОА был достоверно выше в гипоталамусе агрессивных крыс по сравнению с ручными ($F_{1,32} = 16,88$, $p < 0,001$) (рис. 6, в), в то время как в среднем мозге ($F_{1,32} = 3,21$, $p > 0,05$) (рис. 6, а) и гиппокампе ($F_{1,39} = 2,44$, $p > 0,05$) (рис. 6, б) эффект генотипа не был статистически значимым. Однократное введение ТС-2153 не повлияло на экспрессию данного белка (средний мозг: $F_{2,32} < 1$; гиппокамп: $F_{2,39} < 1$; гипоталамус: $F_{2,32} < 1$), также не было обнаружено эффекта взаимодействия генотипа и препарата в среднем мозге ($F_{2,32} < 1$) и гиппокампе ($F_{2,39} < 1$). В то же время значительный эффект взаимодействия этих факторов наблюдался в гипоталамусе агрессивных и ручных крыс ($F_{2,32} = 5,71$, $p < 0,01$): ТС-2153 снизил уровень белка МАОА в данной структуре у ручных животных ($p < 0,05$), а у агрессивных наблюдалась тенденция к его повышению ($p = 0,056$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существуют противоречивые данные относительно участия Т1ПГ2 в регуляции агрессивного поведения. Так, некоторыми исследователями была получена положительная корреляция между экспрессией и активностью Т1ПГ2 и этим типом поведения [2–6]. Однако нокаут гена *Tph2* приводил к повышению агрессии у мышей и крыс [9, 10]. Стоит отметить, что последствия нокаута какого-либо гена скорее отражают компенсаторные изменения, вызванные отсутствием его продукта, чем эффекты самого гена. В нашей работе мы показали, что экспрессия гена *Tph2* в среднем мозге агрессивных крыс была выше, чем у ручных. В то же время уровень белка Т1ПГ2 был повышен у агрессивных животных в гиппокампе и гипоталамусе, но не в среднем

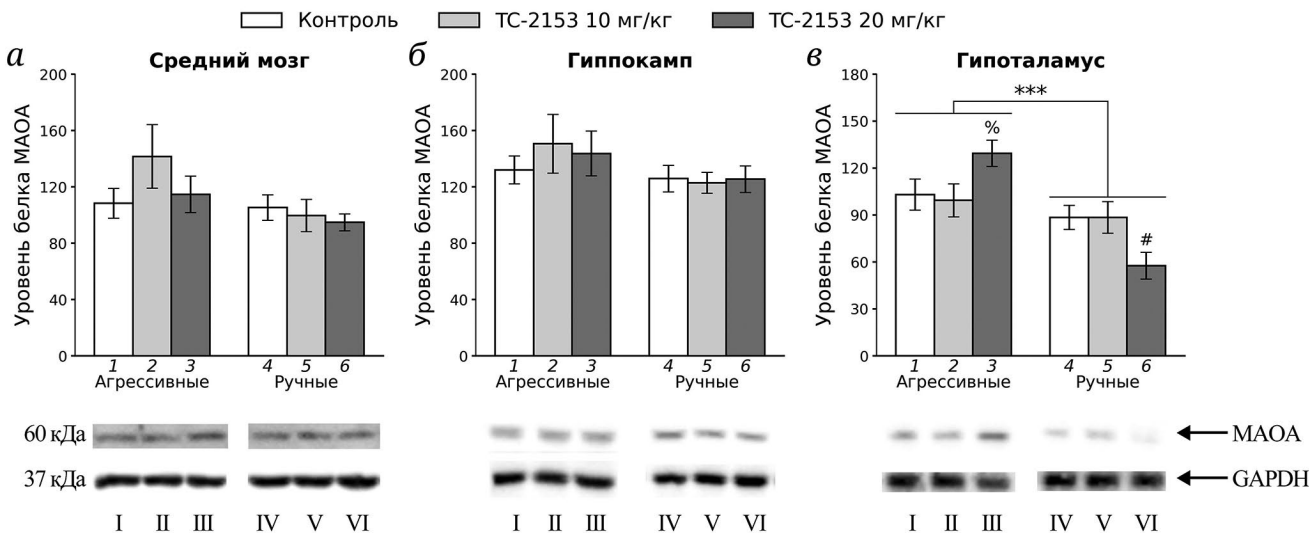


Рис. 6. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень белка MAOA в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. Уровень белка представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. *** $p < 0,001$ – эффект генотипа, # $p < 0,05$, % $p = 0,056$ в сравнении с контрольной группой (4–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг. Часть результатов иммуноблота на мембране, использованных для обчёта уровня белка MAOA: I – агрессивные, контроль; II – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; III – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; IV – ручные, контроль; V – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; VI – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

мозге (рис. 7). Эти результаты согласуются с основными данными о положительной корреляции экспрессии ТПГ2 и агрессивного поведения. Известно, что тела серотониновых нейронов находятся в ядрах шва среднего мозга, откуда отдают проекции в другие отделы ЦНС. Фермент ТПГ2 производится в телах серотониновых нейронов в среднем мозге и с помощью аксонального транспорта доставляется в другие структуры мозга, где обеспечивает синтез серотонина в синаптических окончаниях. Таким образом, наблюдаемое в нашей работе увеличение уровня мРНК в среднем мозге, возможно, возникает в основном за счёт серотонинергических нейронов, посылающих проекции в гиппокамп и гипоталамус, где наблюдается повышение уровня белка. Ферментативная активность ТПГ2 не различалась между агрессивными и ручными крысами. Данные результаты расходятся с более ранними, полученными на крысах 24–27 поколений селекции, когда наблюдалось повышение активности этого фермента в среднем мозге ручных крыс по сравнению с агрессивными [20]. Наблюдаемое расхождение может объясняться результатом продолжающихся перестроек в серотониновой системе у этих линий крыс за прошедшие 30 лет отбора.

Известно, что снижение экспрессии основного фермента разрушения серотонина MAOA приводит к повышению агрессии [11–13, 16], однако в данной работе у агрессивных крыс мы обнаружили повышенный базальный уровень этого белка

в гипоталамусе по сравнению с ручными и повышенный уровень активности MAO в среднем мозге и гиппокампе (рис. 7). Возможно, наблюдаемое повышение уровня белка и ферментативной активности ассоциировано с этим специфическим типом агрессии. Так, ранее у ручных лисиц было показано снижение активности данного фермента в стволе мозга по сравнению с дикими [42], тогда как у агрессивных и ручных крыс 35–36 поколений селекции и диких серых крыс активность MAOA не различалась [27]. Интересно, что нами не было обнаружено различий между генотипами в уровне мРНК гена *Maoa* на фоне изменений в уровне белка. Более того, различия в уровне белка и ферментативной активности не совпадают по локализации. Это может указывать на различные пути воздействия на регуляцию MAOA в зависимости от структуры мозга.



Рис. 7. Межлинейные различия по активности и экспрессии ключевых ферментов серотониновой системы, ТПГ2 и MAOA, в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе агрессивных и ручных крыс

Ранее мы обнаружили, что у агрессивных крыс наблюдается более низкая экспрессия 5-HT_{1A}-рецептора в среднем мозге [22], где он в основном экспрессируется пресинаптически, а его активация приводит к гиперполяризации серотонинергических нейронов и ингибированию серотониновой сигнализации (обзор см. в работе Altieri et al. [43]). С другой стороны, экспрессия 5-HT_{2A}-рецепторов, которые являются известными активаторами 5-HT-системы (обзор см. в работе Raote et al. [44]), была повышена в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе агрессивных крыс [22]. Таким образом, на основе наблюдаемых паттернов экспрессии этих двух типов рецепторов и более ранних данных о повышенном уровне серотонина в поясной коре, прилежащем ядре и скорлупе агрессивных крыс [19] мы предположили, что данная линия характеризуется более активной 5-HT-системой по сравнению с ручными крысами. Этот вывод подтверждается представленными здесь данными о повышенной активности и экспрессии ТПГ2 и МАОА – основных ферментов синтеза и катаболизма серотонина – у агрессивных крыс.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что у агрессивных крыс по сравнению с ручными был повышен уровень белка внутриклеточной трансдукции стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы STEP [28]. Этот белок играет существенную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Более того, на мышах было показано, что ингибирование активности ТПГ2 с помощью пара-хлорфенилаланина приводило к снижению уровня мРНК гена, кодирующего белок STEP в стриатуме [45], а в данной работе мы показали увеличение экспрессии ТПГ2 у агрессивных животных. Эти результаты могут свидетельствовать о связи этих двух ферментов. Возможно, что данное взаимодействие опосредовано нейротрофическим фактором мозга BDNF, ведь известно, что недостаток ТПГ2 при нокауте кодирующего её гена у мышей приводит к повышению экспрессии белка BDNF [46, 47], который, в свою очередь, негативно коррелирует с экспрессией STEP.

Бензопентатиепин ТС-2153 является ингибитором белка STEP [48] и оказывает влияние на серотонинергическую систему головного мозга [31–33]. Более того, нами было показано, что ТС-2153 снижал проявление агрессии и уровень белка STEP у агрессивных крыс, а также оказывал анксиолитический эффект как на агрессивных, так и на ручных животных [28].

В данной работе мы обнаружили, что однократное введение ТС-2153 не оказало эффекта ни на уровень мРНК гена *Trh2*, ни на количество белка ТПГ2. Ранее на мышах также не было обнаружено влияния хронического введения ТС-2153 на экспрессию гена *Trh2* в среднем мозге [33]. Однако

Влияние однократного введения ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ2 и МАОА в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе

ТС-2153	Агрессивные	Ручные
Активность ТПГ2		
Активность МАО		
Уровень белка МАОА		

Рис. 8. Влияние однократного введения ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ2 и МАОА в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе агрессивных и ручных крыс

ТС-2153 повлиял на активность ТПГ2 – снизил этот показатель в гипоталамусе как у агрессивных, так и у ручных крыс (рис. 8). В предварительных экспериментах *in vitro* было показано, что ТС-2153 в концентрациях 0,01 мМ и меньше – предположительные концентрации этого вещества в мозге крыс при используемых в этой работе дозировках – напрямую не влиял на активность ТПГ2, а, значит, это вещество оказывает своё действие опосредованно. Активность ТПГ2 регулируется кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II [49], активность которой зависит от концентрации кальция. Ранее мы показали, что ТС-2153 снижает активность серотониновых 5-HT_{2A}-рецепторов [31], чья активация сопровождается повышением внутриклеточной концентрации кальция, а антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов блокируют это повышение [50–52]. Таким образом, ТС-2153, снижая функциональную активность 5-HT_{2A}-рецепторов, может влиять на концентрацию кальция, что приводит к снижению активности ТПГ2.

Снижение активности этого фермента под действием ТС-2153 согласуется с антиагрессивным и анксиолитическим эффектами этого вещества [28]. Так как активность и экспрессия ТПГ2 положительно коррелируют с уровнем агрессии, логично, что снижение активности этого фермента сопровождается снижением выраженности агрессии. Однако действие ТС-2153 на активность ТПГ2 наблюдается как у агрессивных, так и ручных крыс, хотя антиагрессивное действие проявляется только у агрессивной линии. Ручные крысы характеризуются почти максимальным баллом дружелюбного поведения в тесте «перчатка», и, возможно, снижение активности ТПГ2 уже не приводит к видимым поведенческим эффектам в этом направлении. В то же время анксиолитическое действие ТС-2153 наблюдается у обеих линий крыс. Оно тоже может быть опосредовано снижением активности ТПГ2: многочисленные исследования показали также положительную корреляцию между ТПГ2 и тревожностью (обзор см. в работе Kulikova et al. [53]).

ТС-2153 также повлиял на ферментативную активность МАО (рис. 8). Введение ТС-2153 снизило активность этого фермента в среднем мозге агрессивных (на уровне тенденции) и ручных крыс. Известно, что ингибиторы МАО оказывают анксиолитический эффект [54–56]. Ранее нами было показано, что однократное введение ТС-2153 снизило тревожность у агрессивных и ручных крыс [28] в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Возможно, что наблюдаемое изменение поведения связано также с действием этого вещества на активность МАО в среднем мозге. Предварительные эксперименты показали, что ТС-2153 также не связывается напрямую с этим ферментом. Влияние данного вещества на активность МАО может быть опосредовано через митоген-активируемую протеинкиназу р38, которая фосфорилирует серин в 209-м положении и деактивирует МАОА [57]. Активность же р38 тоже регулируется фосфорилированием, и этот белок является одной из мишеней фосфатазы STEP [58]. При этом ТС-2153, ингибируя STEP, через р38 распространяет своё действие на активность МАОА.

В дополнение к этому ТС-2153 изменил уровень белка МАОА, снизив его в гипоталамусе ручных крыс, а в гипоталамусе агрессивных наблюдалась тенденция к его повышению. При этом влияния на экспрессию гена *Maoa* не было выявлено. Возможно, в данный временной промежуток (5 часов после инъекции) уровень мРНК уже пришёл в норму, и мы видим только изменения в уровне белка. Гипоталамус является важнейшим звеном гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) и регулятором реакции организма на стрессовое воздействие. Агрессивные и ручные крысы различаются по базовому состоянию ГГНС и ответу на стресс [34, 35, 59]. В то же время пути регуляции экспрессии МАОА подвержены влиянию стресса и взаимосвязаны с ГГНС (обзор см. в работе Higuchi et al. [60]). Таким образом, межлинейные различия агрессивных и ручных крыс в ГГНС могут служить причиной разнонаправленного ответа на однократное введение ТС-2153 в гипоталамусе. В частности, известно, что транскрипционный фактор FoxO1 является репрессором гена *Maoa* [61]. Его активность, в свою очередь, регулируется киназами р38 и ERK1/2 [62] – субстратами стриятумспецифичной протеинтирозинфосфатазы STEP [58], которую блокирует ТС-2153. При этом эти две киназы оказывают противоположное действие на FoxO1: р38 активирует данный транскрипционный фактор, а ERK1/2 – деактивирует. Разнонаправленное действие ингибитора STEP бензопентатиепина ТС-2153 на уровень белка МАОА у агрессивных и ручных крыс может свидетельствовать о разном состоянии этих сигнальных путей у двух линий животных.

Таким образом, в данной работе мы обнаружили существенные различия в активности и экспрессии основных ферментов синтеза и катаболизма серотонина – ТПГ2 и МАОА – у крыс, селекционированных в течение более 85 поколений на выраженное агрессивное поведение по отношению к человеку или его отсутствие. Более того, мы показали, что у агрессивных и ручных крыс ингибитор белка STEP ТС-2153 снижает активность ТПГ2 и МАОА в гипоталамусе и среднем мозге соответственно и разнонаправленно влияет на уровень белка МАОА в гипоталамусе. Полученные в работе данные позволяют глубже понять вклад ключевых ферментов серотониновой системы в процессы, лежащие в основе агрессивного поведения, вызванного страхом, а также пути влияния вещества ТС-2153 на серотонинергическую систему мозга.

Вклад авторов. В.С. Москалюк – проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста статьи; Р.В. Кожемякина – проведение экспериментов; Т.М. Хоменко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов – разработка и синтез ТС-2153; А.В. Куликов – проведение экспериментов, редактирование текста статьи; В.С. Науменко – редактирование текста статьи, общее руководство проектом; Е.А. Куликова – концепция, анализ результатов, редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

Финансирование. Крысы содержались за счёт средств бюджетного проекта FWNR-2022-0010. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00028.

Благодарности. Исследование было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта: RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты проводились согласно правилам лабораторной практики в Российской Федерации, утверждённым Министерством здравоохранения РФ (приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 года), и в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health, «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», NIH Publications No. 80023, 1996) и были одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 99 от 09.11.2021). Нами были приложены все усилия, чтобы минимизировать количество животных, использованных в экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carver, C. S., Johnson, S. L., and Joormann, J. (2009) Two-mode models of self-regulation as a tool for conceptualizing effects of the serotonin system in normal behavior and diverse disorders, *Curr. Dir. Psychol. Sci.*, **18**, 195-199, <https://doi.org/10.1111/j.1467-8721.2009.01635.x>.
2. Kulikov, A. V., Osipova, D. V., Naumenko, V. S., Terenina, E., Mormède, P., and Popova, N. K. (2012) A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism, *Behav. Brain Res.*, **233**, 113-119, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.031>.
3. Kulikov, A. V., Osipova, D. V., and Naumenko, V. S. (2005) Association between *Tph2* gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains, *Genes Brain Behav.*, **4**, 482-485, <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00145.x>.
4. Osipova, D. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2009) C1473G polymorphism in mouse *tph2* gene is linked to tryptophan tydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test, *J. Neurosci. Res.*, **1174**, 1168-1174, <https://doi.org/10.1002/jnr.21928>.
5. Popova, N. K. (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system, *Bioessays*, **28**, 495-503, <https://doi.org/10.1002/bies.20412>.
6. Takahashi, A., Shiroishi, T., and Koide, T. (2014) Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/Ms: association with serotonin-related genes, *Front. Neurosci.*, **8**, 156, <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00156>.
7. Laas, K., Kiive, E., Mäestu, J., Vaht, M., and Veidebaum, T. (2017) Nice guys: homozygosity for the *TPH2*-703G/T (rs4570625) minor allele promotes low aggressiveness and low anxiety, *J. Affect. Disord.*, **215**, 230-236, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.03.045>.
8. Manuck, S. B., Flory, J. D., Ferrell, R. E., Dent, K. M., Mann, J. J., and Muldoon, M. F. (1999) Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene, *Biol. Psychiatry*, **45**, 603-614, [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00375-8).
9. Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., and Alenina, N. (2012) Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin, *Translat. Psychiatry*, **2**, e122-9, <https://doi.org/10.1038/tp.2012.44>.
10. Meng, X., Grandjean, J., Sbrini, G., Schipper, P., Hofwijks, N., Stoop, J., Calabrese, F., and Homberg, J. (2022) Tryptophan hydroxylase 2 knockout male rats exhibit a strengthened oxytocin system, are aggressive, and are less anxious, *ACS Chem. Neurosci.*, **13**, 2974-2981, <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00448>.
11. Godar, S. C., Fite, P. J., Mcfarlin, K. M., Bortolato, M., and Program, C. P. (2016) The role of monoamine oxidase A in aggression: current translational developments and future challenges, *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **69**, 90-100, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.01.001>.
12. Popova, N. K., Skrinskaya, Yu. A., Amstislavskaya, T. G., Vishnivetskaya, G. B., Seif, I., and De Meier, E. (2001) Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **31**, 597-602, <https://doi.org/10.1023/A:1012364910091>.
13. Scott, A. L., Bortolato, M., Chen, K., and Shih, J. C. (2008) Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation, *Neuroreport*, **19**, 739-743, <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282fd6e88>.
14. Mejia, J. M., Ervin, F. R., Baker, G. B., and Palmour, R. M. (2002) Monoamine oxidase inhibition during brain development induces pathological aggressive behavior in mice, *Biol. Psychiatry*, **52**, 811-821, [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(02\)01418-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01418-x).
15. Whitaker-Azmitia, P. M., Zhang, X., and Clarke, C. (1994) Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: preliminary behavioral and neurochemical studies, *Neuropsychopharmacology*, **11**, 125-132, <https://doi.org/10.1038/npp.1994.42>.
16. Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H., and van Oost, B. A. (1993) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A, *Science*, **262**, 578-580, <https://doi.org/10.1126/science.8211186>.
17. Soliman, A., Bagby, R. M., Wilson, A. A., Miler, L., Clark, M., Rusjan, P., Sacher, J., Houle, S., and Meyer, J. H. (2011) Relationship of monoamine oxidase A binding to adaptive and maladaptive personality traits, *Psychol. Med.*, **41**, 1051-1060, <https://doi.org/10.1017/S0033291710001601>.
18. Alia-Klein, N., Goldstein, R. Z., Kriplani, A., Logan, J., Tomasi, D., Williams, B., Telang, F., Shumay, E., Biegon, A., Craig, I. W., Henn, F., Wang, G.-J., Volkow, N. D., and Fowler, J. S. (2008) Brain monoamine oxidase A activity predicts trait aggression, *J. Neurosci.*, **8**, 5099-5104, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0925-08.2008>.
19. Albert, F. W., Shchepina, O., Winter, C., Römler, H., Teupser, D., Palme, R., Ceglarek, U., Kratzsch, J., Sohr, R., Trut, L. N., Thiery, J., Morgenstern, R., Plyusnina, I. Z., Schöneberg, T., and Pääbo, S. (2008) Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans, *Horm. Behav.*, **53**, 413-421, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.010>.

