

Том 89, Номер 9

ISSN 0320-9725

Сентябрь 2024



БИОХИМИЯ



СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 9, 2024

- Универсальный адаптерный белок Bag3 и малые белки теплового шока (обзор)
*М.А. Замотина, Л.К. Муранова, А.И. Заболотский, П.А. Тюрин-Кузьмин,
К.Ю. Кулебякин, Н.Б. Гусев* 1479
- Роль филамина С в мышечных клетках (обзор)
*Д.В. Голиусова, М.Ю. Шарикова, К.А. Лаврентьева, О.С. Лебедева, Л.К. Муранова,
Н.Б. Гусев, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова* 1492
- Разнообразие молекулярных функций РНК-связывающих убиквитинлигаз
из белкового семейства MKRN (обзор)
Е.А. Гусева, М.А. Емельянова, В.Н. Сидорова, А.Н. Тюльпаков, О.А. Донцова, П.В. Сергиев 1506
- Аномальная температурная зависимость триплет-триплетного переноса энергии
в реакционных центрах мутанта I(L177)H *Cereibacter sphaeroides*
Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков 1523
- Влияние содержания в условиях повышенной скученности на социальное поведение крыс
и экспрессию генов, связанных с нейровоспалением
И.В. Павлова, Н.Д. Брошевицкая, А.А. Потехина, А.М. Швадченко 1532
- Состав белков экзосом сыворотки крови пациентов, перенесших ишемический инсульт,
ассоциирован с когнитивными нарушениями в постинсультном периоде
Т.А. Дружкова, М.Ю. Жанина, Е.Е. Владимирова, А.Б. Гехт, Н.В. Гуляева 1546
- Новый подход для исследования ингибиторов поли(ADP-рибоза)-полимеразы,
основанный на использовании пермеабелизованных адгезированных клеток
*С.И. Шрам, Т.А. Щербакова, Т.В. Абрамова, М.С. Смирновская, А.И. Баландина,
А.В. Куликов, В.К. Швядас, В.Н. Сильников, Н.Ф. Мясоедов, Д.К. Нилов* 1562
- T-Клеточный рецептор, кросс-реактивный к SPR-гомологичным эпитопам коронавирусов
*Я.В. Сердюк, К.В. Зорникова, Д.В. Дианов, Н.О. Иванова, В.Д. Давыдова, Е.И. Фефелова,
Т.А. Ненашева, С.А. Шитиков, А.В. Боголюбова* 1576
- Изменения транскриптомной активности клеток мозга крыс под влиянием
синтетических пептидов на основе адrenокортикотропного гормона
*И.Б. Филиппенков, Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, В.В. Ставчанский, Л.А. Андреева,
Н.Ф. Мясоедов, Н.Г. Левицкая, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова* 1590

CONTENTS

Vol. 89, Issue 9, 2024

- Universal Adapter Protein Bag3 and Small Heat Shock Proteins (Review)
*M. A. Zamotina, L. K. Muranova, A. I. Zabolotskii, P. A. Tyurin-Kuzmin,
K. Yu. Kulebyakin, and N. B. Gusev* 1479
- The Role of Filamin C in Muscle Cells (Review)
*D. V. Goliusova, M. Y. Sharikova, K. A. Lavrenteva, O. S. Lebedeva, L. K. Muranova,
N. B. Gusev, A. N. Bogomazova, and M. A. Lagarkova* 1492
- Diversity of Molecular Functions of RNA-Binding Ubiquitin Ligases from
the MKRN Protein Family (Review)
E. A. Guseva, M. A. Emelianova, V. N. Sidorova, A. N. Tyulpakov, O. A. Dontsova, and P. V. Sergiev 1506
- Anomalous Temperature Dependence of the Triplet-Triplet Energy Transfer
in *Cereibacter sphaeroides* I(L177)H Mutant Reaction Centers
T. Y. Fufina, L. G. Vasilieva, I. B. Klenina, and I. I. Proskuryakov 1523
- The Influence of Long-Term Housing in Overcrowding on the Social Behavior of Rats
and the Expression of Genes Associated with Neuroinflammation
I. V. Pavlova, N. D. Broshevitskaya, A. A. Potekhina, and A. M. Shvadchenko 1532
- Serum Exosome Protein Composition in Ischemic Stroke Patients Is Associated
with Cognitive Impairment in the Post-Stroke Period
T. A. Druzhkova, M. Yu. Zhanina, E. E. Vladimirova, A. B. Guekht, and N. V. Gulyaeva 1546
- A New Approach for Studying Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors
Using Permeabilized Adherent Cells
*S. I. Shram, T. A. Shcherbakova, T. V. Abramova, M. S. Smirnovskaya, A. I. Balandina,
A. V. Kulikov, V. K. Švedas, V. N. Silnikov, N. F. Myasoedov, and D. K. Nilov* 1562
- T-Cell Receptor Cross-Reactive to SPR Homologous Epitopes of Coronaviruses
*Y. V. Serdyuk, K. V. Zornikova, D. V. Dianov, N. O. Ivanova, V. D. Davydova, E. I. Fefelova,
T. A. Nenasheva, S. A. Sheetikov, and A. V. Bogolyubova* 1576
- Changes of Transcriptomic Activity in Rat Brain Cells under the Influence of Synthetic
Adrenocorticotropic Hormone-Like Peptides
*I. B. Filippenkov, N. Y. Glazova, E. A. Sebentsova, V. V. Stavchansky, L. A. Andreeva,
N. F. Myasoedov, N. G. Levitskaya, S. A. Limborska, and L. V. Dergunova* 1590

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АДАПТЕРНЫЙ БЕЛОК Bag3 И МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА

Обзор

© 2024 М.А. Замотина¹, Л.К. Муранова¹, А.И. Заболотский¹,
П.А. Тюрин-Кузьмин², К.Ю. Кулебякин², Н.Б. Гусев^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии,
119991 Москва, Россия; электронная почта: nbgusev@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.04.2024

После доработки 20.05.2024

Принята к публикации 24.05.2024

Белок Bag3 (Bcl-2 associated athanogene) содержит несколько доменов и взаимодействует с большим набором различных белков-партнёров, среди которых есть малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) и белки теплового шока семейства Hsp70. Тройной комплекс Bag3-sHsp-Hsp70 связывает и переносит в фагосомы денатурированные белки и таким образом играет ключевую роль в процессе шаперон-зависимой селективной автофагии (chaperone assisted selective autophagy, CASA). Помимо этого, данный комплекс регулирует сборку стресс-гранул (гранулостаз) и обеспечивает регуляцию цитоскелета. Вследствие того, что Bag3 и белки теплового шока участвуют в различных клеточных процессах, мутации Bag3 и/или sHsp коррелируют с развитием нейродегенеративных заболеваний и кардиомиопатий. В данной работе анализируется роль sHsp в процессах, регулируемых Bag3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Bag3, Hsp70, малые белки теплового шока, избирательная автофагия, протеостаз.

DOI: 10.31857/S0320972524090019 EDN: JKCXIN

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время внимание многих исследователей привлекают адаптерные белки, которые выступают в качестве своеобразных узлов, хабов, с которыми могут взаимодействовать сразу несколько белков. После связывания с белками-адаптерами белки-клиенты, в свою очередь, оказываются способными взаимодействовать с другими белковыми мишенями. Вследствие этого в клетке формируется ансамбль (своеобразный узел), в котором может быть сосредоточено много разных белков, влияющих на активность и свойства друг друга и образующих своеобразные поточные линии, по которым идёт синтез каких-либо метаболитов или происходит эффективная передача сигнала. Одним из таких адаптерных белков

является белок Bag3 (Bcl-2 associated athanogene). Белки семейства Bag вовлечены в регуляцию многочисленных и разнообразных процессов, происходящих в клетке, таких как апоптоз, контроль синтеза белка и качества правильного сворачивания полипептидных цепей, а также передача гормонального сигнала и многие другие жизненно важные процессы.

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА Bag3

В геноме человека представлено 6 генов, кодирующих белки семейства Bag [1]. Аббревиатура Bag производится из сокращения «Bcl-2 associated athanogene» и обусловлена тем, что изначально эту группу белков рассматривали в качестве партнёров белков семейства Bcl (Bcl-2), важных антиапо-

* Адресат для корреспонденции.

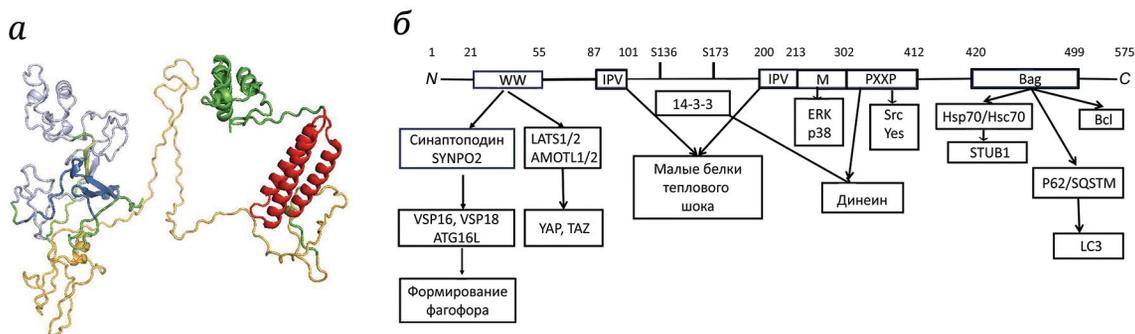


Рис. 1. Модель строения Bag3 PMDB (PN0083680) (а) и функциональные домены Bag3 (б). На панели а WW-домен обозначен тёмно-синим цветом, IPV-домен – сиреневым цветом, короткий М-домен – салатным цветом, длинный PXXP-домен – оранжевым цветом, Bag-домен – красным цветом. Участки структуры, не входящие в функциональные домены, обозначены зелёным цветом. На панели б приведена схема строения Bag3 с обозначением основных доменов и нумерацией аминокислотных остатков. WW-Домен взаимодействует с белками, содержащими полипролиновые последовательности, и обеспечивает связывание с синаптоподином (SYNPO) и протеинкиназами LATS1/2, регулирующими внутриклеточную локализацию коактиваторов транскрипции YAP и TAZ. Домен IPV содержит два участка связывания малых белков теплового шока (sHsp), а также участки, фосфорилирование которых обеспечивает связывание белка 14-3-3 и его взаимодействие с динеином. Домен М обеспечивает взаимодействие с протеинкиназами p38 и ERK, а домен PXXP может связывать белки, обладающие SH2-доменами, такие как Src и Yes. Bag-Домен связывается с антиапоптотическими белками семейства Bcl, а также белками теплового шока Hsp70/Hsc70. Этот домен обеспечивает обмен адениловых нуклеотидов на Hsp70/Hsc70. Hsp70, в свою очередь, связывается с убиквитинлигазой STUB1, обеспечивающей убиквитирование белков-мишеней. Помимо этого, Bag3 за счёт своего Bag-домена связывается и с рецептором автофагии p62/SQSTM1, который взаимодействует с убиквитированным белком-мишенью и расположенным на мембране фагосом белком LC3

птогических белков [1, 2]. Для белков, объединённых в семейство Bag, характерно наличие одного (или нескольких) консервативных Bag-доменов, состоящих из ~80–90 аминокислотных остатков и обеспечивающих взаимодействие этих белков с белками теплового шока Hsp70/Hsc70. Белки семейства Bag отличаются по своим размерам, набору функционально важных доменов, механизмам функционирования и тем процессам, в регуляции которых они принимают участие [2]. В этом обзоре мы ограничимся рассмотрением только одного представителя семейства этих белков, а именно белка Bag3, и лишь вскользь упомянем другого представителя этого семейства, Bag1.

Bag3 человека состоит из 575 аминокислотных остатков и преимущественно локализуется в цитозоле [1], хотя в скелетных мышцах и сердце часть Bag3 может быть связана с сократительным аппаратом в области Z-диска [3]. До последнего времени не было сведений о структуре полноразмерного Bag3, хотя удалось установить структуру Bag-домена (гомологичного для всех белков этого семейства) Bag1 в комплексе с Hsc70 [4]. Были проведены исследования, направленные на моделирование структуры полноразмерного Bag3, и была предложена модель, представленная в базе данных PMDB (PN0083680 [5], рис. 1, а). Согласно этой модели, большая часть молекулы Bag3 имеет не-

упорядоченную структуру и содержит лишь очень небольшое количество β -складок. Упорядоченную структуру имеет только Bag-домен, состоящий из трёх α -спиралей, а также α -спираль в С-концевой части Bag3 [5]. Можно с большим или меньшим доверием относиться к предсказаниям, однако предсказанная структура Bag-домена [5] и его структура, установленная рентгеноструктурным анализом [4], хорошо согласуются между собой. Как бы то ни было, как теоретические предсказания, так и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что большая часть структуры Bag3 мало упорядочена, что позволяет отнести этот белок к группе внутренне разупорядоченных (intrinsically disordered) белков и затрудняет как его кристаллизацию и рентгеноструктурный анализ, так и иные способы анализа структуры этого белка.

В составе Bag3 выделяют несколько функциональных доменов, каждый из которых участвует во взаимодействии с белками-партнёрами и может влиять на функционирование соседних доменов (рис. 1, б). На N-конце располагается так называемый WW-домен, обозначенный так, потому что содержит в своём составе два остатка триптофана (W), отделённых друг от друга 20–22 аминокислотными остатками. Этот домен взаимодействует с полипролиновыми мотивами (PPP_Y, PPS_Y),

Принятые сокращения: Bag3 – Bcl-2 associated athanogene; CASA – chaperone assisted selective autophagy, шаперон-зависимая селективная автофагия; sHsp – small heat shock proteins, малые белки теплового шока.

входящими в структуру нескольких белков, таких как синаптоподин (SYNPO2), протеинкиназы LATS1/2 и адаптерные белки AMOTL1/2 [6, 7]. Синаптоподин (SYNPO2) может взаимодействовать с белками автофагии VPS16, VPS18 и ATG16 [7, 8]. Таким образом, через синаптоподин Bag3 образует комплекс с белками, участвующими в формировании фагофора. Вероятно, именно поэтому подавление синтеза синаптоподина приводит к ингибированию зависимой от шаперонов селективной автофагии (CASA, chaperone-assisted selective autophagy) и ингибирует эффективное удаление фосфорилированного тау-белка в зрелых нейронах [9]. Протеинкиназы LATS1/2 также содержат в своей структуре полипролиновые мотивы, и при этом LATS1/2 способны фосфорилировать YAP и TAZ, выступающие в роли активаторов транскрипционных факторов [10, 11]. В состоянии покоя на WW-домене Bag3 собирается комплекс, состоящий из адаптерного белка AMOTL, протеинкиназы LATS и YAP/TAZ. Это делает возможным фосфорилирование YAP/TAZ под действием LATS. Фосфорилированные YAP/TAZ связываются с другим адаптерным белком 14-3-3 и либо удерживаются в цитозоле, либо подвергаются протеолитической деградации [12]. Таким образом, они не попадают в ядро и не могут активировать транскрипционные факторы TEAD1–4. При стрессе, сопряжённом с накоплением денатурированных и убиквитированных белков, комплекс LATS–YAP/TAZ–AMOTL диссоциирует. Это предотвращает фосфорилирование YAP/TAZ, которые получают свободу перемещаться в ядро, где активируют транскрипционные факторы TEAD1–4 и инициируют транскрипцию определённых генов [12, 13]. Цепочка событий, состоящая в активации (или ингибировании) протеинкиназ LATS и последующем фосфорилировании факторов активации транскрипции, аналогична событиям, происходящим при функционировании регуляторной системы HYPPO, участвующей в процессах дифференцировки, передаче гормонального сигнала и регуляции межклеточных взаимодействий [11, 12, 14]. Любопытно отметить, что передача сигнала по пути HYPPO может регулироваться под действием механического стресса, возникающего при перемещении клеток в вязкой среде или в ходе сократительной активности. При этом высказывается предположение о том, что Bag3 может выступать в роли механосенсора, который обеспечивает передачу сигнала о механических воздействиях, используя описанную выше систему, связанную с фосфорилированием и транслокацией YAP/TAZ в клетке [15].

TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) может связываться с WW-доменом Bag3 за счёт своих PY-мотивов. В мышцах Bag3, расположенный на сокра-

тительном аппарате, связывает TSC1, который может активировать GTPазу малого G-белка RHEB. Этот белок, содержащий в своём составе GDP, ингибирует mTORC1 и таким образом тормозит синтез белка вблизи сократительного аппарата, не затрагивая при этом активность CASA, что приводит к избирательному протеолизу некоторых белков (например, таких как филамин). Одновременно с этим связывание TSC1 на сократительном аппарате уменьшает его концентрацию в цитозоле, вследствие чего mTORC1 цитозоля становится активным и способствует синтезу белка [16].

Вслед за WW-доменом в структуре Bag3 располагается так называемый IPV-домен (рис. 1, б). Судя по предсказаниям [5], он имеет неупорядоченную структуру и содержит только очень короткие β -складки. Такое название этот домен получил потому, что в его структуре есть две короткие последовательности, ограниченные остатками 87–101 и 200–213, содержащими в своём составе последовательности IPIPV и IPVI. Эти последовательности сходны с соответствующими последовательностями, расположенными на C-конце некоторых sHsp, таких как HspB1, HspB4, HspB5. Такие (I/V)P(I/V)-участки способны принимать участие в образовании контактов с гидрофобными канавками, образованными β - и β 8-складками α -кристаллиновых доменов sHsp, и, таким образом, играют важную роль в формировании крупных олигомеров sHsp [17–19]. Было высказано предположение о том, что IPV-мотивы Bag3 (так же как и соответствующие мотивы sHsp) могут взаимодействовать с гидрофобной канавкой, образованной β - и β 8-складками sHsp, и за счёт этого образовывать прочный комплекс с этими белками. Детали этого взаимодействия будут подробно проанализированы в следующем разделе.

Между двумя вышеупомянутыми IPV-мотивами располагаются остатки Ser136 и Ser173, которые могут подвергаться фосфорилированию, после чего становится возможным взаимодействие Bag3 с другим адаптерным белком, 14-3-3 [20, 21]. Этот белок может выступать в качестве адаптера, обеспечивающего связывание Bag3 с динеином, при этом оказывается, что Bag3 взаимодействует с динеином как за счёт 14-3-3, так и напрямую за счёт взаимодействия своего PXXP-домена [20] (рис. 1, а). Такое двухцентровое взаимодействие с динеином делает возможным перемещение Bag3 со всеми связанными с ним белками по микротрубочкам и доставку таких грузов до агрегосом, внутриклеточных центров накопления денатурированных белков, склонных к агрегации. Таким образом, IPV-домен содержит в своём составе важные элементы структуры и играет существенную роль в функционировании Bag3.

Мы более подробно обсудим детали механизма взаимодействия Bag3 с sHsp после описания остальных доменов Bag3.

В центре молекулы Bag3 располагаются так называемые M- и PXXP-домены [6] (рис. 1, б). В этих доменах локализованы участки связывания с различными протеинкиназами. Считается, что в M-домене возможно связывание протеинкиназ p38 и ERK, а в PXXP-домене происходит связывание тирозиновых киназ Yes и Src. Bag3 контролирует взаимодействие ERK с фосфатазой Dusp6, и удаление Bag3 сопровождается диссоциацией Dusp6, что приводит к перманентной активации ERK [22]. Нерецепторные тирозиновые киназы Src (и, вероятно, Yes) связываются с PXXP-доменом Bag3 за счёт своих SH3-доменов [23]. При этом связывание тирозиновых киназ с PXXP-доменом зависит от взаимодействия Bag3 с Hsp70, которое происходит по соседнему высококонсервативному Bag-домени [23]. При мощном протеотоксическом стрессе, т.е. при появлении большого количества денатурированных белков, Hsp70 «отвлекается» на взаимодействие с ними и может диссоциировать от Bag3, что будет влиять на связывание нерецепторных протеинкиназ с Bag3 и их внутриклеточную локализацию и активность.

Любопытно отметить, что, взаимодействуя с разными протеинкиназами, Bag3 может регулировать перемещение активаторов транскрипции из цитозоля в ядро. Как уже отмечалось ранее, при протеотоксическом, а также, вероятно, при механическом стрессе происходит диссоциация комплекса, образованного протеинкиназами LATS1/2 и активаторами транскрипции YAP/TAZ, связанными с доменом WW Bag3. Вследствие этого YAP/TAZ перестаёт фосфорилироваться LATS1/2 по остатку Ser127, становится неспособным взаимодействовать с 14-3-3 и транслоцируется из цитозоля в ядро [6]. Одновременно с этим связанная с PXXP-доменом Bag3 тирозиновая киназа фосфорилирует Tyr357 белка YAP, что ингибирует экспорт YAP из ядра и, таким образом, усиливает его транскрипционную активность [24].

Суммируя, можно заключить, что центральные M- и PXXP-домены Bag3 взаимодействуют и влияют на активность различных протеинкиназ, что делает Bag3 важным участником передачи гормонального сигнала. В этой связи следует отметить, что описанный выше HSP70-путь регуляции очень сложен и включает в себя функционирование большого количества различных протеинкиназ. Достаточно сказать, что активность LATS1/2 регулируется под действием протеинкиназы MST1 и комплекса Сальвадо 1 (SAV1). В то же время активность протеинкиназы MST1 зависит от её фосфорилирования, в котором могут принимать участие MAP-киназы (MAP4K), активность

которых находится под контролем гормонов [10]. Таким образом, Bag3 может опосредованно принимать участие в передаче гормонального сигнала, связанного с регуляцией активности нескольких протеинкиназ.

На C-конце Bag3 располагается консервативный Bag-домен, включающий в себя три длинных α -спирали (рис. 1, а). Этот домен обнаруживается у всех представителей белков семейства Bag и обеспечивает их взаимодействие с несколькими белками-партнёрами. Одним из таких важных партнёров является белок теплового шока Hsp70/Hsc70. Получены кристаллы Bag-домена Bag1 с белком теплового шока Hsc70 и установлено, что представители семейства Bag участвуют в обмене адениловых нуклеотидов в активном центре Hsp70/Hsc70 [4]. Bag1 и Bag3 могут конкурировать за связывание Hsp70 [20, 25, 26], и это может приводить к переключению путей деградации денатурированных белков. Комплекс Bag1-Hsp70, как правило, отправляет денатурированные белки на деградацию в протеасомы, в то время как комплекс Bag3-Hsp70 обеспечивает деградацию денатурированных белков в автофагосомах. Следует заметить, что протеасомной деградации в основном подвергаются изолированные белки или малые белковые комплексы, в то время как крупные агрегаты и органеллы подвергаются деградации в автофагосомах [27]. Автофагосомная и протеасомная системы сложным образом взаимодействуют между собой. Каждая из систем может участвовать в деградации компонентов другой системы и, таким образом, ингибировать её [27]. Однако, как правило, ингибирование одной из систем сопровождается компенсаторным усилением другой системы. При старении или при перегрузке протеасом происходит повышение уровня синтеза Bag3, что приводит к усилению процесса избирательной деградации денатурированных белков в автофагосомах [20, 25]. Обмен адениловых нуклеотидов в АТРазном центре является необходимым условием функционирования Hsp70. Поэтому Bag3, выступающий в качестве фактора обмена нуклеотидов, играет исключительно важную роль в регуляции активности Hsp70. Поскольку Bag3 образует прочные комплексы с Hsp70, повышение концентрации Bag3 (как это ни парадоксально) может приводить не к усилению, а, наоборот, к ослаблению шаперонной активности Hsp70. Это может быть связано с тем, что синтезируемый в больших количествах при хроническом стрессе (вызванном старением, перегрузкой протеасом, синтезом мутантных белков, склонных к агрегации) Bag3 образует прочные комплексы с Hsp70, что затрудняет обмен адениловых нуклеотидов и, таким образом, делает невозможным нормальное функционирование Hsp70,

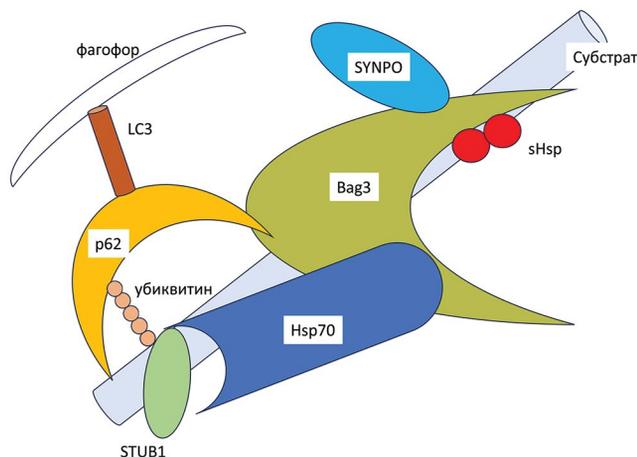


Рис. 2. Схема строения комплекса CASA. Белок-субстрат (голубой цилиндр) связан с HspB8 (два красных кружка) и с субстрат-связывающим центром Hsp70 (темно-синий). Hsp70 связывает убиквитинлигазу STUB1 (светло-зеленый овал), которая убиквитинирует субстрат (отмечено мелкими светло-коричневыми кружками). Bag3 (зеленый полумесяц) связывает рецептор фагосом р62 и через него прикрепляет белковый комплекс к LC3, расположенному на мембране фагосом. Помимо этого, Bag3 через свой WW-домен взаимодействует с SYNPO2 (светло-синий овал) и обеспечивает дополнительное прикрепление к белкам автофагосомного комплекса ATG16, VPS18/16 и к Z-дисульфидной миофибрилле

ингибируя его шаперонную активность [28, 29]. В связи с тем, что Bag-домен играет исключительно важную роль в функционировании Bag3, мутации в этом домене зачастую коррелируют с развитием различных врожденных заболеваний, в том числе различных видов кардиомиопатий [13, 30].

На Bag3, как на подложке, может формироваться комплекс, состоящий из sHsp (связанных с IPV-мотивами) и Hsp70 (связанного с Bag-доменом). При этом белки теплового шока могут удерживать денатурированные белки-субстраты. Hsp70, связавшийся с Bag3, оказывается способным взаимодействовать с E3-убиквитинлигазой (STUB1). За счёт своих тетратрикопептидных доменов STUB1 образует прочные комплексы с Hsp70 [13]. Таким образом, формируется комплекс, состоящий из Bag3, sHsp, Hsp70 и STUB1, который в своём составе содержит денатурированные белки-субстраты. При этом становится возможным убиквитинирование белка-субстрата под действием STUB1. Такой многокомпонентный белковый комплекс оказывается способным взаимодействовать с динеином и транспортируется к центру организации микротрубочек (МТОС) около ядерной мембраны. К этому комплексу добавляется рецепторный белок р62/SQSTM (белок секвестосом 1), который, в свою очередь, связывается с белком LC3 и участвует в образовании фагофор [7, 31–33].

После слияния фагофор с лизосомами завершается процесс CASA (рис. 2).

Bag-Домен не только участвует в связывании Hsp70, но и обеспечивает контакт Bag3 с антиапоптотическими белками семейства Bcl (Bcl2, Bcl-x_l, Mcl-1) [34]. Считается, что связывание с Bag3 стабилизирует белки семейства Bcl, что обеспечивает их высокий антиапоптотический эффект [35].

Суммируя все сказанное, можно заключить, что Bag3 является многодоменным белком, способным взаимодействовать с большим количеством различных белков-партнёров и участвовать в регуляции многочисленных клеточных процессов. Рассмотрим более подробно только один из доменов Bag3, а именно домен IPV, и участие этого домена во взаимодействии с sHsp, а также вовлечённость этого участка в другие процессы, регулируемые Bag3.

МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА И Bag3

В геноме человека обнаружено 10 генов, кодирующих sHsp [36–38]. Мономеры sHsp содержат в своём составе консервативный α-кристаллиновый домен, включающий 80–100 аминокислотных остатков и фланкированный вариabельными по размеру и структуре N- и C-концевыми доменами. При этом некоторые sHsp, такие как HspB6, HspB7, HspB8, представлены в виде мономеров или малых олигомеров (димеров или тетрамеров) [39–41], в то время как другие sHsp, такие как HspB1, HspB4, HspB5, представлены в виде крупных олигомеров, в состав которых могут входить более 20 мономеров [42, 43]. sHsp, склонные к образованию крупных олигомеров, содержат в составе C-концевого домена так называемые (I/V)P(I/V)-мотивы [18]. Эти мотивы контактируют с гидрофобной канавкой, образованной β4–β8-складками соседнего мономера, и способствуют стабилизации крупных олигомеров sHsp [17, 19]. Как уже отмечалось ранее, в структуре Bag3 есть два участка, ограниченных остатками 87–101 и 200–213 и содержащих в своём составе так называемые IPV-мотивы (последовательности IPIPV и IPVI соответственно). Логичным было предположить, что IPV-домены Bag3 также будут взаимодействовать с соответствующей канавкой в α-кристаллиновом домене sHsp. Это предположение было проверено экспериментально. Используя мутантные формы HspB8 и Bag3, Fuchs et al. [44] установили, что удаление любого одного из двух IPV-участков Bag3 не влияет на его взаимодействие с HspB6 или HspB8, в то время как удаление обоих IPV-мотивов исключает такое взаимодействие. Кроме того, было установлено, что мутации в гидрофобной складке, образованной β4–β8-складками sHsp,

также препятствуют образованию комплекса этих белков с Bag3. В этой первой работе было также установлено, что только HspB6 и HspB8 способны прочно взаимодействовать с Bag3. В дальнейшем анализ взаимодействия sHsp и Bag3 был продолжен и расширен. С использованием метода титриметрической калориметрии было изучено взаимодействие Bag3 и его мутантных форм с HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8 [45]. Было установлено, что наибольшим сродством ($K_d \sim 1,2$ мкМ) к Bag3 обладают HspB6 и HspB8, в то время как HspB1 и HspB5 обладали меньшим сродством ($K_d \sim 5-9$ мкМ). Определённое удивление вызывает тот факт, что стехиометрия связывания как sHsp, обладающих олигомерами малых размеров (HspB6 и HspB8), так и sHsp с большим размером олигомеров (HspB1, HspB5) оставалась постоянной и составляла 2 моль sHsp на моль Bag3 [45]. Вероятно, это возможно только в том случае, если Bag3 обладает очень высоким сродством к мономерам sHsp и способен «разбирать» большие олигомеры, извлекая из них мономеры. Именно такой эффект был обнаружен в работе Rauch et al. [45] при анализе взаимодействия HspB1 и Bag3. Сходное явление было обнаружено при исследовании взаимодействия HspB8 и Bag3 [46]. При высоких концентрациях HspB8 склонен формировать крупные комплексы, в которых мономеры слабо взаимодействуют между собой. Сродство Bag3 к HspB8 выше сродства между мономерами HspB8, поэтому Bag3 эффективно извлекает мономеры HspB8 из олигомеров. Любопытно отметить, что K_d комплекса HspB8–Bag3, измеренная в этой работе методом поверхностного плазмонного резонанса, колебалась в интервале 2,4–4,5 нМ, что было значительно меньше аналогичной константы, измеренной методом титриметрической калориметрии.

В литературе описано несколько мутаций остатка Pro209, расположенного во втором IPV-мотиве Bag3. При этом мутация P209L коррелирует с миофибриллярной миопатией, аксональной невропатией, болезнью Шарко–Мари–Тута второго типа и кардиомиопатией; мутация P209Q коррелирует с миофибриллярной миопатией и аксональной сенсомоторной невропатией; и, наконец, мутация P209S коррелирует с болезнью Шарко–Мари–Тута второго типа [30, 47]. При анализе взаимодействия Bag3 дикого типа и его мутантной формы (P209L) с α -кристаллиновым доменом HspB1 оказалось, что анализируемая мутация приводила примерно к трёхкратному увеличению константы диссоциации (от 0,45 мкМ до 1,8 мкМ) и двукратному уменьшению стехиометрии комплекса « α -кристаллиновый домен HspB1/Bag3» от 2 до 1 [48]. Анализ взаимодействия трёх мутантных форм Bag3 с точечными заменами Pro209 (P209/L,S,Q) с белками-партнёрами показал, что

указанная мутация ослабляет взаимодействие с sHsp, но на первых этапах не влияет на сборку комплекса CASA. Такой дефектный комплекс транспортируется динеином к МТОС. На заключительном этапе должно происходить образование фагофор и их слияние с лизосомами, чем в нормальных условиях заканчивается процесс автофагии. Оказалось, что в случае Bag3, мутантного по остатку Pro209, такой мультибелковый комплекс связывается с гистондеацетилазой 6 (HDAC6) и виментином и образует необычно сформированные стабильные, не поддающиеся разборке агрегаты, в которых оказываются имобилизованными как Hsp70, так и все другие белки, участвующие в процессе CASA. Вследствие этого затрудняется процесс избирательной автофагии и развиваются различные патологические процессы [3, 49]. Приведённые данные свидетельствуют о том, что мутация второго IPV-участка хотя и предотвращает связывание sHsp с этим участком в структуре Bag3, однако не влияет на первые этапы сборки CASA-комплекса и его транспортировку по микротрубочкам. В то же время мутация второго IPV-участка делает невозможным протекание заключительных этапов автофагии и иммобилизует компоненты CASA в составе не поддающихся разборке агрегатов. Таким образом, второй IPV-домен не только обеспечивает связывание sHsp, но и оказывает влияние на Bag-домен и нормальное функционирование всего комплекса CASA. В литературе описано две мутации (I94F и R90X), локализованные в первом IPV-мотиве [30]. Однако пока нет сведений о том, как эти мутации влияют на взаимодействие Bag3 с sHsp. Остаток 87 располагается вблизи первого IPV-домена Bag3 мыши. В опытах, проведённых на мышцах, ишемия артерий задних конечностей сопровождалась ишемической миопатией, проявления которой были более тяжёлыми, если животным вводили аденовирус, содержащий ДНК, кодирующую Bag3 с Met в положении 81, чем в случае, когда с помощью аденовируса вводили ДНК, кодирующую Bag3 дикого типа, в котором в этом положении находится остаток Ile [50], и при этом Bag3 с Ile в положении 81 лучше связывал HspB8, чем Bag3, в котором в положении 81 располагался Met. Эти данные свидетельствуют о том, что IPV-домен играет важную роль в функционировании Bag3. С этим выводом хорошо согласуется тот факт, что в IPV-домене Bag3 человека (остатки 55–213) обнаружено несколько точечных мутаций, коррелирующих с развитием дилатационной кардиомиопатии [13, 30].

Анализируя IPV-домен Bag3, естественно задаться вопросом: какие sHsp взаимодействуют с этим участком Bag3. Если исходная точка зрения верна и IPV-мотивы Bag3 действительно взаимо-

действуют только с гидрофобной канавкой, образованной β 4- и β 8-складками α -кристаллинового домена sHsp [44], то, учитывая высокую гомологию α -кристаллинового домена, можно было ожидать, что все sHsp будут взаимодействовать примерно с равным сродством. Тем не менее в ранних работах [44] было установлено, что наиболее прочно с Bag3 взаимодействуют HspB8 и HspB6, а HspB1 практически не связывается с Bag3. В то же время в более поздних исследованиях было установлено, что наибольшим сродством к Bag3 обладает изолированный кристаллиновый домен HspB1 [45]. Было высказано предположение о том, что специфичность взаимодействия определяется гидрофобностью складки, образованной β 4– β 8-складками кристаллиновых доменов sHsp [44], однако это предположение не получило экспериментального подтверждения.

Было обнаружено, что при точечной мутации HspB8 K141E, коррелирующей с дистальной моторной нейропатией, HspB8 располагается в автофагосомах, но они не колокализуются с лизосомами. В то же время HspB8 дикого типа располагается в автофагосомах, колокализованных с лизосомами [51]. Это может быть связано с тем, что мутация в β 6-складке HspB8 (относительно удалённой от гидрофобной канавки, образованной β 4- и β 8-складками) уменьшает сродство HspB8 к Bag3 [52, 53]. Таким образом, не только β 4- и β 8-складки, но и довольно отдалённые участки HspB8 могут играть важную роль во взаимодействии с Bag3. Недавно появились сведения о четырёх новых мутантных формах HspB8 со сдвигом рамки считывания. Сдвиг рамки считывания начинался со 170, 173, 176 или 194 аминокислотных остатков и приводил к синтезу HspB8 с существенно удлинёнными C-концевыми пептидами [54]. Такие мутантные формы HspB8 эффективно взаимодействовали с Bag3. Однако они обладали пониженной растворимостью как в изолированном виде, так и в составе комплексов с Bag3, что приводило к ингибированию процесса CASA и сопровождалось развитием дистальной миопатии с окаймлёнными везикулами (distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV)) [54].

Были предприняты попытки вычлнить роль HspB8 в процессе автофагии на клеточном уровне. Для этого клетки обрабатывали ингибитором протеасом и наблюдали за накоплением и формированием агресом. Было установлено, что HspB8 влияет на взаимодействие Bag3 с белком p62/SQSTM1. При этом HspB8, вероятно, может регулировать фосфорилирование p62/SQSTM1 или его олигомерное состояние [55]. Как бы то ни было, HspB8 влияет на ранние стадии формирования микроагрегатов, которые на поздних этапах попадают в агресомы и подвергаются автофагии.

Таким образом, Bag3 и HspB8 кооперируют в процессах автофагии.

Для понимания механизмов процессов, в которых участвует Bag3, необходимо получить сведения о том, с какими партнёрами этот белок может взаимодействовать одновременно. В опытах *in vitro* было установлено, что Bag3 может одновременно взаимодействовать с Hsp70 и sHsp, образуя тройной комплекс Hsp70–Bag3–HspB8. Более того, HspB8 влиял на способность Bag3 регулировать АТРАЗную активность Hsp70 и увеличивал шаперонную активность комплекса Hsp70–Bag3 при использовании люциферазы в качестве модельного белка-субстрата [45]. Таким образом, представители двух семейств белков теплового шока (Hsp70 и sHsp) могут быть одновременно связаны с Bag3 и способны оказывать взаимное влияние. С этим заключением хорошо согласуются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что нокаут Bag3 или экспрессия точечной мутантной формы E455K, препятствующей взаимодействию мутированного Bag3 с Hsp70, приводили к уменьшению уровня sHsp, при этом наибольшее уменьшение наблюдалось для HspB6 и HspB8, наиболее прочно взаимодействующих с Bag3 [56, 57]. При этом, правда, следует заметить, что в сердцах трансгенных мышей с оверэкспрессией Bag3 уровень sHsp (HspB1 и HspB5) также уменьшался [58]. Авторы считают, что такой эффект ускорения обмена sHsp может быть связан с ускорением автофагии, в процессе которой происходит гидролиз некоторых sHsp. Вероятно, не стоит объединять и сравнивать данные, полученные с разными sHsp. Например, в первичной культуре астроцитов и в клетках глиобластомы человека гиперпродукция HspB5 сопровождалась накоплением агрегатов синуклеина [59]. Авторы объясняют этот неожиданный факт тем, что HspB5 может конкурировать с HspB8 за взаимодействие с Bag3 и таким образом ингибировать процесс автофагии, что приводит к накоплению агрегатов синуклеина. Таким образом, нельзя исключить возможности того, что разные sHsp способны конкурировать между собой и могут оказывать различное влияние на функционирование Bag3. С этим заключением хорошо согласуются экспериментальные данные, полученные при анализе агрегации фрагмента хантингтина, кодируемого ДНК с 43 CAG-повторами, в клетках разного происхождения [60]. Оказалось, что агрегация фрагмента хантингтина эффективно предотвращается комплексом, образованным Bag3 и HspB8. При этом HspB1 не оказывал никакого влияния на предотвращение агрегации. Любопытно отметить, что в этой работе предотвращение агрегации не зависело от присутствия Hsp70, из чего был сделан вывод о том, что в случае некоторых субстратов процесс авто-

фагии может обеспечиваться только HspB8 и Bag3 без участия Hsp70 [60, 61].