20. Popova, N. K., Kulikov, A. V., Nikulina, E. M., Kozlachkova, E. Y., and Maslova, G. B. (1991) Serotonin metabolism and 5-HT receptors in Norway rats selected for low aggressiveness to man, *Aggr. Behav.*, **17**, 207-213, [https://doi.org/10.1002/1098-2337\(1991\)17:4%3C207::AID-AB2480170403%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-2337(1991)17:4%3C207::AID-AB2480170403%3E3.0.CO;2-2).
21. Kondaurova, E. M., Ilchibaeva, T. V., Tsybko, A. S., Kozhemyakina, R. V., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2016) 5-HT_{1A} receptor gene silencers Freud-1 and Freud-2 are differently expressed in the brain of rats with genetically determined high level of fear-induced aggression or its absence, *Behav. Brain Res.*, **310**, 20-25, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.04.050>.
22. Moskaliuk, V. S., Kozhemyakina, R. V., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., and Kulikova, E. A. (2023) On associations between fear-induced aggression, *Bdnf* transcripts, and serotonin receptors in the brains of Norway rats: an influence of antiaggressive drug TC-2153, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 983, <https://doi.org/10.3390/ijms24020983>.
23. Naumenko, V. S., Kozhemyakina, R. V., Plyusnina, I. F., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2013) Serotonin 5-HT_{1A} receptor in infancy-onset aggression: comparison with genetically defined aggression in adult rats, *Behav. Brain Res.*, **243**, 97-101, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.059>.
24. Popova, N. K., Naumenko, V. S., Kozhemyakina, R. V., and Plyusnina, I. Z. (2009) Functional correlates of the brain 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors and expression of 5-HT_{2A} AND 5-HT_{2C} genes in aggressive and nonaggressive Norway rats [in Russian], *Russ. Fiziol. Zhurn. Im I M Sechenova*, **95**, 99-105.
25. Popova, N. K., Naumenko, V. S., Plyusnina, I. Z., and Kulikov, A. V. (2005) Reduction in 5-HT_{1A} receptor density, 5-HT_{1A} mRNA expression, and functional correlates for 5-HT_{1A} receptors in genetically defined aggressive rats, *J. Neurosci. Res.*, **80**, 286-292, <https://doi.org/10.1002/jnr.20456>.
26. Naumenko, V. S., Kozhemyakina, R. V., Plyusnina, I. Z., and Popova, N. K. (2009) Expression of serotonin transporter gene and startle response in rats with genetically determined fear-induced aggression, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **147**, 81-83, <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0441-2>.
27. Voitenko, N. N. (1993) Brain monoamine oxidase in aging wild Norway rats, chosen for lack of aggressive behavior toward humans [in Russian], *Vopr. Med. Khim.*, **39**, 28-30.
28. Moskaliuk, V. S., Kozhemyakina, R. V., Bazovkina, D. V., Terenina, E., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., and Kulikova, E. (2022) On an association between fear-induced aggression and striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in the brain of Norway rats, *Biomed. Pharmacother.*, **147**, 112667, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112667>.
29. Khomenko, T. M., Tolstikova, T. G., Bolkunov, A. V., Dolgikh, M. P., Pavlova, A. V., Korchagina, D. V., Volcho, K. P., and Salakhutdinov, N. F. (2009) 8-(Trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine: novel aminobenzopentathiepine having *in vivo* anticonvulsant and anxiolytic activities, *Lett. Drug Design Discov.*, **6**, 464-467, <https://doi.org/10.2174/157018009789057544>.
30. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., Kulikova, E. A., Volcho, K. P., and Popova, N. K. (2012) A new synthetic varacin analogue, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), decreased hereditary catalepsy and increased the BDNF gene expression in the hippocampus in mice, *Psychopharmacology*, **221**, 469-478, <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2594-8>.
31. Kulikova, E. A., Khotskin, N. V., Illarionova, N. B., Sorokin, I. E., Bazhenova, E. Y., Kondaurova, E. M., and Volcho, K. P. (2018) Inhibitor of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), produces antidepressant-like effect and decreases functional activity and protein Level of 5-HT_{2A} receptor in the brain, *Neuroscience*, **394**, 220-231, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.10.031>.
32. Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Popova, N. K., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., and Kulikov, A. V. (2015) Effect of acute administration of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153) on biogenic amines metabolism in mouse brain, *Lett. Drug Design Discov.*, **12**, 833-836.
33. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., Kulikova, E. A., Khomenko, T. M., Korchagina, D. V., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., and Popova, N. K. (2011) Effect of new potential psychotropic drug, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride, on the expression of serotonin-related genes in mouse brain [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **45**, 282-288.
34. Naumenko, E. V., Popova, N. K., Nikulina, E. M., Dygalo, N. N., Shishkina, G. T., Borodin, P. M., and Markel, A. L. (1989) Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **33**, 85-91, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90434-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90434-6).
35. Plyusnina, I., and Oskina, I. (1997) Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans, *Physiol. Behav.*, **61**, 381-385, [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00445-3).
36. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., Kulikova, E. A., Volcho, K. P., Khomenko, T. M., Salakhutdinov, N. F., and Popova, N. K. (2014) Antidepressant activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153): comparison with classical antidepressants, *Lett. Drug Des. Discov.*, **11**, 169-173.

37. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and Popova, N. K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 97-101, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.06.005>.
38. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>.
39. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT_{1A} serotonin receptor gene expression in the brain [in Russian], *Mol Biol (Mosk)*, **40**, 37-44, <https://doi.org/10.1134/s0026893306010079>.
40. Evsiukova, V. S., Arefieva, A. B., Sorokin, I. E., and Kulikov, A. V. (2023) Age-related alterations in the level and metabolism of serotonin in the brain of males and females of annual turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*), *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3185, <https://doi.org/10.3390/ijms24043185>.
41. Komleva, P. D., Alhalabi, G., Izyurov, A. E., Khotskin, N. V., and Kulikov, A. V. (2023) Effects of the combination of the C1473G mutation in the *Tph2* gene and *lethal yellow* mutations in the *Raly-Agouti* locus on behavior, brain 5-HT and melanocortin systems in mice, *Biomolecules*, **13**, 963, <https://doi.org/10.3390/biom13060963>.
42. Popova, N. K., Voitenko, N. N., Kulikov, A. V., and Avgustinovich, D. F. (1991) Evidence for the involvement of central serotonin in mechanism of domestication of silver foxes, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **40**, 751-756, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90080-L](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90080-L).
43. Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E. D., and Andrews, A. M. (2013) Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior, *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 72-83, <https://doi.org/10.1021/cn3002174>.
44. Raote, I., Bhattacharya, A., and Panicker, M. M. (2022) Serotonin 2A (5-HT_{2A}) Receptor Function: Ligand-Dependent Mechanisms and Pathways, in *Serotonin Receptors in Neurobiology* (Chattopadhyay, A., ed.), Frontiers in Neuroscience, Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis, Accessed: October 8, 2022.
45. Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., Bazhenova, E. Yu., and Kulikov, A. V. (2020) Pargyline and p-chlorophenylalanine decrease expression of Ptpn5 encoding striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in the mouse striatum, *Mol. Biol.*, **54**, 274-280, <https://doi.org/10.1134/S0026893320020090>.
46. Kronenberg, G., Mosienko, V., Gertz, K., Alenina, N., Hellweg, R., and Klempin, F. (2016) Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein concentrations in mice lacking brain serotonin, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **266**, 281-284, <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0611-3>.
47. Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Lunardi, G., and Pasqualetti, M. (2013) Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation, *Mol. Psychiatry*, **18**, 1106-1118, <https://doi.org/10.1038/mp.2012.128>.
48. Xu, J., Chatterjee, M., Baguley, T. D., Brouillette, J., Kurup, P., Ghosh, D., Kanyo, J., Zhang, Y., Seyb, K., Ononenyi, C., Foscue, E., Anderson, G. M., Gresack, J., Cuny, G. D., Glicksman, M. A., Greengard, P., Lam, T. T., Tautz, L., Nairn, A. C., Ellman, J. A., and Lombroso, P. J. (2014) Inhibitor of the tyrosine phosphatase STEP reverses cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *PLoS Biol.*, **12**, e1001923, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001923>.
49. Kuhn, D. M., Sakowski, S. A., Geddes, T. J., Wilkerson, C., and Haycock, J. W. (2007) Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase 2: identification of serine-19 as the substrate site for calcium, calmodulin-dependent protein kinase II, *J. Neurochem.*, **103**, 1567-1573, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04855.x>.
50. Hagberg, G.-B., Blomstrand, F., Nilsson, M., Tamir, H., and Hansson, E. (1998) Stimulation of 5-HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca²⁺ channels, *Neurochem. Int.*, **32**, 153-162, [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00087-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00087-9).
51. Lin, O. A., Karim, Z. A., Vemana, H. P., Espinosa, E. V. P., and Khasawneh, F. T. (2014) The antidepressant 5-HT_{2A} receptor antagonists pizotifen and cyproheptadine inhibit serotonin-enhanced platelet function, *PLoS One*, **9**, e87026, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087026>.
52. Seitz, P. K., Bremer, N. M., McGinnis, A. G., Cunningham, K. A., and Watson, C. S. (2012) Quantitative changes in intracellular calcium and extracellular-regulated kinase activation measured in parallel in CHO cells stably expressing serotonin (5-HT) 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors, *BMC Neurosci.*, **13**, 25, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-25>.
53. Kulikova, E. A., and Kulikov, A. V. (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models, *Exp. Opin. Ther. Targets*, **23**, 655-667, <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1634691>.
54. Jaka, O., Iturria, I., van der Toorn, M., Hurtado de Mendoza, J., Latino, D. A. R. S., Alzualde, A., Peitsch, M. C., Hoeng, J., and Koshibu, K. (2021) Effects of natural monoamine oxidase inhibitors on anxiety-like behavior in zebrafish, *Front. Pharmacol.*, **12**, 669370, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.669370>.
55. Poltyrev, T., Gorodetsky, E., Bejar, C., Schorer-Apelbaum, D., and Weinstock, M. (2005) Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic-

- pituitary-adrenal axis in male and female prenatally stressed rats, *Psychopharmacology (Berl)*, **181**, 118-125, <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2229-z>.
56. Zisook, S. (1985) A clinical overview of monoamine oxidase inhibitors, *Psychosomatics*, **26**, 240-251, [https://doi.org/10.1016/S0033-3182\(85\)72877-0](https://doi.org/10.1016/S0033-3182(85)72877-0).
 57. Cao, X., Rui, L., Pennington, P. R., Chlan-Fourney, J., Jiang, Z., Wei, Z., Li, X.-M., Edmondson, D. E., and Mousseau, D. D. (2009) Serine 209 resides within a putative p38(MAPK) consensus motif and regulates monoamine oxidase-A activity, *J. Neurochem.*, **111**, 101-110, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06300.x>.
 58. Muñoz, J. J., Tárrega, C., Blanco-Aparicio, C., and Pulido, R. (2003) Differential interaction of the tyrosine phosphatases PTP-SL, STEP and HePTP with the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38alpha is determined by a kinase specificity sequence and influenced by reducing agents, *Biochem. J.*, **372**, 193-201, <https://doi.org/10.1042/BJ20021941>.
 59. Herbeck, Yu. E., Os'kina, I. N., Gulevich, R. G., and Plyusnina, I. Z. (2010) Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior, *Cytol. Genet.*, **44**, 108-113, <https://doi.org/10.3103/S0095452710020064>.
 60. Higuchi, Y., Soga, T., and Parhar, I. S. (2017) Regulatory pathways of monoamine oxidase A during social stress, *Front. Neurosci.*, **11**, 604, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00604>.
 61. Wu, J. B., and Shih, J. C. (2011) Valproic acid induces monoamine oxidase A via Akt/forkhead box O1 activation, *Mol. Pharmacol.*, **80**, 714-723, <https://doi.org/10.1124/mol.111.072744>.
 62. Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1, *Cell Signal.*, **19**, 519-527, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.015>.

KEY ENZYMES OF SEROTONERGIC SYSTEM TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 AND MONOAMINE OXIDASE A IN THE BRAIN OF RATS SELECTIVELY BRED FOR REACTION TOWARD HUMANS: EFFECTS OF BENZOPENTATHIEPIN TC-2153

V. S. Moskaliuk^{1*}, R. V. Kozhemyakina¹, T. M. Khomenko², K. P. Volcho²,
N. F. Salakhutdinov², A. V. Kulikov¹, V. S. Naumenko¹, and E. A. Kulikova¹

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (SB RAS),
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: v.moskaliuk@alumni.nsu.ru*

² *N. N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia*

In the Institute of cytology and genetics (Novosibirsk) for over 85 generations takes place a selection of grey rats for high aggression toward humans (aggressive rats) or its complete absence (tame rats). Aggressive rats are an interesting model to study fear-induced aggression. Benzopentathiepin TC-2153 exerts an antiaggressive effect on aggressive rats and affects serotonergic system – an important regulator of aggression. The aim of this study was to investigate the TC-2153 effect on key serotonergic system enzymes – tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) and monoamine oxydase A (MAOA) – in the brain of aggressive and tame rats. TC-2153 (10 or 20 mg/kg) or vehicle were administered once i.p. to male aggressive and tame rats. TPH2 and MAOA enzymatic activity, mRNA and protein levels were assessed. Selection for high aggression level resulted in elevated *Tph2* mRNA levels in the midbrain, TPH2 protein in hippocampus and TPH2 and MAOA proteins in hypothalamus. MAO activity was higher in the midbrain and hippocampus of aggressive rats while TPH2 activity did not differ between the strains. Single TC-2153 administration decreased TPH2 and MAO activity in hypothalamus and midbrain respectively. The drug acted upon MAOA protein levels in hypothalamus: elevated that of aggressive rats and decreased in the tame ones. Thus, this study shows profound differences in the expression and activity of the key serotonergic system enzymes in the brain of rats selectively bred for highly aggressive behavior toward humans and its absence, and effects of benzopentathiepin TC-2153 on these enzymes may point to the mechanisms of its antiaggressive action.

Keywords: fear-induced aggression, domestication, monoamine oxydase A, tryptophan hydroxylase 2, serotonin, TC-2153, rats, brain

ПОСТИНТЕГРАЦИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ВИЧ-1 СОПРЯЖЕНА С АКТИВАЦИЕЙ КЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ DNA-PK И ATM И ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ ИХ МИШЕНЕЙ

© 2024 А.Н. Анисенко^{1,2,3*}, А.А. Нефедова³, И.И. Киреев², М.Б. Готтих^{1,2}

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

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

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

Поступила в редакцию 28.03.2024

После доработки 18.04.2024

Принята к публикации 25.04.2024

Интеграция ДНК копии генома ВИЧ-1 в клеточный геном приводит к появлению в нем ряда повреждений, репарация которых абсолютно необходима для успешной репликации вируса. Ранее мы показали, что клеточные протеинкиназы ATM и DNA-PK, которые в норме обеспечивают репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, важны для инициации процесса постинтеграционной репарации ВИЧ-1, несмотря на то что в результате интеграции не образуются двуцепочечные разрывы ДНК. В данной работе мы проанализировали изменение статуса фосфорилирования киназ ATM (pSer1981), DNA-PK (pSer2056) и родственной им киназы ATR (pSer428), а также их мишеней: Chk1 (pSer345), Chk2 (pThr68), H2AX (pSer139) и p53 (pSer15), в процессе постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Мы показали, что ATM и DNA-PK, но не ATR, автофосфорилируются в ходе постинтеграционной репарации, а также фосфорилируют белки-мишени Chk2 и H2AX, что указывает на общность механизмов сигналинга при репарации двуцепочечных разрывов ДНК и постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВИЧ-1, DNA-PK, ATM, протеинкиназы, репарация ДНК, постинтеграционная репарация.

DOI: 10.31857/S0320972524060113 EDN: XLBUOU

ВВЕДЕНИЕ

Жизненный цикл вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) – сложный многостадийный процесс, направленный на встраивание вирусного генетического материала в геном клетки и продукцию новых вирионов. На первых этапах после проникновения вируса в клетку его РНК-геном переводится в форму двуцепочечной ДНК (кДНК) под действием вирусного фермента – обратной транскриптазы. Эта кДНК в комплексе с другим важным вирусным ферментом – интегразой – транспортируется в ядро, где интеграз

катализирует встраивание кДНК в геном клетки. Этот процесс, называемый интеграцией, приводит к появлению повреждений клеточной ДНК в местах встраивания вирусной кДНК: пятинуклеотидных одноцепочечных участков, расположенных по краям от встроенной кДНК, а также неспаренных динуклеотидов CA на 5'-концах кДНК [1–3].

Эти повреждения должны быть исправлены для того, чтобы завершить интеграцию, восстановить целостность генома и обеспечить репликацию вируса [4]. Процесс исправления повреждений и восстановления целостности генома получил название постинтеграционной репара-

Принятые сокращения: кДНК – ДНК копия генома ВИЧ-1; ПИР – постинтеграционная репарация; ATM – мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок; ATR – атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок; Chk1 и Chk2 – киназы 1 и 2 контрольной точки; DNA-PK – ДНК-зависимая протеинкиназа, DNA-PKcs – каталитическая субъединица DNA-PK; HR – гомологичная рекомбинация; NHEJ – процесс негомологичного соединения концов.

* Адресат для корреспонденции.

ции (ПИР). Известно, что основную роль в ПИР играют клеточные белки [4–6], однако точный механизм этого процесса не удалось установить до сих пор, как и не удалось прийти к консенсусу в вопросе, какие именно клеточные белки обеспечивают восстановление целостности поврежденной ДНК.

В начале 2000-х годов стали появляться указания на возможное участие протеинкиназ из семейства PIKK – ключевых регуляторов репарации двуцепочечных разрывов в ДНК – в репликации ВИЧ-1. К таким участникам относятся ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK), сформированная белками Ku70, Ku80 и каталитической субъединицей DNA-PK (DNA-PKcs), и мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) [7–10]. Однако вопрос о том, в каком именно этапе жизненного цикла вируса эти белки принимают участие, оставался открытым. В частности, вызвала сомнения возможность участия этих белков в процессе ПИР, поскольку в результате интеграции возникают одноцепочечные бреши в ДНК, но не образование двуцепочечных разрывов. Тем не менее нам удалось показать, что клеточные белки Ku70, Ku80, DNA-PKcs и ATM участвуют в процессе ПИР, причем к местам повреждений ДНК, вызванных интеграцией, эти белки привлекаются за счет образования комплекса между интегразой ВИЧ-1 и белком Ku70, входящим в состав DNA-PK [11, 12]. Ингибиторы фосфорилирующей активности как DNA-PK, так и ATM подавляли вирусную репликацию, действуя именно на этапе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [11, 12]. Это позволило сделать вывод, что обе протеинкиназы, DNA-PK и ATM, активируются в результате взаимодействия с интегразой и запускают тем самым процессы репарации ДНК и регуляции клеточного цикла. Однако до сих пор не известно, какие именно мишени этих киназ фосфорилируются в ходе ПИР и насколько этот процесс в целом напоминает репарацию двуцепочечных разрывов ДНК.

В настоящем исследовании мы оценили, фосфорилируются ли стандартные мишени клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК, инициируемого протеинкиназами ATM и DNA-PK, в ходе ПИР ВИЧ-1. Параллельно было проанализировано, происходит ли фосфорилирование третьей протеинкиназы из семейства PIKK – ATR (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок; ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein) и ее основной мишени, Chk1. Эта киназа инициирует репарацию одноцепочечных разрывов в ДНК, например, при остановке репликативной вилки, но не участвует в процессе ПИР. Таким образом, мы оценили накопление фосфорилированных форм самих протеинкиназ: pSer2056-DNA-PKcs,

pSer1981-ATM и pSer428-ATR, а также их наиболее распространенных мишеней: pSer345-Chk1, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX и pSer15-p53, в ответ на трансдукцию клеток лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1. Установлено, что протеинкиназа ATR, как и ее мишень, киназа 1 контрольной точки (Chk1), практически не модифицируются в ходе ПИР, в то время как ATM и DNA-PKcs подвергаются автофосфорилированию. Фосфорилируются также по указанным выше сайтам все протестированные мишени ATM и DNA-PK: Chk2, H2AX и p53. Важно, что фосфорилирование ATM, DNA-PKcs, киназы 2 контрольной точки (Chk2) и гистона H2AX происходит только в случае успешной интеграции и последующего образования комплекса интегразы с Ku70, а фосфорилирование p53 не связано с интеграцией и происходит в ответ на накопление линейной формы кДНК ВИЧ-1. Нам также удалось впервые показать, что фосфорилированный гистон H2AX образует в ядрах трансдуцированных клеток локусы, типичные для процесса репарации двуцепочечных разрывов в ДНК, причем их количество и средняя интенсивность флуоресценции локусов напрямую отражают эффективность протекания ПИР и могут использоваться в качестве маркера эффективности этого процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток и наработка VSV-G псевдотипированных репликативно-некомпетентных векторов на основе генома ВИЧ-1. Клетки HEK293T культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Для наработки VSV-G псевдотипированных репликативно-некомпетентных лентивирусных векторов на основе генома ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы (HIV_wt) клетки HEK293T котрансфицировали кальций-фосфатным методом плазмидами pCMV-VSV-G («Addgene», США; #8454), pCMVΔR8.2 («Addgene»; #12263) и LeGo-G/BSD («Addgene»; #27354) в соотношении 1/2/3 по массе. Для сборки векторов с мутантными формами интегразы HIV_mut, HIV_E152A, HIV_F185A плазмида pCMVΔR8.2 была заменена на аналогичную плазмиду с указанной мутацией, полученную в нашей лаборатории. Через 6 ч после трансфекции среду заменяли на новую. Лентивирусные векторы собирали через 48 и 72 ч после трансфекции. Векторы концентрировали ультрацентрифугированием с использованием углового ротора Type 45 Ti («Beckman», США) в течение 2 ч при 30 000 g и температуре 4 °C.

Определение титра лентивирусных векторов. Для определения титра вектора HIV_wt

в лунки 24-луночного планшета («Corning», США) переносили по 100 000 клеток НЕК293Т. Через 24 ч готовили серию 10-кратных разведений исходного образца вектора, и 5 мкл исходного вектора или его разведений использовали для трансдукции клеток НЕК293Т. Через 48 ч с момента трансдукции оценивали процентное содержание GFP-положительных клеток, содержащих зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein), в популяции с помощью метода проточной цитометрии на приборе CytoFlex («Beckman»), и на основании этих данных рассчитывали концентрацию трансдуцирующих единиц в образцах. Поскольку векторы HIV_mut, HIV_E152A и HIV_F185A в своем составе содержат мутантные формы интегразы и у них нарушен один из этапов раннего цикла ВИЧ-1, титр псевдовиральных частиц в этом случае оценить с использованием проточной цитометрии было невозможно. В этом случае титр определяли с помощью ИФА-теста к р24-антигену ВИЧ-1 («Вектор-Бест», Россия).

Вестер-блот-анализ. 1 млн клеток НЕК293Т трансдуцировали лентивирусным вектором HIV_wt при множественности инфекции (MOI), равной 10, или эквивалентным количеством лентивирусных векторов HIV_mut, HIV_E152A или HIV_F185A. Через 2 ч среду с несвязавшимся вектором отбирали, клетки промывали 2 раза 1× ФСБ (фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4), после чего помещали в среду для культивирования. Через 10 ч после трансдукции клетки лизировали при 4 °C RIPA-буфером («Servicebio», Китай) с добавлением ингибиторов фосфатаз Phosphatase inhibitor cocktail 2 и 3 («Sigma», США), а также ингибиторов протеаз Halt protease inhibitor cocktail («Pierce», США). Перед анализом остатки клеток удаляли центрифугированием при 14 000 g в течение 10 мин при 4 °C. Для каждой экспериментальной точки определяли содержание белка в образцах с помощью набора DC protein assay kit («Bio-Rad», США), на гель наносили одинаковое количество белка. Анализируемые образцы клеточных лизатов разделяли в градиентном (4–15%) геле Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels («Bio-Rad»), переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad») методом полусухого переноса на приборе Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad»). Исследуемые белки визуализировали первичными мышиными антителами на фосфорилированные формы p53 (pSer15), первичными кроличьими антителами на DNA-PK (pSer2056), ATM (pSer1981), ATR (pSer428), Chk1 (pThr68), Chk2 (pSer345), γH2AX (pSer139) («Cell Signaling Technology», США). В качестве вторичных антител использовали HRP-конъюгированные антитела против кроличьих или мышиных антител («Cell Signaling Technology»). Визуализацию целевых белковых полос проводили с помощью

субстрата пероксидазы хрена Clarity Western ECL substrate («Bio-Rad») в системе детекции люминесценции ChemiDoc MP system («Bio-Rad»).

Для оценки влияния активности DNA-PK и ATM на накопление фосфорилированных форм p53 (pSer15) и H2AX (pSer139) при трансдукции клеток лентивирусным вектором использовали ингибиторы DNA-PK – Nu7441 («Sigma») и ATM – Ku-55933 («Sigma») в концентрациях, при которых наблюдается 50%-ное подавление ПИР [12]. Ингибиторы были растворены в диметилсульфоксиде. В работе с ингибиторами во всех экспериментальных точках поддерживали уровень диметилсульфоксида в среде на уровне 0,5%.

Оценка образования локусов γH2AX. Клетки НЕК293Т рассеивали на предварительно обработанные фибронектином покровные стекла, через 24 ч клетки трансдуцировали лентивирусными векторами HIV_wt, HIV_mut, HIV_E152A, HIV_F185A при MOI = 15. Через 12 ч после трансдукции клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом (ПФА) на 1× ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре. Параллельно с указанными образцами был подготовлен препарат нетрансдуцированных клеток для оценки эндогенного уровня локусов (отрицательный контроль), а также клетки, обработанные в течение 1 ч перед фиксацией 50 мкМ этопозидом (положительный контроль). Окрашивание препаратов проводили по протоколу набора реагентов HCS DNA Damage Kit («Invitrogen», США). На последнем этапе образцы заключали в среду (Mowiol, DAPI 1 мкг/мл, DABCO 1 мг/мл, «Sigma»). Детектировали флуоресценцию Alexa Fluor 555 и DAPI на микроскопе Eclipse-Ti2 («Nikon», Япония) с объективом 60×/1.4 и sCMOS-камерой Neo («Andor», Ирландия) (эффективный размер пикселя – 110 нм). Подсчет количества локусов и интенсивностей локусов проводили в программе ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

DNA-PKcs, ATM и их мишени Chk2, H2AX и p53 фосфорилируются в ответ на трансдукцию клеток векторами на основе генома ВИЧ-1. Ранее при изучении вопроса возможного участия представителей семейства PIKK-киназ в ранних этапах репликации ВИЧ-1, а именно в регуляции ПИР, мы показали, что протекание ПИР зависит от фосфорилирующей активности ATM и DNA-PK, но не ATR [12]. Поскольку эти две киназы обычно активируются при появлении двуцепочечных разрывов ДНК [13], а в продукте интеграции кДНК ВИЧ-1 такие разрывы отсутствуют, можно было предположить, что дальнейший спектр клеточных реакций может отличаться от реакций,

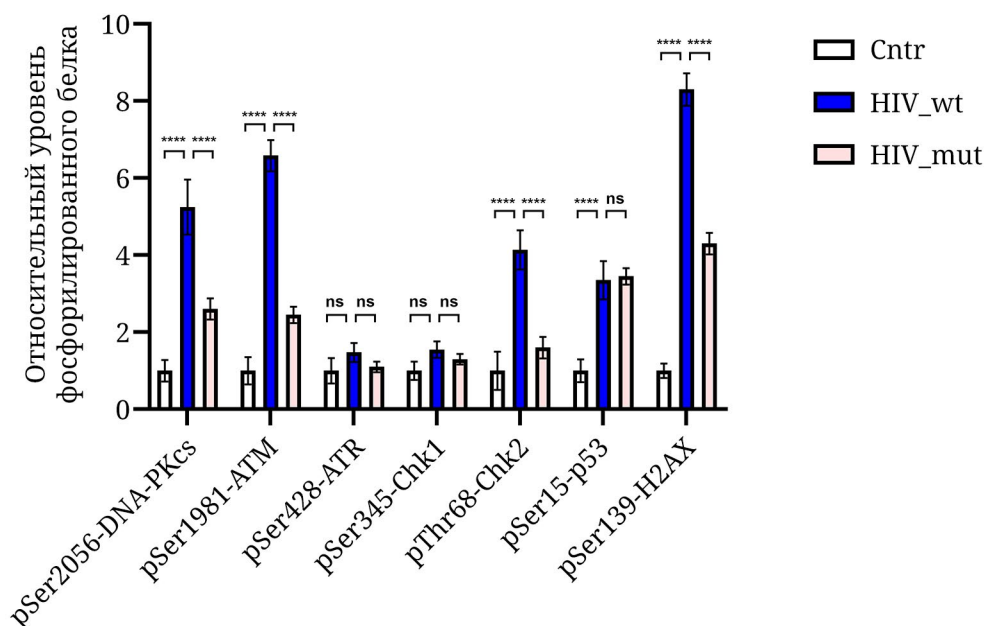


Рис. 1. Анализ уровня фосфорилирования белков DNA-PKcs, ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53 и H2AX в клетках, трансдуцированных HIV_wt, HIV_mut или нетрансдуцированном контроле (Cntr), через 12 ч после добавления лентивирусных векторов. На графике представлены уровни фосфорилированной формы белка в клетках, трансдуцированных HIV_wt или HIV_mut, относительно нетрансдуцированного образца (среднее $\pm$ SD по трем независимым повторам). Статистическая значимость изменений в уровне фосфорилированного белка оценивалась с помощью двухфакторной ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки; ns – статистические отличия отсутствуют, **** p -value < 0,0001

характерных для репарации двуцепочечных разрывов. В связи с этим необходимо было проверить, фосфорилируются ли хорошо известные мишени ATM и DNA-PK при обработке клеток лентивирусными векторами на основе генома ВИЧ-1.

В качестве таких мишеней далее мы рассматривали сами ферменты DNA-PKcs и ATM, т.к. они автофосфорилируются в ходе активации, а также их нижестоящие мишени Chk2, p53 и репаративный гистон H2AX. Помимо них, мы дополнительно решили проанализировать статус фосфорилирования ATR (автофосфорилируется при активации) и его мишени Chk1 в качестве негативного контроля, поскольку киназа ATR не участвует в репликации ВИЧ-1, и, следовательно, она не должна активироваться в ходе ПИР. Клетки НЕК293Т трансдуцировали VSV-G псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы (HIV_wt), и через 12 ч в белковых лизатах оценивали статус фосфорилирования Ser2056 в составе DNA-PKcs, Ser1981 – в составе ATM, Thr68 – в Chk2, Ser139 – в H2AX и Ser15 – в p53, а также Ser428 – в ATR и Ser345 – в Chk1. В качестве контрольного образца использовались нетрансдуцированные клетки (рис. 1). Анализ фосфорилированных форм проводили через 12 ч после трансдукции, поскольку максимальная эффективность ПИР наблюдается в интервале 10–18 ч после трансдукции [12].

В образцах, обработанных вектором HIV_wt, детектировались фосфорилированные формы белков pSer2056-DNA-PKcs, pSer1981-ATM, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX (γ H2AX), а также pSer15-p53, причем их количества существенно превышали фоновые значения в контрольных образцах (рис. 1). В этих условиях, как и ожидалось, ни ATR, ни его мишень Chk1 практически не фосфорилировались.

Изменение статуса фосфорилирования указанных белков может быть вызвано как протеканием ПИР, в ходе которого активируются DNA-PK и ATM, так и другими факторами, не связанными с ПИР. Для того чтобы понять, действительно ли модификации белков вызваны ПИР, мы дополнительно оценили поведение этих мишеней при обработке клеток лентивирусным вектором HIV_mut, кодирующим интегразу, с аминокислотными заменами E212A/L213A, препятствующими ее взаимодействию с Ku70 [14]. Такие мутации в составе интегразы нарушают эффективное протекание ПИР у ВИЧ-1 [11]. В этом случае практически все мишени, за исключением p53, фосфорилировались слабее (рис. 1).

Накопление γ H2AX и pSer15-p53 происходит по двум независимым путям. Для выяснения причин различий фосфорилирования H2AX и p53 при трансдукции клеток векторами на основе ВИЧ-1 нами дополнительно был получен вектор HIV_E152A, содержащий в своем составе каталитически неактивную форму интегразы

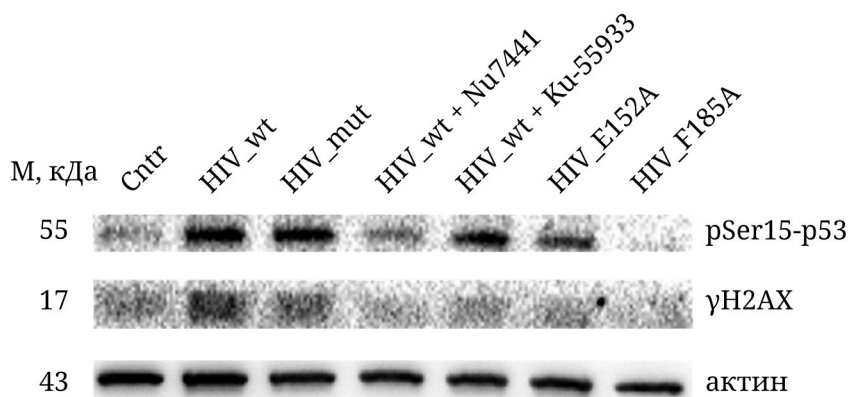


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ фосфорилированных форм p53 (pSer15) и H2AX (pSer139). Cntr – нетрансдуцированные вектором клетки; HIV_wt, HIV_mut, HIV_E152A, HIV_F185A – клетки, трансдуцированные векторами на основе ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы или соответствующей мутантной формой; образцы HIV_wt + Nu7441 и HIV_wt + Ku-55933 после трансдукции клеток вектором HIV_wt дополнительно обрабатывали ингибитором DNA-PKcs – Nu7441 (2 мкМ), или ингибитором ATM – Ku-55933 (5 мкМ)

(замена E152A) и не способный интегрировать вирусную кДНК [15], а также вектор HIV_F185A, содержащий интегразу с заменой F185A. Эта аминокислотная замена в составе интегразы препятствует ее связыванию с обратной транскриптазой ВИЧ-1, что нарушает корректное протекание обратной транскрипции [16]. В результате при трансдукции клеток вектором HIV_E152A в них накапливается линейная двуцепочечная кДНК, но она не может встроиться в геном клетки-хозяина, а в случае вектора HIV_F185A не происходит даже обратная транскрипция и в клетках присутствует лишь РНК-геном вируса.

Клетки HEK293T трансдуцировали векторами HIV_wt, HIV_mut, HIV_E152A или HIV_F185A, и через 12 ч в лизатах оценивали количество γH2AX и pSer15-p53 методом Вестерн-блоттинга (рис. 2). Гистон H2AX эффективно фосфорилировался только в случае HIV_wt, а фосфорилирование p53 происходило во всех случаях, когда в клетке синтезировалась кДНК, т.е. при трансдукции клеток векторами HIV_wt, HIV_mut и HIV_E152A. Следовательно, фосфорилирование p53 не зависело ни от образования комплекса интегразы с Ku70, ни от способности интегразы встраивать вирусную кДНК в геном клетки, однако оно не наблюдалось при трансдукции клеток вектором HIV_F185, не способным к обратной транскрипции. На основании этих данных можно предположить, что сигналом для фосфорилирования Ser15 в составе p53 является сам факт появления линейной двуцепочечной ДНК в трансдуцированных клетках.

Мы также оценили кинетику накопления γH2AX и pSer15-p53 при трансдукции клеток векторами HIV_wt, HIV_mut и HIV_E152A в интервале времени 10–18,5 ч после трансдукции, когда наблюдается максимальная эффективность ПИР [12]. В случае псевдовируса HIV_wt высокий уровень

фосфорилирования H2AX наблюдался уже через 10 ч после трансдукции и сохранялся на протяжении всего этапа ПИР вплоть до 18,5 ч (рис. 3). При трансдукции клеток вектором HIV_mut также накапливается γH2AX, но профиль его накопления существенно отличался: через 10 ч уровень γH2AX незначительно превышал фоновые значения, после чего постепенно нарастал, достигая максимума к 18,5 ч. Аналогичный профиль накопления γH2AX был зафиксирован для вектора HIV_E152 (рис. 3). Очевидно, фосфорилирование H2AX в случае HIV_mut и HIV_E152A обусловлено накоплением в ядрах трансдуцированных клеток линейной кДНК вектора, а не повреждениями ДНК, возникающими в ходе интеграции, как в случае HIV_wt. Профили накопления pSer15-p53 идентичны для всех трех типов векторов: через 10 ч после трансдукции фосфорилированная форма белка незначительно превосходит контрольные уровни, постепенно возрастает, достигая максимального уровня через 18,5 ч (рис. 3).

Вышеописанные результаты демонстрируют, что фосфорилирование p53 по Ser15 происходит не на этапе ПИР, однако остается открытым вопрос, участвуют ли в этой модификации киназы ATM и DNA-PK. Для ответа на него мы оценили накопление фосфорилированной формы p53 при трансдукции клеток HEK293T вектором HIV_wt в присутствии ингибитора DNA-PKcs (Nu7441) или ингибитора ATM (Ku-55933). Оба ингибитора одинаково эффективно подавляли накопление γH2AX (рис. 2). Фосфорилирование p53 эффективно подавлялось ингибитором DNA-PKcs, а ингибитор ATM значительно в меньшей степени влиял на этот процесс (рис. 2).

Таким образом, в ответ на интеграцию вирусной кДНК и ПИР специфично фосфорилируются только H2AX. Фосфорилирование p53 происходит

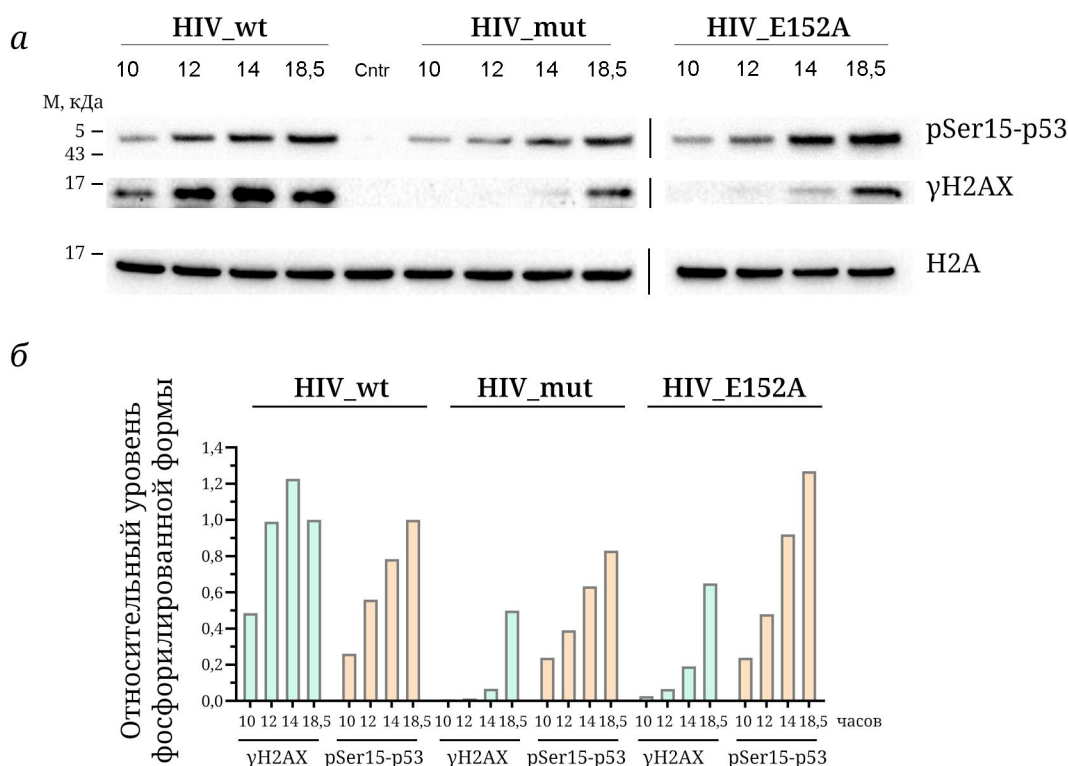


Рис. 3. Кинетика накопления γ H2AX и pSer15-p53 в клетках HEK293T, трансдуцированных векторами HIV_wt, HIV_mut или HIV_E152A через 10, 12, 14 и 18,5 ч после трансдукции. *а* – Вестерн-блот-анализ; *б* – количественный анализ результатов вестерн-блоттинга. За 1 принят уровень γ H2AX и pSer15-p53 в клетках, трансдуцированных HIV_wt через 18,5 ч после добавления вектора. Образец, обозначенный как Cntr, не трансдуцирован вектором

в ответ на накопление в трансдуцированных клетках линейной кДНК ВИЧ-1, хотя и зависит от активности DNA-PKcs.

Накопление локусов γ H2AX в ядрах трансдуцированных клеток может служить маркером успешности протекания ПИР. Обработка клеток ионизирующим излучением или агентами, вызывающими появление в клеточной ДНК двуцепочечных разрывов, приводит к появлению в ядрах клеток локусов γ H2AX. Этот процесс преимущественно контролируется протеинкиназами ATM и DNA-PK [17]. Каждый локус содержит по крайней мере несколько сотен молекул γ H2AX, и число локусов коррелирует с числом двуцепочечных разрывов по крайней мере на ранних стадиях репарации [18]. В нашем случае в ответ на ретровирусную интеграцию мы обнаружили увеличение уровня фосфорилирования гистона H2AX по Ser139, поэтому мы решили проверить, формируются ли локусы γ H2AX в ядрах трансдуцированных клеток и зависит ли их формирование от способности интегразы взаимодействовать с Ku70.

Для этого клетки HEK293T трансдуцировали вектором HIV_wt при MOI = 10 или аналогичным по р24 количеством векторов HIV_mut, HIV_E152A и HIV_F185, и через 12 ч после трансдукции ана-

лизировали содержание локусов γ H2AX методом иммуноцитохимии с использованием антител к pSer139-H2AX и последующей визуализацией с помощью конфокальной микроскопии. Лишь в небольшой доле клеток без обработки лентивирусными векторами детектировались единичные локусы γ H2AX (рис. 4, *а*). Для подтверждения работоспособности наших антител, использованных в работе, мы проанализировали накопление γ H2AX в ядрах клеток, обработанных в течение 1 ч перед фиксацией этопозидом (50 мкМ) – известным ингибитором топоизомеразы II, который индуцирует накопление двуцепочечных разрывов в ДНК. В этих условиях практически все ядро клеток давало окрашивание антителами на γ H2AX (рис. 4, *б*), что говорит о множественных повреждениях ДНК при такой концентрации этопозиды.