Боковой амиотрофический склероз связан с накоплением агрегатов различных белков. Среди этих белков присутствует продукт гена *C9ORF72*. АТГ-независимая транскрипция этого гена приводит к формированию на *N*-конце синтезируемого белка повторяющихся последовательностей аминокислот, кодируемых гексануклеотидной последовательностью G4C2. Эти короткие последовательности – поли(РА), поли(РР), поли(GR), поли(PR) или поли(GA) – приводят к агрегации таких модифицированных белков [62]. Работая на линии immortalized мотонейронов линии NSC32, Cristofani et al. показали, что такие модифицированные белки накапливаются в агрегатах, в состав которых входит p62/SQSTM1, и медленно подвергаются автофагии. Гиперпродукция HspB8 существенно уменьшала образование практически всех возможных типов агрегатов [62]. Боковой амиотрофический склероз может быть также связан с агрегацией некоторых РНК/ДНК-связывающих белков. TAR-ДНК-связывающий белок (TDP43), исходно располагающийся в ядре, способен подвергаться протеолизу с образованием фрагментов TDP25 и TDP35. Эти фрагменты утратили сигнал ядерной локализации и переходят из ядра в цитозоль, при этом являясь очень склонными к агрегации. Накопление агрегатов, содержащих эти белки, может быть причиной развития амиотрофического склероза. Повышение экспрессии HspB8 в immortalized мотонейронах предотвращает накопление агрегатов TDP25 и TDP35 [63]. Анализ экспериментальных данных, выполненный итальянскими учёными, показал, что повышение уровня синтеза HspB8 позволяет затормозить (или полностью предотвратить) накопление агрегатов TDP25, TDP43, мутированной супероксиддисмутазы, а также белков, несущих повторяющиеся дипептиды [64, 65]. Таким образом, HspB8 в комплексе с другими белками системы CASA оказывается способным защищать мотонейроны от накопления вредоносных белковых агрегатов. В этой связи высказывается предположение о том, что разработка и внедрение низкомолекулярных соединений, способствующих увеличению синтеза HspB8, могут быть перспективными для лечения многих нейродегенеративных заболеваний [64].

Стресс может вызывать формирование так называемых стресс-гранул, накапливающихся в цитозоле и образованных РНК и РНК-связывающими белками, такими как FUS, TIA-1 и hnRNPA1. Такие гранулы могут подвергаться разделению фаз и образуют своеобразные капли, лишённые какой-либо оболочки. В норме после окончания стресса эти стресс-гранулы разбираются, освобождая РНК. При патологии со стресс-гранулами могут связы-

ваться продукты неоконченного синтеза белка (или не полностью свёрнутые белки). Это меняет и делает более жёсткой структуру стресс-гранул, которые уже не могут подвергаться диссоциации и образуют опасные для жизнедеятельности клетки агрегаты, которые могут быть причиной развития нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз или фронтотемпоральная деменция [66]. Оказалось, что сразу после стресса HspB8 диссоциирует из комплекса Bag3–Hsp70 и переходит на стресс-гранулы, с которыми оказались связанными не до конца свёрнутые или денатурированные белки [66]. Связавшийся со стресс-гранулами HspB8 привлекает комплекс Bag3–Hsp70, тем самым иницируя и способствуя эффективному функционированию системы CASA. Любопытно отметить, что этот эффект присущ только HspB8 и не может быть реализован другими sHsp, в частности HspB1 [66].

В процессе митоза происходят значительные изменения цитоскелета и, в частности, изменения в структуре актиновых филаментов. При этом в ходе митоза происходит фосфорилирование Bag3 под действием циклин-зависимой протеинкиназы-1 [67], и он в комплексе с HspB8 и p62/SQSTM1 оказывается способным связывать белковый комплекс Arp2/3, регулирующий полимеризацию и ветвление нитей актина, а также гистондеацетилазу 6 типа (HDAC6), регулирующую активность другого актин-связывающего белка, кортактина [68]. Уменьшение уровня HspB8 и/или Bag3 сопровождается нарушением процесса митоза и накоплением двух- или многоядерных клеток [69]. Высказывается предположение о том, что многофункциональный Bag3 может взаимодействовать со многими белками-партнёрами и регулировать различные внутриклеточные активности. При этом после связывания с HspB8 активность Bag3 может переключаться с регуляции процессов автофагии на регуляцию активности цитоскелета [69]. Таким образом, система контроля качества белка (Protein Quality Control, PQC) не только предотвращает агрегацию белков и их избирательный протеолиз, но также может активно участвовать в контроле процессов полимеризации/деполимеризации актина и даже в ориентации веретена деления [70]. Любопытно отметить, что эта последняя активность зависит от HspB8 и p62/SQSTM1 и не зависит от Hsp70 [70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Bag3 является универсальным адаптером, способным взаимодействовать с большим количеством различных белков-партнёров. В частности, Bag3 способен одновременно взаимодействовать

с белком теплового шока Hsp70/Hsc70 и разными sHsp. sHsp узнают и связывают неправильно упакованные или частично денатурированные белки, которые переносятся на Hsp70 и подвергаются убиквитированию под действием связанной с Hsp70 убиквитинлигазы STUB1. Комплекс, состоящий из убиквитированного белка-субстрата, Bag3, Hsp70 и sHsp, переносится с помощью динеина к центру организации микротрубочек, где взаимодействует с рецепторами автофагии p62/SQSTM1 и LC3 и формирует автофагосомы, которые позднее сливаются с лизосомами и обеспечивают так называемую селективную шаперон-зависимую автофагию (CASA). Состав комплекса не постоянен и может включать различный набор компонентов, зависящий от природы белка-субстрата, подвергающегося удалению. Достаточно противоречивые данные свидетельствуют о том, что практически все sHsp могут взаимодействовать с Bag3, однако все сходятся во мнении о том, что HspB8 является основным партнёром Bag3. В будущем представляется важным подробно проанализировать влияние различных sHsp на процессы, находящиеся под контролем Bag3. Мутации HspB8 или участков Bag3, отвечающих за связывание sHsp,

коррелируют с развитием нейродегенеративных заболеваний и/или кардиомиопатий и обусловлены нарушением функционирования системы CASA. Эта система не только участвует в избирательном удалении денатурированных белков, но также может играть важную роль в процессах гранулостаза и регуляции цитоскелета.

Вклад авторов. М.А. Замотина – сбор данных литературы; Л.К. Муранова и А.И. Заболоцкий – анализ данных литературы и редактирование; П.А. Тюрин-Кузьмин и К.Ю. Кулебякин – внесение дополнительных сведений и данных литературы по взаимодействию Bag3 с протеинкиназами; Н.Б. Гусев – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 24-74-10008) и Программы развития МГУ (проект № 23-Ш04-34).

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. Takayama, S., and Reed, J. C. (2001) Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins, *Nat. Cell Biol.*, **3**, E237-E241, <https://doi.org/10.1038/ncb1001-e237>.
2. Kabbage, M., and Dickman, M. B. (2008) The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1390-1402, <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7535-2>.
3. Ruparelia, A. A., Oorschot, V., Vaz, R., Ramm, G., and Bryson-Richardson, R. J. (2014) Zebrafish models of BAG3 myofibrillar myopathy suggest a toxic gain of function leading to BAG3 insufficiency, *Acta Neuropathol.*, **128**, 821-833, <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1344-5>.
4. Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2001) Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors, *Science*, **291**, 1553-1557, <https://doi.org/10.1126/science.1057268>.
5. Basu, S., Naha, A., Veeraraghavan, B., Ramaiah, S., and Anbarasu, A. (2022) In silico structure evaluation of BAG3 and elucidating its association with bacterial infections through protein-protein and host-pathogen interaction analysis, *J. Cell. Biochem.*, **123**, 115-127, <https://doi.org/10.1002/jcb.29953>.
6. Sherman, M. Y., and Gabai, V. (2022) The role of Bag3 in cell signaling, *J. Cell. Biochem.*, **123**, 43-53, <https://doi.org/10.1002/jcb.30111>.
7. Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., Behrends, C., Furst, D. O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., and Hohfeld, J. (2013) Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy, *Curr. Biol.*, **23**, 430-435, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.064>.
8. Zheng, Z., and Song, Y. (2023) Synaptopodin-2: a potential tumor suppressor, *Cancer Cell Int.*, **23**, 158, <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03013-6>.
9. Ji, C., Tang, M., Zeidler, C., Hohfeld, J., and Johnson, G. V. (2019) BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation via autophagy in neuronal processes, *Autophagy*, **15**, 1199-1213, <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1580096>.
10. Du, Y. (2024) The Hippo signalling pathway and its impact on eye diseases, *J. Cell. Mol. Med.*, **28**, e18300, <https://doi.org/10.1111/jcmm.18300>.
11. Veltrop, R. J. A., Kukk, M. M., Topouzidou, K., Didden, L., Muchir, A., van Steenbeek, F. G., Schurgers, L. J., and Harakalova, M. (2024) From gene to mechanics: a comprehensive insight into the mechanobiology

- of LMNA mutations in cardiomyopathy, *Cell Commun. Signal.*, **22**, 197, <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01546-5>.
12. Baldan, S., Meriin, A. B., Yaglom, J., Alexandrov, I., Varelas, X., Xiao, Z. J., and Sherman, M. Y. (2021) The Hsp70-Bag3 complex modulates the phosphorylation and nuclear translocation of Hippo pathway protein Yap, *J. Cell Sci.*, **134**, <https://doi.org/10.1242/jcs.259107>.
 13. Tedesco, B., Vendredy, L., Timmerman, V., and Poletti, A. (2023) The chaperone-assisted selective autophagy complex dynamics and dysfunctions, *Autophagy*, **19**, 1619-1641, <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2160564>.
 14. Baroja, I., Kyriakidis, N. C., Halder, G., and Moya, I. M. (2024) Expected and unexpected effects after systemic inhibition of Hippo transcriptional output in cancer, *Nat. Commun.*, **15**, 2700, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46531-1>.
 15. Gunay, K. A., Silver, J. S., Chang, T. L., Bednarski, O. J., Bannister, K. L., Rogowski, C. J., Olwin, B. B., and Anseth, K. S. (2021) Myoblast mechanotransduction and myotube morphology is dependent on BAG3 regulation of YAP and TAZ, *Biomaterials*, **277**, 121097, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121097>.
 16. Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Ludecke, L., Tapia, V. E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B. K., Furst, D. O., and Hohfeld, J. (2017) The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1864**, 62-75, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.007>.
 17. Delbecq, S. P., Jehle, S., and Klevit, R. (2012) Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'IxI' motif, *EMBO J.*, **31**, 4587-4594, <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.318>.
 18. Janowska, M. K., Baughman, H. E. R., Woods, C. N., and Klevit, R. E. (2019) Mechanisms of small heat shock proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034025>.
 19. Hilton, G. R., Hochberg, G. K., Laganowsky, A., McGinnigle, S. I., Baldwin, A. J., and Benesch, J. L. (2013) C-terminal interactions mediate the quaternary dynamics of alphaB-crystallin, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **368**, 20110405, <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0405>.
 20. Brenner, C. M., Choudhary, M., McCormick, M. G., Cheung, D., Landesberg, G. P., Wang, J. F., Song, J., Martin, T. G., Cheung, J. Y., Qu, H. Q., Hakonarson, H., and Feldman, A. M. (2023) BAG3: nature's quintessential multi-functional protein functions as a ubiquitous intra-cellular glue, *Cells*, **12**, <https://doi.org/10.3390/cells12060937>.
 21. Kogel, D., Linder, B., Brunschweiler, A., Chines, S., and Behl, C. (2020) At the crossroads of apoptosis and autophagy: multiple roles of the co-chaperone BAG3 in stress and therapy resistance of cancer, *Cells*, **9**, <https://doi.org/10.3390/cells9030574>.
 22. Falco, A., Festa, M., Basile, A., Rosati, A., Pascale, M., Florenzano, F., Nori, S. L., Nicolin, V., Di Benedetto, M., Vecchione, M. L., Arra, C., Barbieri, A., De Laurenzi, V., and Turco, M. C. (2012) BAG3 controls angiogenesis through regulation of ERK phosphorylation, *Oncogene*, **31**, 5153-5161, <https://doi.org/10.1038/onc.2012.17>.
 23. Colvin, T. A., Gabai, V. L., Gong, J., Calderwood, S. K., Li, H., Gummuluru, S., Matchuk, O. N., Smirnova, S. G., Orlova, N. V., Zamulaeva, I. A., Garcia-Marcos, M., Li, X., Young, Z. T., Rauch, J. N., Gestwicki, J. E., Takayama, S., and Sherman, M. Y. (2014) Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks, *Cancer Res.*, **74**, 4731-4740, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0747>.
 24. Smoot, R. L., Werneburg, N. W., Sugihara, T., Hernandez, M. C., Yang, L., Mehner, C., Graham, R. P., Bronk, S. F., Truty, M. J., and Gores, G. J. (2018) Platelet-derived growth factor regulates YAP transcriptional activity via Src family kinase dependent tyrosine phosphorylation, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 824-836, <https://doi.org/10.1002/jcb.26246>.
 25. Minoia, M., Boncoraglio, A., Vinet, J., Morelli, F. F., Brunsting, J. F., Poletti, A., Krom, S., Reits, E., Kampinga, H. H., and Carra, S. (2014) BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch, *Autophagy*, **10**, 1603-1621, <https://doi.org/10.4161/auto.29409>.
 26. Rusmini, P., Cristofani, R., Galbiati, M., Cicardi, M. E., Meroni, M., Ferrari, V., Vezzoli, G., Tedesco, B., Messi, E., Piccolella, M., Carra, S., Crippa, V., and Poletti, A. (2017) The role of the heat shock protein B8 (HSPB8) in motoneuron diseases, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 176, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00176>.
 27. Limanaqi, F., Biagioni, F., Gambardella, S., Familiari, P., Frati, A., and Fornai, F. (2020) Promiscuous roles of autophagy and proteasome in neurodegenerative proteinopathies, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, <https://doi.org/10.3390/ijms21083028>.
 28. Hutt, D. M., Mishra, S. K., Roth, D. M., Larsen, M. B., Angles, F., Frizzell, R. A., and Balch, W. E. (2018) Silencing of the Hsp70-specific nucleotide-exchange factor BAG3 corrects the F508del-CFTR variant by restoring autophagy, *J. Biol. Chem.*, **293**, 13682-13695, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002607>.
 29. Roth, D. M., Hutt, D. M., Tong, J., Bouche-careilh, M., Wang, N., Seeley, T., Dekkers, J. F., Beekman, J. M., Garza, D., Drew, L., Masliah, E., Morimoto, R. I., and Balch, W. E. (2014) Modulation of the maladaptive stress response to manage diseases of protein folding, *PLoS Biol.*, **12**, e1001998, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001998>.

30. Lin, H., Koren, S. A., Cvetojevic, G., Girardi, P., and Johnson, G. V. W. (2022) The role of BAG3 in health and disease: A “Magic BAG of Tricks”, *J. Cell. Biochem.*, **123**, 4-21, <https://doi.org/10.1002/jcb.29952>.
31. Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *J. Biol. Chem.*, **282**, 24131-24145, <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>.
32. Turco, E., Savova, A., Gere, F., Ferrari, L., Romanov, J., Schuschnig, M., and Martens, S. (2021) Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation, *Nat. Commun.*, **12**, 5212, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25572-w>.
33. Klimek, C., Kathage, B., Wordehoff, J., and Hohfeld, J. (2017) BAG3-mediated proteostasis at a glance, *J. Cell Sci.*, **130**, 2781-2788, <https://doi.org/10.1242/jcs.203679>.
34. Kirk, J. A., Cheung, J. Y., and Feldman, A. M. (2021) Therapeutic targeting of BAG3: considering its complexity in cancer and heart disease, *J. Clin. Invest.*, **131**, e149415, <https://doi.org/10.1172/JCI149415>.
35. Jacobs, A. T., and Marnett, L. J. (2009) HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynon-enal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins, *J. Biol. Chem.*, **284**, 9176-9183, <https://doi.org/10.1074/jbc.M808656200>.
36. Fontaine, J. M., Rest, J. S., Welsh, M. J., and Benndorf, R. (2003) The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 62-69, [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)8<62:tsodfp>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)8<62:tsodfp>2.0.co;2).
37. Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. A., and de Jong, W. W. (2003) The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 53-61, [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)8<53:thgecs>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)8<53:thgecs>2.0.co;2).
38. Mymrikov, E. V., Seit-Nebi, A. S., and Gusev, N. B. (2011) Large potentials of small heat shock proteins, *Physiol. Rev.*, **91**, 1123-1159, <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2010>.
39. Bukach, O. V., Seit-Nebi, A. S., Marston, S. B., and Gusev, N. B. (2004) Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6), *Eur. J. Biochem.*, **271**, 291-302, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03928.x>.
40. Muranova, L. K., Shatov, V. M., Slushchev, A. V., and Gusev, N. B. (2021) Quaternary structure and hetero-oligomerization of recombinant human small heat shock protein HspB7 (cvHsp), *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7777, <https://doi.org/10.3390/ijms22157777>.
41. Shatov, V. M., Weeks, S. D., Strelkov, S. V., and Gusev, N. B. (2018) The role of the arginine in the conserved N-terminal domain RLFDQxFG motif of human small heat shock proteins HspB1, HspB4, HspB5, HspB6, and HspB8, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, <https://doi.org/10.3390/ijms19072112>.
42. Braun, N., Zacharias, M., Peschek, J., Kastenmuller, A., Zou, J., Hanzlik, M., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Buchner, J., and Weinkauff, S. (2011) Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20491-20496, <https://doi.org/10.1073/pnas.1111014108>.
43. Kaiser, C. J. O., Peters, C., Schmid, P. W. N., Stavropoulou, M., Zou, J., Dahiya, V., Mymrikov, E. V., Rockel, B., Asami, S., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Reif, B., Zacharias, M., Buchner, J., and Weinkauff, S. (2019) The structure and oxidation of the eye lens chaperone alphaA-crystallin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1141-1150, <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0332-9>.
44. Fuchs, M., Poirier, D. J., Seguin, S. J., Lambert, H., Carra, S., Charette, S. J., and Landry, J. (2009) Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction, *Biochem. J.*, **425**, 245-255, <https://doi.org/10.1042/BJ20090907>.
45. Rauch, J. N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S. A., Makley, L. N., Southworth, D. R., and Gestwicki, J. E. (2017) BAG3 is a modular, scaffolding protein that physically links heat shock protein 70 (Hsp70) to the small heat shock proteins, *J. Mol. Biol.*, **429**, 128-141, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.013>.
46. Sciandrone, B., Ami, D., D’Urzo, A., Angeli, E., Relini, A., Vanoni, M., Natalello, A., and Regonesi, M. E. (2023) HspB8 interacts with BAG3 in a “native-like” conformation forming a complex that displays chaperone-like activity, *Protein Sci.*, **32**, e4687, <https://doi.org/10.1002/pro.4687>.
47. Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B. K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A. V., and Engel, A. G. (2009) Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy, *Ann. Neurol.*, **65**, 83-89, <https://doi.org/10.1002/ana.21553>.
48. Meister-Broekema, M., Freilich, R., Jagadeesan, C., Rauch, J. N., Bengoechea, R., Motley, W. W., Kuiper, E. F. E., Minoia, M., Furtado, G. V., van Waarde, M., Bird, S. J., Rebelo, A., Zuchner, S., Pytel, P., Scherer, S. S., Morelli, F. F., Carra, S., Weihl, C. C., Bergink, S., Gestwicki, J. E., et al. (2018) Myopathy associated BAG3 mutations lead to protein aggregation by stalling Hsp70 networks, *Nat. Commun.*, **9**, 5342, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07718-5>.
49. Adriaenssens, E., Tedesco, B., Mediani, L., Asselbergh, B., Crippa, V., Antoniani, F., Carra, S., Poletti, A., and Timmerman, V. (2020) BAG3 Pro209 mutants associated with myopathy and neuropathy relocate chaperones of the CASA-complex to aggresomes, *Sci. Rep.*, **10**, 8755, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65664-z>.

50. McClung, J. M., McCord, T. J., Ryan, T. E., Schmidt, C. A., Green, T. D., Southerland, K. W., Reinardy, J. L., Mueller, S. B., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Keum, S., Marchuk, D. A., Spangenburg, E. E., Dokun, A., Annex, B. H., and Kontos, C. D. (2017) BAG3 (Bcl-2-associated athanogene-3) coding variant in mice determines susceptibility to ischemic limb muscle myopathy by directing autophagy, *Circulation*, **136**, 281-296, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024873>.
51. Kwok, A. S., Phadwal, K., Turner, B. J., Oliver, P. L., Raw, A., Simon, A. K., Talbot, K., and Agashe, V. R. (2011) HspB8 mutation causing hereditary distal motor neuropathy impairs lysosomal delivery of autophagosomes, *J. Neurochem.*, **119**, 1155-1161, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07521.x>.
52. Shemetov, A. A., and Gusev, N. B. (2011) Biochemical characterization of small heat shock protein HspB8 (Hsp22)-Bag3 interaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **513**, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.06.014>.
53. Carra, S., Boncoraglio, A., Kanon, B., Brunsting, J. F., Minoia, M., Rana, A., Vos, M. J., Seidel, K., Sibon, O. C., and Kampinga, H. H. (2010) Identification of the *Drosophila* ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases, *J. Biol. Chem.*, **285**, 37811-37822, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127498>.
54. Tedesco, B., Vendredy, L., Adriaenssens, E., Cozzi, M., Asselbergh, B., Crippa, V., Cristofani, R., Rusmini, P., Ferrari, V., Casarotto, E., Chierichetti, M., Mina, F., Pramaggiore, P., Galbiati, M., Piccolella, M., Baets, J., Baeke, F., De Rycke, R., Mouly, V., Laurenzi, T., et al. (2023) HSPB8 frameshift mutant aggregates weaken chaperone-assisted selective autophagy in neuromyopathies, *Autophagy*, **19**, 2217-2239, <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2179780>.
55. Guilbert, S. M., Lambert, H., Rodrigue, M. A., Fuchs, M., Landry, J., and Lavoie, J. N. (2018) HSPB8 and BAG3 cooperate to promote spatial sequestration of ubiquitinated proteins and coordinate the cellular adaptive response to proteasome insufficiency, *FASEB J.*, **32**, 3518-3535, <https://doi.org/10.1096/fj.201700558RR>.
56. Fang, X., Bogomolovas, J., Wu, T., Zhang, W., Liu, C., Veevers, J., Stroud, M. J., Zhang, Z., Ma, X., Mu, Y., Lao, D. H., Dalton, N. D., Gu, Y., Wang, C., Wang, M., Liang, Y., Lange, S., Ouyang, K., Peterson, K. L., Evans, S. M., et al. (2017) Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3189-3200, <https://doi.org/10.1172/JCI94310>.
57. Fang, X., Bogomolovas, J., Trexler, C., and Chen, J. (2019) The BAG3-dependent and -independent roles of cardiac small heat shock proteins, *JCI Insight*, **4**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126464>.
58. Inomata, Y., Nagasaka, S., Miyate, K., Goto, Y., Hino, C., Toukairin, C., Higashio, R., Ishida, K., Saino, T., Hirose, M., Tsumura, H., and Sanbe, A. (2018) Bcl-2-associated athanogene 3 (BAG3) is an enhancer of small heat shock protein turnover via activation of autophagy in the heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 1141-1147, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.158>.
59. Lu, S. Z., Guo, Y. S., Liang, P. Z., Zhang, S. Z., Yin, S., Yin, Y. Q., Wang, X. M., Ding, F., Gu, X. S., and Zhou, J. W. (2019) Suppression of astrocytic autophagy by alphaB-crystallin contributes to alpha-synuclein inclusion formation, *Translat. Neurodegener.*, **8**, 3, <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0143-7>.
60. Carra, S., Seguin, S. J., Lambert, H., and Landry, J. (2008) HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy, *J. Biol. Chem.*, **283**, 1437-1444, <https://doi.org/10.1074/jbc.M706304200>.
61. Li, F., Xiao, H., Hu, Z., Zhou, F., and Yang, B. (2018) Exploring the multifaceted roles of heat shock protein B8 (HSPB8) in diseases, *Eur. J. Cell Biol.*, **97**, 216-229, <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.03.003>.
62. Cristofani, R., Crippa, V., Vezzoli, G., Rusmini, P., Galbiati, M., Cicardi, M. E., Meroni, M., Ferrari, V., Tedesco, B., Piccolella, M., Messi, E., Carra, S., and Poletti, A. (2018) The small heat shock protein B8 (HSPB8) efficiently removes aggregating species of dipeptides produced in C9ORF72-related neurodegenerative diseases, *Cell Stress Chaperones*, **23**, 1-12, <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0806-9>.
63. Crippa, V., Cicardi, M. E., Ramesh, N., Seguin, S. J., Ganassi, M., Bigi, I., Diacci, C., Zelotti, E., Baratashvili, M., Gregory, J. M., Dobson, C. M., Cereda, C., Pandey, U. B., Poletti, A., and Carra, S. (2016) The chaperone HSPB8 reduces the accumulation of truncated TDP-43 species in cells and protects against TDP-43-mediated toxicity, *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 3908-3924, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw232>.
64. Crippa, V., D'Agostino, V. G., Cristofani, R., Rusmini, P., Cicardi, M. E., Messi, E., Loffredo, R., Pancher, M., Piccolella, M., Galbiati, M., Meroni, M., Cereda, C., Carra, S., Provenzani, A., and Poletti, A. (2016) Transcriptional induction of the heat shock protein B8 mediates the clearance of misfolded proteins responsible for motor neuron diseases, *Sci. Rep.*, **6**, 22827, <https://doi.org/10.1038/srep22827>.
65. Crippa, V., Galbiati, M., Boncoraglio, A., Rusmini, P., Onesto, E., Giorgetti, E., Cristofani, R., Zito, A., and Poletti, A. (2013) Motoneuronal and muscle-selective removal of ALS-related misfolded proteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1598-1604, <https://doi.org/10.1042/BST20130118>.
66. Ganassi, M., Mateju, D., Bigi, I., Mediani, L., Poser, I., Lee, H. O., Seguin, S. J., Morelli, F. F., Vinet, J., Leo, G., Pansarasa, O., Cereda, C., Poletti, A., Alberti, S., and Carra, S. (2016) A surveillance function of the HSPB8-

- BAG3-HSP70 chaperone complex ensures stress granule integrity and dynamism, *Mol. Cell*, **63**, 796-810, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.021>.
67. Luthold, C., Lambert, H., Guilbert, S. M., Rodrigue, M. A., Fuchs, M., Varlet, A. A., Fradet-Turcotte, A., and Lavoie, J. N. (2021) CDK1-mediated phosphorylation of BAG3 promotes mitotic cell shape remodeling and the molecular assembly of mitotic p62 bodies, *Cells*, **10**, <https://doi.org/10.3390/cells10102638>.
 68. Luthold, C., Varlet, A. A., Lambert, H., Bordeleau, F., and Lavoie, J. N. (2020) Chaperone-assisted mitotic actin remodeling by BAG3 and HSPB8 involves the deacetylase HDAC6 and its substrate cortactin, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22010142>.
 69. Varlet, A. A., Fuchs, M., Luthold, C., Lambert, H., Landry, J., and Lavoie, J. N. (2017) Fine-tuning of actin dynamics by the HSPB8-BAG3 chaperone complex facilitates cytokinesis and contributes to its impact on cell division, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 553-567, <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0780-2>.
 70. Fuchs, M., Luthold, C., Guilbert, S. M., Varlet, A. A., Lambert, H., Jette, A., Elowe, S., Landry, J., and Lavoie, J. N. (2015) A role for the chaperone complex BAG3-HSPB8 in actin dynamics, spindle orientation and proper chromosome segregation during mitosis, *PLoS Genet.*, **11**, e1005582, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005582>.

UNIVERSAL ADAPTER PROTEIN Bag3 AND SMALL HEAT SHOCK PROTEINS

Review

**M. A. Zamotina¹, L. K. Muranova¹, A. I. Zabolotskii¹, P. A. Tyurin-Kuzmin²,
K. Yu. Kulebyakin², and N. B. Gusev^{1,2*}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: nbgusev@mail.ru

² Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Fundamental Medicine,
Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Bag3 (Bcl-2 associated athanogene) protein contains several functional domains and interacts with a number of different protein-partners among which are small heat shock proteins (sHsp) and heat shock proteins of Hsp70 family. Triple complex Bag3-sHsp-Hsp70 binds and transports to phagosomes denatured proteins and thus plays key role in chaperone assisted selective autophagy (CASA). In addition, this complex regulates formation and pathway of stress-granules (granulostasis) and participates in cytoskeleton regulation. Since Bag3 and small heat shock proteins participate in many cellular processes mutations of these proteins are often correlate with neurodegenerative diseases and cardiomyopathies. Probable role of sHsp in Bag3 dependent processes is analyzed.

Keywords: Bag3, Hsp70, small heat shock proteins, selective autophagy, proteostasis

РОЛЬ ФИЛАМИНА С В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Обзор

© 2024 Д.В. Голиусова^{1,2*}, М.Ю. Шарикова¹, К.А. Лаврентьева¹, О.С. Лебедева¹, Л.К. Муранова³, Н.Б. Гусев³, А.Н. Богомазова¹, М.А. Лагарькова¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия; электронная почта: daria.goliusova@mail.ru

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

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

Поступила в редакцию 13.06.2024

После доработки 02.07.2024

Принята к публикации 14.08.2024

Филамин С (FLNC) является представителем семейства высокомолекулярных белков, связывающих актиновые филаменты в составе цитоскелета различных типов клеток. В геноме человека FLNC кодируется геном *FLNC*, который расположен на 7-й хромосоме и экспрессируется преимущественно в скелетных и сердечных мышечных клетках. Филамин С участвует в организации и стабилизации трехмерной сети тонких нитей актина в саркомерах и, как предполагается, выполняет роль механосенсора, передающего механические сигналы к различным белковым мишеням. Под действием механического стресса FLNC может утрачивать правильную структуру, что повышает риск его агрегации. Молекулы FLNC с нарушенной нативной структурой могут утилизироваться путем BAG3-опосредованной шаперон-зависимой селективной аутофагии. Мутации гена *FLNC* могут сопровождаться изменениями во взаимодействии FLNC с белками-партнерами и приводить к формированию агрегатов, что перегружает системы аутофагии и протеасомной деградации белков, вследствие чего развиваются различные патологические процессы. Молекулярные механизмы *FLNC*-ассоциированных наследственных заболеваний, называемых филаминопатиями, остаются недостаточно изученными. Данный обзор посвящен анализу структуры и механизмам функционирования филамина С в скелетных и сердечных мышечных клетках в норме и при патологиях, связанных с мутациями гена *FLNC*. Представленные сведения суммируют результаты, полученные на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях, и позволяют наметить перспективные пути дальнейшего изучения патогенетических механизмов филаминопатий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: филамин С, филаминопатия, аутофагия, протеостаз, ИПСК, кардиомиоциты.

DOI: 10.31857/S0320972524090029 EDN: JKCGOZ

ВВЕДЕНИЕ

Филамин С (filamin C, FLNC), наряду со своими гомологами филамином А (FLNA) и филамином В (FLNB), составляют семейство высокомолекулярных белков, связывающих актиновые филаменты в составе цитоскелета различных

клеток млекопитающих [1]. В отличие от паралогичных генов *FLNA* и *FLNB*, которые экспрессируются практически во всех типах соматических клеток, ген *FLNC* экспрессируется у человека преимущественно в скелетных и сердечных мышечных клетках (далее – мышечных клетках), хотя низкий уровень его экспрессии наблюдался

Принятые сокращения: ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; КМ – кардиомиоциты; ИПСК-КМ – кардиомиоциты, дифференцированные из ИПСК; CASA – шаперон-зависимая селективная аутофагия; FLNC, FLNA и FLNB – филамины С, А и В; Hsp – белки теплового шока; LOF и non-LOF – мутации с потерей и без потери функции белка соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

и в других типах клеток [2]. В эмбриональном развитии млекопитающих ген *Flnc* экспрессируется, начиная с ранних стадий дифференцировки миоцитов, и играет важную роль в миогенезе и закладке миокарда [3]. Тотальный и кардиомиоцит-специфичный нокауты гена *Flnc* у мышей приводят к внутриутробной гибели эмбрионов из-за нарушения структурной целостности миокарда желудочков. Индуцибельный нокаут гена *Flnc* во взрослом сердце мышей также летален ввиду обширного фиброза миокарда и стремительного развития симптомов дилатационной кардиомиопатии [3, 4]. У пациентов с наследственными филаминопатиями мутации, как правило, находятся в гетерозиготном состоянии. Мутации в гене *FLNC* приводят к развитию разных типов скелетных и сердечных миопатий: миофибриллярной скелетной миопатии [5, 6], дистальной скелетной миопатии [7], гипертрофической [8], дилатационной [9], аритмогенной [10] и рестриктивной кардиомиопатиям [11]. Высокую вариабельность клинической симптоматики филаминопатий связывают с типом и положением мутаций в гене *FLNC*. Однако тонкие молекулярные механизмы, лежащие в основе различных наследственных нарушений функционирования *FLNC*, остаются неизвестными. Аминокислотные замены, локализованные в разных доменах *FLNC*, могут приводить к изменению взаимодействия *FLNC* с разными партнерами, и, таким образом, несмотря на то что все мутации касаются гена одного и того же белка, пути развития заболевания в каждом случае могут быть разными. К сожалению, до сих пор не решены многие вопросы, касающиеся структуры, функции и механизмов белок-белковых взаимодействий *FLNC*. Для понимания механизмов патогенеза филаминопатий и поиска адекватных методов терапии требуется глубокое изучение *FLNC* и его участия в различных процессах. В данной работе мы предполагаем провести обзор данных литературы, касающихся изолированного филамина С, его взаимодействия с белками-партнерами, механизмов его функционирования и механосенсорной роли. В отличие от ранее опубликованных обзоров, мы постараемся сопоставить данные, полученные на изолированных белках, с таковыми, полученными на клеточном и тканевом уровнях, и наметить наиболее перспективные пути анализа молекулярных механизмов, лежащих в основе филаминопатий.

СТРУКТУРА ГЕНА *FLNC* И ЕГО БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА

У человека ген *FLNC* (NCBI Gene ID: 2318) расположен на длинном плече 7-й хромосомы

в локусе 7q32-35, состоит из 48 экзонов и занимает ~28,8 т.п.н. геномной ДНК [2]. Примерно на 53,6 т.п.н. ниже функционального гена *FLNC* расположен его псевдоген *pseFLNC* (NCBI Gene ID: 392787) в инвертированной ориентации длиной в 1605 п.н. и на 98% идентичный функциональным экзонам 46, 47, 48 и интронам 45 (частично), 46 и 47 гена *FLNC* [12]. Для гена *FLNC* описаны две полноразмерные белок-кодирующие сплайс-изоформы мРНК: каноническая, состоящая из 48 экзонов (NM_001458.5), и неканоническая, состоящая из 47 экзонов (NM_001127487.2). Эти изоформы различаются наличием или отсутствием кассетного экзона (экзон 31), кодирующего шарнирную область (петлю 1) филамина С [2]. В здоровых мышцах кассетный экзон, как правило, исключается при сплайсинге с образованием неканонической (короткой) изоформы, которая кодирует белок с молекулярной массой 287 281 Да, включающий 2692 а.о. (Uniprot, Q14315-2) и не содержащий петли 1. Каноническая (длинная) изоформа кодирует белок с молекулярной массой 291 022 Да, состоящий из 2725 а.о. (Uniprot, Q14315-1) [2]. Сравнительный анализ сплайсинга мРНК в образцах РНК миокарда левого желудочка пациентов с ишемической кардиомиопатией показал повышенную экспрессию длинной изоформы *FLNC* по сравнению со здоровым контролем [13]. Однако, в целом, роль альтернативного сплайсинга *FLNC* недостаточно изучена.

Филамин С содержит в своем составе N-концевой актин-связывающий участок (ABD, actin-binding domain) с двумя кальпонин-гомологичными доменами (CH, calponin homology domain), 24 иммуноглобулин-подобных (Ig, immunoglobulin domain) повторяющихся домена Ig1–24, которые формируют две стержневые (rod) структуры ROD1 (Ig1–15) и ROD2 (Ig16–23), и C-концевой домен димеризации Ig24 (рис. 1, а) [1].

Мономеры *FLNC* взаимодействуют между собой преимущественно за счет контактов, образуемых иммуноглобулин-подобным доменом 24, формируя димер (рис. 1, б) с молекулярной массой ~582 кДа [14]. Стержневые участки ROD1 и ROD2 и домен димеризации Ig24 *FLNC* разделены между собой двумя шарнирными областями, или петлями: петлей 1 на границе доменов ROD1 (Ig15) и ROD2 (Ig16) и петлей 2 на границе домена ROD2 (Ig23) и домена димеризации (Ig24) (см. рис. 1, а). Петля 1 между Ig15 и Ig16 входит в состав только длинной изоформы *FLNC* и, вероятно, обеспечивает большую гибкость белка в условиях стресса. Хотя предполагается, что между доменами Ig15 и Ig16 короткой изоформы *FLNC* тоже может сохраняться некоторая гибкость за счет предполагаемого нарушения β-складчатой структуры домена Ig16 по сравнению с гомоло-

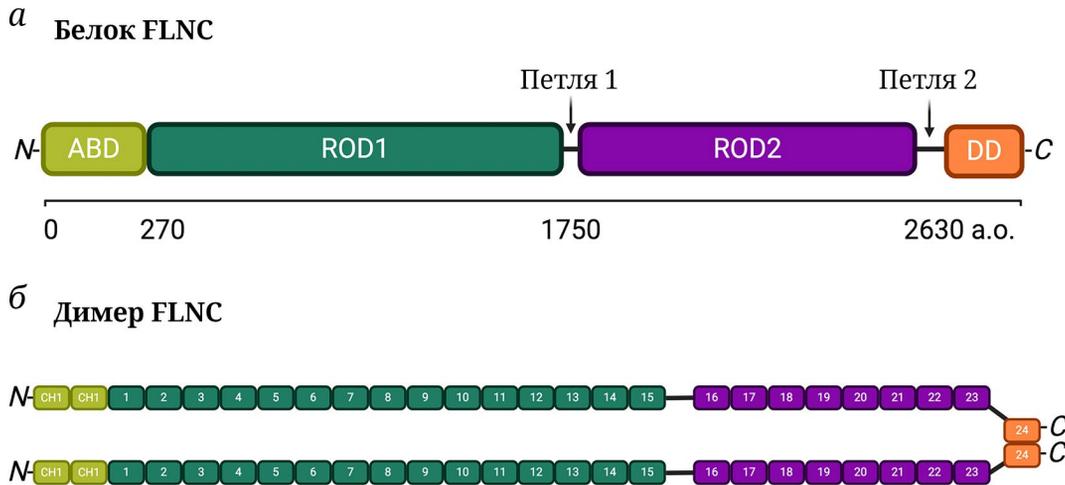


Рис. 1. Структура полипептидной цепи FLNC. *а* – Схема строения мономера FLNC: N-концевой актн-связывающий (ABD) участок (обозначен салатовым цветом), стержневые участки ROD1 (обозначен зеленым цветом) и ROD2 (обозначен фиолетовым цветом), C-концевой домен димеризации (DD, dimerization domain) (обозначен оранжевым цветом), петлевые домены (петля 1, петля 2); а.о. – аминокислотные остатки. *б* – Схема строения димера FLNC: кальпонин-гомологичные домены 1 и 2 (CH1, CH2) в составе ABD-участка; иммуноглобулин-подобные домены 1–15 в составе ROD1-участка; иммуноглобулин-подобные домены 16–23 в составе ROD2-участка; иммуноглобулин-подобный домен 24 в составе домена димеризации. Рисунок создан в BioRender

гичными доменами в составе FLNA и FLNB [15]. Петля 2 между Ig23 и Ig24 позволяет молекулам FLNC изгибаться так, что при гомодимеризации N-концевые домены остаются заякоренными на разных актиновых филаментах и формируется структура, похожая на букву V. Такая форма обеспечивает высокую гибкость димера [16].

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ ФИЛАМИНА С

В зрелых мышечных клетках филамин С локализуется преимущественно в Z-дисках саркомеров, на их периферии, и в меньшем количестве в сарколемме, костамерах и во вставочных дисках вблизи десмосом [17, 18]. В структуре саркомера димеры FLNC связывают два актиновых филамента, участвуют в организации и стабилизации трехмерной сети F-актина и обеспечивают связывание саркомера с сарколеммой [19]. Через свои ROD-домены FLNC взаимодействует с большим числом белковых партнеров. На данный момент в составе интерактома FLNC идентифицировано более 90 белков, среди которых выявлены транскрипционные факторы, рецепторы, внутриклеточные сигнальные молекулы, ионные каналы, цитоскелетные белки с иммуноглобулин-подобными доменами, белки межклеточной адгезии и взаимодействия с внеклеточным матриксом [16, 20]. В составе FLNC большинство сайтов связывания расположены в дистальной части домена ROD2 в иммуноглобулин-подобных доменах Ig16–24 [21]. Интересно, что в составе Ig20 в ROD2-домене FLNC содержится уникальная после-

довательность из 82 а.о., отсутствующая в гомологичных белках FLNA и FLNB. Этот участок может обуславливать взаимодействие с рядом лигандов, специфичных именно для мышечных клеток, например, с миотиллином [22, 23]. Несмотря на внушительный и пополняемый список партнеров FLNC (для более подробной информации см. обзор Мао и Nakamura [16]), структура участков связывания FLNC с белками-партнерами известна только для некоторых его партнеров, например, для интегрина $\beta 2$ [24].

Филамин С играет важнейшую роль в формировании миофибрилл и участвует в восстановлении их повреждений путем стабилизации цитоскелета [23, 25]. В норме FLNC, наряду со своими партнерами, в частности, миотиллином, белками Xin, XIRP2 и шапероном белка теплового шока (heat shock proteins) HspB5, динамично перемещается между Z-дисками, сарколеммой и другими внутриклеточными компартментами в зону повышенной механической нагрузки, участвуя в быстрой репарации микроповреждений миофибрилл [18, 23, 26, 27]. При мутациях гена FLNC, приводящих к укорочению полипептидной цепи, у пациентов наблюдается дезорганизация структуры миофибрилл со значительными изменениями локализации FLNC [28–30]. Предполагается, что значительную роль в поддержании нормальной функции FLNC в мышцах играет один из его партнеров, малый белок теплового шока HspB7, который взаимодействует с доменом димеризации Ig24 FLNC [31, 32]. В регуляции динамического перемещения (мобильности) филамина С важную роль играет его фосфорилирование.

Так, установлено, что филамин гладких мышц может фосфорилироваться под действием Ca^{2+} / кальмодулин-зависимой протеинкиназы, и такое фосфорилирование ослабляет взаимодействие филамина с актином [33]. Анализ фосфопротеома позволил установить, что при дифференцировке миобластов в миотубы многие белки Z-диска подвергаются фосфорилированию. В их числе находится филамин, фосфорилирование которого под действием протеинкиназы C, затрагивающее остатки серина во втором шарнирном домене (Ser-2626 и -2627), защищает филамин от протеолиза под действием кальпаина-1 [34, 35]. Дифференцировка из миобластов в миотубы сопровождается уменьшением уровня FLNA и одновременно с этим увеличением уровня FLNC [35]. При этом протеинкиназы C и Akt могут фосфорилировать остатки Ser-2233 (2234) и Ser-2236 (2237), расположенные в уникальном участке двадцатого иммуноглобулин-подобного домена (Ig20) FLNC [36]. Фосфорилирование этих остатков уменьшает вероятность взаимодействия FLNC со специальным белком FILIP1 (filamin A interacting protein 1) и защищает филамин от деградации. Активация протеинфосфатаз или ингибирование протеинкиназ приводит к усилению взаимодействия филамина с FILIP1, что увеличивает вероятность убиквитинирования филамина и способствует его деградации путем шаперон-зависимой селективной аутофагии (chaperone-assisted selective autophagy, CASA) [36]. Данные фосфопротеомного анализа свидетельствуют о том, что в структуре FLNC есть как минимум 6 остатков серина (Ser-1528, -2234, -2237, -2621, -2626, -2627), фосфорилируемых различными протеинкиназами и каким-то образом влияющих на структуру и свойства этого белка и, вероятно, на его перемещение в клетке [34].

Филамин C гомологичен филамину A, для которого ранее были показаны механозависимые свойства доменов, расположенных в ROD-участке, а также их способность передавать механический сигнал [22, 37–40]. Поэтому считается, что FLNC также может участвовать в конверсии механических сигналов в биохимические [16, 41]. В 2020 г. в обзорной работе Мао и Nakamura [16] была предложена модель переменного механохимического связывания белковых партнеров FLNC, основанная на их потенциальном взаимодействии с ROD2-доменами Ig16–21. Эта модель предполагает реорганизацию участков связывания белков-партнеров в ROD2-участке FLNC. Предполагается, что в расслабленном состоянии домены Ig16–21 хорошо организованы и компактны, а механическое воздействие приводит к дестабилизации и разворачиванию структуры этих иммуноглобулин-подобных доменов, что приводит

к смене белковых партнеров, связывающихся с этим участком молекулы FLNC. В недавней работе Deng и Yan [42] были продемонстрированы значительные конформационные изменения ROD2-домена FLNC в ответ на воздействие силы в несколько пиконьютонов (пН). При этом N-концевые домены в составе ROD1 демонстрировали высокую конформационную стабильность [42]. Полученные результаты хорошо согласуются с описанными свойствами стержневых участков FLNA. По данным литературы, для разворачивания доменов, расположенных в ROD2-участке FLNA, достаточно относительно слабых механических сил (~10 пН), а для изменения структуры в области ROD1 необходимы значительно большие усилия величиной от 50 пН [41, 43]. Установлено, что интерфейс димеризации Ig24 поддерживает механическую стабильность молекулы FLNC и обеспечивает реализацию механозависимых конформационных изменений ROD2, необходимых для взаимодействия FLNC с белковыми партнерами и внутриклеточной сигнализации [42]. Таким образом, в настоящее время считается, что в зрелых мышечных клетках FLNC выполняет функцию динамического интегрирующего центра или сигнального адаптера в передаче механических сигналов [18, 19, 24, 44, 45].

КОНТРОЛЬ ЗА СОХРАНЕНИЕМ СТРУКТУРЫ ФИЛАМИНА C

В свете механозависимой сигнальной роли филамина C особо важной представляется проблема поддержания его нативной структуры при механических воздействиях. Различные виды стресса могут влиять на правильное сворачивание (фолдинг) саркомерных белков и приводить к накоплению дефектных конформеров, склонных к образованию нерастворимых агрегатов [46, 47]. Это обуславливает высокую потребность мышечных клеток в поддержании протеостаза, которое реализуется за счет функционирования специальной системы «контроля качества» и деградации денатурированных белков. Эти механизмы включают убиквитин-протеасомную систему деградации и аутофагию, посредством которых клетка удаляет необратимо поврежденные белки и нерастворимые агрегаты. Кроме того, в процессе «контроля качества» важная роль принадлежит молекулярным шаперонам, или белкам теплового шока, которые обеспечивают рефолдинг частично денатурированных белков и/или участвуют в регуляции их избирательной деградации [48].

Молекулы филамина, поврежденные в ходе механических воздействий, являются мишенью для CASA, проходящей с участием ко-шаперона

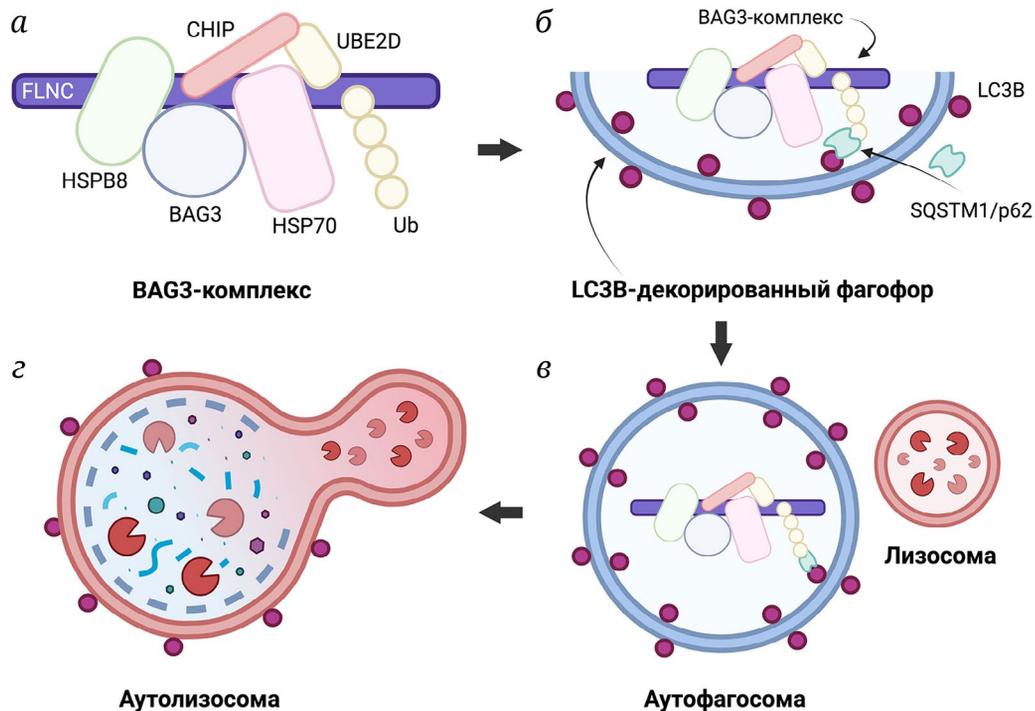


Рис. 2. Деградикация поврежденных молекул FLNC в мышечных клетках путем BAG3-опосредованной шаперон-зависимой селективной аутофагии. *а* – Белковый комплекс BAG3–Hsp70–HspB8–CHIP–p62 (BAG3-комплекс) с убиквитинированным (Ub, ubiquitin) FLNC; BAG3 (BCL2 associated athanogene 3) – атаноген, ассоциированный с BCL2; UBE2D (ubiquitin conjugation enzyme E2D) – убиквитин-конъюгирующий фермент E2D; CHIP (carboxy-terminal Hsp70-interacting protein) – белок, взаимодействующий с С-концом Hsp70, или убиквитинлигаза E3. *б* – Связывание BAG3-комплекса с LC3B-декорирированным фагофором; LC3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta) – легкая цепь 3 бета ассоциированного с микротрубочками белка 1; SQSTM1/p62 (sequestosome-1/ubiquitin-binding protein p62) – секвестасома-1/убиквитин-связывающий белок p62. *в* – Аутофагосома с BAG3-комплексом (слева) и лизосома, содержащая гидролитические ферменты (справа). *г* – Аутолизосома, образованная слиянием аутофагосомы и лизосомы, с лизированным содержимым. Рисунок создан в BioRender на основе работы Höhfeld et al. [47]

BAG3 [47, 49, 50]. На платформе BAG3 происходит сборка мультикомпонентного белкового комплекса BAG3–Hsp70–HspB8–CHIP–p62 (рис. 2, *а*), который может располагаться вблизи Z-диска миофибрилл [49]. Мышечные сокращения могут приводить к деформации и частичному изменению структуры механочувствительных доменов Ig18–21 FLNC. Возникшие нарушения узнаются белками теплового шока Hsp70 и HspB8, которые обеспечивают связывание филамина и его встраивание в большой белковый комплекс, собирающийся на платформе BAG3 (рис. 2, *а*). Сборка такого комплекса позволяет осуществлять либо АТФ-зависимый рефолдинг, обеспечиваемый шаперонами семейства Hsp70 [51–55], либо осуществлять шаперон-зависимый избирательный аутолиз (CASA), если белок-субстрат невозможно ренатурировать. В последнем случае убиквитинлигаза E3 (CHIP), связанная с Hsp70, убиквитинирует белок-субстрат (филамин) при участии убиквитин-конъюгирующего фермента E2D (UBE2D) (рис. 2, *а*). Далее, происходит рекрутирование адаптера убиквитина SQSTM1/p62, который связывает белковый комплекс, собранный на BAG3, с белком LC3B, рас-

положенным на поверхности фагофоров – предшественников аутофагосом (рис. 2, *б*) [49]. После формирования аутофагосом (рис. 2, *в*) происходит их слияние с лизосомами и образование аутолизосом (рис. 2, *г*).

В мышечных клетках BAG3 вовлечен в регуляцию YAP/TAZ-опосредованной транскрипции филамина. BAG3 способен связывать протеинкиназы LATS1/2 и адаптерный белок AMOTL. Пока эти белки остаются в комплексе с BAG3, протеинкиназы фосфорилируют коактиваторы транскрипции YAP и TAZ, и в силу этого коактиваторы транскрипции остаются в цитозоле и/или подвергаются протеолизу. Поэтому они не попадают в ядро и не влияют на транскрипцию. Накопление денатурированных и убиквитинированных белков приводит к вытеснению AMOTL и LATS1/2 из комплекса с BAG3. Нефосфорилированные YAP и TAZ переходят в ядро и стимулируют транскрипцию филамина, что компенсирует потери филамина за счет его протеолиза и поддерживает необходимый уровень его экспрессии [50, 56].

Деградикация филамина С может тонко регулироваться его фосфорилированием, которое,

как правило, защищает филамин от протеолиза (см. выше). Как уже упоминалось, установлено [36], что в зрелых мышечных клетках белок FILIP1 способен связываться с доменом Ig20 FLNC и помогает инициировать систему CASA для деградации дефосфорилированного FLNC. Активация протеинфосфатаз в условиях стресса и вызванное этим дефосфорилирование FLNC может способствовать механизму распознавания частично денатурированных молекул FLNC с участием FILIP1, что обеспечивает дальнейшую селективную деградацию путем аутофагии [36].

В литературе есть довольно разрозненные сведения о том, какие ферменты и адаптерные белки принимают участие в убиквитин-протеасомной деградации филамина. Так, установлено, что филамин может быть субстратом для убиквитинлигазы E3 Ring finger (muscle-specific RING-finger protein-3, MuRF3). При этом нокаут гена *MuRF3*, кодирующего убиквитинлигазу MuRF3, приводит к избыточному накоплению филамина в сердце, что приводит к дегенерации кардиомиоцитов [57]. Вспомогательные белки, относящиеся к семействам KELCH и FBXL22, участвуют в узнавании белков-мишеней убиквитинлигаз и правильной ориентации куллинов и убиквитинлигаз относительно убиквитинируемого белка-мишени. Любопытно, что богатый лейцином адаптерный белок FBXL22 и один из представителей семейства KELCH (KLHL31) узнают FLNC и взаимодействуют с ним, участвуя, таким образом, в направленном убиквитинировании, а значит и в протеасомной деградации этого белка [58, 59].

Установлено связывание механочувствительных доменов Ig18–21 (ROD2) FLNC с малым белком теплового шока HspB1, что может защищать FLNC от чрезмерного разворачивания во время механического стресса [60]. Высказывается предположение [61] о том, что другой малый белок теплового шока, HspB5, также может участвовать в рефолдинге FLNC. Разнообразие механизмов защиты FLNC от чрезмерного растяжения и нарушения конформации под действием механического стресса свидетельствует в пользу важности поддержания его структуры для нормального функционирования. Генетические нарушения, изменяющие нативную структуру филамина C, могут приводить к нарушению протеостаза и изменению работы систем внутриклеточного «контроля качества» и деградации белков.

МУТАЦИИ ГЕНА *FLNC* И ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Ген *FLNC* – один из немногих генов, который сопряжен с развитием как патологий скелет-

ных мышц, так и всех основных типов кардиомиопатий [62]. Зачастую степень тяжести *FLNC*-ассоциированных миопатий зависит от возраста пациентов. Так, педиатрические кардиомиопатии, проявляющиеся в раннем детстве (примерно до 5 лет), протекают, как правило, значительно тяжелее и сопряжены с более неблагоприятным прогнозом по сравнению с кардиомиопатиями взрослых [63–66]. Высокую вариабельность клинических фенотипов филаминопатии связывают с различиями в проявлении мутаций в гене *FLNC* в зависимости от их типа и положения в структуре гена [16, 67–69]. Существенную роль в развитии молекулярного фенотипа филаминопатии может играть изменение характера связывания мутантного FLNC с его белковыми партнерами. Изменения в связывании конкретных партнеров FLNC с последующими молекулярными эффектами может также объяснять разнообразие клинических фенотипов миопатий, наблюдаемых у пациентов [67]. Однако на сегодняшний день в рамках *FLNC*-ассоциированных миопатий не установлены жесткие корреляции «генотип–фенотип». К сожалению, до сих пор слабо изучено влияние мутаций в гене *FLNC* на взаимодействие филамина C с его белковыми партнерами.

Большинство *FLNC*-ассоциированных миопатий вызваны патогенными гетерозиготными нарушениями гена *FLNC* и наследуются по аутосомно-доминантному типу. Чаще всего у пациентов детектируют миссенс-мутации и инделы без потери функции белка (non-loss-of-function, non-LOF). Такие мутации, предположительно, приводят к изменению конформации FLNC, его агрегации и нарушению протеостаза с развитием гипертрофической или рестриктивной кардиомиопатии или скелетной миофибрилярной миопатии [11, 67, 70, 71]. Реже у пациентов детектируют сдвиги рамки считывания и нонсенс-мутации по типу потери функции. Такие LOF-мутации в гене *FLNC* приводят к гаплонедостаточности и развитию дилатационной или аритмогенной кардиомиопатии или дистальной скелетной миопатии с нарушением структуры миофибрилл и атрофией мышц без явной агрегации белков [7, 10, 25, 30]. Хотя, по последним данным, в случае гаплонедостаточности по *FLNC* не исключена возможность агрегации белков и нарушения протеостаза миоцитов [72]. Клинически схоже с LOF-мутациями проявляются мутации актин-связывающего домена FLNC, которые приводят к изменению стехиометрии связывания и увеличению сродства N-концевого домена FLNC к F-актину и сопровождаются развитием дистальной миопатии с атрофией мышц [73].

В редких случаях у пациентов с мутациями *FLNC* диагностируют сочетанные симптомы

сердечно-мышечной патологии [6, 64, 74]. Недавно был описан случай смешанного клинического фенотипа тяжелой гипертрофической кардиомиопатии и рестриктивной кардиомиопатии внутри одной семьи с миссенс-мутацией с.5810T>A:p.Le1937Asn (Ig17, ROD2) в *FLNC* [75]. Помимо этого, на сегодня описаны три тяжелых случая аутосомно-рецессивного наследования филаминопатии типа С. Эти случаи касаются: 1) врожденной миофибриллярной миопатии, вызванной рецессивной гомозиготной мутацией с.1325C>G:p.Pro442Arg (Ig2, ROD1) гена *FLNC* [76]; 2) врожденной дилатационной кардиомиопатии, вызванной компаунд-гетерозиготной мутацией с.318C>G:p.F106L (CH1, ABD) и с.2971C>T:p.R991* (Ig8, ROD1) гена *FLNC* [77] и 3) дилатационной кардиомиопатии, вызванной гомозиготным вариантом с.2122-1G>C сайта сплайсинга гена *FLNC* с проявлением в детском возрасте [78].

Установление корреляции между генотипом и фенотипом для *FLNC*-ассоциированных миопатий ограничено как недостаточностью данных о структуре, функции и конкретных белок-белковых взаимодействиях *FLNC*, так и трудностями моделирования эффектов мутаций *in silico*. Для преодоления последнего ограничения совсем недавно была разработана первая нейронная сеть на основе машинного обучения (AMIVA-F), которая предсказывает влияние миссенс-мутаций на структуру и функции *FLNC* с определением патогенности и фенотипического проявления мутации [79]. Нейросеть опирается на совокупность накопленных клинических и экспериментальных данных по *FLNC*-ассоциированным миопатиям, обладает точностью прогнозирования около 80% и доступна для использования на онлайн-сервере (<https://amiva.msp.univie.ac.at/>). На момент подготовки данного обзора была опубликована одна работа, в которой был использован инструментарий AMIVA-F. Это исследование специалистов из НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова, посвященное анализу клинического и генетического ландшафта российских пациентов с гипертрофической кардиомиопатией [80]. Без сомнения, подобные подходы с использованием современных технологий будут способствовать раскрытию молекулярных механизмов патогенеза филаминопатий.

МУТАЦИИ ГЕНА *FLNC* И ПРОТЕОСТАЗ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Учитывая высокую представленность филамина С в мышечных клетках, мутации non-LOF в гене *FLNC*, потенциально приводящие к нарушению нативной конформации белка, могут давать

существенную нагрузку на систему поддержания протеостаза из-за накопления агрегатов денатурированного *FLNC* [12, 19, 71, 72]. Агрегаты *FLNC* в комплексе с другими белками детектируют в биопсиях скелетных мышц [12, 81] и миокарда [11] пациентов с non-LOF-вариантами *FLNC*. По-видимому, внутриклеточные механизмы поддержания протеостаза могут какое-то время компенсировать негативное влияние мутаций *FLNC* на оборот белков в Z-диске и поддержание его функции [82]. Считается, что окислительный стресс и изменения в митохондриях постепенно снижают активность систем поддержания протеостаза и ослабляют защиту от накопления агрегатов. В результате происходит накопление мутантного *FLNC* и его партнеров, что приводит к нарушению белкового гомеостаза и негативно влияет на функционирование мышц [82]. В случае гипертрофической кардиомиопатии наблюдают увеличение толщины стенок желудочков, направленное на компенсацию недостаточности функции миокарда, и нарушение расслабления желудочков (диастолическая дисфункция) [83]. В случае рестриктивной кардиомиопатии отмечают повышение жесткости и снижение пластичности стенок желудочков с ограничением (рестрикцией) их кровенаполнения в фазе диастолы, однако, в отличие от гипертрофической кардиомиопатии, явного изменения толщины (гипертрофии) миокарда желудочков сердца не наблюдается [11, 84]. Момент перенасыщения систем белковой деградации в кардиомиоцитах на клеточном уровне может коррелировать с появлением первых симптомов заболевания. Однако такие изменения непросто детектировать как *in vitro*, так и *in vivo*, особенно в сердце. В связи с этим экспериментальные работы в данной области немногочисленны.

На модели миофибриллярной миопатии рыбы *Danio rerio* с мутацией p.W2710X в домене димеризации Ig24 *FLNC* было показано, что в скелетных мышцах мутантный *FLNC* формирует агрегаты, с которыми связывается ко-шаперон BAG3. Эти агрегаты не могут разбираться ни системой CASA, ни какими-то иными путями деградации [85]. Удаление этих агрегатов удалось осуществить либо путем уменьшения экспрессии BAG3, либо путем стимуляции аутофагии рапамицином или карбамазепином [85]. На клеточной модели мышечных миобластов (клеточная линия C2C12) с внесенными миссенс-вариантами p.Pro2298Leu в Ig20 (ROD2) или p.Tyr2563Cys в Ig23 (ROD2) *FLNC*, сопряженными с развитием педиатрической рестриктивной кардиомиопатии, было продемонстрировано нарушение конформации *FLNC* с формированием нерастворимых агрегатов в дифференцированных миобластах [86]. На клеточной модели кардиомиоцитов (КМ),

дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК-КМ), было показано, что делеция семи аминокислот в положении p.1668-1674 в Ig15 (ROD1) FLNC приводит к агрегации FLNC, снижению активности процессов аутофагии, перенасыщению аутолизом и стрессу эндоплазматического ретикулума с признаками гипертрофической кардиомиопатии [87]. В этой же работе был выявлен менее тяжелый клеточный фенотип с проявлениями дилатационной кардиомиопатии в ИПСК-КМ с миссенс-мутацией p.G1674S в Ig15 (ROD1) FLNC без явной агрегации FLNC, но с признаками нарушения протеостаза [87]. Описанные экспериментальные модели подчеркивают роль типа и положения мутации гена *FLNC* в проявлении мутации на молекулярном уровне и демонстрируют пока неясную вариабельность механизмов патогенеза филаминопатий у пациентов с non-LOF-вариантами гена *FLNC*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Филамин С играет важнейшую роль в ранней дифференцировке миоцитов, закладке сердца и работе мышечных клеток млекопитающих. Чаще всего мутации в гене *FLNC*, кодирующем филамин С, приводят к нарушению протеостаза мышечных клеток. Однако в рамках наследственных кардиомиопатий, вызванных non-LOF-мутациями гена *FLNC*, нельзя с уверенностью утверждать, что именно агрегация мутантного FLNC является ключом к разгадке молекулярных механизмов филаминопатии. В будущем таким ключом может стать расшифровка интерактома FLNC и его механозависимых белок-белковых взаимодействий. Отсутствие данных в этой области значительно ограничивает возможности установления корреляции «генотип–фенотип» в филаминопатиях. Удобной экспериментальной моделью для дальнейшего изучения роли FLNC в сердце в норме и патологии являются клеточные 2D- и 3D-культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека. С одной стороны, такие конструкторы моделируют *in vitro* эмбриональное развитие сердца и могут отражать ранние молекулярные события,

лежащие в основе патогенеза заболевания. С другой стороны, при условии успешной разработки способов созревания ИПСК-КМ и органоидов сердца такие клеточные системы могут быть использованы для моделирования филаминопатий с «умеренным» фенотипом и более поздним проявлением патологических изменений. Перспективным представляется комплексный подход, сочетающий в себе как *in vivo* и *in vitro* моделирование патологий сердца, так и изучение структуры и взаимодействий мутантного FLNC *in silico* и *in vitro*. Для реализации подобного синтетического исследования необходимо выявить связи в системе «генотип–фенотип» для каждого конкретного случая *FLNC*-ассоциированной миопатии, в том числе с использованием возможностей современного моделирования *in silico*, и определить с использованием биохимических методов белковые партнеры мутантного филамина С. Для подтверждения обнаруженных закономерностей *in vitro* необходимо усовершенствование клеточных моделей на основе ИПСК. Эти усовершенствования должны коснуться применения изогенных систем и улучшения и совершенствования протоколов созревания кардиомиоцитов. Все это позволит исключить влияние генетического фона доноров клеточного материала и ярче проявить влияние мутации на функционирование кардиомиоцита.

Вклад авторов. Д.В. Голиусова – сбор и анализ литературных источников, написание текста статьи, подготовка иллюстраций; М.Ю. Шарикова, К.А. Лаврентьева – сбор литературных источников, оформление списка литературы; О.С. Лебедева, Л.К. Муранова – редактирование текста статьи; Н.Б. Гусев, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова – финальное редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00456).

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. Van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001) Structural and functional aspects of filamins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1538**, 99-117, [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00072-6).
2. Xie, Z., Xu, W., Davie, E. W., and Chung, D. W. (1998) Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 914-919, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9506>.
3. Wu, T., Xu, Y., Zhang, L., Liang, Z., Zhou, X., Evans, S. M., and Chen, J. (2023) Filamin C is essential for mammalian myocardial integrity, *PLoS Genet.*, **19**, e1010630, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010630>.

4. Zhou, Y., Chen, Z., Zhang, L., Zhu, M., Tan, C., Zhou, X., Evans, S. M., Fang, X., Feng, W., and Chen, J. (2020) Loss of filamin C is catastrophic for heart function, *Circ.*, **141**, 869-871, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044061>.
5. Vorgerd, M., van der Ven, P. F., Bruchertseifer, V., Löwe, T., Kley, R. A., Schröder, R., Lochmüller, H., Himmel, M., Koehler, K., Fürst, D. O., and Huebner, A. (2005) A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy, *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 297-304, <https://doi.org/10.1086/431959>.
6. Kley, R. A., Hellenbroich, Y., van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Huebner, A., Bruchertseifer, V., Peters, S. A., Heyer, C. M., Kirschner, J., Schröder, R., Fischer, D., Müller, K., Tolksdorf, K., Eger, K., Germing, A., Brodherr, T., Reum, C., Walter, M. C., Lochmüller, H., Ketelsen, U.-P., and Vorgerd, M. (2007) Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients: a study of 31 German Patients, *Brain*, **130**, 3250-3264, <https://doi.org/10.1093/brain/awm271>.
7. Guergueltcheva, V., Peeters, K., Baets, J., Ceuterick-de Groote, C., Martin, J. J., Suls, A., De Vriendt, E., Mihaylova, V., Chamova, T., Almeida-Souza, L., Ydens, E., Tzekov, C., Hadjidekov, G., Gospodinova, M., Storm, K., Reyniers, E., Bichev, S., van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Mitev, V., Lochmüller, H., Timmerman, V., Tournev, I., De Jonghe, P., and Jordanova, A. (2011) Distal myopathy with upper limb predominance caused by filamin C haploinsufficiency, *Neurology*, **77**, 2105-2114, <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823dc51e>.
8. Valdés-Mas, R., Gutiérrez-Fernández, A., Gómez, J., Coto, E., Astudillo, A., Puente, D. A., Reguero, J. R., Álvarez, V., Moris, C., León, D., Martín, M., Puente, X. S., and López-Otín, C. (2014) Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy, *Nat. Commun.*, **5**, 5326, <https://doi.org/10.1038/ncomms6326>.
9. Begay, R. L., Tharp, C. A., Martin, A., Graw, S. L., Sinagra, G., Miani, D., Sweet, M. E., Slavov, D. B., Stafford, N., Zeller, M. J., Alnefaie, R., Rowland, T. J., Brun, F., Jones, K. L., Gowan, K., Mestroni, L., Garrity, D. M., and Taylor, M. R. G. (2016) FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy, *JACC Basic Trans. Sci.*, **1**, 344-359, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.05.004>.
10. Ortiz-Genga, M. F., Cuenca, S., Dal Ferro, M., Zorio, E., Salgado-Aranda, R., Climent, V., Padrón-Barthe, L., Duro-Aguado, I., Jiménez-Jáimez, J., Hidalgo-Olivares, V. M., García-Campo, E., Lanzillo, C., Suárez-Mier, M. P., Yonath, H., Marcos-Alonso, S., Ochoa, J. P., Santomé, J. L., García-Giustiniani, D., Rodríguez-Garrido, J. L., Domínguez, F., Merlo, M., Palomino, J., Peña, M. L., Trujillo, J. P., Martín-Vila, A., Stolfo, D., Molina, P., Lara-Pezzi, E., Calvo-Iglesias, F. E., Nof, E., Calò, L., Barriales-Villa, R., Gimeno-Blanes, J. R., Arad, M., García-Pavía, P., and Monserrat, L. (2016) Truncating FLNC mutations are associated with high-risk dilated and arrhythmogenic cardiomyopathies, *JACC*, **68**, 2440-2451, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.09.927>.
11. Brodehl, A., Ferrier, R. A., Hamilton, S. J., Greenway, S. C., Brundler, M. A., Yu, W., Gibson, W. T., McKinnon, M. L., McGillivray, B., Alvarez, N., Giuffre, M., Schwartzentruber, J., FORGE Canada Consortium, and Gerull, B. (2016) Mutations in FLNC are associated with familial restrictive cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, **37**, 269-279, <https://doi.org/10.1002/humu.22942>.
12. Fürst, D. O., Goldfarb, L. G., Kley, R. A., Vorgerd, M., Olivé, M., and van der Ven, P. F. (2013) Filamin C-related myopathies: pathology and mechanisms, *Acta Neuropathol.*, **125**, 33-46, <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1054-9>.
13. Kong, S. W., Hu, Y. W., Ho, J. W., Ikeda, S., Polster, S., John, R., Hall, J. L., Bisping, E., Pieske, B., dos Remedios, C. G., and Pu, W. T. (2010) Heart failure-associated changes in RNA splicing of sarcomere genes, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **3**, 138-146, <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.904698>.
14. Pudas, R., Kiema, T. R., Butler, P. J. G., Stewart, M., and Ylänne, J. (2005) Structural basis for vertebrate filamin dimerization, *Structure*, **13**, 111-119, <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.10.014>.
15. Van der Flier, A., Kuikman, I., Kramer, D., Geerts, D., Kreft, M., Takafuta, T., Shapiro, S. S., and Sonnenberg, A. (2002) Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits, *J. Cell Biol.*, **156**, 361-376, <https://doi.org/10.1083/jcb.200103037>.
16. Mao, Z., and Nakamura, F. (2020) Structure and function of filamin C in the muscle Z-disc, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2696, <https://doi.org/10.3390/ijms21082696>.
17. Chiang, W., and Greaser, M. L. (2000) Binding of filamin isoforms to myofibrils, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **21**, 321-333, <https://doi.org/10.1023/a:1005650706464>.
18. Thompson, T. G., Chan, Y. M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G. W., McNally, E. M., Watkins, S., and Kunkel, L. M. (2000) Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein, *J. Cell Biol.* **148**, 115-126, <https://doi.org/10.1083/jcb.148.1.115>.
19. Song, S., Shi, A., Lian, H., Hu, S., and Nie, Y. (2022) Filamin C in cardiomyopathy: from physiological roles to DNA variants, *Heart Fail. Rev.*, **27**, 1373-1385, <https://doi.org/10.1007/s10741-021-10172-z>.
20. Nakamura, F., Stossel, T. P., and Hartwig, J. H. (2011) The filamins: organizers of cell structure and function, *Cell Adhes. Migr.*, **5**, 160-169, <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14401>.

21. Razinia, Z., Mäkelä, T., Yläanne, J., and Calderwood, D. A. (2012) Filamins in mechanosensing and signaling, *Annu. Rev. Biophys.*, **41**, 227-246, <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102252>.
22. Gontier, Y., Taivainen, A., Fontao, L., Sonnenberg, A., van der Flier, A., Carpen, O., Faulkner, G., and Borradori, L. (2005) The Z-disc proteins myotilin and FATZ-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins, *J. Cell Sci.*, **118**, 3739-3749, <https://doi.org/10.1242/jcs.02484>.
23. Leber, Y., Ruparelia, A. A., Kirfel, G., van der Ven, P. F., Hoffmann, B., Merkel, R., Bryson-Richardson, R. J., and Fürst, D. O. (2016) Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage, *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 2776-2788, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw135>.
24. Bhattacharjya, S. (2022) The structural basis of $\beta 2$ integrin intra-cellular multi-protein complexes, *Biophys. Rev.*, **14**, 1183-1195, <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00995-x>.
25. Dalkilic, I., Schienda, J., Thompson, T. G., and Kunkel, L. M. (2006) Loss of filamin C (FLNc) results in severe defects in myogenesis and myotube structure, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 6522-6534, <https://doi.org/10.1128/MCB.00243-06>.
26. Paronavitane, V., Coadwell, W. J., Eguinoa, A., Hawkins, P. T., and Stephens, L. (2003) LL5beta is a phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate sensor that can bind the cytoskeletal adaptor, gamma-filamin, *J. Biol. Chem.*, **278**, 1328-1335, <https://doi.org/10.1074/jbc.M208352200>.
27. Molt, S., Bührdel, J. B., Yakovlev, S., Schein, P., Orfanos, Z., Kirfel, G., Winter, L., Wiche, G., van der Ven, P. F., Rottbauer, W., Just, S., Belkin, A. M., and Fürst, D. O. (2014) Aciculin interacts with filamin C and Xin and is essential for myofibril assembly, remodeling and maintenance, *J. Cell Sci.*, **127**, 3578-3592, <https://doi.org/10.1242/jcs.152157>.
28. Bönnemann, C. G., Thompson, T. G., van der Ven, P. F. M., Goebel, H. H., Warlo, I., Vollmers, B., Reimann, J., Herms, J., Gautel, M., Takada, F., Beggs, A. H., Fürst, D. O., Kunkel, L. M., Hanefeld, F., and Schröder, R. (2003) Filamin C accumulation is a strong but nonspecific immunohistochemical marker of core formation in muscle, *J. Neurol. Sci.*, **206**, 71-78, [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(02\)00341-6](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(02)00341-6).
29. Claeys, K. G., van der Ven, P. F. M., Behin, A., Stojkovic, T., Eymard, D., Dubourg, O., Laforêt, P., Faulkner, G., Richard, P., Vicart, P., Romero, N. B., Stoltenburg, G., Udd, B., Fardeau, M., Voit, T., and Fürst, D. O. (2009) Differential involvement of sarcomeric proteins in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study, *Acta Neuropathol.*, **117**, 293-307, <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0479-7>.
30. Begay, R. L., Graw, S. L., Sinagra, G., Asimaki, A., Rowland, T. J., Slavov, D. B., Gowan, K., Jones, K. L., Brun, F., Merlo, M., Miani, D., Sweet, M., Devaraj, K., Wartchow, E. P., Gigli, M., Puggia, I., Salcedo, E. E., Garrity, D. M., Ambardekar, A. V., Buttrick, P., Reece, T. B., Bristow, M. R., Saffitz, J. E., Mestroni, L., and Taylor, M. R. G. (2018) Filamin C truncation mutations are associated with arrhythmogenic dilated cardiomyopathy and changes in the cell-cell adhesion structures, *JACC. Clin. Electrophysiol.*, **4**, 504-514, <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2017.12.003>.
31. Juo, L. Y., Liao, W. C., Shih, Y. L., Yang, B. Y., Liu, A. B., and Yan, Y. T. (2016) HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles, *J. Cell Sci.*, **129**, 1661-1670, <https://doi.org/10.1242/jcs.179887>.
32. Muranova, L. K., Vostrikova, V. M., Shatov, V. M., Sluchanko, N. N., and Gusev, N. B. (2024) Interaction of the C-terminal immunoglobulin-like domains (Ig 22-24) of filamin C with human small heat shock proteins, *Biochimie*, **219**, 146-154, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.11.010>.
33. Ohta, Y., and Hartwig, J. H. (1995) Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation *in vitro*, *Biochemistry*, **34**, 6745-6754, <https://doi.org/10.1021/bi00020a020>.
34. Reimann, L., Wiese, H., Leber, Y., Schwäble, A. N., Fricke, A. L., Rohland, A., Knapp, B., Peikert, C. D., Drepper, F., van der Ven, P. F., Radziwill, G., Fürst, D. O., and Warscheid, B. (2017) Myofibrillar Z-discs are a protein phosphorylation hot spot with protein kinase C (PKC α) modulating protein dynamics, *Mol. Cell. Proteomics*, **16**, 346-367, <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.065425>.
35. Raynaud, F., Jond-Necand, C., Marcilhac, A., Fürst, D. O., and Benyamin, Y. (2006) Calpain 1-gamma filamin interaction in muscle cells: a possible *in situ* regulation by PKC-alpha, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, 404-413, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.020>.
36. Reimann, L., Schwäble, A. N., Fricke, A. L., Mühlhäuser, W. W. D., Leber, Y., Lohanadan, K., Puchinger, M. G., Schäuble, S., Faessler, E., Wiese, H., Reichenbach, C., Knapp, B., Peikert, C. D., Drepper, F., Hahn, U., Kreutz, C., van der Ven, P. F. M., Radziwill, G., Djinović-Carugo, K., Fürst, D. O., and Warscheid, B. (2020) Phosphoproteomics identifies dual-site phosphorylation in an extended basophilic motif regulating FILIP1-mediated degradation of filamin-C, *Commun. Biol.*, **3**, 1-19, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0982-5>.
37. Chen, H., Zhu, X., Cong, P., Sheetz, M. P., Nakamura, F., and Yan, J. (2011) Differential mechanical stability of filamin A rod segments, *Biophys. J.*, **101**, 1231-1237, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.028>.

38. Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A., and Stossel, T. P. (2011) Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A, *Nature*, **478**, 260-263, <https://doi.org/10.1038/nature10430>.
39. Rognoni, L., Stigler, J., Pelz, B., Ylanne, J., and Rief, M. (2012) Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19679-19684, <https://doi.org/10.1073/pnas.1211274109>.
40. Xu, T., Lannon, H., Wolf, S., Nakamura, F., and Brujic, J. (2013) Domain-domain interactions in filamin A (16-23) impose a hierarchy of unfolding forces, *Biophys. J.*, **104**, 2022-2030, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.03.034>.
41. Knoll, R., Buyandelger, B., and Lab, M. (2011) The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 569628, <https://doi.org/10.1155/2011/569628>.
42. Deng, Y., and Yan, J. (2023) Force-dependent structural changes of filamin C rod domains regulated by filamin C dimer, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 14670-14678, <https://doi.org/10.1021/jacs.3c02303>.
43. Chen, H., Chandrasekar, S., Sheetz, M. P., Stossel, T. P., Nakamura, F., and Yan, J. (2013) Mechanical perturbation of filamin A immunoglobulin repeats 20-21 reveals potential non-equilibrium mechanochemical partner binding function, *Sci. Rep.*, **3**, 1642, <https://doi.org/10.1038/srep01642>.
44. Van der Ven, P. F., Wiesner, S., Salmikangas, S., Auerbach, D., Himmel, M., Kempa, S., Hayess, K., Pacholsky, D., Taivainen, A., Schröder, R., Carpén, O., and Fürst, D. O. (2000) Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin, *J. Cell Biol.*, **151**, 235-248, <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.235>.
45. Kesner, B. A., Ding, F., Temple, B. R., and Dokholyan, N. V. (2010) N-terminal strands of filamin Ig domains act as a conformational switch under biological forces, *Proteins*, **78**, 12-24, <https://doi.org/10.1002/prot.22479>.
46. Martin, T. G., and Kirk, J. A. (2020) Under construction: the dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **148**, 89-102, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.08.018>.
47. Höhfeld, J., Benzing, T., Bloch, W., Fürst, D. O., Gehlert, S., Hesse, M., Hoffmann, B., Hoppe, T., Huesgen, P. F., Köhn, M., Kolanus, W., Merkel, R., Niessen, C. M., Pokrzywa, W., Rinschen, M. M., Wachten, D., and Warscheid, B. (2021) Maintaining proteostasis under mechanical stress, *EMBO Rep.*, **22**, e52507, <https://doi.org/10.15252/embr.202152507>.
48. Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2016) *In vivo* aspects of protein folding and quality control, *Science*, **353**, aac4354, <https://doi.org/10.1126/science.aac4354>.
49. Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D. O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B. K., Hoch, M., and Höhfeld, J. (2010) Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance, *Curr. Biol.*, **20**, 143-148, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.022>.
50. Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., Behrends, C., Fürst, D. O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., and Höhfeld, J. (2013) Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy, *Curr. Biol.*, **23**, 430-435, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.064>.
51. Ulbricht, A., and Höhfeld, J. (2013) Tension-induced autophagy, *Autophagy*, **9**, 920-922, <https://doi.org/10.4161/auto.24213>.
52. Ulbricht, A., Arndt, V., and Höhfeld, J. (2013) Chaperone-assisted proteostasis is essential for mechanotransduction in mammalian cells, *Commun. Integr. Biol.*, **6**, e24925, <https://doi.org/10.4161/cib.24925>.
53. Klimek, C., Kathage, B., Wördehoff, J., and Höhfeld, J. (2017) BAG3-mediated proteostasis at a glance, *J. Cell Sci.*, **130**, 2781-2788, <https://doi.org/10.1242/jcs.203679>.
54. Rauch, J. N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S. A., Makley, L. N., Southworth, D. R., and Gestwicki, J. E. (2017) BAG3 is a modular, scaffolding protein that physically links heat shock protein 70 (Hsp70) to the small heat shock proteins, *J. Mol. Biol.*, **429**, 128-141, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.013>.
55. Pathak, P., Blech-Hermoni, Y., Subedi, K., Mpmugo, J., Obeng-Nyarko, C., Ohman, R., Molloy, I., Kates, M., Hale, J., Stauffer, S., Sharan, S. K., and Mankodi, A. (2021) Myopathy associated LDB3 mutation causes Z-disc disassembly and protein aggregation through PKCa and TSC2-mTOR downregulation, *Commun. Biol.*, **4**, 355, <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01864-1>.
56. Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V. E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B. K., Fürst, D. O., and Höhfeld, J. (2017) The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1864**, 62-75, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.007>.
57. Fielitz, J., van Rooij, E., Spencer, J. A., Shelton, J. M., Latif, S., van der Nagel, R., Bezprozvannaya, S., de Windt, L., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2007) Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4377-4382, <https://doi.org/10.1073/pnas.0611726104>.

58. Spaich, S., Will, R. D., Just, S., Spaich, S., Kuhn, C., Frank, D., Berger, I. M., Wiemann, S., Korn, B., Koegl, M., Backs, J., Katus, H. A., Rotbauer, W., and Frey, N. (2012) F-box and leucine-rich repeat protein 22 is a cardiac-enriched F-box protein that regulates sarcomeric protein turnover and is essential for maintenance of contractile function *in vivo*, *Circ. Res.*, **111**, 1504-1516, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.271007>.
59. Papizan, J. B., Garry, G. A., Brezprozvannaya, S., McAnally, J. R., Bassel-Duby, R., Liu, N., and Olson, E. N. (2017) Deficiency in Kelch protein Khl31 causes congenital myopathy in mice, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3730-3740, <https://doi.org/10.1172/JCI93445>.
60. Collier, M. P., Alderson, T. R., de Villiers, C. P., Nicholls, D., Gastall, H. Y., Allison, T. M., Degiacomi, M. T., Jiang, H., Mlynek, G., Fürst, D. O., van der Ven, P. F. M., Djinovic-Carugo, K., Baldwin, A. J., Watkins, H., Gehmlich, K., and Benesch, J. L. P. (2019) HspB1 phosphorylation regulates its intramolecular dynamics and mechanosensitive molecular chaperone interaction with filamin C, *Sci. Adv.*, **5**, eaav8421, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav8421>.
61. Muranova, L. K., Shatov, V. M., and Gusev, N. B. (2022) Role of small heat shock proteins in the remodeling of actin microfilaments, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 800-811, <https://doi.org/10.1134/S0006297922080119>.
62. Muravyev, A., Vershinina, T., Tesner, P., Sjoberg, G., Fomicheva, Y., Čajbiková, N. N., Kozyreva, A., Zhuk, S., Mamaeva, E., Tarnovskaya, S., Jorholt, J., Sokolnikova, P., Pervunina, T., Vasichkina, E., Sejersen, T., and Kostareva, A. (2022) Rare clinical phenotype of filaminopathy presenting as restrictive cardiomyopathy and myopathy in childhood, *Orphanet J. Rare Dis.*, **17**, 358, <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02477-5>.
63. Kiselev, A., Vaz, R., Knyazeva, A., Khudiakov, A., Tarnovskaya, S., Liu, J., Sergushichev, A., Kazakov, S., Frishman, D., Smolina, N., Pervunina, T., Jorholt, J., Sjoberg, G., Vershinina, T., Rudenko, D., Arner, A., Sejersen, T., Lindstrand, A., and Kostareva, A. (2018) *De novo* mutations in FLNC leading to early-onset restrictive cardiomyopathy and congenital myopathy, *Hum. Mutat.*, **39**, 1161-1172, <https://doi.org/10.1002/humu.23559>.
64. Савостьянов К. В., Басаргина Е. Н., Рябова Е. Е., Пушков А. А., Жанин И. С., Басаргина Е. Ю., Алексеева А. Ю., Муравьева Л. В., Гандаева Л. А., Фисенко А. П. (2021) Молекулярно-генетические особенности формирования рестриктивной кардиомиопатии у российских детей, *Росс. Кардиол. Журн.*, **26**, 4590, <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4590>.
65. Ditaranto, R., Caponetti, A. G., Ferrara, V., Parisi, V., Minnucci, M., Chiti, C., Baldassarre, R., Di Nicola, F., Bonetti, S., Hasan, T., Potena, L., Galiè, N., Ragni, L., and Biagini, E. (2022) Pediatric restrictive cardiomyopathies, *Front. Pediatr.*, **9**, 745365, <https://doi.org/10.3389/fped.2021.745365>.
66. Akinrinade, O., Lesurf, R., Genomics England Research Consortium, Lougheed, J., Mondal, T., Smythe, J., Altamirano-Diaz, L., Oechslin, E., and Mital, S. (2023) Age and sex differences in the genetics of cardiomyopathy, *J. Cardiovasc. Trans. Res.*, **16**, 1287-1302, <https://doi.org/10.1007/s12265-023-10411-8>.
67. Verdonschot, J. A. J., Vanhoutte, E. K., Claes, G. R. F., Helderma-van den Enden, A., Hoeijmakers, J. G. J., Hellebrekers, D., de Haan, A., Christiaans, I., Lekanne Deprez, R. H., Boen, H. M., van Craenenbroeck, E. M., Loeys, B. L., Hoedemaekers, Y. M., Marcelis, C., Kempers, M., Brusse, E., van Waning, J. I., Baas, A. F., Dooijes, D., Asselbergs, F. W., Barge-Schaapveld, D. Q. C. M., Koopman, P., van den Wijngaard, A., Heymans, S. R. B., Krapels, I. P. C., and Brunner, H. G. (2020) A mutation update for the FLNC gene in myopathies and cardiomyopathies, *Hum. Mutat.*, **41**, 1091-1111, <https://doi.org/10.1002/humu.24004>.
68. Eden, M., and Frey, N. (2021) Cardiac Filaminopathies: illuminating the divergent role of filamin C mutations in human cardiomyopathy, *J. Clin. Med.*, **10**, 577, <https://doi.org/10.3390/jcm10040577>.
69. Brodehl, A., and Gerull, B. (2022) Genetic insights into primary restrictive cardiomyopathy, *J. Clin. Med.*, **11**, 2094, <https://doi.org/10.3390/jcm11082094>.
70. Schänzer, A., Schumann, E., Zengeler, D., Gulatz, L., Maroli, G., Ahting, U., Sprengel, A., Gräf, S., Hahn, A., Jux, C., Acker, T., Fürst, D. O., Rupp, S., Schuld, J., and van der Ven, P. F. M. (2021) The p.Ala2430Val mutation in filamin C causes a “hypertrophic myofibrillar cardiomyopathy”, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **42**, 381-397, <https://doi.org/10.1007/s10974-021-09601-1>.
71. Park, Y. E., Kim, D. S., and Shin, J. H. (2022) A novel nonsense mutation in the dimerization domain of FLNC causing mild myofibrillar myopathy, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **221**, 107386, <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2022.107386>.
72. Sellung, D., Heil, L., Daya, N., Jacobsen, F., Mertens-Rill, J., Zhuge, H., Döring, K., Piran, M., Milting, H., Unger, A., Linke, W. A., Kley, R., Preusse, C., Roos, A., Fürst, D. O., Ven, P. F. M. V., and Vorgerd, M. (2023) Novel filamin C myofibrillar myopathy variants cause different pathomechanisms and alterations in protein quality systems, *Cells*, **12**, 1321, <https://doi.org/10.3390/cells12091321>.
73. Duff, R. M., Tay, V., Hackman, P., Ravenscroft, G., McLean, C., Kennedy, P., Steinbach, A., Schöffler, W., van der Ven, P. F. M., Fürst, D. O., Song, J., Djinović-Carugo, K., Penttilä, S., Raheem, O., Reardon, K., Malandrini, A., Gambelli, S., Villanova, M., Nowak, K. J., Williams, D. R., Landers, J. E., Brown, R. H., Udd, B., and Laing, N. G.

- (2011) Mutations in the N-terminal actin-binding domain of filamin C cause a distal myopathy, *Am. J. Hum. Genet.*, **88**, 729-740, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.021>.
74. Avila-Smirnow, D., Gueneau, L., Batonnet-Pichon, S., Delort, F., Bécane, H. M., Claeys, K., Beuvin, M., Goudeau, B., Jais, J. P., Nelson, I., Richard, P., Ben Yaou, R., Romero, N. B., Wahbi, K., Mathis, S., Voit, T., Furst, D., van der Ven, P., Gil, R., Vicart, P., Fardeau, M., Bonne, G., and Behin, A. (2016) Cardiac arrhythmia and late-onset muscle weakness caused by a myofibrillar myopathy with unusual histopathological features due to a novel missense mutation in FLNC, *Rev. Neurol.*, **172**, 594-606, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.07.017>.
75. Gaudreault, N., Ruel, L. J., Henry, C., Schleit, J., Lagüe, P., Champagne, J., Sénéchal, M., Sarrazin, J. F., Philippon, F., Bossé, Y., and Steinberg, C. (2023) Novel filamin C (FLNC) variant causes a severe form of familial mixed hypertrophic-restrictive cardiomyopathy, *Am. J. Med. Genet. A*, **191**, 1508-1517, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63169>.
76. Kölbl, H., Roos, A., van der Ven, P. F. M., Evangelista, T., Nolte, K., Johnson, K., Töpf, A., Wilson, M., Kress, W., Sickmann, A., Straub, V., Kollipara, L., Weis, J., Fürst, D. O., and Schara, U. (2020) First clinical and myopathological description of a myofibrillar myopathy with congenital onset and homozygous mutation in FLNC, *Hum. Mutat.*, **41**, 1600-1614, <https://doi.org/10.1002/humu.24062>.
77. Reinstein, E., Gutierrez-Fernandez, A., Tzur, S., Bormans, C., Marcu, S., Tayeb-Fligelman, E., Vinkler, C., Raas-Rothschild, A., Irge, D., Landau, M., Shohat, M., Puente, X. S., Behar, D. M., and Lopez-Otin, C. (2016) Congenital dilated cardiomyopathy caused by biallelic mutations in filamin C, *Eur. J. Hum. Genet.*, **24**, 1792-1796, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.110>.
78. Alsubhi, A., Aldarwish, M., Agrawal, P. B., Al Tala, S. M., Eldadah, O., Alghamdi, A. A., Silmi, A., and Almannai, M. (2024) A child with dilated cardiomyopathy and homozygous splice site variant in FLNC gene, *Mol. Genet. Metab. Rep.*, **38**, 101027, <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2023.101027>.
79. Nagy, M., Mlynek, G., Kostan, J., Smith, L., Pühringer, D., Charron, P., Rasmussen, T. B., Bilinska, Z., Akhtar, M. M., Syrris, P., Lopes, L. R., Elliott, P. M., Gautel, M., Carugo, O., and Djinović-Carugo, K. (2023) Unlocking predictive power: a machine learning tool derived from in-depth analysis to forecast the impact of missense variants in human filamin C, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.08.05.552086>.
80. Chumakova, O. S., Baklanova, T. N., Milovanova, N. V., and Zateyshchikov, D. A. (2023) Hypertrophic cardiomyopathy in underrepresented populations: clinical and genetic landscape based on a russian single-center cohort study, *Genes*, **14**, 2042, <https://doi.org/10.3390/genes14112042>.
81. Kley, R. A., Maerkens, A., Leber, Y., Theis, V., Schreiner, A., van der Ven, P. F., Uszkoreit, J., Stephan, C., Eulitz, S., Euler, N., Kirschner, J., Müller, K., Meyer, H. E., Tegenthoff, M., Fürst, D. O., Vorgerd, M., Müller, T., and Marcus, K. (2013) A combined laser microdissection and mass spectrometry approach reveals new disease relevant proteins accumulating in aggregates of filaminopathy patients, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 215-227, <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023176>.
82. Kley, R. A., Serdaroglu-Oflazer, P., Leber, Y., Odgerel, Z., van der Ven, P. F., Olivé, M., Ferrer, I., Onipe, A., Mihaylov, M., Bilbao, J. M., Lee, H. S., Höhfeld, J., Djinović-Carugo, K., Kong, K., Tegenthoff, M., Peters, S. A., Stenzel, W., Vorgerd, M., Goldfarb, L. G., and Fürst, D. O. (2012) Pathophysiology of protein aggregation and extended phenotyping in filaminopathy, *Brain*, **135**, 2642-2660, <https://doi.org/10.1093/brain/aws200>.
83. Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühl, U., Maisch, B., McKenna, W. J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L., and Keren, A. (2008) Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases, *Eur. Heart J.*, **29**, 270-276, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm342>.
84. Muchtar, E., Blauwet, L. A., and Gertz, M. A. (2017) Restrictive cardiomyopathy: genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy, *Circ. Res.*, **121**, 819-837, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310982>.
85. Ruparelia, A. A., Oorschot, V., Ramm, G., and Bryson-Richardson, R. J. (2016) FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency, *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 2131-2142, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw080>.
86. Schubert, J., Tariq, M., Geddes, G., Kindel, S., Miller, E. M., and Ware, S. M. (2018) Novel pathogenic variants in filamin C identified in pediatric restrictive cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, **39**, 2083-2096, <https://doi.org/10.1002/humu.23661>.
87. Agarwal, R., Paulo, J. A., Toepfer, C. N., Ewoldt, J. K., Sundaram, S., Chopra, A., Zhang, Q., Gorham, J., DePalma, S. R., Chen, C. S., Gygi, S. P., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (2021) Filamin C cardiomyopathy variants cause protein and lysosome accumulation, *Circ. Res.*, **129**, 751-766, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317076>.

THE ROLE OF FILAMIN C IN MUSCLE CELLS

Review

**D. V. Goliusova^{1,2*}, M. Y. Sharikova¹, K. A. Lavrenteva¹, O. S. Lebedeva¹,
L. K. Muranova³, N. B. Gusev³, A. N. Bogomazova¹, and M. A. Lagarkova¹**

¹ *Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine
of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; e-mail: daria.goliusova@mail.ru*

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

³ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Filamin C (FLNC) is a member of a high-molecular weight protein family, which bind actin filaments in the cytoskeleton of various cells. In human genome FLNC is encoded by the *FLNC* gene located on chromosome 7 and is expressed predominantly in striated skeletal and cardiac muscle cells. Filamin C is involved in organization and stabilization of thin actin filaments three-dimensional network in sarcomeres, and is supposed to play a role of mechanosensor transferring mechanical signals to different protein targets. Under mechanical stress FLNC can undergo unfolding, that increases the risk of its aggregation. FLNC molecules with an impaired native structure can be eliminated by BAG3-mediated chaperone-assisted selective autophagy. Mutations of the *FLNC* gene can be accompanied by changes in FLNC interaction with its protein partners and can lead to the formation of aggregates, which overload autophagy and proteasome protein degradation systems, thus resulting in the development of various pathological processes. The molecular mechanisms of *FLNC*-associated congenital disorders, called filaminopathies, remain poorly understood. This review is devoted to the analysis of structure and mechanisms of filamin C function in muscle and heart cells in normal state and in *FLNC*-associated pathologies. The presented data summarize the results of research at the molecular, cellular and tissue levels and allow us to outline promising ways for further investigation of filaminopathies pathogenetic mechanisms.

Keywords: filamin C, filaminopathy, autophagy, proteostasis, iPSCs, cardiomyocytes

РАЗНООБРАЗИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФУНКЦИЙ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ УБИКВИТИНЛИГАЗ ИЗ БЕЛКОВОГО СЕМЕЙСТВА MKRN

Обзор

© 2024 Е.А. Гусева^{1,2,3*#}, М.А. Емельянова^{1,3#}, В.Н. Сидорова⁴,
А.Н. Тюльпаков⁵, О.А. Донцова^{1,2,3,6}, П.В. Сергиев^{1,2,3*}

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

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

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

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

⁵ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,
115522 Москва, Россия

⁶ Институт биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.06.2024

После доработки 12.08.2024

Принята к публикации 19.08.2024

Белковое семейство Makorin RING finger (MKRN) включает в себя 4 представителя: MKRN1, MKRN2, MKRN3 и MKRN4. Эти белки относятся к классу убиквитинлигаз E3 и играют ключевую роль в таких биологических процессах, как выживание и дифференцировка клеток, реализация врождённого и адаптивного иммунитета. MKRN1 задействован в подавлении роста опухолей, энергетическом обмене, защите от патогенов и апоптотических процессах. Для MKRN1 был идентифицирован широкий спектр мишеней, включая hTERT, APC, FADD, p21 и различные вирусные белки. MKRN2 регулирует пролиферацию клеток и протекание воспалительных реакций. Среди его мишеней такие белки, как p65, PKM2 и STAT1. MKRN3 выполняет роль одного из основных регуляторов времени наступления полового созревания, влияя на уровень гонадотропин-релизинг гормона в нейронах дугообразного ядра. MKRN4 является наименее изученным членом семейства белков MKRN, однако известно, что он вносит значительный вклад в активацию Т-клеток путём убиквитинилирования серин/треониновой киназы MAP4K3. Белки этого семейства связаны с развитием многочисленных заболеваний, например, системной красной волчанки, центрального преждевременного полового созревания, синдрома Прадера-Вилли, дегенеративного спинального стеноза поясничной этиологии, воспаления и рака. В этом обзоре мы детально обсуждаем функциональную роль всех членов семейства белков MKRN, а также их вклад в развитие заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: E3-убиквитинлигазы, белки с RING-доменом, MKRN, макорины, РНК-связывающие убиквитинлигазы, преждевременное половое развитие, системная красная волчанка, супрессоры опухолей.

DOI: 10.31857/S0320972524090031 EDN: JJZXUI

Принятые сокращения: ППР – преждевременное половое развитие; MKRN – Makorin RING finger; PABP – поли(А)-связывающий белок; PABPC1 – цитоплазматический поли(А)-связывающий белок; RING – Really Interesting New Gene.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитинилирование – это посттрансляционная модификация, способствующая выживаемости клеток, принимающая участие в процессах дифференцировки, а также в реализации врождённого и адаптивного иммунитета [1]. Убиквитинлигазы E3 действуют на заключительном этапе убиквитинилирования, связывая субстрат убиквитинилирования и комплекс убиквитинлигазы E2 и убиквитина (Ub). Основная функция убиквитинлигаз E3 заключается в переносе убиквитина на субстрат, за которым часто следует образование полиубиквитиновой цепи, прикреплённой к субстрату. Белки семейства Makorin RING finger (MKRN) входят в состав убиквитинлигаз E3 суперсемейства RING, представители которых наиболее распространены среди убиквитинлигаз. Термин «Маколин» был введён в 2000 году как комбинация слова «makor», что означает «источник», и аббревиатуры RING [2]. Белки семейства MKRN входят в состав убиквитин-протеасомной системы (UPS) и выполняют широкий спектр задач в клетке [1]. Основными мишенями этих белков являются p53 [3, 4], p21 [4], FAS-ассоциированный белок с доменом смерти (FADD) [5], гомолог фосфатазы и тензина (PTEN) [6], p65 [7], секретрируемый нейрональный пентроксин 1 (NPTX1) [8], серин/треонинкиназа MAP4K3 (GLK) [9], некоторые вирусные [10–13] и бактериальные белки [14–16]. MKRN найдены не только у животных, но и у растений и грибов, у которых они играют ключевую роль в таких процессах, как рост, эмбриональный и постэмбриональный органогенез [17, 18].

В геноме человека обнаружено девять генов, относящихся к семейству MKRN [2]. Среди них есть как функциональные копии, так и псевдо-

гены. На сегодняшний день в литературе описаны четыре функциональных гена – *Mkrn1*, *Mkrn2*, *Mkrn3* и *Mkrn4* [1]. Помимо них, также известно 5 предполагаемых псевдогенов – *Mkrnp1*, *Mkrnp2*, *Mkrnp3*, *Mkrnp4*, *Mkrnp5* [2].

Структура MKRN включает несколько доменов цинковых пальцев типа C3H, домен, подобный PAM2, домен RING-пальца и цистидин-гистидиновый (CH) домен [2, 19, 20] (рис. 1). Цинковые пальцы типа C3H (ассоциированные с РНК-связывающей функцией) встречаются в различных рибонуклеопротеинах, участвующих в процессинге РНК, включая сплайсинг, определении локализации мРНК и трансляции [21, 22]. Домен, подобный PAM2 (PCI/PINT-ассоциированный модуль 2), служит для облегчения взаимодействия MKRN с поли(А)-связывающими белками (PABP) путём, независимым от РНК [20]. MKRN1, MKRN3 и MKRN4 обладают этим доменом [20, 23], однако для MKRN2 также наблюдается взаимодействие с PABP [24]. Цинк-связывающий домен, называемый RING (Really Interesting New Gene), отвечает за связывание убиквитинлигазы E2 с убиквитином и стимулирует его перенос [25]. Функция домена, богатого остатками цистеина и гистидина, до сих пор неизвестна [2]. Белки MKRN1, MKRN2 и MKRN4 у человека имеют 4 цинковых пальца типа C3H, в то время как у MKRN3 их 3 [1].

MKRN1

Ген *Mkrn1*, вероятно, является предковым для всего семейства генов MKRN. Филогенетический анализ выявил ортологи MKRN1 у широкого спектра видов животных, включая позвоночных и беспозвоночных [2]. Он охарактеризован у людей, мышей, валлаби, кур, свиней, дрозофил,

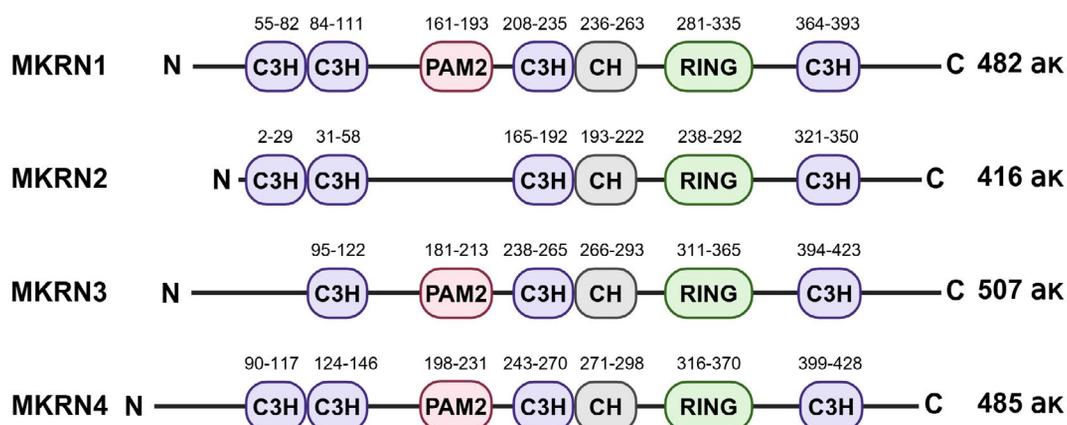


Рис. 1. Организация доменов MKRN1, MKRN2, MKRN3 и MKRN4 человека. Члены семейства белков MKRN содержат несколько доменов цинковых пальцев типа C3H (обозначены фиолетовым цветом); мотив, подобный PAM2 (обозначены розовым цветом); CH-домен (обозначен серым цветом) и C3HC4-домен RING-пальца (обозначен зелёным цветом). Цифры указывают положение аминокислот в белке. Домен PAM2 представлен согласно работе Mirósi et al., 2012 [20]

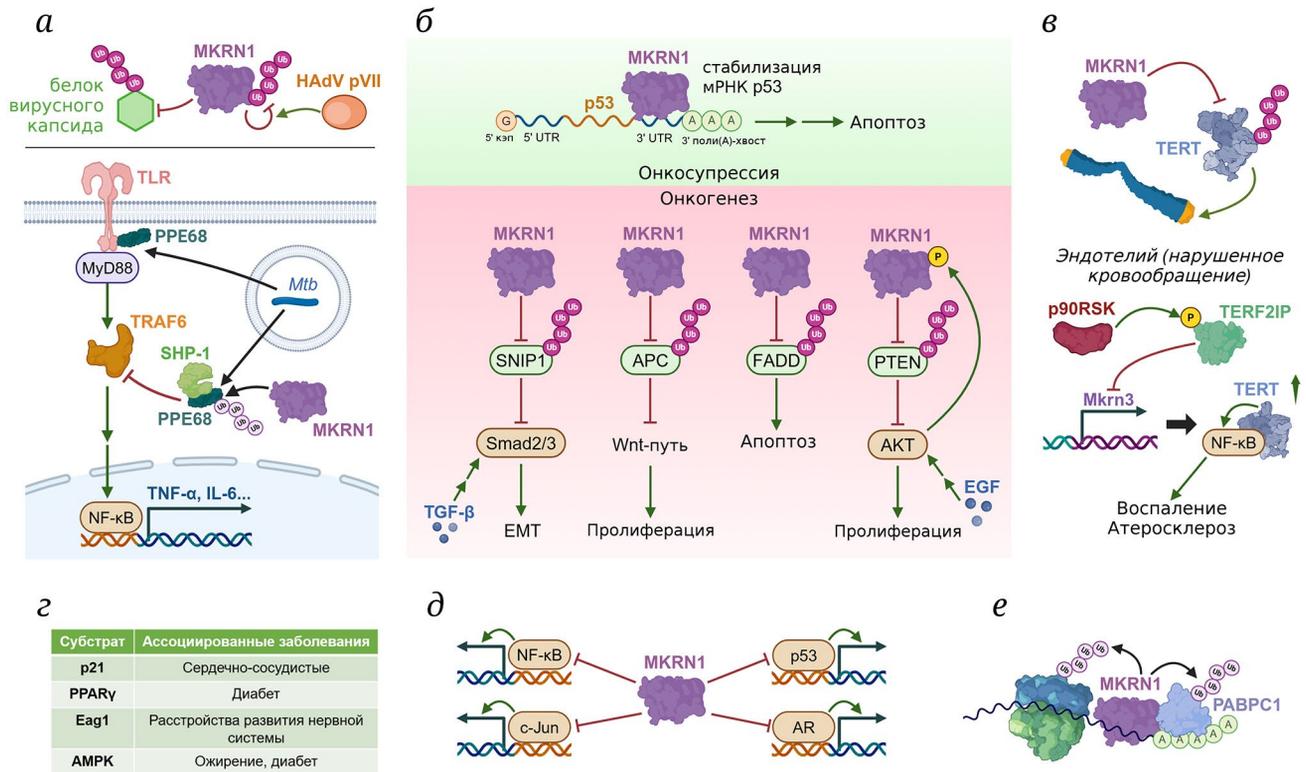


Рис. 2. Разнообразие биологических функций MKRN1. *а* – MKRN1 участвует в противовирусной защите, но способствует подавлению иммунного ответа при микобактериальной инфекции; TLR – toll-подобные рецепторы; TRAF6 – фактор 6, ассоциированный с рецептором TNF; SHP-1 – фосфатаза-1, содержащая домен, гомологичный Src 2; Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*; *б* – MKRN1 оказывает различные эффекты на онкогенез; EMT – эпителиально-мезенхимальный переход; *в* – MKRN1 регулирует уровни белка TERT; *г* – мишени опосредованного MKRN1 убиквитинилирования и связанные с ним заболевания; *д* – MKRN1 действует как транскрипционный репрессор; *е* – MKRN1 участвует в контроле качества трансляции посредством останковки рибосом

нематод и даже растений [11, 26]. Ген *Mkrn1* имеет высокий уровень экспрессии в таких органах человека, как гипоталамус и миндалевидное тело [1], а также яички у мужчин [2]. MKRN1 у человека представлен четырьмя изоформами, кодируемыми одним геном *Mkrn1*, которые возникают в результате альтернативного сплайсинга и варибельного полиаденилирования. Длинная изоформа MKRN1 (MKRN1-long) имеет четыре цинковых пальца типа СЗН, СН-домен и высококонсервативный СЗНС4-домен RING-пальца. Транскрипты коротких изоформ MKRN1 (MKRN1-short1/MKRN1-short3) человека не содержат С-концевого цинкового пальца типа СЗН и последние 6 аминокислот домена RING-пальца, которые необходимы для связывания второго иона цинка и N-концевого сегмента комплекса убиквитинлигазы E2 и убиквитина [1].

Hirotsume et al. [27] предположили, что псевдоген *Mkrn1*, называемый *Mkrn1-p1*, регулирует стабильность матричной РНК *Mkrn1* в транс-положении. Также на модели трансгенных мышей ими было показано, что снижение транскрипции *Mkrn1-p1* приводит к поликистозу почек и

деформации костей [27]. Однако согласно другим исследованиям *Mkrn1-p1* полностью метилирован на обоих аллелях и не транскрибируется, и, как следствие, он не может влиять на стабильность транскриптов *Mkrn1* [28]. Более того, ни одного из фенотипов, вызванных частичным снижением экспрессии *Mkrn1* у мутантных мышей, не наблюдалось у мутантов с полным нарушением работы гена *Mkrn1* [28].

MKRN1 является убиквитинлигазой E3, и на данный момент было обнаружено несколько его мишеней. Одна из них – это обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), являющаяся каталитической субъединицей рибонуклеопротеина, который препятствует деградации и укорочению концов теломер. Теломеры являются важнейшими частями эукариотических хромосом и предотвращают их прогрессирующую деградацию. Было показано, что MKRN1 убиквитинилирует hTERT и тем самым влияет на активность теломеразы и длину теломер [29]. При этом интересно, что связывание сфингозин-1-фосфата hTERT предотвращает его деградацию, опосредованную MKRN1 [30] (рис. 2, *в*).

Известно, что MKRN1 связывается с несколькими вирусными белками (рис. 2, а), включая белок капсида (Сар) цирковируса свиней типа 2 (PCV2). PCV2 вызывает синдром мультисистемного истощения у свиней после отъёма от груди (PWMS), симптомами которого являются истощение, лихорадка, лимфаденопатия и сокращение количества лимфоцитов лимфоидных тканей [10], что приводит к болезням свиней и, следовательно, оказывает серьёзное влияние на свиноводство во всем мире [31]. При индивидуальной экспрессии MKRN1 накапливается в спекл-подобных структурах внутри нуклеоплазмы, тогда как при совместной экспрессии с белком Сар оба белка равномерно распределены в нуклеоплазме и колокализуются. Более того, экспрессия Сар снижается в присутствии MKRN1 [10]. Было обнаружено, что MKRN1 убиквитинилирует остатки лизина в Сар PCV2 и способствует его деградации [11]. Интересно, что нокаут по гену *Mkrn1* или мутации ключевых аминокислот в кодируемом белке способствуют успешному размножению вируса в клетках хозяина; следовательно, MKRN1 функционирует как фактор защиты, который ингибирует репликацию PCV2 [11]. MKRN1 также может связываться с капсидным белком вируса Западного Нила (WNVСр). WNV – это вирус семейства *Flaviviridae*, переносимый членистоногими [32], вызывающий неврологические заболевания, такие как менингит и энцефалит [12]. MKRN1 проводит убиквитинилирование и способствует деградации WNVСр протеасомно-зависимым образом [12].

Интересно, что некоторые вирусные белки могут вызывать самоубиквитинилирование MKRN1 [13]. Так, например, предшественник белка рVII аденовирусов человека (HAdV) связывается с MKRN1 и усиливает его самоубиквитинилирование, тогда как процессированный зрелый белок VII лишён этой функции [13]. MKRN1 подвергается протеасомной деградации на поздней стадии инфекции HAdV-C5 в различных линиях клеток человека. Это может являться примером возможной вирусной стратегии противодействия защите клеток-хозяев от вирусов, опосредованной MKRN1 [13].

Было показано, что ген *Mkrn1* активируется во время микобактериальной инфекции в клетках эндометрия [14]. Кроме того, рекомбинантный MKRN1, экспрессируемый в *E. coli*, убиквитинилирует *M. tuberculosis in vitro*. Это говорит о новой роли MKRN1 в клеточной защите от микобактерий [15], однако точный молекулярный механизм наблюдаемого процесса остаётся неясным. Также было показано, что MKRN1 взаимодействует с белком *M. tuberculosis* из семейства PPE (PPE68) и способствует присоединению цепей убиквитина, связанных через лизин-63 (K63) с остатком K166

PPE68, что подавляет врождённый иммунный ответ (рис. 2, а). Нарушение взаимодействия между MKRN1-убиквитинлигазной системой хозяина и микобактериальным белком PPE может быть потенциальной терапевтической мишенью для лечения туберкулёза [16].