При трансдукции клеток вектором HIV_wt через 12 ч после добавления псевдовirusа в ядрах клеток мы зафиксировали образование четко различимых локусов гистона γ H2AX разной интенсивности (рис. 4, *в*). В случае обработки клеток векторами HIV_E152A и HIV_F185A уровень γ H2AX практически не отличался от контрольных клеток (рис. 4, *д* и *е*). При трансдукции клеток вектором HIV_mut, не способным эффективно инициировать ПИР, мы также наблюдали формирование

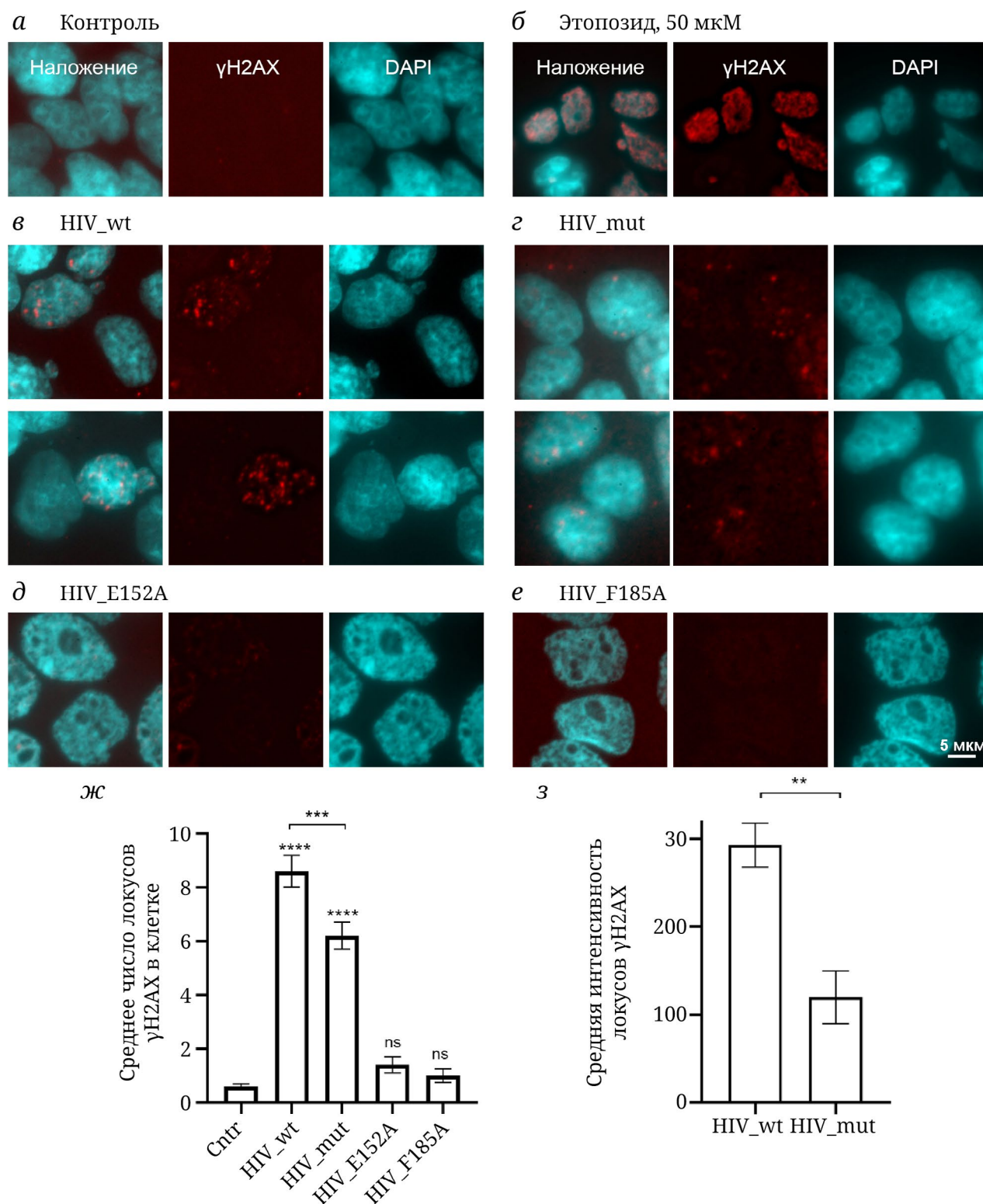


Рис. 4. Накопление локусов γ H2AX в клетках HEK293T, трансдуцированных векторами на основе генома ВИЧ-1. *а–е* – Конфокальные изображения локусов γ H2AX в клетках HEK293T без обработки (*а*), обработанных 50 мкМ этопозидом в течение 1 ч перед фиксацией (*б*), трансдуцированных векторами HIV_wt (*в*), HIV_mut (*г*), HIV_E152A (*д*), HIV_F185A (*е*) при множественности инфекции (MOI), равной 10. Фиксация клеток проводилась через 12 ч после трансдукции. *ж* – Среднее число локусов γ H2AX, приходящихся на одну клетку (проанализировано суммарно 5000 клеток в трех технических повторах для каждого типа воздействия); статистическая значимость отличий оценена с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения; ns – отличия отсутствуют, *** p -значение < 0,001, **** p -значение < 0,0001; *з* – средняя интенсивность флуоресценции локусов γ H2AX; статистическая значимость отличий оценена с помощью t -теста, ** p -значение < 0,01

локусов γ H2AX (рис. 4, *з*), однако их среднее число на клетку и средняя интенсивность флуоресценции локусов была ниже, чем в случае HIV_wt в 1,4 и 2 раза соответственно (рис. 4, *ж* и *з*).

Таким образом, данные, полученные с помощью конфокальной микроскопии и вестерн-блоттинга о разнице в накоплении γ H2AX в клетках, трансдуцированных псевдовirusами с интегразой дикого типа и интегразой, не способной связываться с Ku70, позволяют сделать вывод, что γ H2AX может быть использован в качестве маркера эффективности протекания ретровирусной ПИР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Протеинкиназы из семейства PIKK (PI3K-related kinases), ATM, DNA-PK и ATR, являются ключевыми регуляторами клеточного ответа на повреждения ДНК. ATM и DNA-PK активируются в ответ на двуцепочечные повреждения ДНК, а ATR – на протяженные одонитевые участки ДНК, связанные с RPA-белком (replication protein A). Распознавание этих повреждений и активация соответствующих киназ происходит при участии сенсоров указанных повреждений ДНК. Двуцепочечные разрывы ДНК распознаются гетеродимером Ku70–Ku80 или MRN-комплексом, что приводит к привлечению к местам повреждений DNA-PKcs или ATM соответственно. ATR к протяженным одонитевым участкам ДНК привлекается за счет кофактора – ATRIP [19]. Будучи активированными, эти белки фосфорилируют широкий спектр белков-мишеней, создавая оптимальные условия для репарации повреждений ДНК [19–22]. Две из этих киназ, ATM и DNA-PK, наряду с сигнальной функцией способны напрямую запускать процессы репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Так, комплекс DNA-PK инициирует процесс негомологичного соединения концов (NHEJ, non-homologous end joining), а ATM – гомологичную рекомбинацию (HR, homologous recombination) [13]. Несмотря на такую строгую специализацию каждой из киназ, современные данные говорят в пользу того, что все три киназы могут взаимно влиять, дополняя или модулируя активности друг друга в зависимости от контекста, в котором находится повреждение ДНК [13, 17, 23–28].

При возникновении в клетке двуцепочечных разрывов ДНК и привлечении к ним DNA-PK-комплекса происходит автофосфорилирование каталитической субъединицы DNA-PKcs по аминокислотным остаткам, расположенным в кластерах PQR и ABCDE [29]. Наиболее изученной модификацией DNA-PKcs является фосфорилирование остатка S2056, расположенного в PQR-кластере. Данная

модификация используется в качестве маркера активации DNA-PK [30], но, помимо этого, регулирует ее конформацию и активность [31, 32]. Если к сайту повреждения ДНК привлекается ATM-киназа, она, аналогично DNA-PK, подвергается автофосфорилированию по S1981, что приводит к ее димеризации и переходу в активную форму [33, 34]. Будучи активированными, DNA-PKcs и ATM способны регулировать активности друг друга путем модификации дополнительных сайтов [13, 28], а также фосфорилируют напрямую или посредством активации посредников ряд важных мишеней. Среди них особое внимание привлекают белки Chk2, p53 и репаративный гистон H2AX, накопление фосфорилированных форм которых (pThr68-Chk2, pSer15-p53 и pSer139-H2AX) происходит в ответ на генотоксический стресс [17, 35–38]. Если фосфорилирование Chk2 и p53 необходимо для остановки клеточного цикла и создания благоприятных условий для репарации ДНК через регуляцию экспрессии p53-зависимых генов [39], фосфорилирование гистона H2AX в местах повреждений ДНК регулирует репарацию ДНК напрямую, поскольку фосфорилированная форма гистона служит своеобразной платформой для привлечения к местам повреждений ДНК факторов репарации и удержания их в этом месте вплоть до момента удаления повреждения [40].

Аналогично ATM и DNA-PK, ATR автофосфорилируется по S428 в ходе ее активации в ответ на протяженные одонитевые фрагменты ДНК [41]. Активированная форма ATR фосфорилирует Chk1. При окислительном стрессе ATR также способна стимулировать фосфорилирование гистона H2AX и p53, но путем активации ATM [42].

Интеграция генома ВИЧ-1 в клеточную ДНК приводит к появлению повреждений ДНК. К таким повреждениям можно отнести пятинуклеотидные одонитевые участки по краям от места встраивания вирусной кДНК и неспаренные динуклеотиды 5'-AC-3' на 5'-концах вирусной ДНК. Успешная репликация вируса напрямую зависит от репарации указанных повреждений ДНК [11]. Ранее мы показали, что ПИР зависит от способности интегразы ВИЧ-1 взаимодействовать с клеточным белком Ku70 – компонентом DNA-PK-комплекса, а также от активности двух киназ из PIKK-семейства – ATM и DNA-PK, но не ATR [11, 12]. Поскольку двуцепочечные разрывы ДНК отсутствуют в продукте интеграции ВИЧ-1, а активация ATM и DNA-PK зависит от образования комплекса интегразы с Ku70, мы задались вопросом, характерны ли для ПИР события фосфорилирования самих киназ и их мишеней, описанные ранее для репарации двуцепочечных разрывов в ДНК.

В данном исследовании мы проанализировали образование автофосфорилированных форм

киназ pSer1981-ATM и pSer2056-DNA-PKcs, а также их мишеней pSer15-p53, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX в ответ на трансдукцию клеток HEK293T лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1. Дополнительно мы проанализировали, накапливается ли при трансдукции клеток фосфорилированная форма ATR (pSer428) и ее мишени Chk1 (pSer345). Мы обнаружили, что в ответ на ретровирусную трансдукцию в клетках накапливаются фосфорилированные формы ATM, DNA-PK, p53, Chk2 и H2AX, но не ATR и Chk1, что еще раз подтверждает отсутствие участия ATR в репликации ВИЧ-1 [12].

С помощью лентивирусного вектора HIV_mut, не способного инициировать процесс ПИР, было установлено, что автофосфорилирование киназ ATM и DNA-PK, а также фосфорилирование их мишеней Chk2 и H2AX зависит от образования комплекса интегразы-Ku70. В то же время фосфорилирование p53 по Ser15 не зависело от образования этого комплекса, поскольку его эффективность была одинаковой при трансдукции клеток векторами HIV_wt и HIV_mut. Анализ кинетики накопления pSer15-p53 при трансдукции клеток HIV_wt, HIV_mut и HIV_E152A, в котором подавлена интеграция, показал, что количество модифицированного p53 постепенно возрастает в интервале 10–18,5 ч, достигая максимума к 18,5 ч. Мы полагаем, что в нашей системе модификация p53 происходит не в результате ПИР, а просто за счет накопления в трансдуцированных клетках линейной неинтегрированной кДНК ВИЧ-1. Это предположение подтверждается отсутствием фосфорилирования p53 при использовании вектора HIV_F185, в котором не происходит обратной транскрипции.

В аналогичных условиях образование γH2AX эффективно происходило только в случае вектора, способного инициировать ПИР (HIV_wt), причем высокий уровень γH2AX наблюдался на протяжении всего периода ПИР (10–18,5 ч). При трансдукции клеток HIV_mut и HIV_E152A γH2AX также детектировался, но кинетика его накопления существенно отличалась от образцов, трансдуцированных HIV_wt. Возможно, накопление γH2AX в случае векторов, не способных к ПИР или интеграции, вызвано появлением в клетках линейной двуцепочечной кДНК аналогично тому, как это происходит при модификации p53. Нам также удалось показать, что γH2AX в трансдуцированных HIV_wt клетках распределен в ядре не диффузно, а формирует локусы, характерные для репарации двуцепочечных разрывов ДНК [18]. Отличия в кинетике накопления γH2AX при трансдукции клеток разными векторами на основе ВИЧ-1 позволили нам предположить, что образование γH2AX (их число и средняя интенсивность

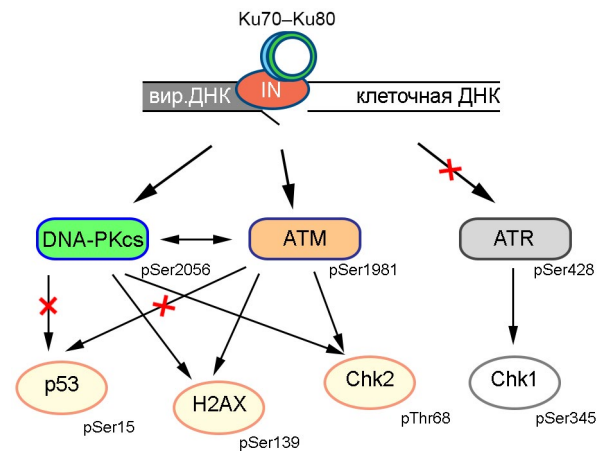


Рис. 5. Фосфорилирование белков из систем клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК при постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Интегразы ВИЧ-1, расположенная в местах встраивания генома ВИЧ-1 и, соответственно, маркирующая повреждение ДНК, привлекает гетеродимерный комплекс Ku70–Ku80. Данный комплекс является строго необходимым для привлечения DNA-PK и ATM и последующей активации этих киназ в местах поврежденных ДНК, вызванных интеграцией ВИЧ-1. DNA-PK и ATM автофосфорилируются по pSer2056 и pSer1981. Активированные в ходе ПИР киназы фосфорилируют мишени H2AX и Chk2, но не p53. ATR в ПИР не участвует и не активируется

локусов) может служить индикатором успешности протекания ПИР ВИЧ-1.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что, хотя интеграция кДНК ВИЧ-1 не приводит к появлению двуцепочечных разрывов в клеточной ДНК, процесс репарации вызванных интеграцией повреждений генома клетки по крайней мере на начальной стадии очень похож на процессы репарации двуцепочечных разрывов ДНК. В ПИР участвуют те же PIKK-киназы, ATM и DNA-PK, что участвуют в процессах NHEJ и HR, они инициируют процесс ПИР путем автофосфорилирования и фосфорилирования своих мишеней – белков Chk2 и H2AX, как и в случае NHEJ и HR (рис. 5). Однако у этих процессов есть и серьезные отличия. Если к двуцепочечным разрывам в ДНК DNA-PKcs или ATM привлекаются за счет связывания, соответственно, гетеродимера Ku70–Ku80 или MRN-комплекса с ДНК, то в случае ПИР обе эти протеинкиназы привлекаются к местам повреждения ДНК в результате связывания белка Ku70 с вирусной интегразой (рис. 5). Кроме того, в ходе репарации двуцепочечных разрывов происходит фосфорилирование p53. На этапе же ПИР фосфорилирование p53 не происходит. Мы зафиксировали фосфорилированную форму p53 в ответ на накопление в трансдуцированных лентивирусными векторами клетках линейной кДНК ВИЧ-1, причем в образовании этой фосфорилированной формы p53 участвует не ATM, а DNA-PK.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 – важный этап в жизненном цикле вируса, без которого невозможна эффективная продукция новых вирусных частиц. Ранее нам удалось показать, что процесс ПИР запускается протеинкиназами из PIKK-семейства – ATM и DNA-PK, которые обычно участвуют в клетке в репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Однако в ходе интеграции двуцепочечные разрывы не возникают, и к местам повреждений ДНК эти киназы привлекаются комплексом вирусной интегразы и клеточного белка Ku70 – компонентом DNA-PK.

В данном исследовании мы изучили, как меняется статус автофосфорилирования киназ из семейства PIKK (ATM, DNA-PK и ATR), а также их мишеней (Chk1, Chk2, H2AX и p53) в ходе ПИР ВИЧ-1. Было обнаружено, что ни протеинкиназа ATR, ни ее мишень Chk1 практически не модифицируются, в то время как ATM и DNA-PKs подвергаются автофосфорилированию. Мишени двух последних киназ, а именно: Chk2, H2AX и p53, также фосфорилировались при трансдукции клеток лентивирусными векторами на основе генома ВИЧ-1. Однако если ATM, DNA-PK, Chk2 и H2AX подвергались модификации только в случае успешной интеграции и последующего образования комплекса интегразы ВИЧ-1 с Ku70, p53 модифицировался в ответ на накопление в трансдуцированных клетках кДНК и не зависел от способности интегразы

взаимодействовать с Ku70. Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что, хотя интеграция кДНК ВИЧ-1 не приводит к появлению двуцепочечных разрывов в клеточной ДНК, процесс репарации вызванных интеграцией повреждений генома клетки по крайней мере на начальной стадии похож на процессы репарации двуцепочечных разрывов ДНК, хотя и отличается в контексте фосфорилирования p53.

Вклад авторов. А.Н. Анисенко, М.Б. Готтих – концепция и руководство работой; А.Н. Анисенко, А.А. Нефедова, И.И. Киреев – проведение экспериментов; А.Н. Анисенко, А.А. Нефедова, И.И. Киреев, М.Б. Готтих – обсуждение результатов исследования; А.Н. Анисенко, М.Б. Готтих – написание текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10021).

Благодарности. Авторы благодарят Программу развития МГУ (ПНР 5.13) и ЦКП «Субдифракционная микроскопия и спектроскопия» НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского за предоставление доступа к оборудованию.

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. Lesbats, P., Engelman, A. N., and Cherepanov, P. (2016) Retroviral DNA Integration, *Chem. Rev.*, **116**, 12730-12757, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00125>.
2. Vincent, K. A., York-Higgins, D., Quiroga, M., and Brown, P. O. (1990) Host sequences flanking the HIV provirus, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6045-6047, <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6045>.
3. Vink, C., Groenink, M., Elgersma, Y., Fouchier, R. A., Tersmette, M., and Plasterk, R. H. (1990) Analysis of the junctions between human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA and human DNA, *J. Virol.*, **64**, 5626-5627, <https://doi.org/10.1128/jvi.64.11.5626-5627.1990>.
4. Княжанская Е. С., Шадрина О. А., Анисенко А. Н., Готтих М. Б. (2016) Роль ДНК-зависимой протеинкиназы в репликации ВИЧ-1, *Мол. Биол.*, **50**, 639-654.
5. Анисенко А. Н., Готтих М. Б. (2019) Участие клеточных систем репарации ДНК в репликации ВИЧ-1, *Мол. Биол.*, **53**, 355-366.
6. Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2005) Retroviral DNA integration and the DNA damage response, *Cell Death Differ.*, **12**, 971-978, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401573>.
7. Daniel, R., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1999) A role for DNA-PK in retroviral DNA integration, *Science*, **284**, 644-647, <https://doi.org/10.1126/science.284.5414.644>.
8. Daniel, R., Greger, J. G., Katz, R. A., Taganov, K. D., Wu, X., Kappes, J. C., and Skalka, A. M. (2004) Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the non-homologous end joining repair pathway, *J. Virol.*, **78**, 8573-8581, <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8573-8581.2004>.
9. Smith, J. A., Wang, F. X., Zhang, H., Wu, K. J., Williams, K. J., and Daniel, R. (2008) Evidence that the Nijmegen breakage syndrome protein, an early sensor of double-strand DNA breaks (DSB), is involved in HIV-1 post-integration repair by recruiting the ataxia telangiectasia-mutated kinase in a process similar to, but distinct from, cellular DSB repair, *Virol. J.*, **5**, 11, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-11>.