MKRN1 играет роль во многих клеточных процессах. Апоптоз, или запрограммированная гибель клеток, позволяет организму строго контролировать количество клеток и размер тканей, а также защищать себя от неконтролируемо делящихся клеток, угрожающих гомеостазу [33]. MKRN1 регулирует убиквитинилирование и протеасомную деградацию адаптерного белка FADD [5]. На клеточных линиях было показано, что нокаут *MKRN1* приводит к стабилизации FADD и стимуляции образования комплексов рецепторов смерти для апоптоза [5]. Также было отмечено, что уровни мРНК MKRN1 были значительно выше в тканях рака молочной железы и шейки матки, чем в соответствующих нормальных тканях [5]. Кроме того, было показано, что MKRN1 убиквитинилирует и индуцирует деградацию основного супрессора опухолей – PTEN – через АКТ-зависимый сигнальный каскад, активируемый EGF. PTEN противодействует сигналингу PI3K/АКТ, который стимулируется фактором роста, путём преобразования фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфата (PIP3) в фосфатидилинозитол (4,5)-трифосфат (PIP2) [6]. Также было обнаружено, что MKRN1 приводит к увеличению скорости роста опухоли желудка посредством убиквитинилирования и последующей протеасомно-зависимой деградации супрессора опухоли p14ARF [34]. Кроме того, MKRN1 напрямую взаимодействует с белком аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), который является онкосупрессором, отрицательно регулирующим сигнальный путь Wnt, и убиквитинилирует его. MKRN1 способствует протеасомной деградации APC и положительно регулирует биологические процессы, опосредованные каскадом реакций пути Wnt/ β -катенина [35]. MKRN1 участвует в канцерогенезе определённого типа плоскоклеточного рака пищевода (ППП), который является одним из самых злокачественных типов опухолей [36], и был идентифицирован как новый антиген SEREX (серологическая идентификация антигенов путём клонирования экспрессии рекомбинантной кДНК) ППП [36]. В почечной светлоклеточной карциноме MKRN1 и MKRN2 служат супрессорами опухолей, регулируя экспрессию p53 [37]. MKRN1 индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход в клетках колоректального рака посредством убиквитинилирования и деградации ядерно-взаимодействующего Smad-белка 1 (SNIP1), который активирует каскад реакций сигнального пути, опосредованного трансформирующим фактором

роста- β (TGF- β), и, таким образом, ускоряет мета-стазирование колоректального рака [38]. В совокупности эти данные показывают роль MKRN1 в качестве возможной терапевтической мишени при лечении рака (рис. 2, б).

На клеточных линиях было обнаружено, что экспрессия MKRN1 снижается в тканях миокарда крыс, как и в клетках H9C2 и AC16, во время прерывистой гипоксии (ПГ) [39]. Кроме того, MKRN1 способствовал убиквитинилированию белка p21 и его протеосомно-зависимой деградации, что приводит к снижению продукции активных форм кислорода и, таким образом, предотвращает апоптоз миокарда, вызванный ПГ (рис. 2, г) [39].

При фосфорилировании белка, взаимодействующего с фактором связывания теломерного повтора 2 (TERF2IP), по остатку S205 (событие, следующие за активацией p90RSK), экспрессия MKRN1 ингибируется, что способствует активации и старению эндотелиальных клеток и, таким образом, развитию атеросклероза (рис. 2, в) [40].

MKRN1 играет роль в развитии нескольких метаболических заболеваний. В качестве убиквитинлигазы E3 он убиквитинилирует ядерный рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором γ (PPAR γ), и направляет его на протеасомно-зависимую деградацию (рис. 2, з). Наиболее высокая экспрессия PPAR γ наблюдается в жировой ткани, где он является ключевым организатором транскрипционного каскада, лежащего в основе дифференцировки адипоцитов [41]. PPAR γ также играет ключевую роль в активации липидного метаболизма жировой ткани [41]. Таким образом, изменённая дифференциация и метаболизм адипоцитов зависят от активности PPAR γ и могут приводить к патофизиологическим состояниям, таким как резистентность к инсулину, сердечно-сосудистые заболевания и диабет [41].

Кроме того, MKRN1 может способствовать нарушению нейроразвития, поскольку он формирует систему контроля качества эндоплазматического ретикула незрелых гликозилированных ядерных белков Eag1, которые составляют нейрон-специфический потенциал-зависимый K⁺-канал и играют важную роль в развитии мозга (рис. 2, з) [42]. Интересно, что MKRN1 отвечает только за раннюю стадию созревания Eag1 в эндоплазматическом ретикулуме и может обеспечить эффективное удаление неправильно свёрнутых мутантных каналов Eag1, приводящих к заболеваниям [42].

Другой мишенью MKRN1 является АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК), которая играет ключевую роль в контроле энергетического метаболизма в ответ на физиологический и пищевой статус (рис. 2, з) [43]. Отсутствие MKRN1 приводит к активации АМРК, увеличению потребления

глюкозы и снижению накопления липидов [43]. В отличие от мышей дикого типа, нокауты по *Mkrm1* менее подвержены ожирению, диабету и неалкогольной жировой болезни печени при содержании на высокожировой диете (ВЖД) [44]. Удивительно, но у мышей с нокаутом *Mkrm1* в печени, белой и бурой жировых тканях наблюдалось увеличение уровня активированной фосфорилированной формы АМРК [44]. В совокупности MKRN1 может являться возможной терапевтической мишенью для лечения метаболических синдромов, таких как ожирение, диабет II типа и жировые заболевания печени [44].

Помимо роли убиквитинлигазы E3, MKRN1 участвует в регуляции транскрипции (рис. 2, д) [7]. В функциональном скрининге дрожжей и при трансфекции клеток млекопитающих MKRN1 был идентифицирован как транскрипционный репрессор фактора транскрипции c-Jun [7], который вместе с белком c-Fos образует комплекс активаторного белка-1 (AP-1) и участвует в ряде биологических процессов, включая пролиферацию, апоптоз, выживание клеток, образование опухолей и морфогенез тканей [45]. Репрессорная активность MKRN1 не ограничивается c-Jun и влияет на различные активаторы, зависимые от РНК-полимеразы II, такие как p53, p65 и человеческий андрогеновый рецептор (hAR) [7]. Интересно, что эта активность MKRN1 опосредована процессом транскрипции и не зависит от убиквитинилирования белка [7].

MKRN1 является новым регулятором трансляции, который работает посредством взаимодействия с PABP [20]. В нейрональных дендритах переднего мозга крысы MKRN1 локализуется с PABP, связанным с дендритными мРНК [20]. Впоследствии была выявлена более точная роль MKRN1 как нового фактора в контроле качества, связанном с рибосомой (ККР) [46]. MKRN1 напрямую связывается с цитоплазматическим поли(А)-связывающим белком PABPC1, тем самым отмечая начало поли(А)-хвостов. Если происходит преждевременное полиаденилирование или считывание стоп-кодона, MKRN1 останавливает транслирующую рибосому и инициирует ККР путём убиквитинилирования рибосомального белка S10 (RPS10), PABPC1 и других регуляторов трансляции (рис. 2, е) [46].

В заключение отметим, что MKRN1 выполняет три основные роли в клеточном метаболизме. Во-первых, как убиквитинлигаза E3 MKRN1 модулирует активность теломеразы и длину теломер путём убиквитинилирования hTERT; действует как фактор защиты хозяина путём убиквитинилирования белка Cap PCV2, WNVSp; белка PPE68 *M. tuberculosis*; регулирует канцерогенез путём убиквитинилирования FADD, PTEN, p14ARF, APC;

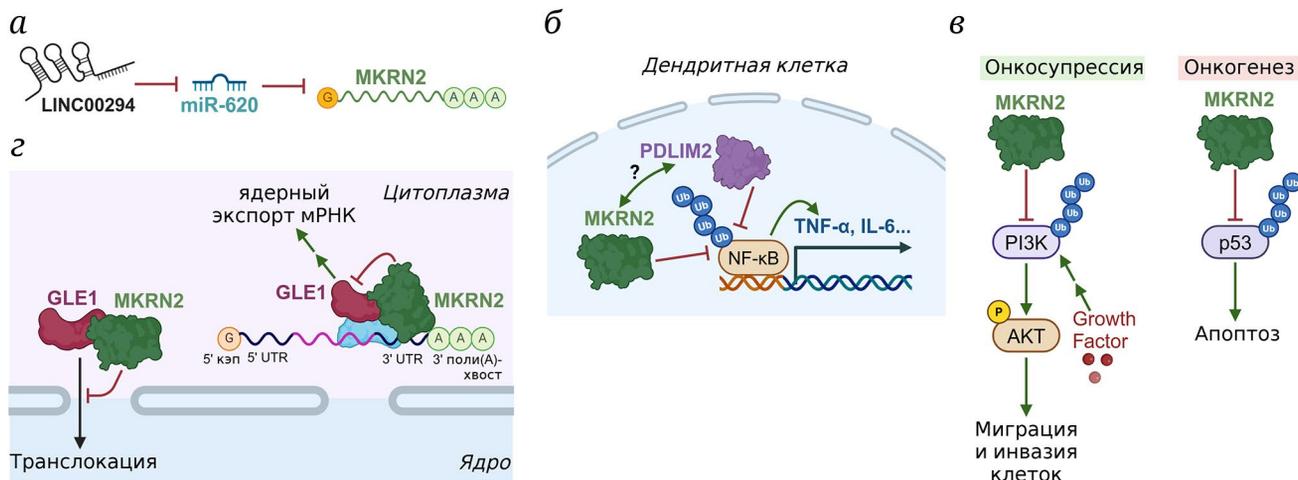


Рис. 3. Многообразие биологических функций MKRN2. *a* – Уровень экспрессии MKRN2 регулируется через отрицательную петлю с участием miR-620 и LINC00294; *б* – MKRN2 и PDLIM2 совместно ингибируют воспалительный ответ, подавляя трансактивацию ядерного фактора κB (NF-κB); *в* – различные действия MKRN2 на онкогенез; *г* – MKRN2 функционально антагонизирует GLE1 во время ядерного экспорта мРНК, возможно, за счёт предотвращения транслокации GLE1 в ядро

участвует в развитии нескольких метаболических заболеваний путём убиквитинилирования p90RSK, PPARγ, AMPK; регулирует развитие мозга, формируя систему контроля качества эндоплазматического ретикулума. Во-вторых, MKRN1 функционирует как транскрипционный регулятор c-Jun, p53, p65, hAR. Наконец, нельзя недооценивать роль MKRN1 как инициатора ККР через взаимодействие с PABPC1. Было показано, что MKRN1 проявляет как убиквитинлигазную, так и РНК-связывающую активность. Он выполняет множество функций, включая прямое убиквитинилирование определённых белков, а также регуляцию транскрипции и трансляции, подразумевающих обе активности MKRN1. Для того чтобы выполнить функцию транскрипционного репрессора, MKRN1 убиквитинилирует транскрипционные факторы и ингибирует их, действуя через процесс транскрипционной интерференции [7]. В процессе контроля качества трансляции MKRN1 связывает поли(А)-участок РНК выше по ходу транскрипции и убиквитинилирует рибосомальный белок RPS10, PABPC1 и другие трансляционные регуляторы [46]. Интересно, что РНК-связывающая активность MKRN1 сама по себе, по-видимому, не оказывает существенного влияния на клетку. Однако точная роль РНК-связывающей функции MKRN1 остаётся неясной и требует дальнейшего изучения.

MKRN2

Ген *Mkfn2* образовался в результате дупликации гена *Mkfn1* 450 миллионов лет назад во время ранней эволюции позвоночных [47]. После-

довательность и структура MKRN2 имеют много общего с таковыми у MKRN1 и включают все характерные элементы, за некоторыми исключениями у древних млекопитающих, таких как утконос и опоссум [48]. Высокая консервативность *Mkfn2* на протяжении эволюции указывает на наличие важной клеточной функции [47].

О регуляции этого гена известно мало, однако некоторые некодирующие РНК (нкРНК) предположительно вовлечены в прямую и косвенную регуляцию *Mkfn2*. В клетках колоректальной карциномы уровень экспрессии MKRN2 регулируется посредством отрицательной обратной связи с помощью miR-620, которая ингибирует трансляцию MKRN2, и LINC00294, которая ингибирует miR-620 (рис. 3, *a*) [49]. Авторы некоторых исследований [49] предполагают, что MKRN2 опосредует регуляторную функцию LINC00294.

Было показано, что MKRN2 отрицательно регулирует воспалительный ответ через подавление p65-опосредованной трансактивации NF-κB [50]. Совместно с PDLIM2 он полиубиквитинилирует ядерный p65 и способствует его протеасомной деградации (рис. 3, *б*). Стоит отметить, что MKRN2 контролирует p65 только на белковом уровне, поскольку количество мРНК p65 в клетках с нокаутом MKRN2 было сопоставимо с таковым в контрольных клетках [50]. Однако в других молекулярных процессах MKRN2 может влиять на уровень некоторых мРНК. Например, MKRN2 ингибирует нейрогенез, повышая уровень мРНК и белка киназы 3β гликогенсинтазы (GSK-3β) [51].

Роль MKRN2 в пролиферации клеток была подробно изучена, однако эффект от уровня экспрессии MKRN2 оказался противоречивым и зависел от типа рака. Например, низкий уровень

экспрессии *MKRN2* говорит о плохом прогнозе при раке желудка [52], колоректальной карциноме [49] и немелкоклеточном раке лёгкого [53]. В то же время снижение экспрессии *MKRN2* подавляет рост атипичных клеток при меланоме [3] и лейкемии [54]. Объяснение этому феномену можно найти в деталях механизма действия *MKRN2*, поскольку в каждом типе рака были обнаружены разные мишени *MKRN2*-зависимого убиквитинирования.

При исследовании немелкоклеточного рака лёгкого было показано, что *MKRN2* осуществляет отрицательную регуляцию сигнального пути PI3K/Akt (рис. 3, в) [53]. При раке желудка *MKRN2* также играет роль опухолевого супрессора: он способствует убиквитин-зависимой деградации мышечной изоформы пируваткиназы (*PKM2*) и ослабляет её влияние на внеклеточную сигнальную регулирующую киназу (*ERK*) [52]. В то же время в клетках меланомы *MKRN2* убиквитинирует опухолевый супрессор p53 (рис. 3, в) [3], подобно *MKRN1* [4]. Хотя уровни экспрессии белка *MKRN2* отрицательно коррелируют с экспрессией p53 и p21, *MKRN2* не оказывает прямого влияния на стабильность белка p21 [3].

У мышей, нокаутных по *Mkfn2*, наблюдается мужское бесплодие [55], которое характеризуется уменьшением размеров семенников, аномалиями головки сперматозоидов и отсутствием сперматогенеза [56]. Детальное исследование показало, что нокаут *Mkfn2* приводит к значительному снижению уровней экспрессии *STAT1*, *SIX4* и *TNC*. В то время как *MKRN2* и *STAT1* взаимодействуют напрямую, уровни экспрессии *SIX4* и *TNC* регулируются *MKRN2* через транскрипционный фактор *EBF2* [55]. В другом исследовании было показано, что дефекты в *Mkfn2* приводят к снижению экспрессии *Odf2* (белок наружных плотных волокон 2) в зародышевых клетках, что вызывает нарушение сборки жгутика хвоста сперматозоида [56]. Кроме того, считается, что *MKRN2* участвует в регуляции развития половых клеток через p53-зависимый путь апоптоза [56]. Таким образом, *MKRN2* может вносить вклад в баланс между выживанием и апоптозом зародышевых клеток.

С помощью животных моделей было показано, что *MKRN2* может играть важную роль в развитии сетчатки и является функциональным антагонистом *GLE1* во время ядерного экспорта мРНК (рис. 3, д). *MKRN2* регулирует экспорт мРНК на уровне РНК, связываясь с *CU*-богатыми областями в 3'UTR, и на уровне белка, взаимодействуя с факторами экспорта (*GLE/NUPL2*, *ZC3H11A*, *RAE1* и другими) [24]. Интересно, что не было выявлено ни одного субстрата убиквитинирования *MKRN2*, связанного с ядерным экспортом.

MKRN2 также ассоциирован с рядом заболеваний. Мутации в *MKRN2* и некоторых других генах могут способствовать развитию дегенеративного стеноза поясничного отдела позвоночника [57]. Авторы некоторых исследований предполагают, что *MKRN2* участвует в регуляции коклюш-зависимой гистаминовой сенсibilизации [58]. Однако не только сам белок может способствовать развитию заболеваний: есть данные о том, что экзосомальная РНК *lnc-MKRN2-42:1* может быть вовлечена в инициацию и развитие болезни Паркинсона [59].

Таким образом, РНК-связывающая убиквитинлигаза *MKRN2* вовлечена в ряд важнейших биологических процессов, включая регуляцию воспалительного ответа и пролиферации клеток. Кроме того, дисфункция *MKRN2* связана с патогенезом таких заболеваний, как мужское бесплодие и болезнь Паркинсона. Разнообразие мишеней убиквитинирования на молекулярном уровне приводит к различным эффектам *MKRN2* даже в рамках одного биологического процесса. Например, его роль в пролиферации зависит от конкретного типа рака. Помимо функций убиквитинлигазы, *MKRN2* также осуществляет связывание с РНК, благодаря чему он участвует в регуляции ядерного экспорта мРНК. Интересно, что до сих пор для этого фермента не было выявлено взаимосвязи между РНК-связывающей и убиквитинлигазной активностью. В связи с этим целесообразно изучение потенциального взаимодействия между *MKRN2* и *PAVPC1*, которое может иметь значительное сходство с таковым для *MKRN3*, поскольку *MKRN2* не вызывает генерализованных эффектов на клетки, как, например, *MKRN1*.

MKRN3

MKRN3 – это безинтронный ретроген, встречающийся исключительно у плацентарных млекопитающих и экспрессирующийся с отцовской хромосомы [48]. Он появился в результате обратной транскрипции мРНК *MKRN1*, катализируемой обратной транскриптазой ретротранспозонов [48]. В геноме человека *MKRN3* расположен на хромосоме 15q11-13 в области, ассоциированной с синдромом Прадера–Вилли (СПВ) [19, 60], хотя до сих пор неясно, участвует ли *MKRN3* в развитии этого заболевания [61].

У млекопитающих экспрессия данного гена зависит от ткани и периода онтогенеза. Наиболее высокий уровень мРНК *Mkfn3* наблюдается в гипоталамусе в раннем постнатальном периоде жизни и постепенно снижается после полового созревания [62, 63]. У грызунов экспрессия *Mkfn3*

локализована в дугообразном ядре, которое контролирует наступление половой зрелости [64]. В гонадах экспрессия *Mkrn3* зависит от пола. У самцов мышей мРНК *Mkrn3* появляется в семенниках до начала полового созревания и сохраняется на относительно высоком уровне в зрелом возрасте преимущественно в интерстициальном отделе и в семявыносящих канальцах [65]. В яичниках самок мышей мРНК *Mkrn3* также появляется до начала полового созревания, однако в период созревания её уровень значительно снижается и затем остаётся низким [65].

Интересно, что MKRN3 также связан с некоторыми аномалиями, влияющими на пол. Например, крупномасштабные делеции в импринтированном локусе 15q11-13, затрагивающие некодирующие и 5 белок-кодирующих генов (включая *MKRN3*), вызывают СПВ у человека [66]. Это заболевание характеризуется слабостью скелетной мускулатуры, умственной отсталостью и гормональными аномалиями [66]. Однако считается, что из всех симптомов СПВ MKRN3 вызывает только гипогонадизм [67, 68] и центральное преждевременное половое развитие (ППР) [69]. ППР характеризуется развитием вторичных половых признаков в возрасте до 9 лет у мужчин и 8 лет у женщин. ППР обусловлено более ранней активацией гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и повышением уровня гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH) [70], который является основным регулятором репродуктивной оси [71].

Делеция всего гена или мутации, приводящие к потере функций белка, в *MKRN3* вызывают ППР, без других симптомов СПВ [69]. В целом, на сегодняшний день у пациентов с ППР выявлено 59 мутаций в гене *MKRN3*, приводящих к потере функций белка, среди которых 6 нонсенс-мутаций, 16 сдвигов рамки считывания и 37 миссенс-мутаций. Было показано, что различия в фенотипе пациентов зависят от типа мутации. У пациентов, имеющих сдвиг рамки считывания, преждевременный стоп-кодон и мутации в промоторной области *MKRN3*, наблюдаются более высокий базальный уровень лютеинизирующего гормона и более значительное увеличение костного возраста по сравнению с пациентами с миссенс-мутациями [72]. Большинство описанных мутаций затрагивают домен RING finger СЗНС4 (убиквитинлигазная активность), мотивы цинковых пальцев СЗН (РНК-связывающая активность) и специфичный для семейства домен СН, однако тридцать из них находятся вне указанных структурных элементов [73]. Напротив, сверхэкспрессия *Mkrn3* вызывала задержку начала полового созревания у самок мышей, в то время как у самцов мышей изменений в сроках полового созревания не наблюдалось [74].

Время начала полового созревания определяется тремя основными факторами: метаболическими, экологическими и нейроэндокринными. Одним из сигналов к началу полового созревания является достижение критического соотношения жировой и мышечной массы. Адипомиокины, такие как иризин, участвующие в модуляции метаболических процессов, могут опосредовать передачу сигналов в нейронную сеть гипоталамуса [75]. Экспрессия гена *FNDC5*, кодирующего предшественник иризина, была обнаружена в гипоталамусе и гонадах [76], что указывает на его роль в регуляции репродуктивной системы на разных уровнях. На нейронном уровне было показано, что введение иризина вызывает начало полового созревания, сопровождающееся снижением уровня MKRN3 и повышением уровня нейрокина В (NKВ, Tac2/3) и кисспептина (*Kiss*, *Kiss1*) [75], которые являются двумя ключевыми положительными регуляторами синтеза и секреции GnRH (рис. 4, а) [77, 78].

Считается, что MKRN3 участвует в регуляции уровней GnRH, NKВ и *Kiss*. Сверхэкспрессия *Mkrn3* приводит к снижению уровней белка кисспептина и нейрокина В в гипоталамусах мышей [74], а нокаут *Mkrn3* вызывает повышение уровней NKВ [79] и GnRH1 [80]. Интересно, что миссенс-мутации, нарушающие функционирование домена RING finger, также приводят к повышению уровня GnRH1 [81]. Наблюдаемые различия являются результатом замедленной дегградации мутантного варианта по сравнению с белком дикого типа, что связано с нарушением аутоубиквитинилирования MKRN3 [81, 82].

Кроме того, было показано, что MKRN3 регулирует уровни РНК 404 генов нейронов дугообразного ядра, которые играют важную роль в развитии нейронов и синаптической пластичности, контролируя организацию внеклеточного матрикса, направление аксонов и формирование синапсов [79]. Более того, 13 из этих генов ассоциированы с возрастом менархе [79], что подтверждает гипотезу о том, что MKRN3 может быть одним из центральных регуляторов сроков полового созревания. Между тем, влияние MKRN3 на уровень мРНК *GnRH1*, *Kiss1* и *Tac3* представляется противоречивым. Сверхэкспрессия *MKRN3* приводит к повышению концентрации соответствующих мРНК [74], что, однако, может быть компенсаторным эффектом повышенной убиквитинлигазной активности. В то же время было показано, что нокаут *Mkrn3* не влияет на уровни экспрессии *Kiss1*, *Tac3* и *Gnrh1* у самок мышей различных возрастов на протяжении постнатального развития [79]. Однако у гетерозиготных мышей с нокаутом *Mkrn3* в отцовском аллеле наблюдалось значительное повышение уровня мРНК *GnRH1* для обоих полов [80].

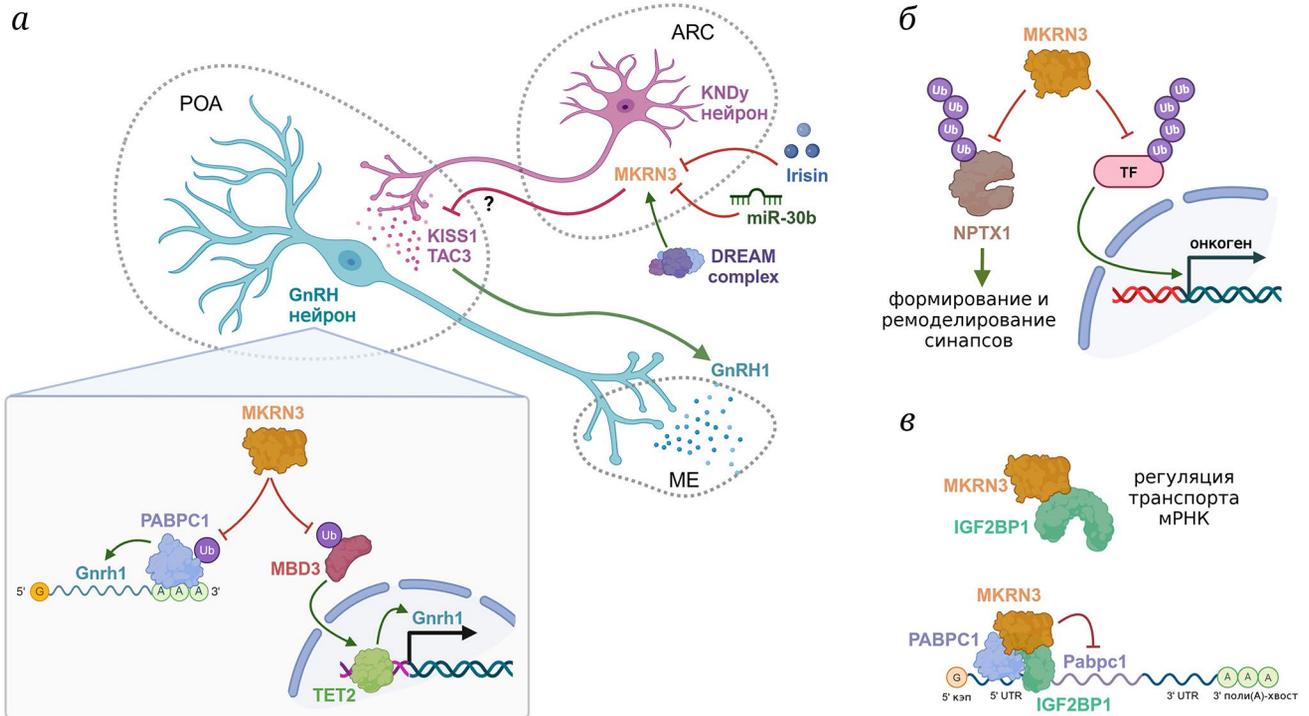


Рис. 4. Многообразие биологических функций MKRN3. *а* – MKRN3 участвует в гипоталамической регуляции полового созревания, POA – преоптическая область, ARC – аркуатное ядро, ME – срединное возвышение; *б* – MKRN3 убиквитинилирует белки для протеасомной деградации; *в* – возможные функции комплекса MKRN3–IGF2BP1

Было выдвинуто предположение о том, что MKRN3 регулирует уровни мРНК *KISS1* и *TAC3*, ингибируя активность промоторов соответствующих генов путём прямого связывания с ними [64]. Этот эффект был продемонстрирован на клеточной линии НЕК293Т [64], однако доказательства способности MKRN3 проникать в ядра отсутствуют. Более вероятным представляется, что MKRN3 регулирует промоторы с помощью промежуточных белков, таких как белок, содержащий метил-СpG-связывающий домен (MBD3), который является мишенью убиквитинилирования MKRN3. MBD3 в комплексе с тетра-метилцитозин диоксигеназой 2 (TET2) активирует промотор *GnRH1* [80]. Было показано, что осуществляемое MKRN3 убиквитинилирование MBD3 нарушает его связывание с TET2 [80]. Это приводит к общему снижению содержания 5hmC в геномах млекопитающих и, в частности, к снижению активности промотора *GnRH1* (рис. 4, *а*).

Кроме того, известно, что MKRN3 может влиять на уровень трансляции мРНК *GnRH1* путём ингибирования формирования комплекса инициации трансляции [83]. MKRN3 непосредственно связывает и убиквитинилирует поли(А)-связывающие белки (PABPC1 и PABPC4) [83, 84], которые регулируют полиаденилирование и нонсенс-опосредованный распад (NMD), контролируют инициацию трансляции мРНК и осуществляют

контроль качества мРНК [85–87]. Убиквитинилирование, осуществляемое MKRN3, препятствует связыванию PABPC1/4 с поли(А)-хвостом мРНК и, таким образом, приводит к укорочению поли(А)-хвоста мРНК *GnRH1* и снижению её стабильности (рис. 4, *а*) [83]. Кроме того, было показано, что PABP образуют авторепрессивный гетеромерный рибонуклеопротеиновый комплекс с другим белком-партнёром MKRN3 – белком 1, связывающим мРНК IGF2 (IGF2BP1) [79, 88]. Таким образом, MKRN3 может способствовать ингибированию трансляции мРНК *PABP*, образуя комплекс с IGF2BP1 и PABP. IGF2BP1 также участвует в аксональном транспорте мРНК [89], следовательно, взаимодействие MKRN3 с IGF2BP1 может регулировать данный процесс (рис. 4, *в*).

Также было выдвинуто предположение о том, что MKRN3 может быть вовлечён в развитие ПИП на уровне специализации нейронов. Хотя MKRN3 не требуется для дифференцировки GnRH1-экспрессирующих нейронов [84], его функционирование может быть необходимо для формирования нейронной ниши. Действительно, секретируемый пептид NPTX1, который играет роль в формировании и ремоделировании синапсов [90], оказался мишенью полиубиквитинилирования MKRN3 (рис. 4, *б*) [8]. Хотя уровень NPTX1 в сыворотке крови у больных ПИП с дефицитом MKRN3 не изменён [91], эти белки демонстрируют обратную

концентрационную зависимость в гипоталамусах самок мышей в препубертатный период [8]. Таким образом, гипоталамическое нарушение деградации NPTX1 может быть вовлечено в прогрессирование ППП.

Однако биологическая функция MKRN3 не ограничивается регуляцией полового созревания. Достоверно определённые белки-партнёры MKRN3 вовлечены в такие процессы, как регуляция секреции инсулина, межклеточная адгезия, р53-регулируемый клеточный метаболизм, транскрипционная репрессия, а также транспорт и локализация РНК [79, 84]. Кроме того, считается, что MKRN3 может играть роль опухолевого супрессора, поскольку потеря его убиквитинлигазной активности способствует развитию глиобластомы [92] и немелкоклеточной карциномы лёгких [23]. Предполагаемый механизм онкосупрессии подразумевает участие в деградации различных онкогенов и предотвращение определённых взаимодействий посредством непротеолитического убиквитинилирования (рис. 4, б).

Экспериментальные данные указывают на важную роль MKRN3 в контроле сроков полового созревания и поддержке правильной дифференцировки нейронов. Следовательно, экспрессия этого гена должна строго регулироваться в организме.

Было показано, что статус метилирования CpG-области в промоторе *Mkfn3* меняется в процессе полового созревания у мышей, и она значительно меньше метилирована до начала полового созревания [93], что соответствует наблюдаемым различиям в уровнях экспрессии. Кроме того, предполагается, что транскрипционный фактор DREAM является положительным регулятором экспрессии MKRN3 (рис. 4, а), поскольку делеция 4 нуклеотидов в его сайте связывания перед последовательностью MKRN3 приводит к снижению активности промотора и развитию ППП [94].

Также было обнаружено, что микроРНК miR-30b является отрицательным регулятором MKRN3 (рис. 4, а). miR-30b связывается с консервативной областью 3'UTR и способствует снижению содержания MKRN3 в гипоталамусе [95]. По-видимому, фермент Dicer, синтезирующий микроРНК, играет существенную роль в функционировании miR-30b. Врождённая абляция Dicer в Kiss1-экспрессирующих нейронах мышей способствует значительному увеличению экспрессии *Mkfn3* [96]. В то же время на фенотипическом уровне у этих мутантных мышей наблюдается гипогонадотропный гипогонадизм у обоих полов и неполное половое созревание у самок.

Таким образом, MKRN3 является важнейшим молекулярным регулятором, который влияет на экспрессию генов на уровне РНК и белка, но при этом обладает высокой избирательностью

действия. С одной стороны, MKRN3 влияет на транскрипцию своих мишеней через модуляцию метилирования CpG комплексом MBD3-TET2. С другой стороны, он регулирует стабильность мРНК и трансляцию за счёт нарушения связывания PABPC1/4 с поли(А)-содержащей мРНК. Однако, несмотря на участие в столь глобальных процессах и широкое разнообразие мишеней убиквитинилирования, MKRN3 проявляет высокую степень специфичности в своём молекулярном действии. В частности, он в основном вовлечён в регуляцию направления аксонов, организации синапсов, развития и дифференцировки нейронов. Современное понимание этого феномена основано на следующем наблюдении: экспрессия MKRN3 строго регулируется микроРНК и метилированием его промотора. Однако это не объясняет, как обеспечивается внутриклеточная специфичность активности фермента. Наиболее вероятное объяснение механизма регуляции заключается в том, что она опосредована специфическим распознаванием последовательности мРНК, трансляция которой регулируется. При таком сценарии MKRN3 должен обладать способностью взаимодействовать с РНК напрямую, хотя это ещё предстоит подтвердить.

MKRN4

Mkfn4, как и *Mkfn2*, появился в ходе масштабной дупликации генома, специфичной для позвоночных. Оба этих гена расположены в древних дублированных областях в геномах тетрапод и рыб. Интересно, что *Mkfn4* отсутствует у мышей и крыс, что позволяет предположить его потерю в линии, ведущей к мышинным грызунам [48].

Было показано, что у высших позвоночных, таких как птицы и млекопитающие, *Mkfn4* экспрессируется на высоком уровне в нескольких органах, таких как семенники, мышцы и лёгкие. В то же время представители лучепёрых рыб демонстрируют гонадоспецифичные паттерны экспрессии *Mkfn4* [48]. Что ещё более интересно, у лучепёрых рыб материнская копия *Mkfn4* экспрессируется до активации зиготического генома [48].

Структура MKRN4 включает RING-домен и три цинковых пальца C3H, характерные для семейства. В отличие от MKRN1–3, природа и количество цинковых пальцев в MKRN4 гораздо более вариабельны, причём различия зависят от конкретной линии [48]. Ещё одной особенностью последовательности MKRN4 является отсутствие мотива, богатого цистеином и гистидином (CH) [48].

Единственной известной мишенью убиквитинилирования MKRN4, которая необходима для активации Т-клеток, является С-концевой CNH-домен GLK. Было показано, что индуцированная

MKRN4 деградация GLK предохраняет Т-клетки от гиперактивации, которая приводит к развитию системной красной волчанки [9].

РНК-Связывающая активность MKRN. В настоящее время всё чаще обнаруживают ферменты, которые связывают РНК-ассоциированные механизмы с убиквитин-опосредованной деградацией белков. Эти ферменты играют ключевую роль в различных биологических процессах, включая активацию сплайсосомы [97], ответ на повреждение ДНК, инициацию трансляции и регуляцию транскрипции [98]. В частности, было показано, что MKRN влияют на два последних процесса. Однако данных об их РНК-связывающей функции недостаточно.

На сегодняшний день доказано, что три из четырёх ферментов этого семейства являются компонентами рибонуклеопротеиновых комплексов. Было показано, что MKRN1 и MKRN3 связываются с PABPC1, задействуя PAM2-подобный мотив [20, 21, 83]. Наличие PAM2-подобного мотива у MKRN4 указывает на то, что он также может быть частью аналогичного рибонуклеопротеинового комплекса, хотя это ещё предстоит изучить. Примечательно, что несмотря на очевидное сходство последовательностей и организации доменов белков, в составе этих комплексов они проявляют различные свойства. MKRN1 функционирует как глобальный сенсор трансляционных ошибок и запускает ККР [46], а MKRN3 убиквитинилирует PABPC1, тем самым дестабилизируя мРНК [83]. В отличие от остальных членов семейства, MKRN2 не имеет PAM2-подобного мотива и в основном связан с GLE1-содержащим комплексом ядерного экспорта мРНК [24].

Только для двух ферментов (MKRN1 и MKRN2) было продемонстрировано прямое взаимодействие с РНК. Примечательно, что оба фермента предпочитают связываться в области 3'UTR [24, 46]. Кроме того, были охарактеризованы мотивы связывания обоих ферментов, и выяснилось, что для связывания MKRN1 требуется участок поли(А) длиной не менее восьми нуклеотидов [46], тогда как MKRN2 проявляет сродство к регионам, богатым CU [24]. Однако функции других компонентов рибонуклеопротеинового комплекса в определении специфичности узнавания РНК MKRN остаются неясными. Например, РНК-связывающая активность MKRN1 значительно усиливается PABPC1. Более того, мотив узнавания, определённый для MKRN1, в точности соответствует таковому у RRM (РНК-распознающий мотив) домена PABP [99]. Это указывает на то, что несмотря на способность MKRN связывать РНК, специфичность их узнавания может определяться преимущественно другими белками, входящими в состав рибонуклеопротеиновых комплексов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что все члены семейства белков MKRN обладают доменом RING finger и катализируют реакцию E3-убиквитинлигазы. MKRN2–4 появились в результате дупликаций генома и активности ретротранспозонов, поэтому MKRN демонстрируют высокую эволюционную консервативность. MKRN являются примером высокоорганизованных молекулярных машин, выполняющих множество функций в клетке. Более того, мишенями MKRN являются не только эукариотические, но и прокариотические и вирусные белки, и эти убиквитинлигазы широко распространены в различных царствах живых организмов, что делает их важными участниками клеточного метаболизма. Наиболее широкая биологическая функция описана для MKRN1: он модулирует длину теломера, опосредует деградацию ряда вирусных белков, участвует в апоптозе и клеточном метаболизме. MKRN2 известен тем, что отрицательно регулирует воспалительный ответ и контролирует пролиферацию клеток, однако его эффекты могут быть противоречивыми. MKRN3 известен своей тканеспецифичной экспрессией, зависящей от периода онтогенеза, и отрицательной регуляцией полового созревания. MKRN4 способствует нормальному функционированию и активации Т-клеток. Кроме того, собранные данные выявили существенную роль всех MKRN в развитии различных заболеваний, что делает их потенциальными мишенями для создания новых терапевтических подходов.

Также интересно рассмотреть РНК-связывающую функцию, описанную для MKRN. Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что MKRN1, MKRN2 и MKRN3 являются компонентами рибонуклеопротеиновых комплексов. Однако механизм, с помощью которого они распознают РНК, остаётся малоизученным. Кроме того, предстоит выяснить, обладают ли MKRN мотивами узнавания в принципе, или же специфичность их связывания определяется другими белками рибонуклеопротеиновых комплексов. Таким образом, имеющиеся данные и накопившиеся вопросы делают семейство белков MKRN интересным объектом для дальнейших исследований.

Вклад авторов. Е.Г. и М.Е. – написание и редактирование текста; В.С. – подготовка рисунков; О.Д. и А.Т. – обсуждение материала; П.С. – руководство работой, финансирование. Все авторы ознакомились с текстом работы и согласились опубликовать текущую версию манускрипта.

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 24-14-00048).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, T., Liu, W., Wang, C., Ma, X., Akhtar, M. F., Li, Y., et al. (2022) MRKNs: gene, functions, and role in disease and infection, *Front. Oncol.*, **12**, 862206, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.862206>.
2. Gray, T. A., Hernandez, L., Carey, A. H., Schaldach, M. A., Smithwick, M. J., Rus, K., et al. (2000) The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C3H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system, *Genomics* **66**, 76-86, <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6199>.
3. Zhang, Y., Cui, N., and Zheng, G. (2020) Ubiquitination of P53 by E3 ligase MKRN2 promotes melanoma cell proliferation, *Oncol. Lett.*, <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11261>.
4. Lee, E.-W., Lee, M.-S., Camus, S., Ghim, J., Yang, M.-R., Oh, W., et al. (2009) Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis, *EMBO J.*, **28**, 2100-2113, <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.164>.
5. Lee, E.-W., Kim, J.-H., Ahn, Y.-H., Seo, J., Ko, A., Jeong, M., et al. (2012) Ubiquitination and degradation of the FADD adaptor protein regulate death receptor-mediated apoptosis and necroptosis, *Nat. Commun.* **3**, 978, <https://doi.org/10.1038/ncomms1981>.
6. Lee, M.-S., Jeong, M.-H., Lee, H.-W., Han, H.-J., Ko, A., Hewitt, S. M., et al. (2015) PI3K/AKT activation induces PTEN ubiquitination and destabilization accelerating tumourigenesis, *Nat. Commun.* **6**, 7769, <https://doi.org/10.1038/ncomms8769>.
7. Omwancha, J., Zhou, X.-F., Chen, S.-Y., Baslan, T., Fisher, C. J., Zheng, Z., et al. (2006) Makorin RING finger protein 1 (MKRN1) has negative and positive effects on RNA polymerase II-dependent transcription, *Endocrine*, **29**, 363-374, <https://doi.org/10.1385/ENDO:29:2:363>.
8. Liu, H., Kong, X., and Chen, F. (2017) Mkrn3 functions as a novel ubiquitin E3 ligase to inhibit Nptx1 during puberty initiation, *Oncotarget*, **8**, 85102-85109, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19347>.
9. Chuang, H.-C., Hung, W.-T., Chen, Y.-M., Hsu, P.-M., Yen, J.-H., Lan, J.-L., et al. (2022) Genomic sequencing and functional analyses identify MAP4K3/GLK germline and somatic variants associated with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.*, **81**, 243-254, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221010>.
10. Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Doberstein, K., Rödner, C., and Mankertz, A. (2009) Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins, *Virology*, **386**, 122-131, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.039>.
11. Wang, T., Du, Q., Wu, X., Niu, Y., Guan, L., Wang, Z., et al. (2018) Porcine MKRN1 modulates the replication and pathogenesis of porcine circovirus type 2 by inducing capsid protein ubiquitination and degradation, *J. Virol.*, **92**, e00100-18, <https://doi.org/10.1128/JVI.00100-18>.
12. Ko, A., Lee, E.-W., Yeh, J.-Y., Yang, M.-R., Oh, W., Moon, J.-S., et al. (2010) MKRN1 induces degradation of West Nile virus capsid protein by functioning as an E3 ligase, *J. Virol.*, **84**, 426-436, <https://doi.org/10.1128/JVI.00725-09>.
13. Inturi, R., Mun, K., Singethan, K., Schreiner, S., and Punga, T. (2018) Human adenovirus infection causes cellular E3 ubiquitin ligase MKRN1 degradation involving the viral core protein pVII, *J. Virol.*, **92**, e01154-17, <https://doi.org/10.1128/JVI.01154-17>.
14. Meenu, S., Thiagarajan, S., Ramalingam, S., Michael, A., and Ramalingam, S. (2016) Modulation of host ubiquitin system genes in human endometrial cell line infected with *Mycobacterium tuberculosis*, *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, **205**, 163-171, <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00430-015-0432-z>.
15. Subrahmanian, M., Marimuthu, J., Sairam, T., and Sankaran, R. (2020) *In vitro* ubiquitination of *Mycobacterium tuberculosis* by E3 ubiquitin ligase, MKRN1, *Biotechnol. Lett.*, **42**, 1527-1534, <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02873-6>.
16. Dou, Y., Xie, Y., Zhang, L., Liu, S., Xu, D., Wei, Y., et al. (2022) Host MKRN1-mediated mycobacterial PPE protein ubiquitination suppresses innate immune response, *Front. Immunol.*, **13**, 880315, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880315>.
17. Arumugam, T. U., Davies, E., Morita, E. H., and Abe, S. (2007) Sequence, expression and tissue localization of a gene encoding a makorin RING zinc-finger protein in germinating rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) seeds, *Plant Physiol. Biochem.*, **45**, 767-780, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.006>.
18. Wadekar, H. B., Sahi, V. P., Morita, E. H., and Abe, S. (2013) MKRN expression pattern during embryonic and post-embryonic organogenesis in rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare), *Planta*, **237**, 1083-1095, <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1828-2>.

19. Jong, M. T. C., Gray, T. A., Ji, Y., Glenn, C. C., Saitoh, S., Driscoll, D. J., et al. (1999) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region, *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 783-793, <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.783>.
20. Miroci, H., Schob, C., Kindler, S., Ölschläger-Schütt, J., Fehr, S., Jungnitz, T., et al. (2012) Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells, *J. Biol. Chem.*, **287**, 1322-1334, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315291>.
21. Cassar, P. A., Carpenedo, R. L., Samavarchi-Tehrani, P., Olsen, J. B., Park, C. J., Chang, W. Y., et al. (2015) Integrative genomics positions MKRN1 as a novel ribonucleoprotein within the embryonic stem cell gene regulatory network, *EMBO Rep.*, **16**, 1334-1357, <https://doi.org/10.15252/embr.201540974>.
22. Hall, T. M. T. (2005) Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 367-373, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.04.004>.
23. Li, K., Zheng, X., Tang, H., Zang, Y.-S., Zeng, C., Liu, X., et al. (2021) E3 ligase MKRN3 is a tumor suppressor regulating PABPC1 ubiquitination in non-small cell lung cancer, *J. Exp. Med.*, **218**, e20210151, <https://doi.org/10.1084/jem.20210151>.
24. Wolf, E. J., Miles, A., Lee, E. S., Nabeel-Shah, S., Greenblatt, J. F., Palazzo, A. F., et al. (2020) MKRN2 physically interacts with GLE1 to regulate mRNA export and zebrafish retinal development, *Cell Rep.*, **31**, 107693, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107693>.
25. Morreale, F. E., and Walden, H. (2016) Types of ubiquitin ligases, *Cell*, **165**, 248-248.e1, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.003>.
26. Sahi, V. P., Wadekar, H. B., Ravi, N. S., Arumugam, T. U., Morita, E. H., and Abe, S. (2012) A molecular insight into Darwin's "plant brain hypothesis" through expression pattern study of the MKRN gene in plant embryo compared with mouse embryo, *Plant Signal. Behav.*, **7**, 375-381, <https://doi.org/10.4161/psb.19094>.
27. Hirotsune, S., Yoshida, N., Chen, A., Garrett, L., Sugiyama, F., Takahashi, S., et al. (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene, *Nature*, **423**, 91-96, <https://doi.org/10.1038/nature01535>.
28. Gray, T. A., Wilson, A., Fortin, P. J., and Nicholls, R. D. (2006) The putatively functional *Mkrm1-p1* pseudogene is neither expressed nor imprinted, nor does it regulate its source gene in trans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12039-12044, <https://doi.org/10.1073/pnas.0602216103>.
29. Kim, J. H., Park, S.-M., Kang, M. R., Oh, S.-Y., Lee, T. H., Muller, M. T., et al. (2005) Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT, *Genes Dev.*, **19**, 776-781, <https://doi.org/10.1101/gad.1289405>.
30. Panneer Selvam, S., De Palma, R. M., Oaks, J. J., Oleinik, N., Peterson, Y. K., Stahelin, R. V., et al. (2015) Binding of the sphingolipid S1P to hTERT stabilizes telomerase at the nuclear periphery by allosterically mimicking protein phosphorylation, *Sci. Signal.*, **8**, ra58, <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa4998>.
31. Segalés, J., Allan, G. M., and Domingo, M. (2005) Porcine circovirus diseases, *Anim. Health Res. Rev.*, **6**, 119-142, <https://doi.org/10.1079/AHR2005106>.
32. Brinton, M. A. (2002) The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the western hemisphere, *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**, 371-402, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160654>.
33. Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis, *Nature*, **407**, 770-776, <https://doi.org/10.1038/35037710>.
34. Ko, A., Shin, J.-Y., Seo, J., Lee, K.-D., Lee, E.-W., Lee, M.-S., et al. (2012) Acceleration of gastric tumorigenesis through MKRN1-mediated posttranslational regulation of p14ARF, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **104**, 1660-1672, <https://doi.org/10.1093/jnci/djs424>.
35. Lee, H.-K., Lee, E.-W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S.-H., Kim, S.-Y., et al. (2018) Ubiquitylation and degradation of adenomatous polyposis coli by MKRN1 enhances Wnt/ β -catenin signaling, *Oncogene*, **37**, 4273-4286, <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0267-3>.
36. Shimada, H., Shiratori, T., Yasuraoka, M., Kagaya, A., Kuboshima, M., Nomura, F., et al. (2009) Identification of Makorin 1 as a novel SEREX antigen of esophageal squamous cell carcinoma, *BMC Cancer*, **9**, 232, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-232>.
37. Yang, Y., Luo, Y., Huang, S., Tao, Y., Li, C., and Wang, C. (2023) MKRN1/2 serve as tumor suppressors in renal clear cell carcinoma by regulating the expression of p53, *Cancer Biomark.*, **36**, 267-278, <https://doi.org/10.3233/CBM-210559>.
38. Zhang, Y., Li, Q., Liu, H., Tang, H., Yang, H., Wu, D., et al. (2023) MKRN1 promotes colorectal cancer metastasis by activating the TGF- β signalling pathway through SNIP1 protein degradation, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **42**, 219, <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02788-w>.
39. Bai, X., Yang, H., Pu, J., Zhao, Y., Jin, Y., and Yu, Q. (2021) MKRN1 ubiquitylates p21 to protect against intermittent hypoxia-induced myocardial apoptosis, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2021**, 1-13, <https://doi.org/10.1155/2021/9360339>.

40. Kotla, S., Le, N.-T., Vu, H. T., Ko, K. A., Gi, Y. J., Thomas, T. N., et al. (2019) Endothelial senescence-associated secretory phenotype (SASP) is regulated by Makorin-1 ubiquitin E3 ligase, *Metabolism*, **100**, 153962, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.153962>.
41. Semple, R. K. (2006) PPAR and human metabolic disease, *J. Clin. Invest.*, **116**, 581-589, <https://doi.org/10.1172/JCI28003>.
42. Fang, Y.-C., Fu, S.-J., Hsu, P.-H., Chang, P.-T., Huang, J.-J., Chiu, Y.-C., et al. (2021) Identification of MKRN1 as a second E3 ligase for Eag1 potassium channels reveals regulation via differential degradation, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100484, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100484>.
43. Lee, M.-S., Han, H.-J., Han, S. Y., Kim, I. Y., Chae, S., Lee, C.-S., et al. (2018) Loss of the E3 ubiquitin ligase MKRN1 represses diet-induced metabolic syndrome through AMPK activation, *Nat. Commun.*, **9**, 3404, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05721-4>.
44. Han, H., Chae, S., Hwang, D., and Song, J. (2018) Attenuating MKRN1 E3 ligase-mediated AMPK α suppression increases tolerance against metabolic stresses in mice, *Cell Stress*, **2**, 325-328, <https://doi.org/10.15698/cst2018.11.164>.
45. Meng, Q., and Xia, Y. (2011) c-Jun, at the crossroad of the signaling network, *Protein Cell*, **2**, 889-898, <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1113-3>.
46. Hildebrandt, A., Brüggemann, M., Rücklé, C., Boerner, S., Heidelberger, J. B., Busch, A., et al. (2019) The RNA-binding ubiquitin ligase MKRN1 functions in ribosome-associated quality control of poly(A) translation, *Genome Biol.*, **20**, 216, <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1814-0>.
47. Gray, T. A., Azama, K., Whitmore, K., Min, A., Abe, S., and Nicholls, R. D. (2001) Phylogenetic conservation of the Makorin-2 gene, encoding a multiple zinc-finger protein, antisense to the RAF1 proto-oncogene, *Genomics*, **77**, 119-126, <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6627>.
48. Böhne, A., Darras, A., D'Cotta, H., Baroiller, J.-F., Galiana-Arnoux, D., and Volff, J.-N. (2010) The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene, *BMC Genomics*, **11**, 721, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-721>.
49. Qi, P., Yexie, Z., Xue, C., Huang, G., Zhao, Z., and Zhang, X. (2023) LINC00294/miR-620/MKRN2 axis provides biomarkers and negatively regulates malignant progression in colorectal carcinoma, *Hum. Exp. Toxicol.*, **42**, 096032712311675, <https://doi.org/10.1177/09603271231167577>.
50. Shin, C., Ito, Y., Ichikawa, S., Tokunaga, M., Sakata-Sogawa, K., and Tanaka, T. (2017) MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- κ B and negatively regulates inflammatory responses, *Sci. Rep.*, **7**, 46097, <https://doi.org/10.1038/srep46097>.
51. Yang, P.-H., Cheung, W. K. C., Peng, Y., He, M.-L., Wu, G.-Q., Xie, D., et al. (2008) Makorin-2 is a neurogenesis inhibitor downstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) signal, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8486-8495, <https://doi.org/10.1074/jbc.M704768200>.
52. Liu, Z., Xiang, S., Guo, X., Zhou, J., Liao, L., Kou, J., et al. (2022) MKRN2 inhibits the proliferation of gastric cancer by downregulating PKM2, *Aging*, **14**, 2004-2013, <https://doi.org/10.18632/aging.203643>.
53. Jiang, J., Xu, Y., Ren, H., Wudu, M., Wang, Q., Song, X., et al. (2018) MKRN2 inhibits migration and invasion of non-small-cell lung cancer by negatively regulating the PI3K/Akt pathway, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 189, <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0855-7>.
54. Lee, K. Y., Chan, K. Y. Y., Tsang, K. S., Chen, Y. C., Kung, H., Ng, P. C., et al. (2014) Ubiquitous expression of MAKORIN-2 in normal and malignant hematopoietic cells and its growth promoting activity, *PLoS One*, **9**, e92706, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092706>.
55. Wang, L., Yong, Y.-L., Wang, K.-K., Xie, Y.-X., Qian, Y.-C., Zhou, F.-M., et al. (2023) MKRN2 knockout causes male infertility through decreasing STAT1, SIX4, and TNC expression, *Front. Endocrinol.*, **14**, 1138096, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1138096>.
56. Qian, Y.-C., Xie, Y.-X., Wang, C.-S., Shi, Z.-M., Jiang, C.-F., Tang, Y.-Y., et al. (2020) Mkrn2 deficiency induces teratozoospermia and male infertility through p53/PERP-mediated apoptosis in testis, *Asian J. Androl.*, **22**, 414, https://doi.org/10.4103/aja.aja_76_19.
57. Jiang, X., and Chen, D. (2021) The identification of novel gene mutations for degenerative lumbar spinal stenosis using whole-exome sequencing in a Chinese cohort, *BMC Med. Genomics*, **14**, 134, <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00981-4>.
58. Raza, A., Diehl, S. A., Kremmentsov, D. N., Case, L. K., Li, D., Kost, J., et al. (2023) A genetic locus complements resistance to *Bordetella pertussis*-induced histamine sensitization, *Commun. Biol.*, **6**, 244, <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04603-w>.
59. Wang, Q., Han, C., Wang, K., Sui, Y., Li, Z., Chen, N., et al. (2020) Integrated analysis of exosomal lncRNA and mRNA expression profiles reveals the involvement of lnc-MKRN2-42:1 in the pathogenesis of Parkinson's disease, *CNS Neurosci. Ther.*, **26**, 527-537, <https://doi.org/10.1111/cns.13277>.

60. Jong, M. T. C., Carey, A. H., Caldwell, K. A., Lau, M. H., Handel, M. A., Driscoll, D. J., et al. (1999) Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region, *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 795-803, <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.795>.
61. Kanber, D., Giltay, J., Wiczorek, D., Zogel, C., Hochstenbach, R., Caliebe, A., et al. (2009) A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome, *Eur. J. Hum. Genet.*, **17**, 582-590, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.232>.
62. Heras, V., Sangiao-Alvarellos, S., Manfredi-Lozano, M., Sanchez-Tapia, M. J., Ruiz-Pino, F., Roa, J., et al. (2019) Hypothalamic miR-30 regulates puberty onset via repression of the puberty-suppressing factor, Mkrn3, *PLoS Biol.*, **17**, e3000532, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000532>.
63. Abreu, A. P., Dauber, A., Macedo, D. B., Noel, S. D., Brito, V. N., Gill, J. C., et al. (2013) Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene *MKRN3*, *N. Engl. J. Med.*, **368**, 2467-2475, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302160>.
64. Abreu, A. P., Toro, C. A., Song, Y. B., Navarro, V. M., Bosch, M. A., Eren, A., et al. (2020) MKRN3 inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons, *J. Clin. Invest.*, **130**, 4486-4500, <https://doi.org/10.1172/JCI136564>.
65. Pereira, S. A., Oliveira, F. C. B., Naulé, L., Royer, C., Neves, F. A. R., Abreu, A. P., et al. (2023) Mouse testicular Mkrn3 expression is primarily interstitial, increases peripubertally, and is responsive to LH/hCG, *Endocrinology*, **164**, bqad123, <https://doi.org/10.1210/endocr/bqad123>.
66. Hoyos Sanchez, M. C., Bayat, T., Gee, R. R. F., and Fon Tacer, K. (2023) Hormonal imbalances in Prader-Willi and Schaaf-Yang syndromes imply the evolution of specific regulation of hypothalamic neuroendocrine function in mammals, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 13109, <https://doi.org/10.3390/ijms241713109>.
67. Ludwig, N. G., Radaeli, R. F., Silva, M. M. X., Romero, C. M., Carrilho, A. J. F., Bessa, D., et al. (2016) A boy with Prader-Willi syndrome: unmasking precocious puberty during growth hormone replacement therapy, *Arch. Endocrinol. Metab.*, **60**, 596-600, <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000196>.
68. Lee, H. S., and Hwang, J. S. (2013) Central precocious puberty in a girl with Prader-Willi syndrome, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, **26**, <https://doi.org/10.1515/jpem-2013-0040>.
69. Meader, B. N., Albano, A., Sekizkardes, H., and Delaney, A. (2020) Heterozygous deletions in *MKRN3* cause central precocious puberty without Prader-Willi syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **105**, 2732-2739, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa331>.
70. Carel, J.-C., and Léger, J. (2008) Precocious puberty, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2366-2377, <https://doi.org/10.1056/NEJMcp0800459>.
71. Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., et al. (1971) Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones, *Science*, **173**, 1036-1038, <https://doi.org/10.1126/science.173.4001.1036>.
72. Seraphim, C. E., Canton, A. P. M., Montenegro, L., Piovesan, M. R., Macedo, D. B., Cunha, M., et al. (2021) Genotype-phenotype correlations in central precocious puberty caused by *MKRN3* mutations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **106**, e1041-e1050, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa955>.
73. Brito, V. N., Canton, A. P. M., Seraphim, C. E., Abreu, A. P., Macedo, D. B., Mendonca, B. B., et al. (2023) The congenital and acquired mechanisms implicated in the etiology of central precocious puberty, *Endocr. Rev.*, **44**, 193-221, <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac020>.
74. Roberts, S. A., Naulé, L., Chouman, S., Johnson, T., Johnson, M., Carroll, R. S., et al. (2022) Hypothalamic overexpression of makorin ring finger protein 3 results in delayed puberty in female mice, *Endocrinology*, **163**, bqac132, <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac132>.
75. Kutlu, E., Ozgen, L. T., Bulut, H., Kocyigit, A., Ustunova, S., Hüseyinbas, O., et al. (2023) Investigation of irisin's role in pubertal onset physiology in female rats, *Peptides*, **163**, 170976, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.170976>.
76. Wahab, F., Khan, I. U., Polo, I. R., Zubair, H., Drummer, C., Shahab, M., et al. (2019) Irisin in the primate hypothalamus and its effect on GnRH *in vitro*, *J. Endocrinol.*, **241**, 175-187, <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0574>.
77. Ezzat, A., Pereira, A., and Clarke, I. J. (2015) Kisspeptin is a component of the pulse generator for GnRH secretion in female sheep but not the pulse generator, *Endocrinology*, **156**, 1828-1837, <https://doi.org/10.1210/en.2014-1756>.
78. Topaloglu, A. K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A. S., Kotan, L. D., Porter, K. M., et al. (2009) TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction, *Nat. Genet.*, **41**, 354-358, <https://doi.org/10.1038/ng.306>.
79. Naulé, L., Mancini, A., Pereira, S. A., Gassaway, B. M., Lydeard, J. R., Magnotto, J. C., et al. (2023) MKRN3 inhibits puberty onset via interaction with IGF2BP1 and regulation of hypothalamic plasticity, *JCI Insight*, **8**, e164178, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.164178>.

80. Li, C., Lu, W., Yang, L., Li, Z., Zhou, X., Guo, R., et al. (2020) MKRN3 regulates the epigenetic switch of mammalian puberty via ubiquitination of MBD3, *Natl. Sci. Rev.*, **7**, 671-685, <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa023>.
81. Chen, Z., You, Q., Wang, J., Dong, Z., Wang, W., Yang, Y., et al. (2024) The functional study of a novel MKRN3 missense mutation associated with familial central precocious puberty, *Am. J. Med. Genet. A*, **194**, e63460, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63460>.
82. Magnotto, J. C., Mancini, A., Bird, K., Montenegro, L., Tütüncüler, F., Pereira, S. A., et al. (2023) Novel MKRN3 missense mutations associated with central precocious puberty reveal distinct effects on ubiquitination, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **108**, 1646-1656, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad151>.
83. Li, C., Han, T., Li, Q., Zhang, M., Guo, R., Yang, Y., et al. (2021) MKRN3-mediated ubiquitination of Poly(A)-binding proteins modulates the stability and translation of *GNRH1* mRNA in mammalian puberty, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 3796-3813, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab155>.
84. Yellapragada, V., Liu, X., Lund, C., Käsäkoski, J., Pulli, K., Vuoristo, S., et al. (2019) MKRN3 interacts with several proteins implicated in puberty timing but does not influence GNRH1 expression, *Front. Endocrinol.*, **10**, 48, <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00048>.
85. Smith, R. W. P., Blee, T. K. P., and Gray, N. K. (2014) Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans, *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1229-1237, <https://doi.org/10.1042/BST20140111>.
86. Burgess, H. M., and Gray, N. K. (2010) mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1517-1522, <https://doi.org/10.1042/BST0381517>.
87. Brook, M., and Gray, N. K. (2012) The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover, *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 856-864, <https://doi.org/10.1042/BST20120100>.
88. Patel, G. P. (2005) The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 7074-7089, <https://doi.org/10.1093/nar/gki1014>.
89. Donnelly, C. J., Willis, D. E., Xu, M., Tep, C., Jiang, C., Yoo, S., et al. (2011) Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity: Axonal mRNAs compete for a limited supply of ZBP1, *EMBO J.*, **30**, 4665-4677, <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.347>.
90. Schaukowitch, K., Reese, A. L., Kim, S.-K., Kilaru, G., Joo, J.-Y., Kavalali, E. T., et al. (2017) An intrinsic transcriptional program underlying synaptic scaling during activity suppression, *Cell Rep.*, **18**, 1512-1526, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.033>.
91. Jeong, H. R., Yoon, J. S., Lee, H. J., Shim, Y. S., Kang, M. J., and Hwang, I. T. (2021) Serum level of NPTX1 is independent of serum MKRN3 in central precocious puberty, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, **34**, 59-63, <https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0402>.
92. Wang, C., Zhang, M., Liu, Y., Cui, D., Gao, L., and Jiang, Y. (2023) CircRNF10 triggers a positive feedback loop to facilitate progression of glioblastoma via redeploying the ferroptosis defense in GSCs, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **42**, 242, <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02816-9>.
93. Fanis, P., Morrou, M., Tomazou, M., Michailidou, K., Spyrou, G. M., Toumba, M., et al. (2023) Methylation status of hypothalamic *Mkrn3* promoter across puberty, *Front. Endocrinol.*, **13**, 1075341, <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1075341>.
94. Macedo, D. B., França, M. M., Montenegro, L. R., Cunha-Silva, M., Bessa, D. S., Abreu, A. P., et al. (2018) Central precocious puberty caused by a heterozygous deletion in the MKRN3 promoter region, *Neuroendocrinology*, **107**, 127-132, <https://doi.org/10.1159/000490059>.
95. Mørup, N., Stakaitis, R., Main, A. M., Golubickaite, I., Hagen, C. P., Juul, A., et al. (2023) Circulating levels and the bioactivity of miR-30b increase during pubertal progression in boys, *Front. Endocrinol.*, **14**, 1120115, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1120115>.
96. Roa, J., Ruiz-Cruz, M., Ruiz-Pino, F., Onieva, R., Vazquez, M. J., Sanchez-Tapia, M. J., et al. (2022) Dicer ablation in Kiss1 neurons impairs puberty and fertility preferentially in female mice, *Nat. Commun.*, **13**, 4663, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32347-4>.
97. Makarova, O. V., Makarov, E. M., Urlaub, H., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., et al. (2004) A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing, *EMBO J.*, **23**, 2381-2391, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600241>.
98. Hildebrandt, A., Alanis-Lobato, G., Voigt, A., Zarnack, K., Andrade-Navarro, M. A., Beli, P., et al. (2017) Interaction profiling of RNA-binding ubiquitin ligases reveals a link between posttranscriptional regulation and the ubiquitin system, *Sci. Rep.*, **7**, 16582, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16695-6>.
99. Webster, M. W., Chen, Y.-H., Stowell, J. A. W., Alhusaini, N., Sweet, T., Graveley, B. R., et al. (2018) mRNA deadenylation is coupled to translation rates by the differential activities of Ccr4-not nucleases, *Mol. Cell*, **70**, 1089-1100.e8, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.033>.

DIVERSITY OF MOLECULAR FUNCTIONS OF RNA-BINDING UBIQUITIN LIGASES FROM THE MKRN PROTEIN FAMILY

Review

**E. A. Guseva^{1,2,3*#}, M. A. Emelianova^{1,3#}, V. N. Sidorova⁴, A. N. Tyulpakov⁵,
O. A. Dontsova^{1,2,3,6}, and P. V. Sergiev^{1,2,3*}**

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

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia

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

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia

⁵ Bochkov Research Centre of Medical Genetics, 115522 Moscow, Russia

⁶ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

Makorin RING finger protein family includes four members (MKRN1, MKRN2, MKRN3, and MKRN4) that belong to E3 ubiquitin ligases and play a key role in various biological processes, such as cell survival, cell differentiation, and innate and adaptive immunity. MKRN1 contributes to the tumor growth suppression, energy metabolism, anti-pathogen defense, and apoptosis and has a broad variety of targets, including hTERT, APC, FADD, p21, and various viral proteins. MKRN2 regulates cell proliferation, inflammatory response; its targets are p65, PKM2, STAT1, and other proteins. MKRN3 is a master regulator of puberty timing; it controls the levels of gonadotropin-releasing hormone in the arcuate nucleus neurons. MKRN4 is the least studied member of the MKRN protein family, however, it is known to contribute to the T cell activation by ubiquitination of serine/threonine kinase MAP4K3. Proteins of the MKRN family are associated with the development of numerous diseases, for example, systemic lupus erythematosus, central precocious puberty, Prader–Willi syndrome, degenerative lumbar spinal stenosis, inflammation, and cancer. In this review, we discuss the functional roles of all members of the MKRN protein family and their involvement in the development of diseases.

Keywords: E3 ubiquitin ligase, RING finger proteins, MKRN, makorins, RNA-binding ubiquitin ligase, central precocious puberty, systemic lupus erythematosus, tumor suppressors

АНОМАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ТРИПЛЕТ-ТРИПЛЕТНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ МУТАНТА I(L177)N *Cereibacter sphaeroides*

© 2024 Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: pros@issp.serpukhov.su

Поступила в редакцию 20.03.2024

После доработки 08.08.2024

Принята к публикации 22.08.2024

Тушение триплетного состояния первичного донора фотосинтетических реакционных центров за счёт переноса энергии на молекулу каротиноида является эффективным механизмом защиты от заселения химически активного синглетно-возбуждённого кислорода. Этот процесс в реакционных центрах *Cereibacter sphaeroides* является термоактивированным и прекращается при температурах ниже 40 К. Замещение в этих реакционных центрах аминокислотного остатка изолейцина на гистидин в положении 177 L-субъединицы приводит к резкому уменьшению энергии активации, так что триплеты каротиноида продолжают заселяться даже при температуре 10 К. Энергия активации триплет-триплетного переноса энергии у мутанта оценена в $7,5 \text{ см}^{-1}$, что более чем в десять раз ниже активационной энергии в исходных реакционных центрах. При этом в определённом диапазоне температур перенос энергии протекает у мутанта медленнее, что связано с увеличением эффективного расстояния триплет-триплетного переноса. Насколько нам известно, данная мутация – это первая модификация реакционных центров, в результате которой произошло значительное понижение энергии активации процесса триплет-триплетного переноса энергии на молекулу каротиноида. Реакционные центры мутанта I(L177)N представляют значительный интерес для дальнейших исследований механизмов тушения триплетных состояний и других фотофизических и фотохимических процессов в реакционных центрах бактериального фотосинтеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр, первичный донор электрона, каротиноид, триплет-триплетный перенос энергии, температурная зависимость, направленный мутагенез, *Cereibacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972524090045 EDN: JJXTCO

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших защитных функций фототрофных организмов является тушение триплетных состояний фотосинтетических пигментов. Такие состояния возникают с определённой вероятностью на всех стадиях процессов переноса и преобразования энергии возбуждённых молекул пигментов, и особенно при фотоиндуцированном переносе электронов в реакционных центрах (РЦ).

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл; БФео – бактериофеофитин; Кар – каротиноид; РЦ – реакционный центр; В_А, В_В – мономерные бактериохлорофиллы; Р – димер бактериохлорофиллов, первичный донор РЦ; Q_А, Q_В – акцепторы РЦ, убихиноны; T-T – триплет-триплетный.

* Адресат для корреспонденции.

Триплеты большинства хлорофиллов и бактериохлорофиллов (БХл) представляют существенную потенциальную опасность, поскольку они имеют энергию, достаточную для заселения чрезвычайно активного [1] синглетно-возбуждённого состояния кислорода. В данной работе исследовали тушение триплетов БХл РЦ *Cereibacter* (ранее *Rhodobacter*) *sphaeroides*. В состав РЦ *C. sphaeroides* входят три белковые субъединицы и десять кофакторов: 4 молекулы БХл *a*, две молекулы бактериофеофитина (БФео) *a*, две молекулы убихинона (Q), ион негемового железа и одна молекула каротиноида (Кар), обычно сфероидена, в 15,15'-цис-конфигурации [2, 3]. Кофакторы организованы в две квазисимметричные цепи (часто обозначаемые А и В). Два из четырёх БХл образуют димер Р с достаточно сильным межмолекулярным взаимодействием, а остальные два БХл (В_А, В_В) взаимодей-

ствуют с кофакторами РЦ значительно слабее и называются мономерными БХл. Димер Р при возбуждении РЦ выполняет роль первичного донора электрона. Перенос электрона развивается в значительной степени селективно по А-цепи кофакторов: $^1P^* \rightarrow V_A \rightarrow B_{FEO_A} \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$ [4, 5]. В ходе нормально функционирующего фотосинтеза все стадии переноса, вплоть до $P^+Q_B^-$, имеют суммарный нулевой спин, сохраняя исходное синглетное состояние возбуждённого первичного донора, $S = 0$. Если, однако, перенос электрона от БФео к убихинону невозможен (например, при интенсивном освещении, когда Q_A может находиться в восстановленном состоянии), в радикальной паре $[P^+B_{FEO}^-]$ протекает синглет-триплетная спиновая эволюция, после рекомбинации зарядов приводящая к заселению триплетного состояния первичного донора, 3P . Квантовый выход 3P меняется в пределах от примерно 0,1 до 1 при понижении температуры от комнатной до < 70 К [4]. Чаще всего тушение триплетов (бактерио)хлорофиллов происходит за счёт быстрого переноса их энергии на молекулы Кар. Впервые этот процесс был исследован в работе Parson и Monger [6] для РЦ *C. sphaeroides*. Триплеты большинства бактериальных Кар лежат по энергии ниже уровня синглетного кислорода и имеют короткое время жизни, что эффективно предотвращает генерацию $^1O_2^*$. В этой же работе было обнаружено, что быстрый триплет-триплетный (*T-T*) перенос энергии с первичного донора на Кар замедляется при понижении температуры и при $T < 40$ К прекращается. Авторами было сделано предположение о том, что наблюдаемый перенос энергии – двухступенчатый, и промежуточное состояние расположено выше 3P по энергии, так что весь процесс принимает характер термоактивированного. В ряде последующих работ было показано, что роль такого состояния играет молекула мономерного БХл V_B , расположенная в неактивной цепи РЦ (рис. 1) [7–16]. Поскольку состояние 3V_B ни в одной из работ зарегистрировать не удалось, такой вывод был сделан на основе исследования изменения температурной зависимости скорости *T-T* переноса $^3P \rightarrow$ Кар в результате модификаций РЦ, влияющих на уровни энергии триплетов Р или V_B , т.е. на энергию активации (E_a) процесса. Были применены такие подходы, как использование различных штаммов *C. sphaeroides* [7], химическая модификация РЦ [8, 10, 11] и, наконец, изменение белкового окружения кофакторов РЦ путём внесения направленных мутаций [9, 12–16]. Экспериментально определённое значение E_a для дикого штамма *C. sphaeroides* варьирует в пределах от 100 см^{-1} до $210 \pm 40 \text{ см}^{-1}$. Во всех перечисленных работах внесённые изменения приводили либо к заметному увеличению энергии

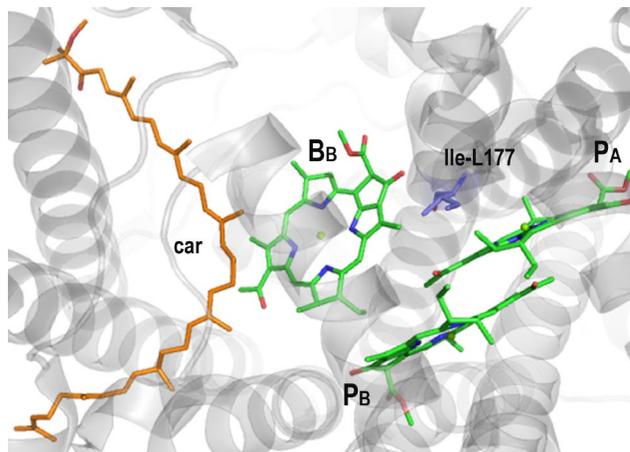


Рис. 1. Расположение аминокислотного остатка изолейцина L177 в структуре РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (PDB ID: 6Z02). Car – каротиноид

активации, либо к её незначительным изменениям. Невозможность наблюдения триплетов V_B была интерпретирована как результат быстрого переноса энергии $^3V_B \rightarrow$ Кар. Участие молекул V_B в тушении 3P также согласуется с рентгеноструктурными данными [2, 3]. *T-T* перенос энергии протекает по механизму Декстера и требует перекрывания электронных оболочек донора и акцептора энергии, что приводит к экспоненциальному уменьшению скорости переноса с увеличением расстояния между участвующими молекулами [17, 18]. Расстояние между Р и Кар несколько превышает общепринятое предельное значение *T-T* переноса (около 10 \AA). При этом молекула V_B расположена между Р и Кар, что делает её подходящим кандидатом на роль промежуточного акцептора.

В данной работе изучена аномальная температурная зависимость *T-T* переноса энергии с 3P на Кар в РЦ мутанта I(L177)Н *C. sphaeroides* методами ЭПР с временным разрешением в диапазоне температур $200\text{--}10$ К и оптического флеш-фотолиза. В этом мутанте остаток изолейцина в положении L177 заменён на гистидин (рис. 1). Указанная мутация оказалась уникальной тем, что она приводит к значительному понижению активационной энергии E_a процесса $^3P \rightarrow$ Кар, так что перенос энергии с заселением триплетов Кар продолжается даже при $T = 10$ К.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение РЦ, несущих аминокислотную замену изолейцина на гистидин в позиции L177, описано ранее [19]. В качестве РЦ псевдодикого типа использовали РЦ, выделенные из штамма *C. sphaeroides* DD13, который содержал производ-

ную pRK-415, несущую немодифицированные копии генов *puf-LMX* [19]. Культуру рекомбинантных штаммов *C. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера [20] в темноте, в полуаэробных условиях в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл). РЦ выделяли методом ионообменной (дикий тип) и аффинной (мутант) хроматографии, как описано ранее [21, 22]. Для работы с изолированными РЦ использовали буфер, содержащий 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 0,2%-ный холат натрия, который, как показано нами ранее, способствует стабилизации РЦ [23].

Измерения ЭПР проводили на спектрометре прямого детектирования высокого временного разрешения, разработанного в нашей лаборатории на базе 3-см спектрометра (РЭ 1306, СССР). Модуляцию магнитного поля выключали, сигнал снимали непосредственно с предусилителя блока СВЧ. Выходной сигнал усилителя подавался на вход стробоскопического интегратора SR 250 («Stanford Research Systems», США), где интегрировался в заданном временном интервале. Запуск интегратора (момент начала интегрирования) был синхронизирован с возбуждающей вспышкой света. Выходной сигнал интегратора записывали в память компьютера синхронно с развёрткой магнитного поля, управляемой тем же компьютером. Для повышения чувствительности развёртку магнитного поля проводили многократно, суммируя полученные спектры. Временное разрешение спектрометра составляет примерно 170 нс.

В качестве источника возбуждающего импульса света использовали лазерную систему («Solar Laser Systems», Белоруссия), состоящую из лазера накачки LQ 529В и параметрического преобразователя LP 603. Возбуждение, если не указано иначе, проводили в полосу поглощения Р; конкретные длины волн возбуждения указаны в подписях к рисункам. Энергия вспышки на поверхности образца составляла ~ 1 мДж при длительности 6 нс и ширине полосы генерации < 1 нм.