10. Lau, A., Swinbank, K. M., Ahmed, P. S., Taylor, D. L., Jackson, S. P., Smith, G. C. M., and O'Connor, M. J. (2005) Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 493-500, <https://doi.org/10.1038/ncb1250>.
11. Knyazhanskaya, E., Anisenko, A., Shadrina, O., Kalinina, A., Zatsepin, T., Zalevsky, A., Mazurov, D., and Gottikh, M. (2019) NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase, *Retrovirology*, **16**, 30, <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0492-z>.
12. Anisenko, A., Nefedova, A., Agapkina, Y., and Gottikh, M. (2023) Both ATM and DNA-PK are the main regulators of HIV-1 post-integrational DNA repair, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2797, <https://doi.org/10.3390/ijms24032797>.
13. Blackford, A. N., and Jackson, S. P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response, *Mol. Cell*, **66**, 801-817, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
14. Anisenko, A. N., Knyazhanskaya, E. S., Zalevsky, A. O., Agapkina, J. Y., Sizov, A. I., Zatsepin, T. S., and Gottikh, M. B. (2017) Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting, *Sci. Rep.*, **7**, 5649, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05659-5>.
15. Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J. F. (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase, *Retrovirology*, **5**, 114, <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114>.
16. Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hehl, E., Kalpana, G. V., Prasad, V., and Kappes, J. C. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex, *J. Virol.*, **73**, 2126-2135, <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2126-2135.1999>.
17. Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P. A. (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation, *Cancer Res.*, **64**, 2390-2396, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3207>.
18. Rothkamm, K., and Löbrich, M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5057-5062, <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>.
19. Menolfi, D., and Zha, S. (2020) ATM, ATR and DNA-PKcs kinases – the lessons from the mouse models: inhibition ≠ deletion, *Cell Biosci.*, **10**, 8, <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0376-x>.
20. Schlam-Babayov, S., Bensimon, A., Harel, M., Geiger, T., Aebersold, R., Ziv, Y., and Shiloh, Y. (2021) Phosphoproteomics reveals novel modes of function and inter-relationships among PIKKs in response to genotoxic stress, *EMBO J.*, **40**, e104400, <https://doi.org/10.15252/embj.2020104400>.
21. Anisenko, A., Kan, M., Shadrina, O., Brattseva, A., and Gottikh, M. (2020) Phosphorylation targets of DNA-PK and their role in HIV-1 replication, *Cells*, **9**, 1908, <https://doi.org/10.3390/cells9081907>.
22. Bensimon, A., Schmidt, A., Ziv, Y., Elkon, R., Wang, S. Y., Chen, D. J., Aebersold, R., and Shiloh, Y. (2010) ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage, *Sci. Signal.*, **3**, rs3, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001034>.
23. Finzel, A., Grybowski, A., Strasen, J., Cristiano, E., and Loewer, A. (2016) Hyperactivation of ATM upon DNA-PKcs inhibition modulates p53 dynamics and cell fate in response to DNA damage, *Mol. Biol. Cell*, **27**, 2360-2367, <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-01-0032>.
24. Schlam-Babayov, S., Ziv, Y., and Shiloh, Y. (2021) It takes three to the DNA damage response tango, *Mol. Cell Oncol.*, **8**, 1881395, <https://doi.org/10.1080/23723556.2021.1881395>.
25. Lu, H., Zhang, Q., Laverty, D. J., Puncheon, A. C., Augustine, M. M., Williams, G. J., Nagel, Z. D., Chen, B. P. C., and Davis, A. J. (2023) ATM phosphorylates the FATC domain of DNA-PKcs at threonine 4102 to promote non-homologous end joining, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 6770-6783, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad505>.
26. Mladenov, E., Fan, X., Paul-Konietzko, K., Soni, A., and Iliakis, G. (2019) DNA-PKcs and ATM epistatically suppress DNA end resection and hyperactivation of ATR-dependent G2-checkpoint in S-phase irradiated cells, *Sci. Rep.*, **9**, 14597, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51071-6>.
27. Liu, S., Opiyo, S. O., Manthey, K., Glanzer, J. G., Ashley, A. K., Amerin, C., Troksa, K., Shrivastav, M., Nickoloff, J. A., and Oakley, G. G. (2012) Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10780-10794, <https://doi.org/10.1093/nar/gks849>.
28. Zhou, Y., Lee, J. H., Jiang, W., Crowe, J. L., Zha, S., and Paull, T. T. (2017) Regulation of the DNA damage response by DNA-PKcs inhibitory phosphorylation of ATM, *Mol. Cell*, **65**, 91-104, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.004>.
29. Kurosawa, A. (2021) Autophosphorylation and self-activation of DNA-dependent protein kinase, *Genes*, **12**, 1091, <https://doi.org/10.3390/genes12071091>.
30. Hsu, F. M., Zhang, S., and Chen, B. P. C. (2012) Role of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in cancer development and treatment, *Transl. Cancer Res.*, **1**, 22-34, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2012.04.01>.
31. Lafont, F., Fleury, F., and Benhelli-Mokrani, H. (2020) DNA-PKcs Ser2056 auto-phosphorylation is affected by an O-GlcNAcylation/phosphorylation interplay, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1864**, 129705, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129705>.

32. Chen, B. P. C., Chan, D. W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J., and Chen, D. J. (2005) Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14709-14715, <https://doi.org/10.1074/jbc.M408827200>.
33. Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature*, **421**, 499-506, <https://doi.org/10.1038/nature01368>.
34. So, S., Davis, A. J., and Chen, D. J. (2009) Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites, *J. Cell Biol.*, **187**, 977-990, <https://doi.org/10.1083/jcb.200906064>.
35. Yuan, Z., Guo, W., Yang, J., Li, L., Wang, M., Lei, Y., Wan, Y., Zhao, X., Luo, N., Cheng, P., Liu, X., Nie, C., Peng, Y., Tong, A., and Wei, Y. (2015) PNAS-4, an early DNA damage response gene, induces S phase arrest and apoptosis by activating checkpoint kinases in lung cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **290**, 14927, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658419>.
36. Li, J., and Stern, D. F. (2005) Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **280**, 12041-12050, <https://doi.org/10.1074/jbc.M412445200>.
37. Boehme, K. A., Kulikov, R., and Blattner, C. (2008) p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7785-7790, <https://doi.org/10.1073/pnas.0703423105>.
38. Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2, *Cell*, **91**, 325-334, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80416-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80416-X).
39. Loughery, J., Cox, M., Smith, L. M., and Meek, D. W. (2014) Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7666-7680, <https://doi.org/10.1093/nar/gku501>.
40. Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. (2010) H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy, *J. Nucleic Acids*, **2010**, 920161, <https://doi.org/10.4061/2010/920161>.
41. Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C. C. Y., Glover, J. N. M., Yang, X. H., and Zou, L. (2011) ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation, *Mol. Cell*, **43**, 192-202, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.019>.
42. Kulkarni, A., and Das, K. C. (2008) Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **294**, 998-1006, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00004.2008>.

POST-INTEGRATIONAL DNA REPAIR OF HIV-1 IS ASSOCIATED WITH THE ACTIVATION OF DNA-PK AND ATM CELLULAR PROTEIN KINASES AND PHOSPHORYLATION OF THEIR TARGETS

A. N. Anisenko^{1,2,3*}, A. A. Nefedova³, I. I. Kireev², and M. B. Gottikh^{1,2}

¹ Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: a_anisenko@mail.ru

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

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

Integration of the DNA copy of the HIV-1 genome into the cellular genome results in series of damages, the repair of which is critical for successful viral replication. We have previously demonstrated that the ATM and DNA-PK kinases, normally responsible for repairing double-strand breaks in the cellular DNA, are required to initiate HIV-1 post-integration repair, even though integration does not result in double-strand DNA breaks. In this study, we analyzed changes in the phosphorylation status of ATM (pSer1981), DNA-PK (pSer2056) and their related kinase ATR (pSer428), as well as their targets: Chk1 (pSer345), Chk2 (pThr68), H2AX (pSer139) and p53 (pSer15) during HIV-1 post-integration repair. We have shown that ATM and DNA-PK, but not ATR, undergo autophosphorylation during postintegration DNA repair and phosphorylate their target proteins Chk2 and H2AX. These data indicate common signaling mechanisms between double-strand DNA break repair and postintegration repair of HIV-1.

Keywords: HIV-1, DNA-PK, ATM, kinases, DNA repair, post-integrational DNA repair

ОСОБЕННОСТИ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ В ФОТОСИСТЕМЕ 1 ИЗ ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Chlorella ohadii*

© 2024 Д.А. Черепанов^{1,2*}, А.А. Петрова², М.С. Фадеева³, Ф.Е. Гостев¹,
И.В. Шелаев¹, В.А. Надточенко^{1,4}, А.Ю. Семенов^{1,2*}

¹ ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tscherepanov@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

³ Тель-Авивский университет, Факультет естественных наук имени Джорджа С. Уайза,
69978 Тель-Авив, Израиль

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

Поступила в редакцию 30.03.2024

После доработки 23.04.2024

Принята к публикации 24.04.2024

Первичные реакции переноса энергии возбуждения и разделения зарядов в фотосистеме 1 (ФС1) из пустынной зеленой водоросли *Chlorella ohadii*, выращенной при низкой освещенности, были исследованы методом широкополосной фемтосекундной спектроскопии «возбуждение-зондирование» в диапазоне от 400 до 850 нм во временном диапазоне 100 фс–500 пс. Фотохимические реакции инициировались с синего и красного края полосы поглощения Qu хлорофилла и сравнивались с аналогичными процессами в ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. При возбуждении ФС1 из *C. ohadii* на длине волны 660 нм во временном интервале до 25 пс наблюдались процессы перераспределения энергии в светособирающих субъединицах комплекса, в то время как формирование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^{+}A_1^{-}$ в этих условиях было кинетически неоднородным с характерными временами 25 и 120 пс. При альтернативном варианте возбуждения в красный край полосы Qu на длине волны 715 нм в половине комплексов наблюдались первичные реакции разделения зарядов во временном диапазоне 7 пс, а в остальной части комплексов образование ион-радикальной пары $P_{700}^{+}A_1^{-}$ лимитировалось переносом энергии и происходило с характерным временем 70 пс. Аналогичные фотохимические реакции в ФС1 из *Synechocystis* 6803 были существенно быстрее: при возбуждении на длине волны 680 нм примерно в 30% комплексов образование первичных ион-радикальных пар происходило со временем 3 пс. При возбуждении на 720 нм в половине комплексов наблюдалось кинетически неразрешимое сверхбыстрое первичное разделение зарядов, а последующее образование ион-радикальной пары $P_{700}^{+}A_1^{-}$ наблюдалось со временем 25 пс. Фотодинамика ФС1 из *C. ohadii* имела заметное сходство с процессами переноса энергии возбуждения и разделения зарядов в ФС1 из микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, однако в динамике переноса энергии в ФС1 из *C. ohadii* наблюдались существенно более медленные компоненты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: зеленая водоросль *Chlorella ohadii*, фемтосекундная лазерная спектроскопия, первичные фотохимические реакции, экситонная динамика, разделение зарядов.

DOI: 10.31857/S0320972524060129 EDN: XLBDRS

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интерес многих исследователей в области первичных процессов фото-

синтеза привлечен к изучению фотосинтезирующих организмов, обитающих в экстремальных экологических условиях. Такие условия могут включать, в частности, низкую и высокую освещенность, температуру, влажность и спектральный состав света. Большой интерес представляет

* Адресат для корреспонденции.

изучение структуры и функций пигмент-белковых комплексов фотосистемы 1 (ФС1) из организмов, живущих при исключительно высокой освещенности. Одним из таких организмов является зеленая водоросль *Chlorella ohadii*, обнаруженная в почве пустыни Негев и способная к фотосинтезу в условиях чрезвычайно высокой освещенности (~2000 мкЭ) [1]. В недавней работе израильских и немецких ученых [2] была выделена и подробно охарактеризована ФС1 из *C. ohadii*. С помощью криоэлектронной микроскопии с разрешением 2,7 Å были получены структуры ФС1 из клеток, выращенных при низкой (40–100 мкЭ, ФС1_{LL}) и при высокой (2500 мкЭ, ФС1_{HL}) освещенности. Было показано, что ФС1_{LL} состоит из 24 пигмент-белковых субъединиц, объединенных в четыре структурных компартмента: основной комплекс, включающий реакционный центр (РЦ) и внутреннюю (интегральную) светособирающую антенну (ССА); пару внешних светособирающих антенных комплексов I (LHCI), расположенных в виде двух опоясывающих колец вблизи донорного участка РЦ, и один димерный комплекс LHCI, локализованный вблизи от акцепторного участка РЦ. Наиболее заметные различия в структурах комплексов ФС1_{LL} и ФС1_{HL} касаются внешней ССА. LHCI_{HL} содержит значительно меньше хлорофилла (Хл) *b*, чем LHCI_{LL}: в большинстве субъединиц LHCI_{HL} хотя бы одна молекула Хл *b* заменялась Хл *a*. Последовательности аминокислот в LHCI ФС1_{LL} из *C. ohadii* были высоко гомологичны последовательностям LHCI из эталонной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. При этом расположение четырех субъединиц LHCI было идентично расположению в ФС1 растений, а оставшихся шести – расположению в зеленых водорослях *Chl. reinhardtii* и *Bryopsis corticulans* [3–6].

Для изучения механизма переноса энергии и первичного разделения зарядов в фотосинтетических комплексах ФС1 широко используются методы широкополосной фемтосекундной спектроскопии «возбуждение-зондирование» [7–9]. Изучение реакций разделения зарядов в ФС1 цианобактерий затруднено наличием внутренней (интегральной) ССА, которая содержит примерно 90 молекул Хл *a* [10, 11]. У водорослей и высших растений ССА ФС1 включает также дополнительные периферические субъединицы, поэтому стехиометрия пигментного состава в этих структурах составляет 200–250 молекул Хл *a* и Хл *b* на РЦ [12, 13]. В работах Holzwarth et al. [14–16] первичные фотохимические реакции ФС1 из водоросли *Chl. reinhardtii* изучались, в частности, методом широкополосной

фемтосекундной спектроскопии. Авторами было предположено, что в этом комплексе фотохимические реакции могут протекать по двум механизмам в зависимости от длины волны возбуждения. Возбуждение в красный край полосы Qu на длине волны 700 нм затрагивало непосредственно пигменты РЦ, что позволило авторам оценить характерное время первичной реакции разделения зарядов, которое по их интерпретации получилось равным 3–5 пс [15, 16].

Комплексы ФС1, выделенные из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Thermosynechococcus elongatus*, не содержат периферических светособирающих субъединиц [10, 11]. При возбуждении этих комплексов в области 670–680 нм абсорбционные изменения на временном интервале до 10 пс обусловлены процессами миграции энергии во внутренней ССА, а разделение зарядов с образованием первичной ион-радикальной пары лимитировано переносом энергии в РЦ и происходит со временем 35–40 пс [7, 17, 18]. При возбуждении этих комплексов с красного края полосы Qu в области 720–760 нм наблюдалось сверхбыстрое разделение зарядов на временном интервале ≤ 0,2 пс [19–21], что существенно быстрее оценок скорости первичных реакций, полученных для ФС1 из *Chl. reinhardtii* [14–16].

Настоящая работа является первой из серии работ, посвященных исследованию сверхбыстрой кинетики переноса энергии и разделения зарядов ФС1_{LL} из клеток *C. ohadii*, выращенных при низкой освещенности, с помощью лазерной фемтосекундной спектроскопии методом «возбуждение-зондирование». В работе проведено сравнение кинетики переходов спектральных интермедиатов ФС1_{LL} из *C. ohadii* с переходами в эталонной ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. В дальнейшем планируется сравнение первичных процессов в ФС1_{LL} и ФС1_{HL} из клеток *C. ohadii*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение комплексов ФС1 из клеток *Chlorella ohadii*, выращенных в условиях низкой освещенности. Комплексы ФС1 из *C. ohadii* были выделены, как описано в работе Caspy et al. [2]. Клетки выращивали при перемешивании и барботировании воздухом и CO₂ при 25 °C и освещении 50 мкЭ. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g, промывали буфером Tris-NaOH (30 mM, pH 8,0), содержащим 10 mM NaCl и 10% сахарозы, разрушали с помощью пресса Френча,

Принятые сокращения: РЦ – реакционный центр; ССА – светособирающая антенна; ФС1 – фотосистема 1; Хл – хлорофилл; EADS – эволюционно-ассоциированные дифференциальные спектры; LHCI – светособирающий антенный комплекс I.

затем получали мембранную фракцию и солюбилизовали, добавляя 1,5% (w/v) *n*-додецил- β -D-мальтозида (ДДМ). Суперкомплекс ФС1 получали путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (15–50% сахарозы, 20 mM Tris-Tricin (pH 8,0), 300 mM NaCl и 0,2% ДДМ) с использованием ротора SW-60 («Beckman», США) при 48 000 об/мин в течение 15 ч.

Выделение комплексов ФС1 из клеток цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803. Клетки выращивали в среде BG-11 и осаждали при 10 000 *g* в течение 15 мин. Разрушение клеток осуществляли с помощью Френч-пресса с последующим осаждением неразрушенных частиц при 3 000 *g* в течение 10 мин. Далее, супернатант (мембранные фрагменты) был инкубирован в присутствии 1% (w/v) ДДМ в течение 2 ч при 4 °C при концентрации хлорофилла 0,5 мг/мл. После центрифугирования при 14 000 *g* в течение 20 мин супернатант был нанесен на линейный градиент сахарозы (5–20% (w/v)) и далее был центрифугирован в течение 3 ч при 140 000 *g* на роторе VTi50 («Beckman») (закупленном с помощью Программы развития МГУ) в соответствии с процедурой, описанной ранее [22].

Сверхбыстрые абсорбционные изменения $\Delta A(\lambda, t_m)$ регистрировались методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» в оптическом диапазоне $400 \leq \lambda \leq 850$ нм на временных задержках t от 100 фс до 500 пс. Экспериментальная установка и методика измерений были описаны ранее [19]. Возбуждение ФС1 осуществлялось фемтосекундными лазерными импульсами с максимумом на длинах волн 660 нм (длительность – 40 фс, энергия – 0,8 нДж) и 715 нм (длительность – 37 фс, энергия – 4 нДж). Зондирование обеспечивалось широкополосными импульсами суперконтинуума при угле поляризации 54,7 градусов относительно поляризации возбуждающего импульса. Разностные спектры поглощения в диапазоне 400–850 нм снимали с помощью ПЗС-камеры Newton («Andor», США), соединенной с полихроматором Acton SP-300 («Thermo Fisher Scientific», США). Эксперименты проводились при температуре 6 °C в проточной оптической ячейке с длиной оптического пути 0,5 мм; диаметр области возбуждения – 0,2 мм; оптическая плотность образца составляла 10 единиц при оптическом пути 1 см. Скорость циркуляции в проточной ячейке (9 мл/мин) была достаточно высокой, чтобы избежать многократного возбуждения одного и того же объема пробы. Спектры корректировались дисперсией групповой задержки, как описано ранее [23, 24]. Учет когерентного артефакта и деконволюции аппаратной функции в области $t = 0$ проводился по методике, предложенной в работах Dobryakov et al. [23, 25] и Cherepanov et al. [26]. Экспериментальные данные

для дифференциального спектра Хл *a* в тетрагидрофуране взяты из работы Cherepanov et al. [27].

Математический анализ абсорбционной динамики включал разложение спектрально-временных матриц $\Delta A(\lambda, t_m)$ на линейную комбинацию n дискретных экспоненциальных функций:

$$Q[\tau](\lambda, t) = \sum_{k=1}^n D_k(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_k) + D_{n+1}(\lambda) \quad (1)$$

в предположении, что характерные времена $\{\tau_k\}$ не зависят от длины волны наблюдения λ и, следовательно, могут рассматриваться как «глобальные» параметры, определяемые нелинейной минимизацией суммы квадратов отклонений теоретической модели от экспериментальных данных. Зависящие от длины волны предэкспоненциальные амплитуды $D_k(\lambda)$, рассчитываемые стандартным методом линейной регрессии для каждой экспоненциальной функции k , определяют спектры, связанные с распадом (Decay-Associated Spectra, DAS), одновременно рассчитывается финальный спектр $D_{n+1}(\lambda)$. После определения характерных времен $\{\tau_k\}$ в соответствии с методикой, предложенной Stokkum et al. [28], рассчитывались дифференциальные спектры последовательных кинетических интермедиатов – эволюционно-ассоциированные дифференциальные спектры (evolution-associated difference spectra, EADS), представляющие собой разностные спектры интермедиатов, возникающих в последовательной кинетической модели:

$$A_1(\lambda) \xrightarrow{\tau_1} A_2(\lambda) \xrightarrow{\tau_2} A_3(\lambda) \xrightarrow{\tau_3} \dots \xrightarrow{\tau_n} A_{n+1}(\lambda). \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 спектр поглощения комплексов ФС1 из микроводосли *C. ohadii* сравнивается со спектром ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* 6803. Пигментный комплекс ФС1 цианобактерии включает только внутреннюю (интегральную) ССА, ее пигменты окружают кофакторы электрон-транспортной цепи. Мономер ФС1 из *Synechocystis* 6803 содержит 96 молекул Хл *a* и 20 молекул β -каротина, а также 3 молекулы кантаксантина и эхинеона [29]. Комплекс ФС1 из *C. ohadii*, помимо интегральной антенны, включает 10 периферических подвижных светособирающих субъединиц, в целом, на один РЦ этой ФС1 приходится 208 молекул Хл *a*, 47 молекул Хл *b*, 32 молекулы β -каротина, а также 30 молекул других каротиноидов (21 – лютеин, 4 – виолаксантин, 2 – астаксантин, 2 – β -криптоксантин, 1 – эхинеон), поглощающих в области 470–520 нм [2]. Поглощение ФС1 из *C. ohadii* в области полосы Qu обусловлено преимущественно Хл *a*.

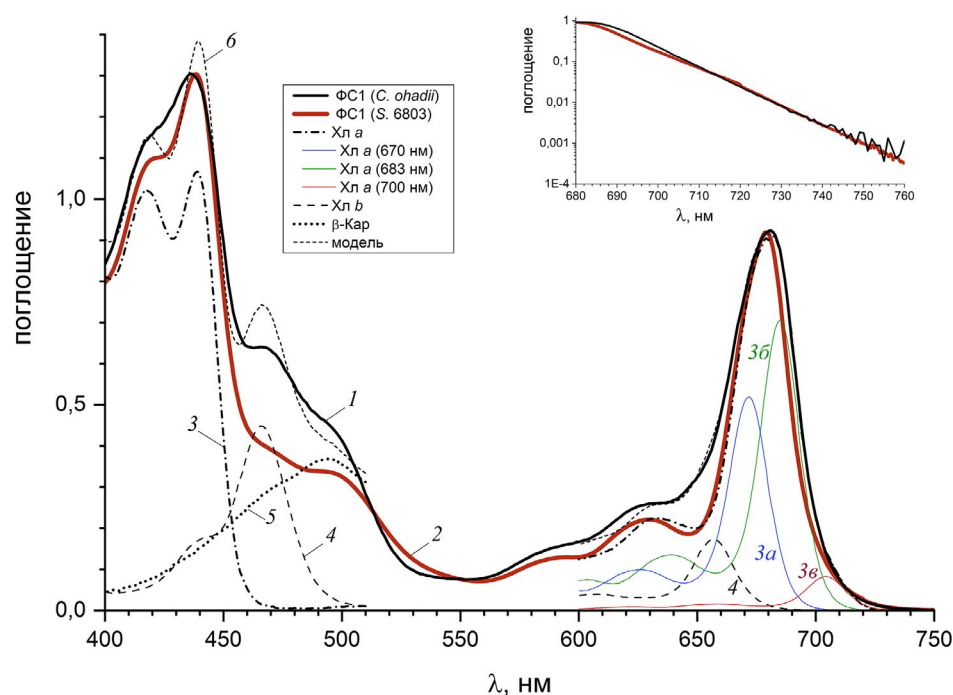


Рис. 1. Сравнение спектров поглощения ФС1 из водоросли *C. ohadii* (1) и цианобактерии *Synechocystis* 6803 (2). Спектр ФС1 из *C. ohadii* аппроксимирован суммой спектров Хл *a* (3), Хл *b* (4) и бета-каротина (5) по методике из работы Cherepanov et al. [26]. Относительные вклады Хл *a* и Хл *b* в модельный спектр (6) составляют 90% и 10% соответственно. В области 600–750 нм представлены три фракции Хл *a* с максимумами в полосе Qy на 671 нм (3а – 40%), 685 нм (3б – 54%) и 705 нм (3в – 6%). На вставке показан красный край спектров в логарифмическом масштабе

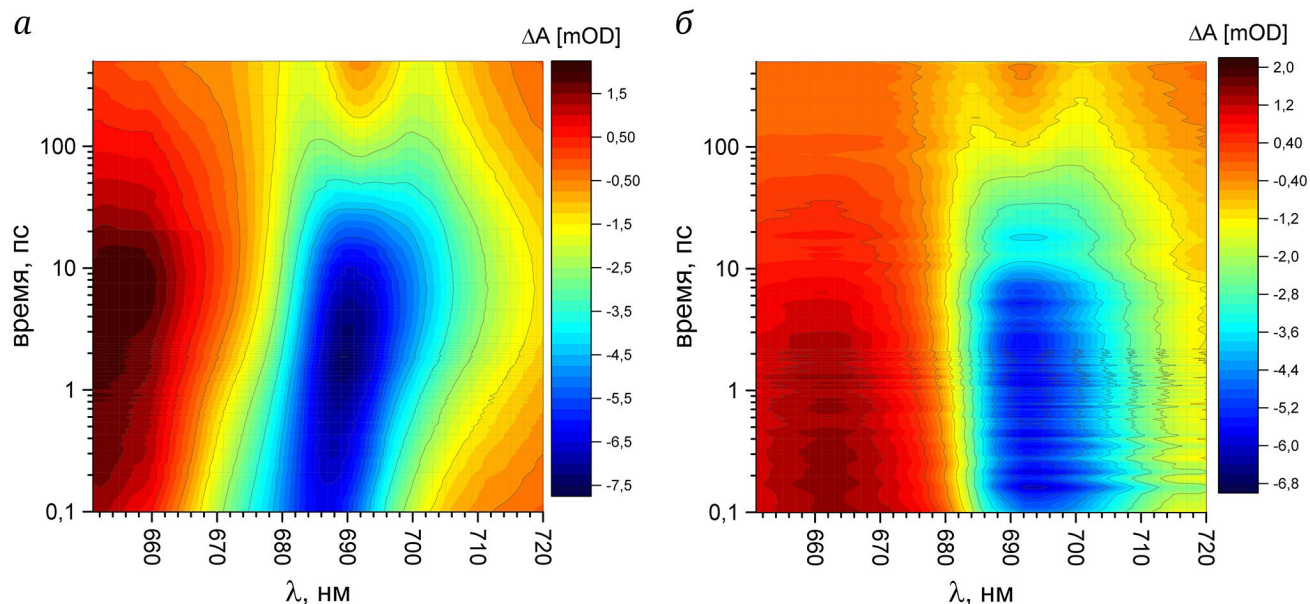


Рис. 2. Спектральные изменения ФС1 из *C. ohadii* вблизи полосы Qy, инициированные возбуждением с максимумом на 660 нм (а) и 715 нм (б). Шкала амплитуд показана справа от цветковых карт

В спектре полосы Qy можно выделить фракции с максимумом около 671 нм (40%), 685 нм (54%) и 704 нм (6%), в то время как Хл *b* вносит лишь небольшой вклад в полосу поглощения Qy в области 650–660 нм (рис. 1). Примечательно, что модельный спектр Хл *a*, рассчитанный для ФС1 из

C. ohadii в области полосы Qy (штрих-пунктир), хорошо воспроизводит спектр поглощения ФС1 из *Synechocystis* 6803 (сплошная красная линия). Отличие двух спектров состоит в том, что длинноволновый край полосы Qy спектра ФС1 из *C. ohadii* сдвинут на ~5 нм в красную сторону относительно

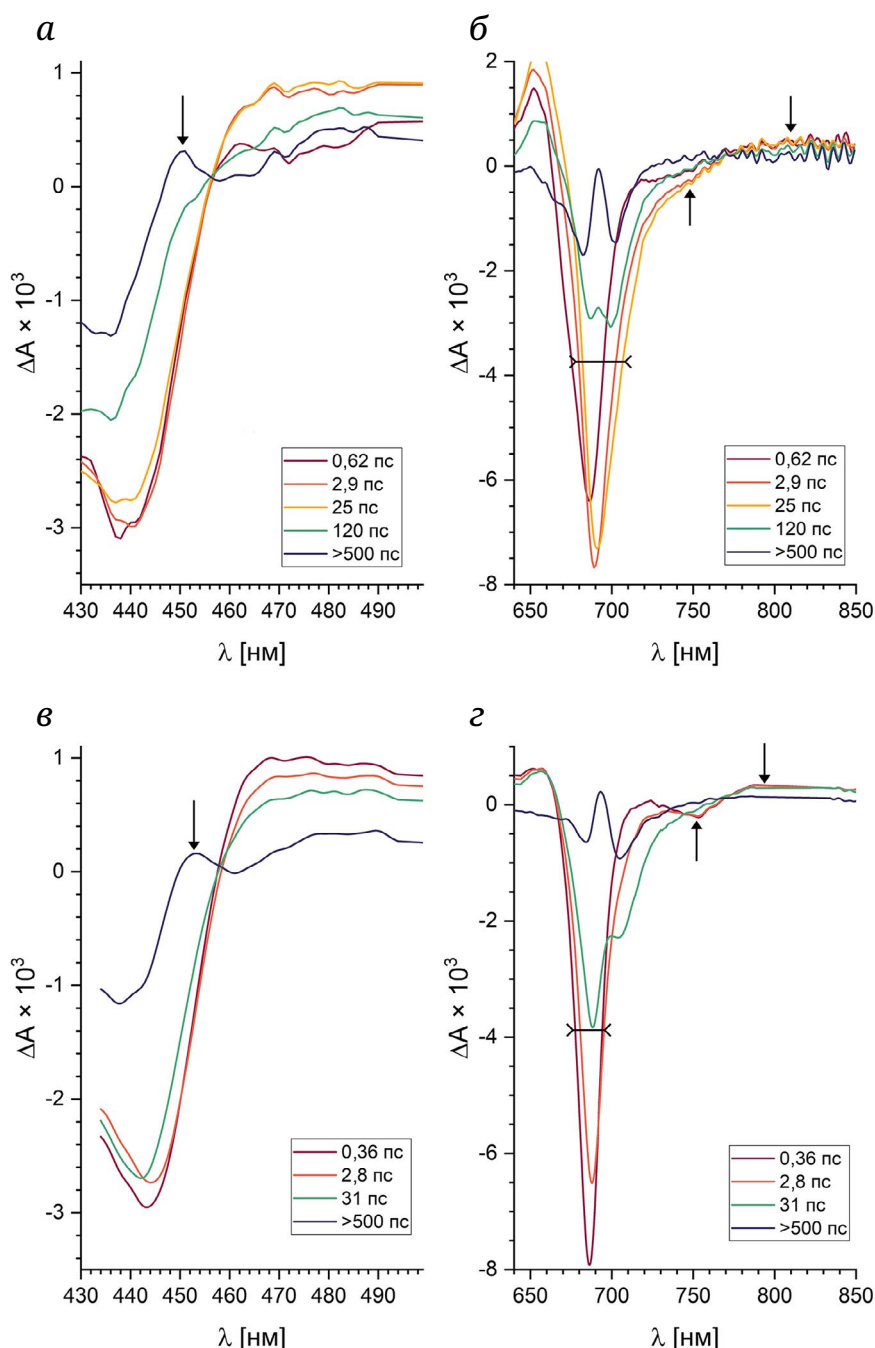


Рис. 3. Дифференциальные спектры последовательных кинетических интермедиатов (EADS) ФС1 из *C. ohadii* (а, б) и *Synechocystis* 6803 (в, г) в области Соре (а, в) и вблизи полосы Qy (б, г). Возбуждение на длинах волн 660 нм (*C. ohadii*) и 680 нм (*Synechocystis* 6803). Характерные времена переходов τ_i и соответствующие им спектры $A_i(\lambda)$ получены с помощью нелинейной многоэкспоненциальной деконволюции

спектра ФС1 из *Synechocystis* 6803. Однако при этом асимптотический спад спектра ФС1 из *C. ohadii* в области 710–760 нм, построенный в полулогарифмических координатах, совпадает с поглощением ФС1 из *Synechocystis* 6803 (вставка на рис. 1).

Фотоиндуцированные изменения поглощения ФС1 из *C. ohadii*, вызванные возбуждением с синего и красного краев полосы Qy на длинах волн 660 и 715 нм, представлены на рис. 2, а и б соответственно.

Возбуждение на 660 нм затрагивало преимущественно фракции Хл *a* антенны с максимумом около 670 нм (синяя кривая на рис. 1), а последующий перенос возбуждения в область основной полосы 685 нм происходил на временной шкале 0,1–1 пс (сдвиг полосы выцветания Qy представлен на рис. 2, а синим цветом). Установление равновесия с длинноволновыми формами Хл антенны, поглощающими в области 700 нм, происходило на временном интервале 3–10 пс, что видно по

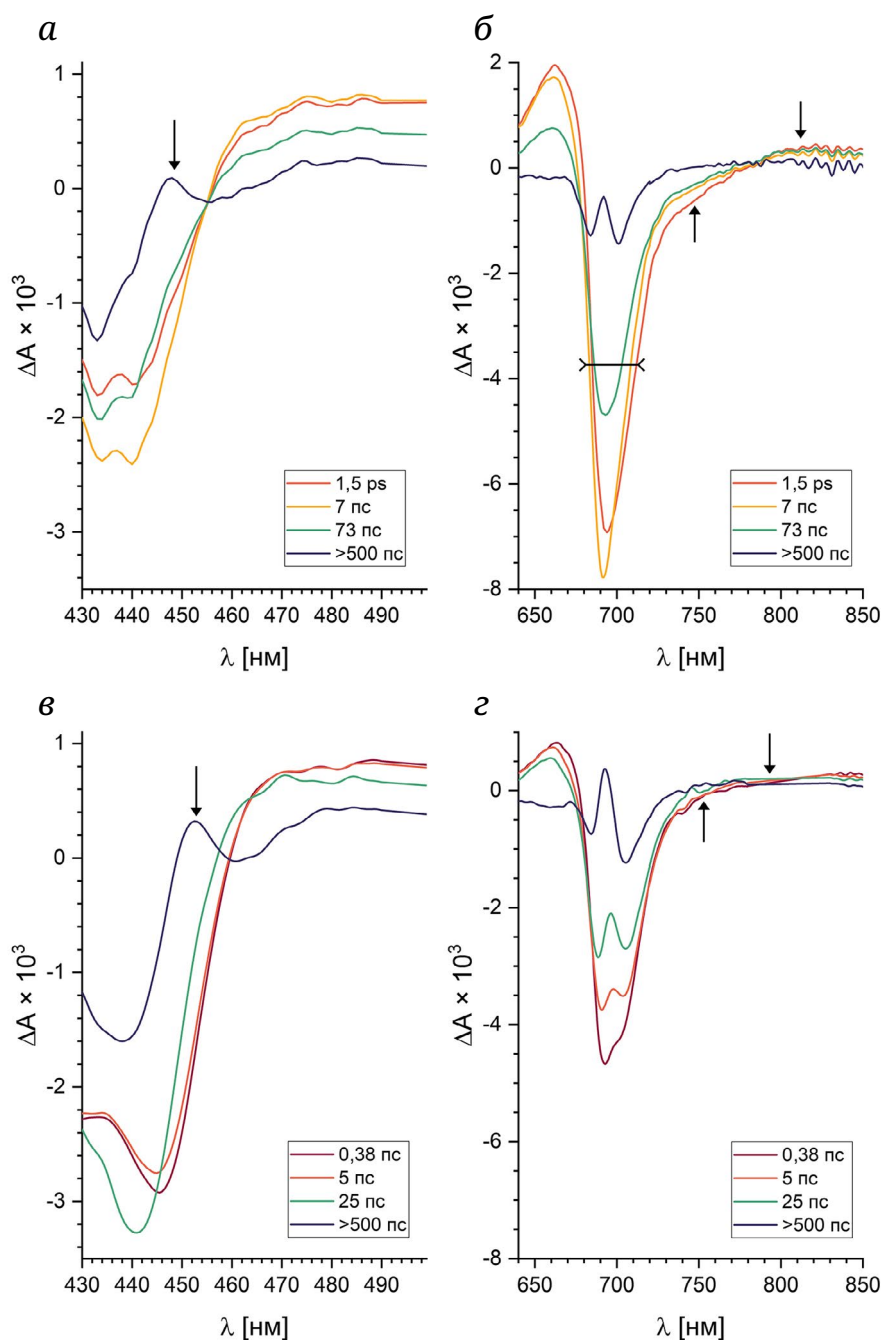


Рис. 4. Спектры EADS ФС1 из *C. ohadii* (а, б) и *Synechocystis* 6803 (в, г) в области Core (а, в) и вблизи полосы Qy (б, г). Возбуждение на длинах волн 715 нм (*C. ohadii*) и 720 нм (*Synechocystis* 6803). Характерные времена переходов τ_i и соответствующие им спектры $A_i(\lambda)$ получены с помощью нелинейной многоэкспоненциальной деконволюции

уширению области выцветания в этом временном диапазоне. Наконец, перенос энергии в РЦ и разделение зарядов с образованием ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ происходило на временной шкале 40–100 пс. Спектральным маркером катиона P_{700}^+ является появление двух полос выцветания с локальными минимумами около 686 и 700 нм, тогда как образование аниона филлохинона A_1^- не вызывает заметных изменений поглощения в области полосы Qy [30].

Возбуждение ФС1 из *C. ohadii* с красного края полосы Qy с центром на длине волны 715 нм затрагивало преимущественно длинноволновую фракцию Хл *a* антенны с максимумом около 705 нм (красная кривая на рис. 1). В этих условиях установление равновесия в светособирающих комплексах происходило на временной шкале 1–3 пс, что видно по сдвигу полосы выцветания на рис. 2, б в область коротких длин волн. Образование ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в этих усло-

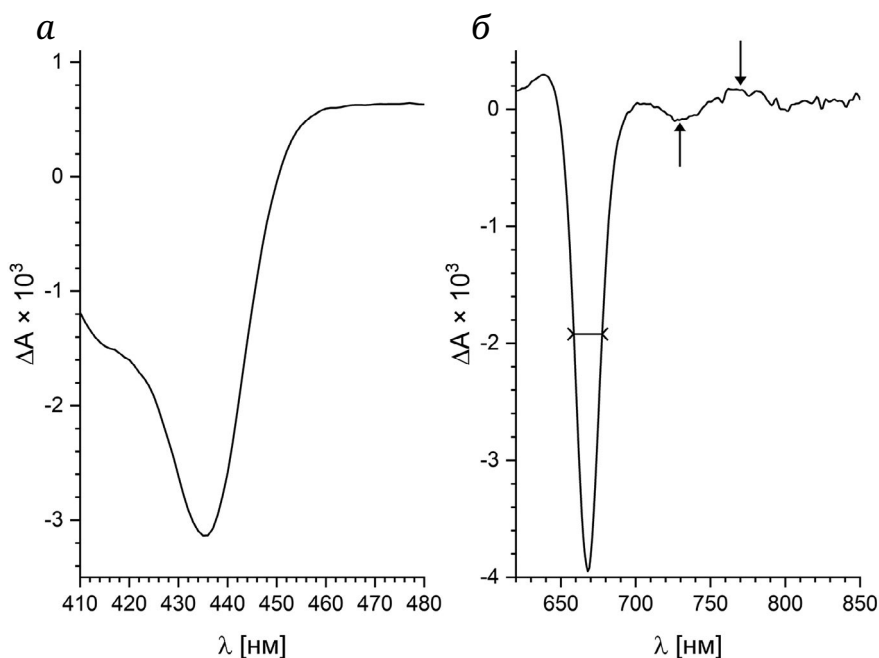


Рис. 5. Дифференциальный спектр возбужденного состояния мономера Хл а в растворе тетрагидрофурана

виях возбуждения происходило заметно быстрее – во временном диапазоне 20–50 пс.

Количественный анализ спектральной динамики был проведен методом глобального разложения на экспоненциальные компоненты (1) с помощью последовательной кинетической модели (2). Последовательная модель позволяет качественно описать установление равновесия между различными фракциями Хл в антенне и лимитированное переносом энергии разделение зарядов в РЦ. На рис. 3 приведены спектры EADS комплексов из *C. ohadii* и *Synechocystis* 6803, полученные при возбуждении ФС1 в синий край полосы Qu на длинах волн 660 и 680 нм соответственно.

Аналогичные спектры, полученные при возбуждении ФС1 с красного края полосы Qu на длине волны 715–720 нм приведены на рис. 4.

Для интерпретации наблюдаемых спектральных интермедиатов важную информацию предоставляет разностный спектр возбужденного состояния S_1 мономера Хл а в растворе тетрагидрофурана (рис. 5), помогающий выделить в спектрах EADS маркеры возбужденного состояния молекул Хл. К числу особенностей разностного спектра S_1 можно отнести следующие:

(i) полоса выцветания Qu с минимумом на 668 нм, обусловленная исчезновением основного состояния и появлением стимулированного излучения, имеет полуширину 20 нм (горизонтальная отметка на рис. 5) и амплитуду, примерно равную амплитуде выцветания полосы Core в области 435–450 нм;

(ii) в области 730 нм наблюдается дополнительная отрицательная полоса стимулированного излучения (отмечена направленной вверх стрелкой), обусловленная сопряжением перехода $S_1 \rightarrow S_0$ с возбуждением вибронных колебаний макроцикла Хл;

(iii) в области 770 нм наблюдается положительная полоса поглощения возбужденного состояния (отмечена направленной вниз стрелкой), обусловленная переходом $S_1 \rightarrow S_n$ на более высокий электронный уровень возбужденного Хл;

(iv) в области 460–500 нм спектр поглощения возбужденного состояния Хл представляет собой широкую полосу, не имеющую выраженной структуры; используя указанные маркеры, можно проводить интерпретацию наблюдаемых спектров EADS.