Изменения оптического поглощения образцов в ответ на такую же лазерную вспышку измеряли с помощью фотоумножителя ФЭУ-79 (СССР). Измерения сигнала триплетов Кар проводили на длине волны 540 нм с использованием интерференционного светофильтра и стеклянного фильтра СЗС-21 для подавления артефакта вспышки. Для измерения отклика системы измеряли сигнал от лазерной вспышки без образца и при удалённом стеклянном фильтре. Сигналы ФЭУ записывали на осциллограф НДО4022 («Teledyne/LeCroy», США) и затем передавали на компьютер для обработки.

Температуру образцов в обоих случаях стабилизировали при помощи криостатов ESR 900

(«Oxford Instruments», Англия). В качестве крионосителя использовали жидкий азот или жидкий гелий в зависимости от требуемой температуры. Препараты РЦ, содержащие 66% глицерина, помещали в кварцевые трубки внутренним диаметром 3 мм. Состояние с восстановленным акцептором Q_A получали путём добавления 10 мМ аскорбата натрия и замораживания под светом, начиная от температуры 285 К.

Использованная оптическая система не имеет достаточного временного разрешения для прямого определения интересующей нас скорости нарастания сигнала ³Кар. Кинетические параметры оптических изменений поглощения образца получали следующим образом. С использованием программы Origin («OriginLab», США) проводили свёртку функции отклика системы с теоретической биэкспоненциальной кривой. Результат совмещали с экспериментальной кинетикой, меняя параметры расчёта и добиваясь наилучшего совпадения с экспериментом.

Измерение спектра оптического поглощения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1601PC («Shimadzu», Япония) в плоской 1-мм кювете, помещаемой в самодельный криостат. К образцам, содержащим 66%-ный глицерин, был добавлен 1 мМ аскорбат натрия для поддержания первичного донора в восстановленном состоянии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлены низкотемпературные спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и мутанта I(L177)Н. Данная мутация вызывает наиболее яркие изменения спектра в районе длинноволновой Q_Y-полосы поглощения Р, которая в случае мутанта сдвигается в коротковолновую область на 18 нм, и её интенсивность падает.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР РЦ мутанта I(L177)Н (рис. 3, а) и РЦ дикого типа (рис. 3, б) *C. sphaeroides*, измеренные при нескольких температурах.

Более детальные температурные зависимости триплетных спектров ЭПР приведены на рис. П1 и рис. П2 Приложения.

Достаточно хорошее спектральное разрешение позволяет легко идентифицировать линии ЭПР, принадлежащие триплетам Кар и первичного донора РЦ, как показано на рис. 3. Важные параметры спектров ЭПР триплетных состояний, расщепление в нулевом поле [25], составляют: |D| = 0,0190 см⁻¹, |E| = 0,0033 см⁻¹ для триплета Р и |D| = 0,0278 см⁻¹, |E| = 0,0040 см⁻¹ для триплета Кар. Эти значения одинаковы для мутанта и дикого типа и хорошо соответствуют впервые

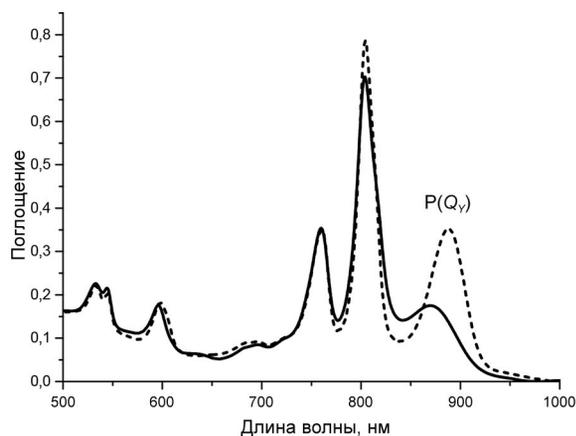


Рис. 2. Спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (пунктир) и мутанта I(L177)H (сплошная линия), $T = 100$ К. Полосы Q_y первичного донора Р лежат в области 870–890 нм. Подробное описание спектра приведено в работе Vasilieva et al. [24]

приведённым в работе Frank et al. [26] величинам. Сравнивая спектры на рис. 3, можно отметить следующие различия между свойствами триплетных состояний в этих РЦ. В РЦ дикого типа *C. sphaeroides* при температурах 100 К и 10 К наблюдаются чистые спектры триплетов Кар (рис. 3, б, 1) и первичного донора (рис. 3, б, 3). Спектры мутантных РЦ при всех приведённых температурах представляют собой суперпозицию обоих этих триплетных состояний. Важно отметить, что триплет Кар в этом случае отчётливо виден даже при 10 К (рис. 3, а, 3). Температурная зависимость спектра ЭПР мутанта I(L177)H указывает на значительное уменьшение энергии активации E_a T - T переноса энергии на Кар. Оценка величины E_a приведена в разделе «Обсуждение результатов».

Нельзя полностью исключить вероятность неомогенности препарата РЦ мутанта. Теоретически препарат может содержать фракции с различной эффективностью переноса энергии ${}^3P \rightarrow {}^3V \rightarrow {}^3Car$, что вызывается присутствием неодинаковых по энергии молекул Р и В. В таком случае освещение на разных длинах волн будет приводить к возбуждению разных фракций и к появлению спектров ЭПР с разными вкладами состояний 3P и 3Car . На рис. ПЗ Приложения приведены результаты такого измерения при возбуждении в области первичного донора (860–905 нм) и мономерных БХл (800–804 нм). Во всех случаях наблюдаемая форма линии ЭПР практически не изменяется, что указывает на гомогенность препарата РЦ мутанта.

Несмотря на меньшую величину энергии активации, T - T перенос энергии у мутанта I(L177)H при некоторых температурах протекает медленнее, чем у дикого типа. На это указывает при-

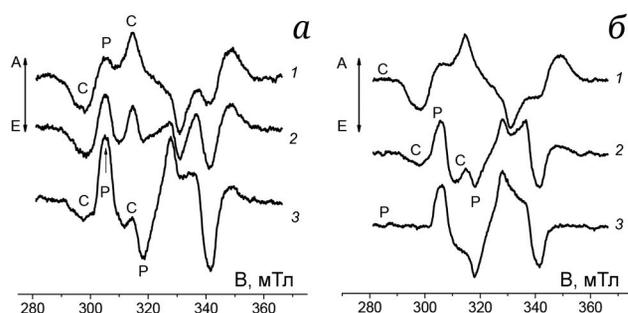


Рис. 3. Влияние температуры на спектры ЭПР РЦ мутанта I(L177)H (а) и РЦ дикого типа (б) *C. sphaeroides*. (1) $T = 100$ К, (2) $T = 40$ К, (3) $T = 10$ К. Буквами на спектрах обозначены: С – линии триплетов Кар, Р – линии триплетов первичного донора Р. Линии обозначены только в низкопольной части спектра. Условия измерения: запись сигнала в интервале 0,2–1,7 мкс после возбуждающей вспышки, $\lambda_{\text{возб}} = 882$ нм. Стрелки показывают направление поглощения (А) и излучения (Е) мощности СВЧ

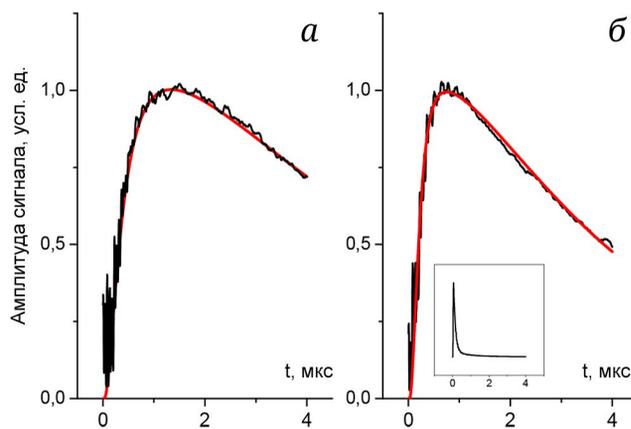


Рис. 4. Изменения оптического поглощения при $\lambda = 540$ нм, вызванные возбуждением в полосу первичного донора ($\lambda_{\text{возб}} = 870$ нм) в РЦ с восстановленным первичным акцептором. а – РЦ мутанта I(L177)H; б – РЦ дикого типа. $T = 100$ К. На врезке представлен инвертированный отклик системы на 6-нс вспышку лазера. Гладкими кривыми представлены результаты свёртки сигнала вспышки с теоретическими биэкспонентами. Параметры теоретических кривых приведены в тексте

сутствие сигнала триплет Р в интервале времён регистрации ЭПР (пик Р на рис. 3, а, 1), отсутствующего у дикого типа (рис. 3, б, 1). Для более детального изучения данного эффекта были проведены оптические измерения динамики 3Car (рис. 4).

На этом рисунке представлены начальные участки сигналов, измеренных в районе максимума поглощения триплетов Кар [6] при возбуждении в полосу поглощения первичного донора. Время нарастания сигналов было оценено в 250 нс для РЦ мутанта и в 100 нс в случае РЦ дикого типа при $T = 100$ К. Время полуспада

сигналов лежит в пределах 3–5 мкс, характерных для триплетных состояний Кар.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тушение триплетного состояния первичного донора РЦ является важным процессом, поскольку защищает РЦ от генерации активного синглетного кислорода в условиях высокой освещённости, когда первичный акцептор Q_A не успевает реокисляться цепью электронного транспорта, так что очередной квант света застаёт его в восстановленном состоянии. В результате описываемой мутации изолейцин в положении 177 L-субъединицы РЦ *S.phaeroides* был замещён на гистидин. Остаток изолейцина расположен приблизительно между первичным донором Р и БХл V_B (рис. 1). Внесение мутации I(L177)H достаточно слабо влияет на фотохимические свойства РЦ. Так, квантовый выход фотоиндуцированного переноса электрона практически не меняется по сравнению с РЦ дикого типа и остаётся близким к единице. Это подтверждается измерениями квантового выхода как в стационарном режиме, так и с временным разрешением [19, 27].

С другой стороны, некоторые свойства мутантного РЦ меняются существенно. В частности, заметно снижается стабильность его структуры при нагревании в присутствии детергентов LDAO и Triton-X100 [28], но использование холата натрия помогает снять эту проблему [23]. Кроме того, полоса поглощения первичного донора смещается в коротковолновую сторону, и её амплитуда существенно снижается (рис. 2). Происходят структурные изменения РЦ, к наиболее существенному из которых следует отнести возникновение прочной, предположительно ковалентной связи P_A (половины димера Р со стороны А-цепи кофакторов) с внесённым остатком гистидина L177 [19, 21, 22, 24], см. также структуру PDB, ID: 8C3F. Значительное изменение претерпевает также T-T перенос энергии с первичного донора на Кар РЦ. В резком отличии от РЦ дикого типа, такой перенос продолжается даже при температурах гелиевого диапазона (рис. 3, а). Это, исходя из современных представлений о механизме процесса, указывает на значительное понижение E_a , активационной энергии T-T переноса энергии ${}^3P \rightarrow V_B$. Такое понижение может быть вызвано повышением энергии триплетного первичного донора, сопровождающим повышение его синглетно-возбуждённого уровня (рис. 2). Была предпринята попытка оценить значение E_a мутанта. Корректный подход основан на измерении температурной зависимости константы скорости заселения состояния ${}^3\text{Кар}$ в РЦ с восстановленным акцептором Q_A .

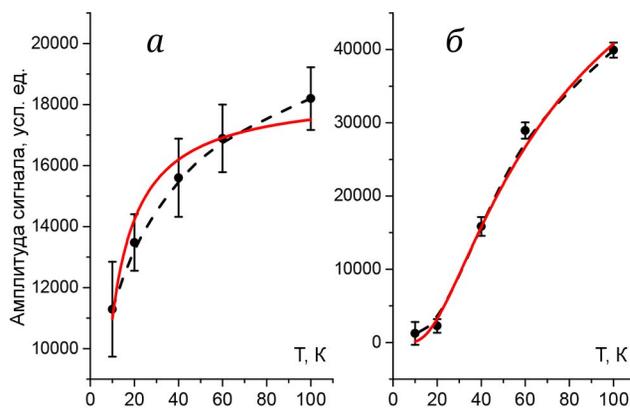


Рис. 5. Температурные зависимости амплитуды низкочастотной линии ЭПР триплетного состояния Q_A в РЦ мутанта I(L177)H (а) и дикого типа (б) в условиях фотовосстановленного первичного акцептора Q_A . Пунктиром и точками обозначены экспериментальные данные, а сплошными линиями – кривые, рассчитанные по формуле $A = B \cdot \exp(-E_a/kT)$. Наилучшие совпадения с экспериментальными зависимостями получены при значениях $E_a = 7,5 \text{ см}^{-1}$ (а); $E_a = 91 \text{ см}^{-1}$ (б). В качестве погрешностей измерения приведены стандартные отклонения шумовой составляющей спектров

Некоторым приближением к такому подходу можно считать использование температурной зависимости амплитуды сигнала ЭПР состояния ${}^3\text{Кар}$, измеренной в коротком интервале после возбуждающей вспышки, чтобы минимизировать возможный эффект температурной зависимости спада сигнала ${}^3\text{Кар}$. При этом остаётся неучтённой температурная зависимость квантового выхода триплетного Р. Однако, согласно работе Parson et al. [29], эта зависимость не является критической для температур ниже 77 К, по крайней мере для РЦ дикого типа. Температурная зависимость амплитуды сигнала триплетного Кар моделировалась экспонентой $A = B \cdot \exp(-E_a/kT)$. Были использованы данные спектров рис. П1 и рис. П2 Приложения. На рис. 5, а представлен результат такой процедуры для РЦ мутанта. Наилучшее соответствие экспериментальным данным получено при значении $E_a = 7,5 \text{ см}^{-1}$.

Для оценки возможных погрешностей выбранной процедуры аналогичный подсчёт был сделан для РЦ дикого типа (рис. 5, б). Полученная при этом величина энергии активации 91 см^{-1} хорошо соответствует значению 100 см^{-1} , определённому из корректного измерения температурной зависимости константы скорости заселения ${}^3\text{Кар}$ [11]. Более низкое качество моделирования температурной зависимости в случае мутанта (рис. 5, а) может быть связано с иной, чем у дикого штамма, зависимостью квантового выхода 3P от температуры. Ещё одна возможность – появление у мутанта независимого от температуры прямого

канала переноса энергии ${}^3P \rightarrow \text{Кар}$. В этом случае температурная зависимость будет описываться выражением $A = C + B \cdot \exp(-E_a/kT)$. Результаты обработки данных по этой формуле приведены на рис. П4 Приложения. Наилучшее совпадение с экспериментом получено при $E_a = 36 \text{ см}^{-1}$, $B = 9700$, $C = 10\,500$. Несмотря на хорошее совпадение расчётной и экспериментальной кривых, очень большой вклад прямого канала $T-T$ переноса энергии вызывает сомнение. Доводы в пользу такого вывода будут подробнее обсуждены ниже.

При промежуточных значениях температуры $T-T$ перенос энергии ${}^3P \rightarrow \text{Кар}$ у мутанта протекает медленнее, чем в РЦ дикого типа. На рис. 3, а и рис. 4 это продемонстрировано для $T = 100 \text{ К}$. На спектре ЭПР (рис. 3, а, 1) такое замедление проявляется в виде остаточного сигнала 3P . Прямая регистрация кинетики оптического поглощения ${}^3\text{Кар}$ (рис. 4) при той же температуре позволила оценить уменьшение скорости $T-T$ переноса у мутанта в 2,5 раза по сравнению с РЦ дикого типа. Ранее похожее влияние внесённой мутации наблюдали в работе Frank et al. [14]. Наблюдаемое замедление объясняется изменением величины предэкспоненциальных множителей в соотношениях, описывающих температурные зависимости этих процессов (коэффициент B в случае приведённых выше зависимостей амплитуды ${}^3\text{Кар}$). Эти множители при переносе энергии по механизму Декстера сами экспоненциально зависят от расстояния между донором и акцептором энергии [17, 18]. Экспоненциальная зависимость означает, что даже небольшие структурные изменения могут существенно влиять на скорость переноса. Отметим, что кристаллическая структура РЦ I(L177)Н + F(M197)Н, полученная с разрешением $2,6 \text{ \AA}$, не выявила существенных смещений молекул Кар, Р или В_в относительно друг друга [22].

Существует иная возможность увеличения расстояния $T-T$ переноса энергии, не требующая пространственного смещения донора и акцептора. Известно, что триплетное состояние распределено по димеру Р в случае РЦ *S. sphaeroides* не вполне симметрично, примерно в соотношении 63 : 37 в пользу половины димера Р_А [30]. Образование прочной химической связи с этой половиной [19, 21, 22, 24] может внести изменение в характер делокализации триплета Р и привести к увеличению эффективного расстояния переноса энергии на мономерный БХл. Предлагаемое изменение делокализации триплетного возбуждения в димере Р должно приводить к увеличению параметра D , которого в эксперименте не наблюдается. Нужно, однако, отметить, что на величину D триплетного состояния пер-

вичного донора влияет также примешивание состояния с переносом заряда [4], способное значительно уменьшить D . Увеличение асимметрии Р в результате проведённой аминокислотной замены повышает вероятность увеличения вклада состояния с переносом заряда. На появление значительной асимметрии донора Р в результате мутации указывает также существенное увеличение ширины сигнала ЭПР состояния Р* [31] и данные FTIR-спектроскопии [32]. Увеличение расстояния и замедление $T-T$ переноса энергии делает менее вероятным появление прямого канала переноса энергии, упомянутого выше, хотя данный вывод требует дополнительного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РЦ мутанта I(L177)Н *Cereibacter sphaeroides* сохраняют высокую фотохимическую активность и достаточную стабильность и по этой причине являются интересным объектом исследования. Они демонстрируют аномальную возможность $T-T$ переноса энергии от первичного донора Р к молекуле Кар при температурах диапазона жидкого гелия. Мы предполагаем, что это связано с понижением активационной энергии первой стадии $T-T$ переноса, ${}^3P \rightarrow \text{В}_в$, которое вызывается повышением уровня энергии 3P . Возможность активации канала прямого переноса энергии ${}^3P \rightarrow \text{Кар}$ также нельзя полностью отвергать без проведения дополнительного исследования, как и процессы с участием экситонных состояний [33]. Приведённая оценка энергии активации $E_a = 7,5 \text{ см}^{-1}$ (приблизительно $0,9 \text{ кДж/моль}$) носит весьма предварительный характер. Для уточнения этого параметра и механизма $T-T$ переноса энергии необходимо проведение измерений температурной зависимости константы скорости процесса ${}^3P \rightarrow \text{В}_в$. Полученные мутантные РЦ представляют значительный интерес для изучения альтернативных механизмов тушения триплетных состояний, в частности, радикал-триплетных пар [34], и влияния магнитного поля на дезактивацию 3P [35]. Работа в этом направлении проводится в настоящее время.

Вклад авторов: И.И. Проскуряков – концепция исследования и руководство работой; Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева – направленный мутагенез, выделение реакционных центров, приготовление образцов; И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков – проведение измерений, обработка результатов, написание и редактирование текста статьи; Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков – обсуждение результатов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта № 122041100204-3 Минобрнауки России.

Благодарности. В работе использовались приборы ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266, <http://www.scr-rf.ru/scr/670266/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2019), Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins, *Chem. Rev.*, **119**, 2043-2086, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00554>.
2. Yeates, T. O., Komiya, H., Chirino, A., Rees, D. C., Allen, J. P., and Feher, G. (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: protein-cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7993-7997, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7993>.
3. Ermler, U., Fritzsche, G., Buchanan, S. K., and Michel, H. (1994) Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions, *Structure*, **2**, 925-936, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00094-8).
4. Hoff, A. J., and Deisenhofer, J. (1997) Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria, *Phys. Rep.*, **287**, 1-247, [https://doi.org/10.106/S0370-1573\(97\)00004-5](https://doi.org/10.106/S0370-1573(97)00004-5).
5. Blankenship, R. E. (2021) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
6. Parson, W. W., and Monger, T. G. (1976) Interrelationships among excited states in bacterial reaction centers, *Brookhaven Symp. Biol.*, **28**, 195-212.
7. Schenck, C. C., Mathis, P., and Lutz, M. (1984) Triplet formation and triplet decay in reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Photochem. Photobiol.*, **39**, 407-417, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb08198.x>.
8. Frank, H. A., Chynwat, V., Hartwich, G., Meyer, M., Katheder, I., and Scheer, H. (1993) Carotenoid triplet state formation in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers exchanged with modified bacteriochlorophyll pigments and reconstituted with spheroidene, *Photosynth. Res.*, **37**, 193-203, <https://doi.org/10.1007/BF00032823>.
9. Frank, H. A., Innes, J., Aldema, M., Neumann, R., and Schenck, C. C. (1993) Triplet state EPR of reaction centers from the His^{L173} → Leu^{L173} mutant of *Rhodobacter sphaeroides* which contains a heterodimer primary donor, *Photosynth. Res.*, **38**, 99-109, <https://doi.org/10.1007/BF00015066>.
10. Frank, H. A., Chynwat, V., Posteraro, A., Hartwich, G., Simonin, I., and Scheer, H. (1996) Triplet state energy transfer between the primary donor and the carotenoid in *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1 reaction centers exchanged with modified bacteriochlorophyll pigments and reconstituted with spheroidene, *Photochem. Photobiol.*, **64**, 823-883, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb01842.x>.
11. Angerhofer, A., Bornhäuser, F., Aust, V., Hartwich, G., and Scheer, H. (1998) Triplet energy transfer in bacterial photosynthetic reaction centres, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 404-420, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00093-0).
12. Laible, P. D., Chynwat, V., Thurnauer, M. C., Schiffer, M., Hanson, D. K., and Frank, H. A. (1998) Protein modifications affecting triplet energy transfer in bacterial photosynthetic reaction centers, *Biophys. J.*, **74**, 2623-2637, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77968-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77968-8).
13. De Winter, A., and Boxer, S. G. (1999) The mechanism of triplet energy transfer from the special pair to the carotenoid in bacterial photosynthetic reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8786-8789, <https://doi.org/10.1021/jp992259d>.
14. Laible, P. D., Morris, Z. S., Thurnauer, M. C., Schiffer, M., and Hanson, D. K. (2003) Inter- and intraspecific variation in excited-state triplet energy transfer rates in reaction centers of photosynthetic bacteria, *Photochem. Photobiol.*, **78**, 114-123, [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780114IAIVIE2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780114IAIVIE2.0.CO2).
15. Mandal, S., Carey, A.-M., Locsin, J., Gao, B.-R., Williams, J. C., Allen, J. P., Lin, S., and Woodbury, N. W. (2017) Mechanism of triplet energy transfer in photosynthetic bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **121**, 6499-6510, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03373>.
16. Mandal, S., Espiritu, E., Akram, N., Lin, S., Williams, J. C., Allen, J. P., and Woodbury, N. W. (2018) Influence of the electrochemical properties of the bacteriochlorophyll dimer on triplet energy-transfer dynamics in bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 10097-10107, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07985>.

17. Dexter, D. L. (1953) A theory of sensitized luminescence in solids, *J. Chem Phys.*, **21**, 836-850, <https://doi.org/10.1063/1.1699044>.
18. You, Z.-Q., Hsu, C.-P., and Fleming, G. R. (2006) Triplet-triplet energy-transfer coupling: theory and calculation, *J. Chem. Phys.*, **124**, <https://doi.org/10.1063/1.2155433>.
19. Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Болгарина Т. И., Шувалов В. А. (2005) Влияние замещения изолейцина L177 гистидином на пигментный состав и свойства реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **70**, 1527-1533, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0256-3>.
20. Cohen-Basire, G., Siström, W. R., and Stanier, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell Comp. Physiol.*, **49**, 25-68, <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490104>.
21. Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., Shkuropatov, A. Ya., and Shuvalov, V. A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of P_A bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769-5773, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.032>.
22. Fufina, T. Y., Selikhanov, G. K., Gabdulkhakov, A. G., and Vasilieva, L. G. (2023) Properties and crystal structure of the *Cereibacter sphaeroides* photosynthetic reaction center with double amino acid substitution I(L177)H + F(M197)H, *Membranes*, **13**, 157, <https://doi.org/10.3390/membranes13020157>.
23. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г. (2021) Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **86**, 607-614, <https://doi.org/10.31857/S0320972521040126>.
24. Vasilieva, L. G., Fufina, T. Y., Gabdulkhakov, A. G., Leonova, M. M., Khatypov, R. A., and Shuvalov, V. A. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P_A and P_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.008>.
25. Budil, D. E., and Thurnauer, M. C. (1991) The chlorophyll triplet state as a probe of structure and function in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**, 1-41, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80081-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80081-7).
26. Frank, H. A., Bolt, J. D., de V. Costa, S. M., and Sauer, K. (1980) Electron paramagnetic resonance detection of carotenoid triplet states, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4893-4898, <https://doi.org/10.1021/ja00535a009>.
27. Фуфина Т. Ю., Леонова М. М., Хатыпов Р. А., Христин А. М., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Особенности аксиального лигандирования бактериохлорофиллов в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий, *Биохимия*, **84**, 509-519, <https://doi.org/10.1134/S0320972519040043>.
28. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шувалов В. А. (2010) Исследование стабильности мутантного фотосинтетического реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H и установление местоположения бактериохлорофилла, ковалентно связанного с белком, *Биохимия*, **75**, 256-263, <https://doi.org/10.1134/s0006297910020112>.
29. Parson, W. W., Clayton, R. K., and Cogdell, R. J. (1975) Excited states of photosynthetic reaction centers at low redox potentials, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 265-278, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90109-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90109-7).
30. Norris, J. R., Budil, D. E., Gast, P., Chang, C.-H., El-Kabbani, O., and Schiffer, M. (1989) Correlation of paramagnetic states and molecular structure in bacterial photosynthetic reaction centers: the symmetry of the primary electron donor in *Rhodospseudomonas viridis* and *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4335-4339, <https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4335>.
31. Фуфина Т. Ю., Селиханов Г. К., Проскуряков И. И., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Свойства реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотными замещениями Le на Tyr в позициях L177 и M206, *Биохимия*, **84**, 739-744, <https://doi.org/10.1134/S0320972519050129>.
32. Забелин А. А., Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шкуропатова В. А., Зверева М. Г., Шкуропатов А. Я., Шувалов В. А. (2009) Мутантные реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H с прочно связанным бактериохлорофиллом *a*: структурные свойства и пигмент-белковые взаимодействия, *Биохимия*, **74**, 86-94, <https://doi.org/10.1134/s0006297909010106>.
33. Scholes, G. D. (2003) Long-range resonance energy transfer in molecular systems, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **54**, 57-87, <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103746>.
34. Quintes, T., Mayländer, M., and Richert, S. (2023) Properties and applications of photoexcited chromophore-radical systems, *Nature Rev. Chem.*, **7**, 75-90, <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00453-y>.
35. Chidsey, C. E. D., Takiff, L., Goldstein, R. A., and Boxer, S. G. (1985) Effect of magnetic fields on the triplet state lifetime in photosynthetic reaction centers: Evidence for thermal repopulation of the initial radical pair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6850-6854, <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6850>.

ANOMALOUS TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE TRIPLET-TRIPLET ENERGY TRANSFER IN *Cereibacter sphaeroides* I(L177)H MUTANT REACTION CENTERS

T. Y. Fufina, L. G. Vasilieva, I. B. Klenina, and I. I. Proskuryakov*

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: pros@issp.serpukhov.su*

In photosynthetic reaction centers, quenching of the primary donor triplet state by energy transfer to the carotenoid molecule provides efficient suppression of singlet-excited oxygen generation, the potent chemical oxidant. This process in the *Cereibacter sphaeroides* reaction centers is thermoactivated, and discontinues at temperatures below 40 K. In these reaction centers, substitution of amino acid residue isoleucine for hystidine at the 177 position of the L-subunit results in a sharp decrease of the activation energy, so the carotenoid triplets are populated even at 10 K. Activation energy of the T-T energy transfer was estimated as 7.5 cm⁻¹, which is more than 10-fold lower than the activation energy of the original reaction centers. At certain temperatures the energy transfer in the mutant is decelerated, which is related to the increase of the effective distance of the triplet-triplet transfer. To our knowledge, the described mutation presents the first reaction center modification leading to a significant decrease in activation energy of T-T energy transfer to the carotenoid molecule. The I(L177)H mutant reaction centers present a considerable interest for further studies of the triplet state quenching mechanisms, and of other photophysical and photochemical processes in reaction centers of bacterial photosynthesis.

Keywords: reaction center, primary electron donor, carotenoid, triplet-triplet energy transfer, temperature dependence, site-directed mutagenesis, *Cereibacter sphaeroides*

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ СКУЧЕННОСТИ НА СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕМ

© 2024 И.В. Павлова*, Н.Д. Брошевицкая, А.А. Потехина, А.М. Швадченко

ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: pavlovm@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2024

После доработки 15.07.2024

Принята к публикации 06.08.2024

Исследовали влияние длительного содержания крыс в условиях повышенной скученности на социальное поведение взрослых самцов крыс линии Вистар. С 30 по 180 постнатальный день (ПНД) крыс содержали либо в стандартных условиях по 5 особей (360 см² на крысу, группа СТАНД), либо в скученных условиях по 15 особей в клетках (120 см² на крысу, группа СКУЧ). Начиная с 100 ПНД, изучали поведение крыс в тестах на социальное предпочтение, социальное доминирование в трубе и на агрессивное поведение в тесте «резидент–интродер». После декапитации крыс на 180 ПНД брали образцы мозга из миндалины, дорзального гиппокампа, вентромедиального гипоталамуса и медиальной префронтальной коры для последующего анализа экспрессии мРНК генов *IL-1β*, *TNF*, *TGF-β1*, *IL-6* с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. У крыс группы СКУЧ, по сравнению с группой СТАНД, было меньше время взаимодействия с социальным объектом в тесте на социальное предпочтение, было больше побед при тестировании в трубе, а также больше нападений в тесте «резидент–интродер». У крыс группы СКУЧ была существенно увеличена экспрессия гена *IL-1β* в гиппокампе и медиальной префронтальной коре, а также повышена экспрессия гена *TGF-β1* в гиппокампе, миндалине и префронтальной коре. Социальный стресс повышенной скученности привел к увеличению социального доминирования, агрессивности и уменьшил социальную мотивацию. Изменения в социальном поведении у крыс группы СКУЧ сопровождалось увеличением экспрессии мРНК генов провоспалительного цитокина *IL-1β* и противовоспалительного цитокина *TGF-β1* в ряде структур мозга, что можно рассматривать соответственно, как проявление нейровоспаления и компенсаторных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: повышенная скученность, тест социального доминирования в трубе, тест «резидент–интродер», тест социального предпочтения, провоспалительные цитокины *IL-1β*, *TNF*, *IL-6*, противовоспалительный цитокин *TGF-β1*.

DOI: 10.31857/S0320972524090054 EDN: JJWUXS

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что хронический психосоциальный стресс является фактором риска в развитии различных психопатологий, включая расстройства, связанные с тревогой и депрессией. У людей широко распространено социальное тревожное расстройство, основными симптомами которого являются социальный страх и избегание социальных ситуаций [1]. Для изучения этиологии

и патофизиологии социального тревожного расстройства и разработки новых подходов для его терапевтического лечения были разработаны различные модели психосоциального стресса на животных, такие как, например, социальная нестабильность (social instability), социальное поражение (social defeat), хроническое подчиненное содержание (chronic subordinate colony housing), социальное поражение/перенаселенность (social defeat/overcrowding) и ряд других [1, 2, 3].

Принятые сокращения: НСО – несоциальный объект; ПНД – постнатальный день; СКУЧ – скученные условия; СО – социальный объект; СТАНД – стандартные условия содержания; *TGF-β1* – трансформирующий ростовой фактор бета-1; *TNF* – фактор некроза опухоли.

* Адресат для корреспонденции.

Содержание в условиях повышенной скученности используется в ряде моделей в сочетании с другими стрессорирующими факторами, однако последствия только скученности для формирования социального поведения мало изучены.

Есть данные, что при скученности, как и при других моделях психосоциального стресса, происходит уменьшение социальной мотивации. Так, например, в условиях скученности мыши линии C57BL/6 и японские макаки демонстрировали социальное избегание в трехкамерном тесте на социальность [4]. В смешанной модели «социальное поражение/скученность» также наблюдали уменьшение предпочтения социального объекта [2] и даже его избегание [3, 5] в тесте на социальное предпочтение/избегание. О появлении социальной патологии при скученности свидетельствуют данные о каннибализме и детоубийстве, нарушении в сексуальной мотивации при неконтролируемом размножении большой колонии мышей в замкнутом объеме [6, 7]. Влияние скученности на агрессивное поведение и социальное доминирование изучено в меньшей степени. Однако было показано, что число агрессивных атак, совершаемых доминантами и подчиненными, увеличивалось по мере возрастания числа мышей в колонии, при этом максимальное число мышей достигало 8 [8] или 12 в клетке [9]. Мало вероятно, что такие условия можно рассматривать в качестве повышенной скученности и что животные испытывали при этом стресс. При стрессе социальной нестабильности (чередование периодов социальной изоляции и скученности) также происходило увеличение агонистических взаимодействий [10]. В колониях мышей большого размера (9–12 самцов) в течение 21 дня было обнаружено от пяти до шести изменений в доминировании, которое оценивали по числу совершенных агрессивных атак на соседей по клетке [9]. В настоящее время для оценки социального доминирования успешно применяется тест в трубе [11], который позволяет сравнить доминантные свойства животных из разных популяций. Следует признать, что влияние повышенной скученности на социальное поведение крыс изучено недостаточно, но в то же время такие исследования имеют высокую актуальность. Цель нашей работы заключалась в сопоставлении социального поведения крыс в стандартных условиях содержания (СТАНД, 5 крыс в клетке, 360 см² на животное) и в условиях повышенной скученности (СКУЧ, 15 крыс в клетке, 120 см² на животное). Известно, что при такой степени скученности у животных увеличивается в крови содержание маркера стресса кортикостерона [12–15], уменьшается экспрессия гена противовоспалительного цитокина (интерлейкина-4 (*IL-4*)) и увеличивается экспрессия

провоспалительного цитокина (*IL-17*) [16]. У животных в скученных условиях возникает хроническое воспаление кишечника и изменяется состав кишечной микробиоты [14]. Однако не известно, приводит ли содержание в скученных условиях к нейровоспалению, т.е. увеличивается ли экспрессия провоспалительных цитокинов в различных структурах мозга. Исходя из этого, целью работы был также анализ экспрессии м-РНК генов про- и противовоспалительных цитокинов в различных структурах мозга. Наибольший интерес вызывал ряд структур, участвующих в механизмах социального поведения [17]. Прежде всего, это миндалина и вентромедиальный гипоталамус, имеющие непосредственное отношение к агрессивному поведению [18], а также медиальная префронтальная кора, определяющая социальное доминирование [19], и гиппокамп, остро реагирующий на различные стрессорирующие воздействия благодаря наличию большого числа глюкокортикоидных рецепторов [20].

В задачи данной работы входило: во-первых, сопоставление поведения взрослых крыс групп СТАНД и СКУЧ в тесте на социальное предпочтение, в тесте на социальное доминирование в трубе и на агрессивное поведение в тесте «резидент–интродер»; во-вторых, проведение анализа экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*IL-1β*, фактора некроза опухоли (*TNF*), *IL-6*) и противовоспалительного цитокина (трансформирующего ростового фактора бета-1, *TGF-β1*) в медиальной префронтальной коре, дорзальном гиппокампе, вентромедиальном гипоталамусе и миндалине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах использовали 30 крыс-самцов Вистар в возрасте 30–180 постнатальных дней (ПНД) развития. Крысята были выведены в виварии ИВНД и НФ от родителей (12 пар), полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. На 25 ПНД крысят отсаживали от матери, и в дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (2010/63/EU) и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

На 30 ПНД крысят помещали в различные условия содержания, в которых они находились до окончания экспериментов. Половину крыс содержали в стандартных условиях по 5 особей в клетках размером 53 × 34 × 17 см (360 см² площади

на крысу, группа СТАНД). Другая половина проживала в условиях повышенной скученности – 15 особей в клетке такого же размера (120 см² на крысу, группа СКУЧ). Животные, содержащиеся в условиях скученности, не испытывали недостатка в корме и воде, смена опилок в клетке проводилась каждый день. В каждой группе крыс могло находиться максимум две крысы из одного помета.

Тестирование социального предпочтения проводили на 100–120 ПНД в прямоугольной камере размером 120 × 80 × 35 см, с которой крысы были предварительно ознакомлены. Посередине около двух противоположных коротких стенок камеры располагались цилиндры (диаметр – 20 см) со стенками, сделанными из металлической сетки. Один цилиндр оставался пустым («несоциальный объект», НСО), в другой цилиндр («социальный объект», СО) помещали незнакомую крысу того же пола и такого же возраста, как и тестируемая крыса. Уровень освещенности камеры достигал 40–50 лк. Поведение крыс регистрировали в течение 5 мин. Построение треков движения крысы и их анализ проводили с помощью программы Etho Vision («Noldus», Нидерланды). Анализировали число и длительность взаимодействий с СО и НСО (нос крысы непосредственно вблизи стенки сетчатого цилиндра), пройденную дистанцию, скорость и время движения, число выходов в центр камеры (квадрат размером 26 × 26 см в центре камеры), число болюсов и уринаций. Рассчитывали коэффициент предпочтения цилиндров:

$$K_{\text{предп.}} = (T_{\text{вСО}} - T_{\text{вНСО}}) / (T_{\text{вСО}} + T_{\text{вНСО}}), \quad (1)$$

где $T_{\text{вСО}}$ – время взаимодействия с социальным объектом; $T_{\text{вНСО}}$ – время взаимодействия с несоциальным объектом. Положительные коэффициенты свидетельствовали о предпочтении СО, отрицательные – НСО.

Социальное доминирование оценивали на 120–130 ПНД при помощи тестирования в трубе из прозрачного оргстекла длиной 150 см с внутренним диаметром 6 см. Эксперимент проводили в течение двух дней. В первый день животные исследовали новую обстановку, при этом крысы проходили по трубе в обоих направлениях, во второй день проводили само тестирование. За день до начала эксперимента крыс взвешивали и формировали пары одного веса (с точностью до 20 г), при этом одна крыса была из группы СТАНД, другая – из группы СКУЧ. Иерархический ранг крысы в домашней клетке до экспериментов не определяли и не учитывали при формировании пар. Во время тестирования крыс одновременно запускали с разных концов трубы, чтобы животные двигались друг другу навстречу. «Победителем» считали то животное, которое смогло оттеснить

оппонента назад и выйти с противоположного конца трубы. У каждой пары было две попытки, при этом каждую крысу запускали с разных концов трубы. Если в течение 2 мин не выявлялся «победитель», результат считали ничейным. Процент побед рассчитывали по формуле:

$$\text{Число побед} / \text{число попыток} \times 100\%. \quad (2)$$

Поведение регистрировали на цифровую видеокамеру Logitech C270 HD Webcam («Logitech», Китай). Анализировали число и латентный период побед у крыс в группах СТАНД и СКУЧ, а также подсчитывали число толканий, отступлений и наступлений, совершенных каждой крысой во время теста в соответствии с методикой, описанной в работе Fan et al. [21].