Как следует из рис. 3, а и б, при возбуждении ФС1 из *C. ohadii* на длине волны 660 нм переходные спектры на временных задержках до 25 пс (представлены темно-красной, красной и оранжевой линиями) соответствуют спектру возбужденного Хл а: его характерными маркерами являются выцветание вибронной полосы в области 740–750 нм и появление широкой положительной полосы в области 780–840 нм (вертикальные стрелки на рис. 3, б). Эволюция спектров в этом интервале отражает миграцию энергии к длинноволновым формам Хл антенны. Наиболее значимые абсорбционные изменения, обусловленные образованием ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$, могут быть описаны двумя экспоненциальными переходами с характерными временами 25 и 120 пс.

По всей видимости, различные компартменты ССА передают энергию в РЦ с различной скоростью, поэтому результирующая кинетика не является моноэкспоненциальной. Уменьшение общей амплитуды выпцветания в области полосы Соре (440 нм) и полосы Qu (690 нм) коррелирует с исчезновением маркеров возбужденного состояния (полосы стимулированного излучения на 740–750 нм и положительной полосы поглощения на 780–840 нм), а также характеризуется появлением маркера поглощения катиона P_{700}^+ на 450 нм (вертикальная стрелка на рис. 3, а). Наиболее вероятная интерпретация последней особенности – электрохромный сдвиг полос Соре молекул Хл РЦ под действием электрического поля ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$.

На рис. 3, в и г приведены аналогичные спектры EADS для ФС1 из *Synechocystis* 6803 после возбуждения на длине волны 680 нм. На временных задержках до 2 пс переходные спектры, в целом, соответствуют спектру возбужденного Хл и близки к аналогичным спектрам ФС1 из *C. ohadii*. Переходный спектр $A_3(\lambda)$, образующийся с характерным временем $\tau_2 = 2,8$ пс (зеленая линия), характеризуется следующими особенностями: появляется длинноволновая полоса выпцветания с минимумом на 705 нм; амплитуда основной полосы выпцветания на 688 нм уменьшается вдвое; примерно вдвое уменьшается амплитуда выпцветания вибронной сателлитной полосы на 750 нм; полоса поглощения возбужденного состояния в области 780–840 нм не меняется; полоса выпцветания в области Соре (440–445 нм) практически не меняется, в то время как поглощение возбужденного состояния в области 460–500 нм уменьшается. В совокупности эти изменения могут быть объяснены возникновением в РЦ переходных состояний, в которых возбужденные экситон-сопряженные молекулы Хл РЦ ($P_{700}A_0$)* смешаны с состояниями разделенных зарядов $P_{700}^+A_0^-$ [20, 31]. Перенос электрона на хинонный акцептор и образование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в ФС1 из *Synechocystis* 6803 происходит с характерным временем 31 пс.

На рис. 4, а и б приведены спектры EADS для ФС1 из *C. ohadii* после возбуждения с красного края полосы Qu в области 715 нм. На временных задержках до 7 пс спектральные изменения могут быть приписаны установлению равновесия с участием коротковолновых форм Хл антенны. Переходный спектр $A_3(\lambda)$, образующийся с характерным временем $\tau_2 = 7$ пс (зеленая линия), имеет признаки образования ион-радикальных состояний: уменьшаются амплитуды полосы выпцветания на 690 нм и сателлитной полосы на 750 нм, а также полосы в области Соре 440 нм. Кроме того, увеличивается поглощение в области 455 нм,

что является признаком появления катиона P_{700}^+ . Процесс разделения зарядов в этом варианте возбуждения ФС1 завершается переходом с характерным временем $\tau_3 = 73$ пс.

На рис. 4, в и г приведены спектры EADS для ФС1 из *Synechocystis* 6803 после возбуждения с красного края полосы Qu в области 720 нм. В этих условиях возбуждения начальный переходный спектр $A_1(\lambda)$ на временных задержках до 0,38 пс (темно-красная линия) близок по форме к спектру $A_3(\lambda)$, образующемуся со временем $\tau_2 = 2,8$ пс после возбуждения ФС1 из *Synechocystis* 6803 на 680 нм (рис. 3, в и г; зеленая линия). Переходный спектр $A_1(\lambda)$ в области полосы Qu характеризуется двумя минимумами (при 690 и 704 нм) с амплитудой вдвое меньшей амплитуды начальной полосы выпцветания при возбуждении на 680 нм (рис. 3, г; темно-красная линия). При этом выпцветание вибронной полосы на 750 нм и поглощение возбужденного состояния в области 780–840 нм незначительно. Спектр выпцветания полосы Соре и поглощения возбужденного состояния в области 460–500 нм хорошо соответствует переходному спектру $A_3(\lambda)$, образующемуся с характерным временем $\tau_2 = 2,8$ пс при возбуждении на 680 нм (рис. 3, в и г; зеленая линия). Таким образом, данные результаты подтверждают сделанный ранее вывод о непосредственном возбуждении реакционного центра ФС1 и образовании в нем смешанных состояний с разделенными зарядами $P_{700}^+A_0^-$ при возбуждении в области 720 нм [19, 20]. Образование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в ФС1 из *Synechocystis* 6803 в этих условиях происходит с характерным временем 25 пс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе спектральные изменения ФС1 из микроводоросли *C. ohadii*, индуцированные возбуждением с синего и красного края полосы поглощения Qu, сравниваются с аналогичными изменениями ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* 6803. При возбуждении ФС1 из *C. ohadii* на длине волны 660 нм спектральная динамика во временном интервале до 25 пс отражает перераспределение энергии в светособирающих субъединицах комплекса; образование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в этих условиях лимитируется переносом энергии в РЦ из двух пулов антенных комплексов с характерными временами 25 и 120 пс соответственно. В аналогичных условиях перенос энергии в РЦ ФС1 из *Synechocystis* 6803 происходит существенно быстрее: в ~30% комплексов энергия попадает в РЦ со временем 3 пс, что вызывает образование первичных ион-радикальных пар; в остальной части комплексов возбуждение РЦ

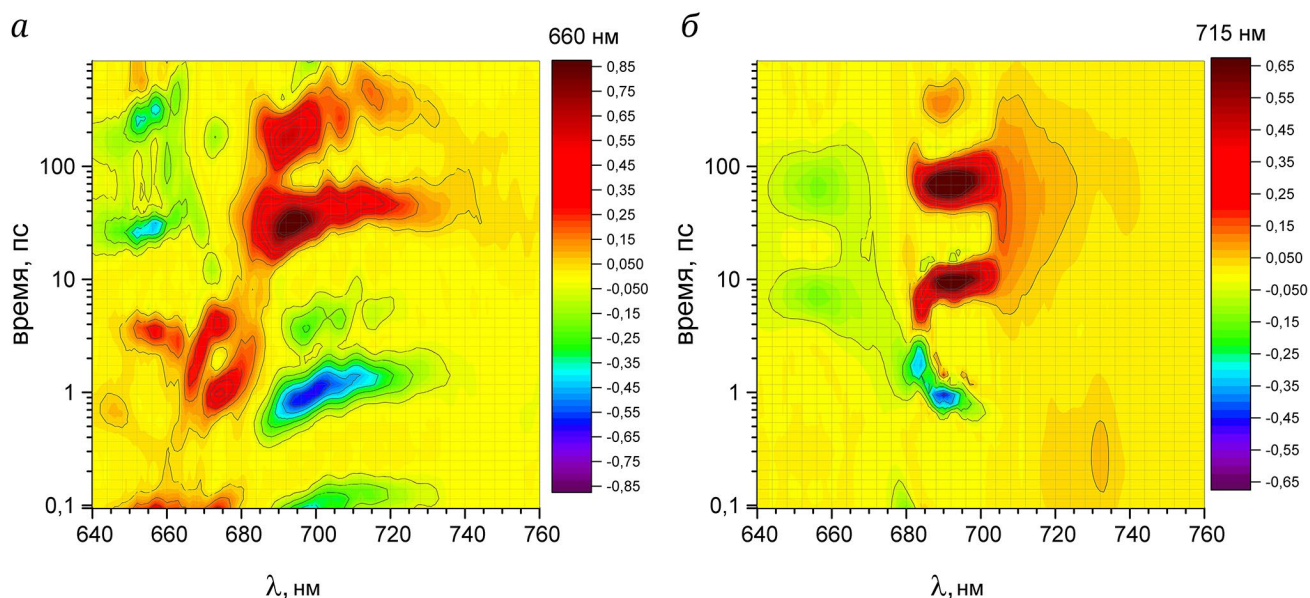


Рис. 6. Карты непрерывного распределения времен жизни переходной кинетики поглощения ФС1 из *C. ohadii*, построенные обратным преобразованием Лапласа с помощью программы CONTIN [33] по данным, представленным на рис. 2. Возбуждение на 660 нм (а) и 715 нм (б). Области уменьшения и увеличения поглощения отмечены синим и красным цветом в соответствии со шкалой, размещенной справа от карты

и формирование состояния $P_{700}^+A_1^-$ происходит со временем 31 пс. Сходные фотохимические реакции в ФС1 из *Synechocystis* 6803 наблюдались ранее [7, 17, 18].

При альтернативном варианте возбуждения ФС1 из *C. ohadii* в красный край полосы Qu на длине волны 715 нм в 50% комплексов наблюдается разделение зарядов с характерным временем 7 пс, в остальных 50% – разделение зарядов и образование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ контролируется переносом энергии с характерным временем около 70 пс. В аналогичных условиях в ФС1 из *Synechocystis* 6803 в половине комплексов наблюдается сверхбыстрое (кинетически неразрешимое) разделение зарядов, последующая стабилизация и образование ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ происходит со временем 25 пс [19].

Наблюдаемые различия в скорости образования ион-радикальных пар между комплексами ФС1 из двух организмов, по-видимому, связаны с различиями в их структуре. Центральная часть комплекса имеет единый план строения у всех кислород-выделяющих организмов, однако комплексы ФС1 хлоропластного типа, характерные для зеленых водорослей и высших растений, окружены внешней антенной из 8–10 пигмент-белковых комплексов LHCl. Поэтому в ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* 6803 на один реакционный центр приходится 90 молекул Хл *a* ССА, а в зеленой водоросли *C. ohadii* – 202 молекулы Хл *a* и 47 молекул Хл *b*. В связи с этим возникает вопрос, типично ли такое медленное разделение зарядов для всех комплексов ФС1 хлоропластного типа.

Первичные фотохимические процессы были ранее исследованы в работах Holzwarth et al. [14–16] в ФС1 из зеленой водоросли *Chl. reinhardtii*. Для корректного сопоставления спектральной динамики ФС1 из *C. ohadii* с картами плотности непрерывного распределения характерных времен, опубликованными ранее [14–16], аналогичные карты распределения характерных времен были рассчитаны методом обратного преобразования Лапласа [32] с помощью программы CONTIN [33]. На рис. 6 приведены результаты непрерывного разложения фотодинамики в области полосы Qu, представленной на рис. 2.

Главными особенностями распределения положительных и отрицательных областей на карте плотности характерных времен для динамики ФС1 из *Chl. reinhardtii* при возбуждении на 670 нм является перенос возбуждения в длинноволновую сторону во временных диапазонах 0,1, 0,6 и 5 пс, а также увеличение поглощения в области полосы выпцветания 685 нм со временем 25 пс (см. рис. 3, А в работе Müller et al. [14]). Близкие кинетические компоненты наблюдаются и в динамике ФС1 из *C. ohadii* при возбуждении на 660 нм: перенос возбуждения в длинноволновую сторону происходит с характерными временами 0,1, 0,8 и 5 пс, а увеличение поглощения в области полосы 690 нм происходит с характерным временем 30 пс (рис. 6, а). Однако, в отличие от *Chl. reinhardtii*, в динамике ФС1 из *C. ohadii* наблюдается также фракция комплексов, в которых перенос энергии в реакционный центр и сопряженное с этим увеличение поглощения полосы 690 нм происходит со временем ~150 пс.

Основные переходы на картах континуального разложения в четырех временных диапазонах: 0,8 пс, 5 пс, 30 пс и 150 пс (рис. 6, а) хорошо совпадают с результатами дискретного разложения (рис. 3, а и б).

При возбуждении ФС1 из *Chl. reinhardtii* на длине волны 700 нм наблюдались кинетические компоненты переноса энергии в коротковолновую сторону с характерными временами 0,2 и 1 пс, а также увеличение поглощения в области полосы выпцветания 685 нм, обусловленное образованием ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ (см. рис. 3, В в работе Müller et al. [14] и аналогичные карты распределения в работах Holzwarth et al. [15, 16]). Кроме того, небольшую по амплитуде компоненту с характерным временем 7 пс авторы интерпретировали как первичную реакцию разделения зарядов [14–16].

В фотодинамике ФС1 из *C. ohadii* при возбуждении на 715 нм перенос возбуждения в коротковолновую сторону происходит со временем 1–2 пс (рис. 4, б и 6, б), что несколько медленнее по сравнению с ФС1 из *Chl. reinhardtii*. Это отличие может быть связано с более длинноволновым характером возбуждения в данной работе. На карте плотности во временном диапазоне 7–11 пс наблюдается увеличение поглощения в области полосы выпцветания 690 нм (рис. 6, б), которое коррелирует с увеличением поглощения в области 750 нм, увеличением поглощения в области Core (430–450 нм) и уменьшением поглощения в области 460–500 нм на спектрах EADS (рис. 4, а и б). Все вместе позволяет отнести наблюдаемые изменения к реакции разделения зарядов, что согласуется с интерпретацией компоненты 7 пс, предложенной ранее [14–16]. Однако в фотодинамике ФС1 из *C. ohadii* при возбуждении на 715 нм не наблюдается компонент в диапазоне 25–30 пс, но присутствует более медленная компонента со временем 70 пс (рис. 6, б), которая отсутствует как в карте распределения ФС1 из *Chl. reinhardtii* (рис. 3, В в работе Müller et al. [14]), так и в динамике поглощения ФС1 из *Synechocystis* 6803 (рис. 4, г). Однако спектр EADS компоненты 7 пс на рис. 4, б не содержит локального минимума в области 705 нм, характерного для первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ (см. рис. 4, г и работы Shelaev et al. [19] и Cherepanov et al. [20]), поэтому механизм разделения зарядов с характерным временем 7 пс в ФС1 из *C. ohadii* требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе спектральные изменения ФС1 из микроводоросли *C. ohadii*, индуцированные

возбуждением с синего и красного края полосы поглощения Qu, сравниваются с аналогичными изменениями ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* 6803. При возбуждении ФС1 из *C. ohadii* на длине волны 660 нм спектральная динамика во временном интервале до 25 пс отражает перераспределение энергии в светособирающих субъединицах комплекса; образование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в этих условиях лимитируется переносом энергии в РЦ из двух пулов антенных комплексов с характерными временами 25 и 120 пс соответственно. В аналогичных условиях перенос энергии в РЦ ФС1 из *Synechocystis* 6803 происходит существенно быстрее: в ~30% комплексов энергия попадает в РЦ со временем 3 пс, что вызывает образование первичных ион-радикальных пар; в остальной части комплексов возбуждение РЦ и формирование состояния $P_{700}^+A_1^-$ происходит со временем 31 пс.

При альтернативном варианте возбуждения ФС1 из *C. ohadii* в красный край полосы Qu на длине волны 715 нм в 50% комплексов наблюдается разделение зарядов с характерным временем 7 пс, в остальных 50% комплексов разделение зарядов и образование стабильной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ контролируется переносом энергии с характерным временем около 70 пс. Сходная фотодинамика ФС1 из *Synechocystis* 6803 при возбуждении на длине волны 720 нм описана ранее [19].

Сравнение кинетики переноса энергии возбуждения и переноса зарядов в ФС1 из микроводорослей *C. ohadii* и *Chl. reinhardtii* демонстрирует их заметное сходство. Однако в кинетике переноса энергии в ФС1 из *C. ohadii* имеются более медленные компоненты, вероятно, обусловленные различием в структуре этих комплексов. В целом, полученные данные свидетельствуют, что реакции разделения зарядов в ФС1 всех анализируемых организмов при возбуждении ССА лимитированы переносом возбуждения в РЦ, при этом скорость переноса энергии и образование ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ замедляется в ряду *Synechocystis* 6803 → *Chl. reinhardtii* → *C. ohadii*. При непосредственном возбуждении ФС1 цианобактерии *Synechocystis* 6803 в красный край полосы Qu наблюдаются сверхбыстрые процессы разделения зарядов в экситонно-сопряженной системе кофакторов РЦ. Сравнение ФС1 из цианобактерий и зеленых водорослей показывает, что размер антенны существенно ограничивает скорость образования ион-радикальной пары. Несмотря на сходный общий размер и близкую структуру ФС1 из *C. ohadii* и *Chl. reinhardtii*, ССА из *C. ohadii* включает длинноволновую фракцию Хл а, перенос энергии возбуждения от которой в РЦ происходит во временном диапазоне 150 пс.

Вклад авторов. Д.А. Черепанов – анализ результатов спектральных измерений, написание текста; М.С. Фадеева – выращивание культуры клеток *C. ohadii*, выделение из них комплексов ФС1; А.А. Петрова – характеристика препаратов ФС1; Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев – проведение фемтосекундных измерений; В.А. Надточенко – концепция работы; А.Ю. Семенов – написание и редактирование текста, руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-10085).

Благодарности. В работе использовано оборудование (фемтосекундная установка) Центра коллективного пользования ФИЦ ХФ РАН «Анализ химических, биологических систем и природных материалов: масс-спектральная микроскопия и фемтосекундная лазерная микроскопия-спектроскопия» (рег. номер: 506694).

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. Treves, H., Raanan, H., Finkel, O. M., Berkowicz, S. M., Keren, N., Shotland, Y., and Kaplan, A. (2013) A newly isolated *Chlorella* sp. from desert sand crusts exhibits a unique resistance to excess light intensity, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **86**, 373-380, <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12162>.
2. Caspy, I., Neumann, E., Fadeeva, M., Liveanu, V., Savitsky, A., Frank, A., Kalisman, Y. L., Shkolnisky, Y., Murik, O., Treves, H., Hartmann, V., Nowaczyk, M. M., Schuhmann, W., Rögner, M., Willner, I., Kaplan, A., Schuster, G., Nelson, N., Lubitz, W., and Nechushtai, R. (2021) Cryo-EM photosystem I structure reveals adaptation mechanisms to extreme high light in *Chlorella ohadii*, *Nat. Plants*, **7**, 1314-1322, <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00983-1>.
3. Mazor, Y., Borovikova, A., and Nelson, N. (2017) The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution, *Nat. Plants*, **3**, 17014, <https://doi.org/10.7554/eLife.07433>.
4. Qin, X., Pi, X., Wang, W., Han, G., Zhu, L., Liu, M., Cheng, L., Shen, J. R., Kuang, T., and Sui, S. F. (2019) Structure of a green algal photosystem I in complex with a large number of light-harvesting complex I subunits, *Nat. Plants*, **5**, 263-272, <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0379-y>.
5. Su, X., Ma, J., Pan, X., Zhao, X., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X., and Li, M. (2019) Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I-LHCI supercomplex, *Nat. Plants*, **5**, 273-281, <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0380-5>.
6. Suga, M., Ozawa, S. I., Yoshida-Motomura, K., Akita, F., Miyazaki, N., and Takahashi, Y. (2019) Structure of the green algal photosystem I supercomplex with a decameric light-harvesting complex I, *Nat. Plants*, **5**, 626-636, <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0438-4>.
7. Semenov, A. Y., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Shuvalov, V. A., Sarkisov, O. M., and Nadtochenko, V. A. (2012) Primary steps of electron and energy transfer in photosystem I: effect of excitation pulse wavelength., *Biochemistry*, **77**, 1011-1020, <https://doi.org/10.1134/S0006297912090088>.
8. Cherepanov, D. A., Semenov, A. Y., Mamedov, M. D., Aybush, A. V., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Shuvalov, V. A., and Nadtochenko, V. A. (2022) Current state of the primary charge separation mechanism in photosystem I of cyanobacteria, *Biophys. Rev.*, **14**, 805-820, <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00983-1>.
9. Savikhin, S., and Jankowiak, R. (2014) Mechanism of primary charge separation in photosynthetic reaction centers, in *The Biophysics of Photosynthesis* (Golbeck, J., and van der Est, A., eds) Springer New York, NY, pp. 193-240, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1148-6_7.
10. Fromme, P., Jordan, P., and Krauß, N. (2001) Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 5-31, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5).
11. Mazor, Y., Nataf, D., Toporik, H., and Nelson, N. (2014) Crystal structures of virus-like photosystem I complexes from the mesophilic cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, *Elife*, **3**, e01496, <https://doi.org/10.7554/elife.01496>.
12. Suga, M., and Shen, J. R. (2020) Structural variations of photosystem I-antenna supercomplex in response to adaptations to different light environments, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **63**, 10-17, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.02.005>.
13. Bai, T., Guo, L., Xu, M., and Tian, L. (2021) Structural diversity of photosystem I and its light-harvesting system in eukaryotic algae and plants, *Front. Plant Sci.*, **12**, 781035, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781035>.
14. Müller, M. G., Niklas, J., Lubitz, W., and Holzwarth, A. R. (2003) Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 1. A new interpretation of the energy trapping and early electron transfer steps in photosystem I, *Biophys. J.*, **85**, 3899-3922, [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(03\)74804-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(03)74804-8).
15. Holzwarth, A. R., Müller, M. G., Niklas, J., and Lubitz, W. (2006) Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 2: mutations near the P700 reaction center

- chlorophylls provide new insight into the nature of the primary electron donor, *Biophys. J.*, **90**, 552-565, <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.059824>.
16. Müller, M. G., Slavov, C., Luthra, R., Redding, K. E., and Holzwarth, A. R. (2010) Independent initiation of primary electron transfer in the two branches of the photosystem I reaction center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4123-4128, <https://doi.org/10.1073/pnas.0905407107>.
 17. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F.E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Nadtochenko, V. A. (2020) Generation of ion-radical chlorophyll states in the light-harvesting antenna and the reaction center of cyanobacterial photosystem I, *Photosynth. Res.*, 1-19, <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00731-0>.
 18. Savikhin, S., Xu, W., Chitnis, P. R., and Struve, W. S. (2000) Ultrafast primary processes in PS I from *Synechocystis* sp. PCC 6803: roles of P700 and A0, *Biophys. J.*, **79**, 1573-1586, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76408-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76408-3).
 19. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Sarkisov, O. M., Nadtochenko, V. A., Shuvalov, V. A., and Semenov, A. Y. (2010) Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 1410-1420, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.026>.
 20. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Petrova, A. A., Aybush, A. V., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Nadtochenko, V. A. (2017) Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Q_y band, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1858**, 895-905, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.08.008>.
 21. Cherepanov, D. A., Brady, N. G., Shelaev, I. V., Nguyen, J., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Nadtochenko, V. A., and Bruce, B. D. (2020) PSI-SMALP, a detergent-free cyanobacterial photosystem I, reveals faster femtosecond photochemistry, *Biophys. J.*, **118**, 337-351, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.3391>.
 22. Shen, G., Antonkine, M. L., van der Est, A., Vassiliev, I. R., Brettel, K., Bittl, R., Zech, S. G., Zhao, J., Stehlik, D., Bryant, D. A., and Golbeck, J. H. (2002) Assembly of photosystem I. II. Rubredoxin is required for the *in vivo* assembly of F(X) in *Synechococcus* sp. PCC 7002 as shown by optical and EPR spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20355-20366, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201104200>.
 23. Dobryakov, A. L., Pérez Lustres, J. L., Kovalenko, S. A., and Ernstring, N. P. (2008) Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications, *Chem. Phys.*, **347**, 127-138, <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2007.11.003>.
 24. Golubeva, E. N., Zubanova, E. M., Melnikov, M. Y., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., and Nadtochenko, V. A. (2014) Femtosecond spectroscopy and TD-DFT calculations of CuCl₄²⁻ excited states, *Dalt. Trans.*, **43**, 17820-17827, <https://doi.org/10.1039/C4DT01409J>.
 25. Dobryakov, A. L., Kovalenko, S. A., Weigel, A., Pérez-Lustres, J. L., Lange, J., Müller, A., and Ernstring, N. P. (2010) Femtosecond pump/supercontinuum-probe spectroscopy: optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing, *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, <https://doi.org/10.1063/1.3492897>.
 26. Cherepanov, D. A., Neverov, K. V., Obukhov, Y.N., Maleeva, Y. V., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Aybush, A. V., Kritsky, M. S., and Nadtochenko, V. A. (2023) Femtosecond dynamics of excited states of chlorophyll tetramer in water-soluble chlorophyll-binding protein BoWSCP, *Biochemistry*, **88**, 1580-1595, <https://doi.org/10.1134/S0006297923100139>.
 27. Cherepanov, D. A., Petrova, A. A., Mamedov, M. D., Vishnevskaya, A. I., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Aybush, A. V., and Nadtochenko, V. A. (2022) Comparative absorption dynamics of the singlet excited states of chlorophylls *a* and *d*, *Biochem.*, **87**, 1179-1186, <https://doi.org/10.1134/S000629792210011X>.
 28. Stokkum, I. H. M. Van, Larsen, D. S., and van Grondelle, R. (2004) Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1657**, 82-104, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.04.011>.
 29. Malavath, T., Caspy, I., Netzer-El, S. Y., Klaiman, D., and Nelson, N. (2018) Structure and function of wild-type and subunit-depleted photosystem I in *Synechocystis*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 645-654, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.02.002>.
 30. Witt, H., Bordignon, E., Carbonera, D., Dekker, J. P., Karapetyan, N., Teutloff, C., Webber, A., Lubitz, W., and Schlodder, E. (2003) Species-specific differences of the spectroscopic properties of P700: analysis of the influence of non-conserved amino acid residues by site-directed mutagenesis of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 46760-46771, <https://doi.org/10.1074/jbc.M304776200>.
 31. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Petrova, A., Aybush, A. V., Nadtochenko, V. A., Xu, W., Golbeck, J. H., and Semenov, A. Y. (2021) Primary charge separation within the structurally symmetric tetrameric Chl_{2A}P_AP_BChl_{2B} chlorophyll exciplex in photosystem I, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **217**, 112154, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112154>.
 32. Petrova, A. A., Casazza, A. P., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Nadtochenko, V. A., Semenov, A. Y., Santabarbara, S., and Cherepanov, D. A. (2023) Role of pheophytin *a* in the primary charge separation of pho-

- tosystem I from *Acaryochloris marina*: femtosecond optical studies of excitation energy and electron transfer reactions, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1864**, 148984, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2023.148984>.
33. Provencher, S. W. (1982) CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Comput. Phys. Commun.*, **27**, 229-242, [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(82\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90174-6).

SPECIFICITY OF PHOTOCHEMICAL ENERGY CONVERSION IN PHOTOSYSTEM I FROM THE GREEN MICROALGA *Chlorella ohadii*

D. A. Cherepanov^{1,2*}, A. A. Petrova², M. S. Fadeeva³, F. E. Gostev¹, I. V. Shelaev¹,
V. A. Nadtochenko^{1,4}, and A. Yu. Semenov^{1,2*}

¹ N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: tcherepanov@gmail.com

² A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: semenov@belozersky.msu.ru

³ The George S. Wise Faculty of Life Sciences, 69978 Tel Aviv, Israel

⁴ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Primary excitation energy transfer and charge separation reactions in photosystem I (PSI) from the extremophile desert green alga *Chlorella ohadii*, grown in low light, were studied using broadband femtosecond pump-probe spectroscopy in the spectral range from 400 to 850 nm and in the time range of 50 fs–500 ps. Photochemical reactions were induced by the excitation into the blue and red edges of the chlorophyll Qy absorption band, and compared with similar processes in PSI from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. When PSI from *C. ohadii* was excited at a wavelength of 660 nm, the processes of energy redistribution in the light-harvesting antenna of the complex were observed in a time interval of up to 25 ps, while the formation of a stable ion-radical pair $P_{700}^+A_1^-$ was kinetically heterogeneous with characteristic times of 25 and 120 ps. With an alternative variant of excitation into the red edge of the Qy band at a wavelength of 715 nm, in half of the complexes, primary charge separation reactions were observed in the time range of 7 ps. In the rest of the complexes, the formation of the ion-radical pair $P_{700}^+A_1^-$ was limited by energy transfer and occurred with a characteristic time of 70 ps. Similar photochemical reactions in PSI from *Synechocystis* 6803 were significantly faster: upon excitation at a wavelength of 680 nm, in ~30% of the complexes, the formation of primary ion-radical pairs occurred with a time of 3 ps. Upon excitation at 720 nm, kinetically unresolvable ultrafast primary charge separation was observed in half of the complexes, and the subsequent formation of a $P_{700}^+A_1^-$ ion-radical pair was observed at 25 ps. The photodynamics of PSI from *C. ohadii* had a noticeable similarity with the processes of excitation energy transfer and charge separation in PSI from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*; however, in the PSI from *C. ohadii* slower components in the energy transfer dynamics were also observed.

Keywords: green alga *Chlorella ohadii*, femtosecond laser spectroscopy, primary photochemical reactions, excitonic dynamics, charge separation

**К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
АЛЕКСАНДРА ЯКОВЛЕВИЧА ФРИДЕНШТЕЙНА,
ВЫДАЮЩЕГОСЯ СОВЕТСКОГО И РОССИЙСКОГО УЧЁНОГО,
ГИСТОЛОГА, ГЕМАТОЛОГА, ИММУНОЛОГА,
ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА АМН СССР И РАМН**

© 2024 А.В. Пронин¹, А.И. Куралесова¹, Ю.Ф. Горская¹, А.Г. Грошева¹,
Ю.В. Герасимов¹, Е.Н. Генкина¹, А.И. Зорина², В.Л. Зорин²

¹ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, 123098 Москва, Россия

²ПАО «Артген биотех», 119333 Москва, Россия; электронная почта zorin@hsci.ru

Александр Яковлевич Фриденштейн – выдающийся советский и российский учёный, имя которого как открывателя мультипотентных мезенхимальных стволовых стромальных клеток (МСК), создателя концепции кроветворного и лимфоидного микроокружения органов гемо- и лимфопоза широко известно в отечественном и мировом научном сообществе.

Будущий учёный родился в Киеве в 1924 году. По окончании школы он поступил в Военно-медицинскую академию им. С.М. Кирова в Ленинграде (Санкт-Петербурге), но в 1945 г. по состоянию здоровья был демобилизован из академии и вернулся в Москву, где был зачислен в Московский медицинский институт МЗ РСФСР. Студентом он принимал активное участие в работе кафедры гистологии по теме «Регенерация кожи и костей у амфибий». По окончании учёбы поступил в аспирантуру при кафедре гистологии, продолжая под руководством известных ученых-гистологов А.В. Румянцева и А.Н. Студицкого исследование физиологической и репаративной регенерации кожи и костей у земноводных. В 1950 году А.Я. Фриденштейн успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Гистогенез висцерального скелета высших позвоночных». Профессор А.Н. Студицкий «горячо рекомендовал его как хорошо подготовленного, талантливого, молодого учёного, который может принести пользу в любом научно-исследовательском институте».

Дальнейшая научная деятельность Александра Яковлевича была связана с НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР, где он начинал в должности младшего научного сотрудника в отделе специфической профилактики и терапии туберкулёза, руководимом проф. А.И. Тогуновой. А затем в 1955 году он перешёл в отдел радиационной микробиологии под руководством академика В.Л. Троицкого, основоположника отечественной радиационной микробиологии и иммунологии. Отдел был

создан в связи с развитием использования мирного атома и проведением испытаний ядерного оружия. Эти факторы определили направления исследований: фагоцитоз, естественный иммунитет у облученных животных. В центре научных интересов А.Я. Фриденштейна было изучение новообразованной костной ткани, индуцированной факторами, вырабатываемыми переходным эпителием мочевого пузыря. Результатом исследования этой темы стала докторская диссертация «Гистогенетический анализ внескелетного остеогенеза» (по специальности «гистология»), которую он защитил в 1960 г.; ему была присуждена степень доктора биологических наук.

В 1963 г. в отделе была создана лаборатория иммуноморфологии, которой А.Я. Фриденштейн руководил 25 лет. В том же году Александр Яковлевич впервые начал и потом продолжал в течение 30 лет преподавать иммуноморфологию студентам кафедры гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Большая эрудиция, нетривиальный ум, оригинальность мышления, использование в лекциях новейших материалов по иммунологии привлекали в аудиторию и студентов других кафедр, и преподавателей. А.Я. Фриденштейн пользовался у студентов огромной популярностью, его авторитет как учёного был непоколебимым. Количество желающих работать у него было столь велико, что в результате 70–75% сотрудников его лаборатории составили выпускники кафедры гистологии.

Замечательно точно описал атмосферу, царившую в лаборатории, Давид Георгиевич Иоселиани, известнейший учёный, профессор, академик РАН, начинавший свою научную деятельность аспирантом в лаборатории Фриденштейна: «Возглавляемый им коллектив жил на одном дыхании: бесконечные разнообразные эксперименты, обсуждение полученных данных, споры. И всё это в демократичной, интеллигентной атмосфере...

Беседы с учителем происходили довольно редко, но этого было достаточно, чтобы надолго зарядиться новыми мыслями, идеями. При своей демократичности и мягкости Александр Яковлевич был строгим и требовательным. И чрезвычайно скромным. Не чины и должности, а только сама Наука, радость поиска, всегда была для него главной».

Фриденштейн был одним из организаторов и активным участником Клуба иммунологов, созданного директором Института НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи академиком О.В. Барояном. Этот Клуб стал кузницей будущих директоров институтов и заведующих лабораториями. Не пропускал он и дискуссионные семинары И.М. Гельфанда, одного из крупнейших математиков XX века, на которые приглашали не только математиков, но и ведущих биологов, врачей. Но любимым детищем А.Я. Фриденштейна оставалась лаборатория иммуноморфологии. Им была создана серьезная научная школа, подготовлены 22 кандидата и 10 докторов наук, были опубликованы в соавторстве 212 статей и 6 монографий, одна из которых написана совместно с известным гематологом проф. И.Л. Чертковым – «Кроветворное микроокружение». Эта книга остаётся настольной для биологов и врачей. Увлечение работами выдающихся ученых И.И. Мечникова, А.А. Максимова, создавших на грани XIX–XX вв. новое научное направление – иммуноморфологию, определило круг исследований Александра Яковлевича: изучение гистогенетических отношений между кроветворными и лимфоидными клетками и стромой органов гемо- и лимфопоэза. Основным методом работы на первом этапе была гетеротопная трансплантация костного мозга, фрагменты которого, помещенные под капсулу почки, формировали кость с костным мозгом. Впервые было установлено, что формирование кроветворного органа на месте трансплантации фрагмента костного мозга обеспечивается приживлением стромальных костномозговых клеток, а именно популяцией клеток, которые способны дифференцироваться, образуя костную, хрящевую, фиброзную, жировую ткани. Методом повторных трансплантаций костного мозга с использованием межлинейных гибридов был проведен дискриминантный анализ принадлежности стромальной ткани [1, 2]. Эти пионерские работы А.Я. Фриденштейна, А.И. Куралесовой, позже и К.В. Петракова показали, что стромальные клетки способны к длительному самоподдержанию и являются самостоятельной, независимой от кроветворной, линией клеток. В костном мозге радиационных химер остеогенная ткань принадлежит реципиенту, а кроветворная ткань – донору, тогда как в гетеротопных трансплантатах фрагментов костного мозга остеогенная ткань имеет донорское происхождение, а кроветворные посте-

пенно замещаются реципиентскими [3, 4]. Выводы о независимости стромальных клеток от кроветворных были получены при использовании толерантных животных [5]. К аналогичному выводу о независимости стромальных клеток от лимфоидных элементов пришёл М.С. Дидух при применении антилинейных сывороток в ходе трансплантации лимфатических узлов и тимуса [6]. На втором этапе исследования были проведены на модели *in vitro*. Учеником А.Я. Фриденштейна Рубеном Карповичем Чайлахяном были разработаны методы визуализации стромальных клеток костного мозга, получения *in vitro* клонов стромальных клеток костного мозга и моноклональных диплоидных штаммов костного мозга. Все эти методы получили безоговорочное международное признание и активно востребованы сегодня [7, 8]. Последователи А.Я. Фриденштейна Р.К. Чайлахян, А.А. Иванов-Смоленский, Н.В. Лациник, Ю.В. Герасимов, А.И. Куралесова с помощью цейтраферной съёмки, хромосомных меток (половых хромосом или хромосом T₆T₆) и по данным типирования по изоантигенам доказали, что дискретные колонии фибробластов, образующиеся *in vitro*, являются клонами [9–11]. Трансплантации *in vivo* штаммов фибробластов в желатиновых губках под капсулу почки приводят к образованию исходного органа. Именно эти клетки ответственны за создание специфического микроокружения. Они способны формировать 4 типа тканей: костную, хрящевую, ретикулярную, жировую. С помощью методов Р.К. Чайлахяна учёные лаборатории А.Я. Фриденштейна исследовали пролиферативные и дифференцировочные потенции МСК, их количественное содержание в органах и тканях организма, в крови в норме, при патологии и облучении, взаимодействии с антигенами, с кроветворными и лимфоидными клетками, при кюретаже и при трансплантации диссоциированных клеток костного мозга [12–14]. Способность клеток к самоподдержанию в течение 40 пассажей при сохранении диплоидности позволили перейти к применению МСК в клинике [15]. Костный мозг, извлеченный у пациента, культивировали *in vitro* 1,5–2 месяца и помещали на носители в место травмы. В течение 2 месяцев вновь образованная кость заполняла всю полость, обеспечивая полную социализацию пациента. Переход А.Я. Фриденштейна и его достойного преемника Р.К. Чайлахяна, унаследовавшего его лабораторию, к внедрению стволовых стромальных клеток в практику здравоохранения стал апофеозом их научной и врачебной деятельности.

Александр Яковлевич плодотворно сотрудничал и с зарубежными коллегами. Так, по результатам его совместной работы с М. Owen (Оксфорд, Англия) были опубликованы статьи по дифференцировке и маркерам остеогенных клеток,

с лабораторией Р. Robby (Бетесда, США) – статьи о влиянии ростовых факторов на эффективность клонирования МСК костного мозга [16].

Методы, разработанные А.Я. Фриденштейном и его учениками, актуальны по сей день и востребованы как в научных исследованиях, так и

в клинической практике. Они дали возможность откликнуться на новые веяния в терапии: например, использование экзосом, обладающих значительными терапевтическими возможностями.

Имя великого учёного А.Я. Фриденштейна навсегда останется в истории мировой науки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fridenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kuralesova, A. I., and Frolova, G. P. (1968) Precursor cells for osteogenic and hemopoietic tissue. Analysis of heterotopic transplants of bone marrow, *Transplantation*, **6**, 230-247, <https://doi.org/10.1097/00007890-196803000-00009>.
2. Фриденштейн А. Я., Петракова К. В., Куралесова А. И., Фролова Г. П. (1968) Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга, *Цитология*, **10**, 557-567.
3. Fridenstein, A. J., Kuralesova A. I. (1971) Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras, *Transplantation*, **12**, 99-108.
4. Фриденштейн А. Я., Куралесова А. И. (1971) Остеогенные клетки-предшественники костного мозга радиохимер. Анализ методом гетеротопной трансплантации, *Онтогенез*, **2**, 455-465.
5. Куралесова А. И. (1970) Гетеротопные трансплантаты костного мозга толерантных животных, *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.*, **7**, 97-100.
6. Дидух М. С., Фриденштейн А. Я. (1970) К вопросу о гистогенетических отношениях между лимфоцитами и ретикулярными клетками при трансплантации лимфатических узлов, *Цитология*, **12**, 901-912.
7. Чайлахян Р. К., Лалыкина К. С. (1969) Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки, *ДАН СССР*, **187**, 473-479.
8. Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лалыкина К. С. (1970) О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок, *Цитология*, **12**, 1147-1155.
9. Иванов-Смоленский А. А., Грошева А. Г. (1978) Гетерологические антисыворотки к стромальным механоцитам костного мозга, *Бюл. Экспер. Биол. Мед.*, **4**, 451-454.
10. Иванов-Смоленский А. А., Горская Ю. Ф., Куралесова А. И., Лациник Н. В. (1976) Происхождение стромальных механоцитов в культурах костного мозга, *Бюл. Экспер. Биол. Мед.*, **10**, 1270-1271.
11. Иванов-Смоленский А. А., Чайлахян Р. К., Герасимов Ю. В., Куралесова А. И., Лациник Н. В. Горская Ю. Ф. (1978) Происхождение стромальных механоцитов костного мозга по данным их типирования по изоантигенам и хромосомным маркерам, *Онтогенез*, **9**, 245-252.
12. Кулагина Н. Н., Сидоренко А. В., Фриденштейн А. Я. (1978) Влияние стромальных механоцитов на антителообразующие клетки, *Цитология*, **20**, 808-814.
13. Кузьменко Г. Н., Панасюк А. Ф., Фриденштейн А. Я., Кулагина Н. Н. (1972) Радиочувствительность клеток костного мозга, образующих колонии фибробластов в монослойных культурах, *Бюл. Экспер. Биол. Мед.*, **10**, 94-97.
14. Фриденштейн А. Я., Лациник Н. В., Куралесова А. И., Чайлахян Р. К., Горская Ю. Ф. (1983) Итоги науки и техники, *Иммунология*, **12**, 5-28.
15. Осепян И. А., Чайлахян Р. К., Гарибян Э. С., Айвазян В. П. (1987) Лечение несросшихся переломов, ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией аутологичных костномозговых фибробластов, выращенных *in vitro*, *Ортопед. Травмотол. Протезир.*, **9**, 59-61.
16. Owen, M. E., and Friedenstien, A. J. (1988) Stromal stem cells, marrow derived osteogenic precursors, *Ciba Found. Symp.*, **136**, 42-60, <https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4>.