Тест «резидент-интродер». Внутривидовое агрессивное поведение оценивали у крыс на 150–180 ПНД при помощи теста «резидент-интродер», перед которым для устранения последствий агонистических взаимодействий внутри домашней клетки крыс содержали в социальной изоляции в течение четырех дней в индивидуальных клетках размером 30 × 45 × 20 см. Во время теста в домашнюю клетку к резиденту подсаживали взрослую незнакомую более молодую (2,5–3 мес.) и меньшую по весу крысу-интродера того же пола и проводили видеорегистрацию поведения обеих крыс в течение 10 мин с помощью цифровой видеокамеры Logitech C270 HD Webcam. Тест проходил в затемненной комнате с уровнем освещенности 20–25 лк. При этом фиксировали следующие параметры агрессивного поведения: 1) латентный период и число нападений, инициируемых резидентом, которые заканчивались либо позой подчинения интродера на спине, либо дракой; 2) число и латентный период стоек напротив оппонента (боксирование); 3) случаи агрессивного груминга со стороны резидента, сопровождающиеся вокализацией интродера. Кроме того, подсчитывали число и длительность преследований интродера с аногенитальным обнюхиванием, за которым часто следовали агрессивные действия резидента. Подсчитывали также число «сексуальных атак» со стороны резидента, которые, согласно данным литературы [22], можно рассматривать как проявление социального доминирования. Сексуальные атаки выражались во взбирании резидента на интродера сзади, после чего следовал груминг гениталий.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Образцы ткани дорзального гиппокампа, миндалина, медиальной префронтальной коры, вентромедиального гипоталамуса 8 животных из каждой группы отбирали после декапитации крыс на 180 ПНД.

Для ПЦР-анализа отбирали крыс, поведение которых было наиболее характерно для каждой группы (СТАНД и СКУЧ), судя по результатам тестов на социальное доминирование в трубе и тесте «резидент-интродуер». За 3–5 мин до декапитации крыс наркотизировали с помощью хлоралгидрата (400 мг/кг, внутривенно) с целью минимизировать стрессующее воздействие. Мозг вынимали, промывали в ледяном изотоническом растворе NaCl, на определенных уровнях мозга в соответствии с атласом мозга крысы [23] с помощью хирургической ложечки (размер 2,5 × 7 мм) и скальпеля производили забор биоматериала из правого и левого полушарий мозга. Далее, выделенные структуры замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

Выделение РНК. К замороженным пробам добавляли по 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) и измельчали с помощью ручного гомогенизатора, после чего инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее, образцы центрифугировали 10 мин (11 000 g) при 4 °С. Супернатант переносили в новые пробирки, добавляли 200 мкл хлороформа и перемешивали пробирки встряхиванием, после чего инкубировали 3 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали 15 мин (16 000 g) при 4 °С. Водную фазу переносили в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропанола и 1 мкл полиакриламида, после чего содержимое пробирок перемешивали с помощью вортекса и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали 20 мин при максимальных оборотах (19 000 g) при комнатной температуре. Полученный осадок дважды промывали 80%-ным этанолом с центрифугированием в течение 10 мин (19 000 g) также при комнатной температуре. После удаления этанола полученный осадок сушили на воздухе и растворяли в 12 мкл деионизированной воды. Полученный раствор инкубировали 5 мин при 55 °С. Концентрацию РНК измеряли с помощью NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США).

Оценку чистоты и качества нуклеиновых кислот делали с помощью спектрофотометрического измерения, исходя из соотношения поглощения при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Для дальнейшего анализа были взяты образцы, значение поглощения которых находилось в пределах от 1,8 и выше для соотношения 260/280, и от 2 и выше – для соотношения 260/230. При несоответствии образца данным параметрам оценки чистоты образец подвергался повторному осаждению (с помощью NaCl) и выделению нуклеиновых кислот. В последующий анализ были взяты пробы РНК, которые соответствовали указанным ранее критериям оценки чистоты, и их концентрация составляла не менее 1000 нг на 9 мкл. Данное количество РНК (1000 нг) было использовано для дальнейшей обработки проб с помощью метода обратной транскрипции. Образцы РНК, не подходящие под данные критерии оценки, были исключены из дальнейшего анализа. После выделения РНК до проведения дальнейшей обработки и анализа экспериментальные пробы хранились при –80 °С.

Обратная транскрипция. Перед обратной транскрипцией из полученной РНК удаляли следовые количества ДНК. На реакцию брали 1 мкг РНК, 1 мкл буфера для DNase I (Mg²⁺) («Thermo Fisher Scientific»), 1 мкл DNase I (1 ед./мкл) («Thermo Fisher Scientific») и доводили конечный объем смеси деионизированной водой до 11 мкл. Смесь инкубировали 30 мин при 37 °С. Для остановки реакции добавляли 1 мкл ЭДТА (50 мМ) и инкубировали 10 мин при 65 °С. Обратную транскрипцию проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV («Евроген») по инструкции производителя, используя смесь случайных (dN10)-праймеров и oligo-dT15-праймеров в присутствии ингибитора РНКаз (RiboCare; «Евроген»). Полученные пробы разводили в 16 раз для проведения ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР в реальном времени на одну пробу брали: 4 мкл образца; по 0,56 мкл прямого и обратного

Таблица 1. Последовательности использованных праймеров и температуры отжига

Ген	Прямой	Обратный	t °С
<i>TGF-β1</i>	GCG CCT GCA GAG ATT CAA GTC AAC	TCA GGC GTA TCA GTG GGG GTC A	65
<i>TNF</i>	GTC CAA CTC CGG GCT CAG AAT	ACT CCC CCG ATC CAC TCA G	65
<i>IL-1β</i>	TCT GTG ACT CGT GGG ATG AT	CAC TTG TTG GCT TAT GTT CTG TC	61
<i>IL-6</i>	GCC ACT GCC TTC CCT ACT TCA C	GAC AGT GCA TCA TCG CTG TTC ATA C	63
<i>YWHAZ</i>	TTG AGC AGA AGA CGG AAG G	GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA	63
<i>HPRT</i>	CGT CGT GAT TAG TGA TGA TGA AC	CGT CGT GAT TAG TGA TGA TGA AC	65

праймера (10 мкМ); 2,8 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR + LowROX («Евроген») и доводили до общего объема (14 мкл) деионизированной водой. Денатурация проходила при температуре 95 °С в течение 15 с, отжиг праймеров длился 30 с и элонгация при 72 °С – в течение 30 с. Общее количество циклов всех реакций было равно 40. Для каждого образца наносили по 2 повтора.

Для проведения реакции использовали амплификатор CFX 384 Real Time PCR («Bio-Rad», США).

Подбор последовательности всех праймеров производили с помощью программы PrimerSelect, подбор температуры отжига проводили в программе perlprimer (табл. 1).

Исследовали экспрессию мРНК следующих генов: *Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)*, *tumor necrosis factor (TNF)*, *Interleukin-1 beta (IL-1β)*, *Interleukin-6 (IL-6)*, *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ)*, *Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)*.

Обработка данных. Относительный уровень экспрессии каждого гена рассчитывался, с помощью метода ΔCt по формуле $2^{-\Delta Ct}$:

$$\Delta Ct = Ct \text{ (исследуемого гена)} - Ct \text{ (значения внутреннего контроля)}, \quad (3)$$

где Ct – минимальный пороговый цикл гена в экспоненциальной фазе амплификационной кривой [24].

Для всех исследованных генов проводили также ПЦР в реальном времени с отрицательными контролями проб. Образцы, где разница между циклом, на котором поднимается сама проба и ее отрицательный контроль была меньше 6, исключались из анализа.

Статистическая обработка результатов. Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова. Если анализируемый параметр удовлетворял данному критерию, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел One-Way ANOVA. Анализировали влияние фактора «ГРУППА» (СТАНД, СКУЧ). С использованием Basic statistics строили гистограммы распределения нападений в зависимости от их латентности. При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров использовали непараметрические методы анализа. При сравнении двух групп применяли U-критерий Манна–Уитни. При сравнении долей использовали критерий χ^2 (2 × 2 таблицы). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; отмечали наличие

тенденции при $0,05 < p < 0,1$. Данные на рисунках представлены в виде средних значений ± ошибки средних (при нормальном распределении) или в виде медианы, границ 25–75% распределения данных, максимальных и минимальных значений, первичных данных (при отсутствии нормального распределения).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние содержания в условиях повышенной скученности на социальное предпочтение крыс. Анализ поведения крыс с помощью One-Way ANOVA обнаружил влияние фактора «ГРУППА» на многие показатели поведения (табл. 2): время взаимодействия с социальным объектом, коэффициент предпочтения (тенденция), дистанция, скорость, время движения, число выходов в центр, число болюсов дефекации (тенденция). Крысы группы СКУЧ, по сравнению с группой СТАНД, меньше времени взаимодействовали с СО (рис. 1, а), время взаимодействия с НСО в этих группах не различалось (рис. 1, б). 21,4% самцов из группы СКУЧ имели отрицательные коэффициенты предпочтения, что свидетельствовало об избегании СО. Кроме того, крысы группы СКУЧ проходили меньшую дистанцию (рис. 1, в) с меньшей скоростью и находились в движении меньше время, что свидетельствовало об уменьшении двигательной активности;

Таблица 2. Значения F и p при анализе с помощью One-Way ANOVA различных показателей поведения в тесте на социальное предпочтение

Показатель поведения	Фактор «ГРУППА»	p
Время взаимодействия с СО	$F_{1,28} = 4,892$	0,035
Время взаимодействия с НСО	–	>0,1
Коэффициент предпочтения	$F_{1,28} = 3,176$	0,086
Дистанция	$F_{1,28} = 50,61$	0,000
Скорость	$F_{1,28} = 49,002$	0,000
Время движения (%)	$F_{1,28} = 17,072$	0,000
Число выходов в центр	$F_{1,28} = 11,608$	0,002
Число болюсов дефекации	$F_{1,28} = 3,047$	0,092
Число уринаций	–	>0,1

Примечание. Прочерк – не выявлено влияние фактора.

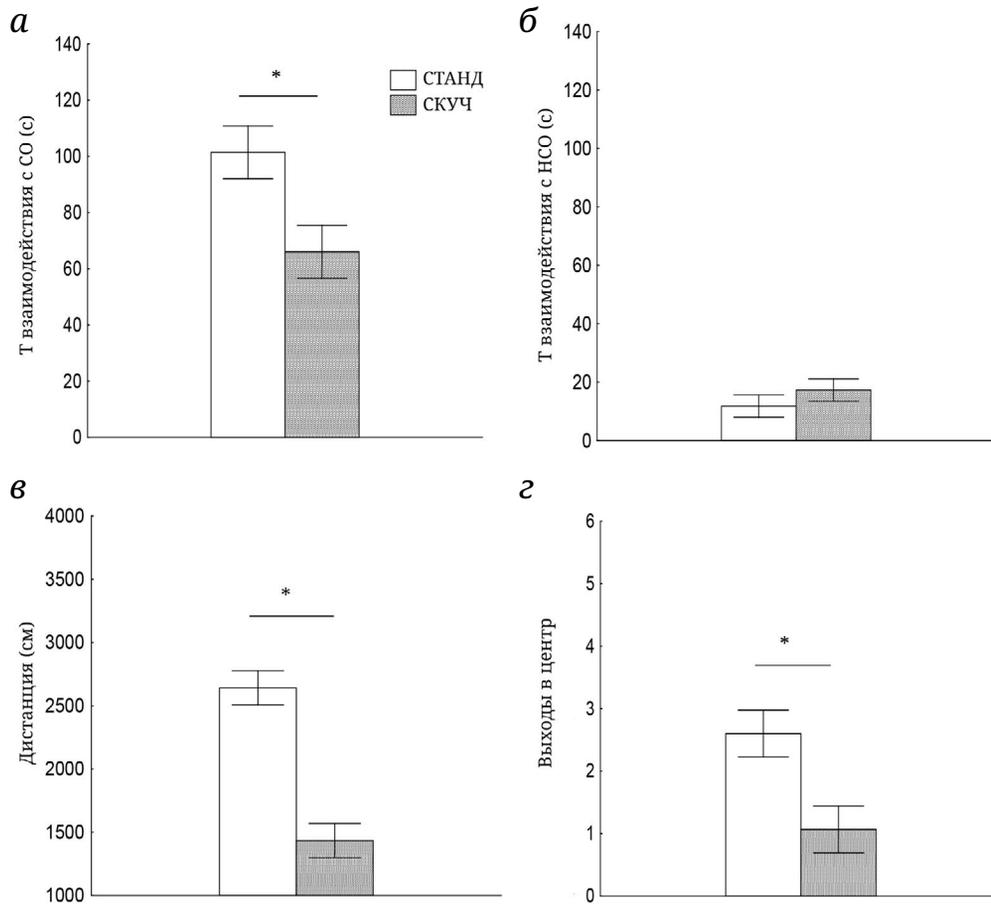


Рис. 1. Влияние содержания в условиях повышенной скученности на различные показатели поведения крыс в тесте на социальное предпочтение. СТАНД – Группа крыс, содержащихся в стандартных условиях; СКУЧ – группа крыс, проживающих в условиях повышенной скученности; Т – время; * $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами СТАНД и СКУЧ (One-Way ANOVA)

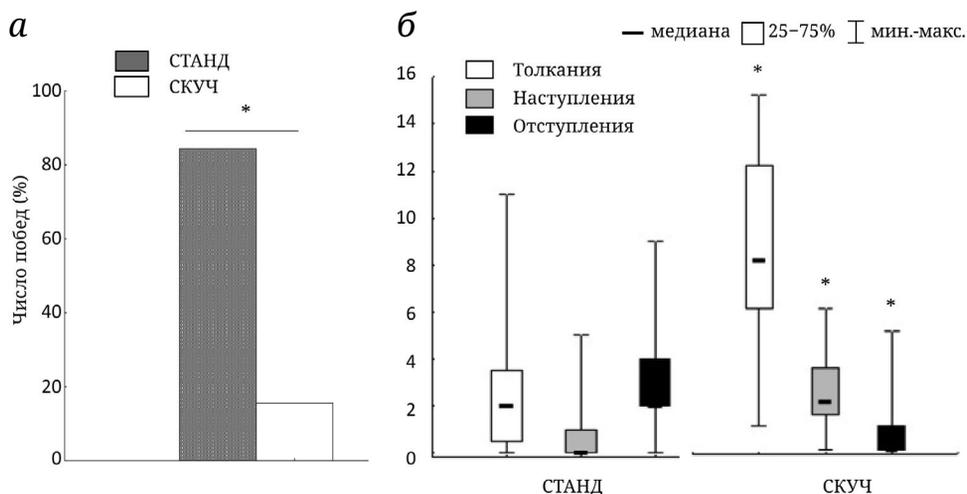


Рис. 2. Влияние содержания в условиях повышенной скученности на поведение крыс в тесте на социальное доминирование в трубе. * $p < 0,05$ – Статистически значимые различия между группами СТАНД и СКУЧ (на панели (а) – χ^2 , 2×2 таблицы; на панели (б) – U-критерий Манна-Уитни)

это соответствовало ранее полученным данным в тесте «Открытое поле» [25]. Число выходов в центр у крыс группы СКУЧ было меньше, чем

у крыс группы СТАНД (рис. 1, д), что говорило о большем у них уровне тревожности в тесте на социальное предпочтение. У крыс группы СКУЧ

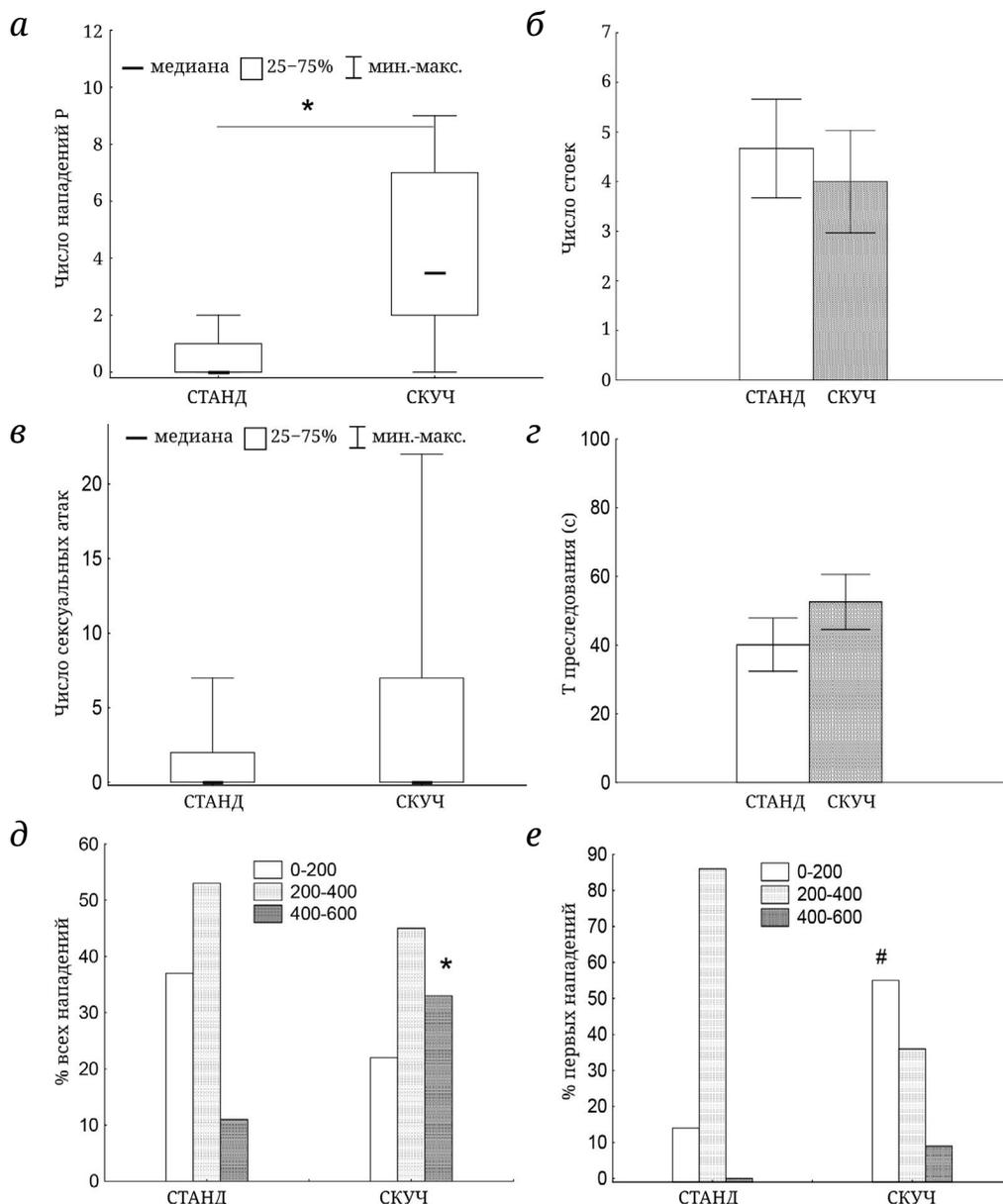


Рис. 3. Влияние содержания в условиях повышенной скученности на различные показатели поведения (а-г) и распределение нападений крыс во времени (д и е) в тесте «резидент-интродер» (%). Т – Время; * $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами СТАНД и СКУЧ; # $0,05 \leq p < 0,1$ – тенденция (на панелях а и в – U-критерий Манна-Уитни; на панелях б и г – One-Way ANOVA; на панелях д и е – χ^2 , 2×2 таблицы)

было несколько больше болюсов дефекации, что можно рассматривать как свидетельство увеличения уровня эмоционального напряжения.

Влияние содержания в условиях повышенной скученности на социальное доминирование крыс. Крысы группы СКУЧ оказывались чаще победителями (84%) в трубе по сравнению с животными группы СТАНД (16%; $\chi^2 = 30,25$; $p = 0,000$; 2×2 таблицы; рис. 2, а). Эти данные свидетельствуют о том, что проживание в скученных условиях, по сравнению со стандартными условиями, приводило к увеличению социального доминирования у самцов.

Подробный анализ числа толканий, отступлений и наступлений за тест в группах у СКУЧ и СТАНД показал (рис. 2, б), что самцы группы СКУЧ совершали больше толканий и наступлений, но меньше отступлений, чем группа СТАНД, т.е. они больше осуществляли активно-наступательных действий против оппонента в трубе, что, по-видимому, обеспечивало их победу.

Влияние содержания в условиях повышенной скученности на поведение крыс в тесте «резидент-интродер». У резидентов группы СКУЧ наблюдалось больше нападений на интродеров, чем у крыс группы СТАНД ($U = 38$; $Z = 2,94$; $p = 0,003$;

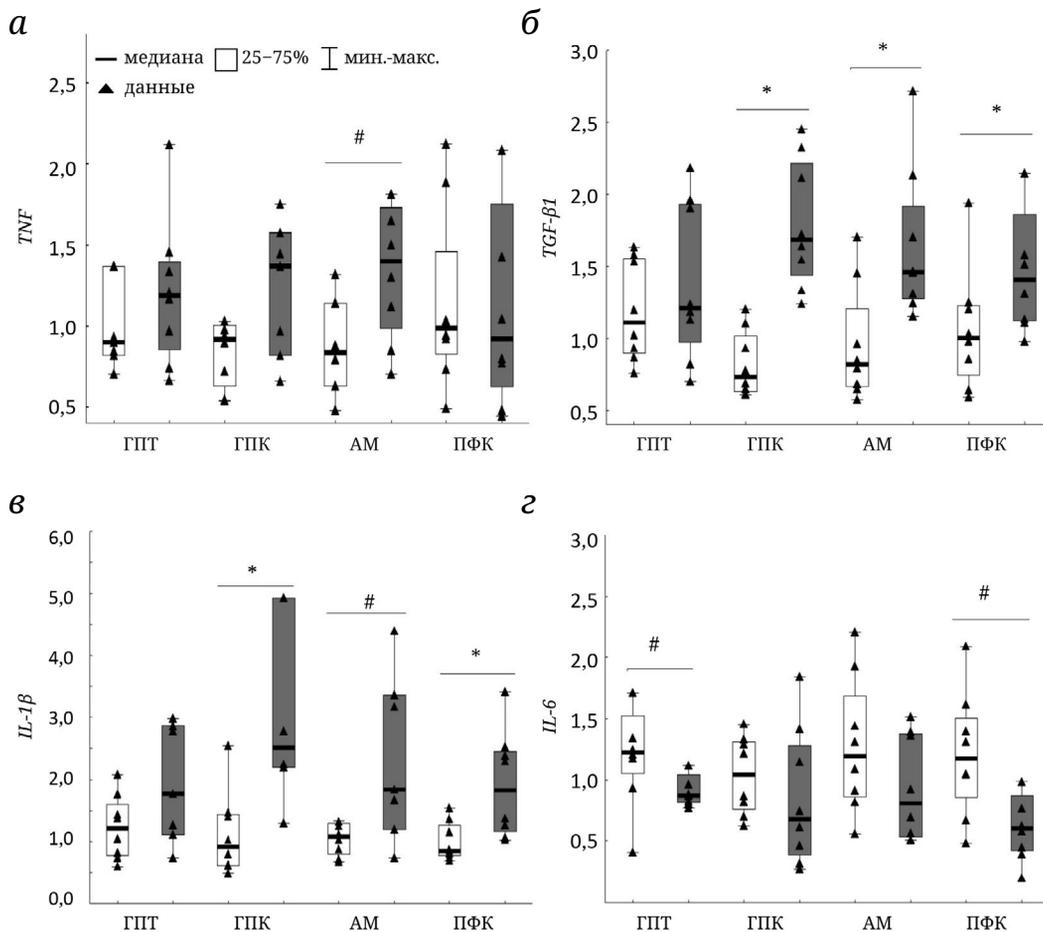


Рис. 4. Экспрессия мРНК генов провоспалительных цитокинов *TNF* (а), *IL-1β* (в), *IL-6* (г) и противовоспалительного цитокина *TGF-β1* (б) в различных структурах мозга у крыс группы СКУЧ и СТАНД. По горизонтали – структуры мозга (ГПТ – вентромедиальный гипоталамус; ГПК – дорзальный гиппокамп; АМ – миндалина; ПФК – дорсомедиальная префронтальная кора); по вертикали – относительное количество мРНК. * $p < 0,05$ – Различия между группами СТАНД и СКУЧ (U-критерий Манна–Уитни); # $0,05 \leq p < 0,1$ – тенденция

U-критерий Манна–Уитни; рис. 3, а). Число стоек друг напротив друга (рис. 3, б) и время преследования резидентом интродера (рис. 3, в) не отличалось в группах СКУЧ и СТАНД. Число сексуальных атак также не различалось статистически в группах СТАНД и СКУЧ (U-критерий Манна–Уитни; рис. 3, в), хотя у крыс в группе СКУЧ их число было наибольшим.

Анализ гистограмм распределения во времени латентности всех нападения показал, что наибольшее число нападения наблюдалось в интервале 200–400 с как у группы СТАНД (53%), так и СКУЧ (45%) (рис. 3, д). В интервале 400–600 с у группы СТАНД наблюдалось всего 11% нападения, а у группы СКУЧ – больше (33%; $p = 0,049$; $\chi^2 = 3,57$). Анализ гистограмм распределения латентности только первых за опыт нападения показал (рис. 3, е), что в группе СТАНД в интервале 0–200 с было совершено 14% нападения, в группе СКУЧ – несколько больше (55%; тенденция; $p = 0,087$; $\chi^2 = 2,92$).

Таким образом, судя по числу нападения, крысы группы СКУЧ показали более агрессивное поведение, по сравнению с группой СТАНД, в тесте «резидент–интродер», причем уровень агрессии у группы СКУЧ практически не снижался к концу теста, и первые агрессивные проявления возникали с меньшим латентным периодом.

Для выявления связи между доминированием в тесте «в трубе» и числом нападения в тесте «резидент–интродер» с помощью One-Way ANOVA по всей выборке сравнивали две группы крыс: в первую были отнесены крысы, победившие в трубе во всех матчах, во вторую – животные, не победившие ни разу. В этих группах в тесте «резидент–интродер» не различалось число нападения ($F_{1,20} = 1,233$; $p = 0,280$), число стоек ($F_{1,20} = 0,392$; $p = 0,538$), число сексуальных атак ($F_{1,20} = 1,438$; $p = 0,245$), число случаев агрессивного груминга ($F_{1,19} = 0,571$; $p = 0,459$). Эти данные свидетельствуют об отсутствии прямой связи между агрессивностью и доминированием.

Влияние скученных условий содержания на экспрессию мРНК генов цитокинов в различных структурах мозга. У крыс группы СКУЧ, по сравнению с группой СТАНД, наблюдалось существенное увеличение экспрессии мРНК гена провоспалительного цитокина *IL-1 β* в гиппокампе и префронтальной коре (рис. 4, в). В миндалине происходило небольшое повышение (на уровне тенденции) экспрессии мРНК генов *IL-1 β* (рис. 4, в) и *TNF* (рис. 4, а). В вентромедиальном гипоталамусе и префронтальной коре у группы СКУЧ происходило небольшое снижение (на уровне тенденции) экспрессии мРНК гена *IL-6* (рис. 4, з). У крыс группы СКУЧ наблюдалось повышение экспрессии гена противовоспалительного цитокина *TGF- β 1* в гиппокампе, миндалине и префронтальной коре (рис. 4, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе в тесте на социальное предпочтение самцы группы СКУЧ меньше времени взаимодействовали с социальным объектом, чем животные группы СТАНД. У 21,4% самцов из группы СКУЧ коэффициенты предпочтения были отрицательными, т.е. они даже избегали социальный объект. Проживание в скученных условиях приводило к уменьшению социальной мотивации. Социальное избегание или уменьшение предпочтения социального объекта наблюдали ранее у мышей при смешанной модели психосоциального стресса социального поражения/скученности [2, 3, 5], при высокой плотности размещения крыс или мышей в клетке [4, 26]. Уменьшение времени взаимодействия с социальным объектом рассматривается в качестве адаптивной поведенческой стратегии для смягчения стресса, связанного со скученностью [4].

В тесте на социальное предпочтение у крыс группы СКУЧ, по сравнению со СТАНД, было обнаружено уменьшение числа выходов в центр, что можно рассматривать как свидетельство увеличение уровня тревожности. Кроме того, происходило уменьшение пройденной дистанции, скорости, времени движения, т.е. снижение двигательной активности. Ранее в нашей работе в открытом поле, имеющем сопоставимые размеры с камерой для социального предпочтения, крысы группы СКУЧ не проявляли признаков повышенной тревожности, но снижали двигательную активность [25]. Можно предположить, что увеличение тревожности в камере на социальное предпочтение в наших опытах было связано с наличием социального объекта в сетчатом цилиндре. В работах других авторов было показано, что при скученности у грызунов развивается тревожный

фенотип [27–31] и появляется депрессивноподобное поведение [32].

В нашей работе впервые было показано, что в тесте на социальное доминирование в трубе самцы группы СКУЧ демонстрировали значительно большее число побед, чем крысы группы СТАНД, что свидетельствовало об увеличении социального доминирования. Самцы группы СКУЧ совершали больше активных наступательных действий в трубе. Ранее увеличение социального доминирования наблюдали у мышей после хронического непредсказуемого стресса [33], а также у крыс после раннего провоспалительного стресса [34], при этом в последней работе у победителей наблюдался более высокий базовый уровень *IL-1 β* в крови, чем у проигравших. Пренатальное воздействие выхлопными газами дизельного топлива также приводило к увеличению доминирования у потомства и большей экспрессии *IL-1 β* в префронтальной коре [35]. В крови у скученных крыс был обнаружен повышенный уровень провоспалительных цитокинов [16, 36, 37].

Тест «резидент-интродер», проведенный после 4-дневной изоляции, показал, что у самцов-резидентов группы СКУЧ было больше нападений на интродера, чем у группы СТАНД. При этом, если у группы СТАНД к концу опыта число нападений снижалось, то у группы СКУЧ оставалось на высоком уровне. Сходное увеличение числа агрессивных нападений и такое же распределение их во времени наблюдали ранее после провоспалительного стресса, вызываемого введением бактериального липополисахарида (ЛПС) в раннем онтогенезе [38]. После стресса социальной нестабильности, создаваемой чередованием периодов социальной изоляции и скученности, также наблюдалось увеличение агонистического поведения у самок крыс [10]. Увеличение агрессивных взаимодействий наблюдали в домашней клетке у мышей при увеличении числа животных в клетке [8, 9, 39]. Такую закономерность авторы объясняли тем, что большая численность популяции побуждает доминирующее животное демонстрировать более высокий уровень агрессивного поведения для поддержания своего доминирующего статуса.

В настоящей работе было показано увеличение экспрессии мРНК генов провоспалительного цитокина *IL-1 β* в гиппокампе, префронтальной коре, миндалине, а также небольшое увеличение экспрессии гена *TNF- α* (тенденция) в миндалине у крыс группы СКУЧ, которых отличал повышенный уровень социального доминирования и агрессивности. Эти данные могут свидетельствовать, вероятно, о запуске процессов нейровоспаления, хотя содержание белков, кодируемых данными генами, мы не исследовали, в чем проявляются

определенные ограничения нашей работы. Ранее после 3-дневного содержания в скученных условиях у крыс наблюдали увеличение уровня белков IL-1 β в префронтальной коре и гипоталамусе [40]. Полученные в настоящей работе факты подтверждают предположение о связи доминирования с активацией иммунной системы [34], которое ранее возникло на основании данных о высоком содержании провоспалительного цитокина IL-1 β в крови у доминантов [34]. Высокий уровень экспрессии гена *IL-1 β* в мозге может вызывать изменение функционирования структур мозга, участвующих в механизмах социальной иерархии. Большую роль, по-видимому, для увеличения социального доминирования играют изменения в префронтальной коре. Так, известно, что медиальная префронтальная кора является ключевой структурой мозга, определяющей иерархический статус [19, 41–43]. Активация или торможение дорзомедиальной части префронтальной коры вызывает мгновенный выигрыш или проигрыш соответственно [43]. Социальное доминирование контролируется синаптической эффективностью в медиальной префронтальной коре (mPFC), и глутаматный рецептор AMPA-типа (AMPA-R) является ключевым для синаптической эффективности [44].

Наши данные об увеличении экспрессии гена провоспалительного цитокина *IL-1 β* в гиппокампе, миндалине и префронтальной коре у крыс группы СКУЧ с высоким уровнем агрессии подтверждают гипотезу о связи агрессии с повышением уровня цитокинов [45]. Ранее было показано, что у агрессивных крыс линии Norway, по сравнению с неагрессивными животными, наблюдается более высокий уровень провоспалительного цитокина IL-1 β в гипоталамусе и во фронтальной коре после введения ЛПС, а уровень противовоспалительного цитокина IL-10, наоборот, уменьшен [46]. Для агрессивных мышей была характерна увеличенная продукция провоспалительных цитокинов клетками селезенки [47]. Эпизоды агрессии приводили к увеличению экспрессии мРНК генов *IL-1 β* и *IL-6* в префронтальной коре и гиппокампе, при этом наблюдались сложные зависимости от социального статуса мышей, числа схваток и реактивности животных по уровню кортикостерона в крови [48]. У доминантов с большой реакцией по уровню кортикостерона после схватки наблюдался существенный прирост мРНК *IL-1 β* и *IL-6* в префронтальной коре [48]. Животные и люди с повышенной агрессивностью показывают увеличенный уровень провоспалительных цитокинов [49].

Хотя крысы группы СКУЧ отличались повышенной агрессивностью и доминированием, в нашей работе не было обнаружено прямой связи

между доминированием и агрессивностью у конкретных крыс, т.е. у животных, имеющих большее число побед в трубе, могло не быть большого числа агрессивных нападений в тесте «резидент-интродер». Оппоненты в трубе никогда не кусали друг друга, победа достигалась напором, толканиями, стойкостью, неготовностью отступить. Ряд данных литературы также свидетельствует об отсутствии связи между доминированием и агрессивностью у грызунов [33, 50] или у кошек [51]. Для более полного анализа причинно-следственных связей между двумя поведенческими показателями, такими как агрессивность и доминирование, и повышением провоспалительных цитокинов в мозге требуются, по-видимому, дополнительные эксперименты с искусственным влиянием на уровень цитокинов в мозге.

Экспрессия гена цитокина *TGF- β 1* была повышена у крыс группы СКУЧ в миндалине, префронтальной коре и гиппокампе, т.е. тех же структурах, в которых была увеличена экспрессия провоспалительных цитокинов. *TGF- β 1* широко известен как противовоспалительный цитокин, который может вырабатываться как глиальными, так и нейрональными клетками [52, 53], его повышенный уровень обнаруживается при длительной хронической активации микроглии. Показана защитная роль *TGF- β 1* при ряде патологий. Так, при болезни Альцгеймера данный цитокин осуществляет иммуномодуляцию и нейропротекцию головного мозга [54]. *TGF- β 1* способен ослаблять нейровоспаление и облегчать демиелинизирующие повреждения при ряде заболеваний [52], подавлять накопление липопротеидов низкой плотности в условиях инсульта [55]. Снижение *TGF- β 1* наблюдается при дефиците когнитивных функций [56]. Кроме того, показана повышенная экспрессия рецептора *TGF- β 1* в гиппокампе у крыс, устойчивых к пренатальному стрессу и не показавших признаков развития депрессивно-подобного поведения [57]. На основании данных литературы можно высказать предположение, что повышенный уровень экспрессии *TGF- β 1* в тех же структурах мозга, которые показали увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов, может говорить о наличии компенсаторных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Содержание крыс-самцов в условиях повышенной скученности, по сравнению с контролем, приводило к уменьшению времени взаимодействия с социальным объектом в тесте на социальное предпочтение, что свидетельствовало об уменьшении социальной мотивации. Содержание

в скученных условиях вызывало увеличение социального доминирования в тесте в трубе и приводило к увеличению агрессивности в тесте «резидент-интродер», судя по увеличению числа нападений, меньшему латентному периоду первых нападений и не снижению их числа к концу опыта. Содержание в скученных условиях вызывало увеличение экспрессии мРНК гена провоспалительного цитокина *IL-1 β* в дорзальном гиппокампе, медиальной префронтальной коре и в меньшей степени в миндалине, что можно рассматривать как признаки нейровоспаления. У крыс группы СКУЧ наблюдался более высокий уровень экспрессии мРНК гена противовоспалительного цитокина *TGF- β 1* в дорзальном гиппокампе, миндалине и медиальной префронтальной коре, что свидетельствовало, по-видимому, о наличии компенсаторных процессов.

Ограничения работы. Молекулярно-генетический анализ образцов мозга по ряду причин был проведен не у всей выборки крыс. Было отобрано по 8 животных в каждой группе, поведение которых в тестах «резидент-интродер» и на соци-

альное доминирование в трубе было наиболее характерно для каждой группы. Анализ экспрессии белков, кодируемых исследованными генами, не был проведен в работе, ограничились изучением только экспрессии мРНК соответствующих генов.

Вклад авторов. И.В. Павлова – концепция и руководство работой, проведение экспериментов, написание текста; Н.Д. Брошевицкая, А.А. Потехина – проведение экспериментов, обработка результатов; А.М. Швадченко – молекулярно-генетический анализ.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ИВНД и НФ РАН по теме «Сетевые, клеточные и молекулярные механизмы нейропластичности в поведении, обучении и памяти животных и человека». Регистрационный номер: 1021062411613-6-3.1.4, руководитель академик РАН П.М. Балабан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Toth, I., and Neumann, I. D. (2013) Animal models of social avoidance and social fear, *Cell Tissue Res.*, **354**, 107-118, <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1636-4>
- Slattery, D. A., Uschold, N., Magoni, M., Bär, J., Popoli, M., Neumann, I. D., and Reber, S. O. (2012) Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: anxiety without depression, *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 702-714, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.002>.
- Tramullas, M., Tramullas, M., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2012) Chronic psychosocial stress induces visceral hyperalgesia in mice, *Stress*, **15**, 281-292, <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.622816>.
- Lee, Y. A., Obora, T., Bondonny, L., Toniolo, A., Miville, J., Yamaguchi, Y., Kato, A., Takita, M., and Goto, Y. (2018) The effects of housing density on social interactions and their correlations with serotonin in rodents and primates, *Sci. Rep.*, **8**, 3497, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21353-6>.
- Finger, B. C., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2012) The temporal impact of chronic intermittent psychosocial stress on high-fat diet-induced alterations in body weight, *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 729-741, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.06.01>.
- Ramsden, E. (2009) The urban animal: population density and social pathology in rodents and humans, *Bulletin of the World Health Organization*, **87**, 82, <https://doi.org/10.2471/blt.09.062836>.
- Calhoun, J. B. (1962) Population density and social pathology, *Sci. Am.*, **206**, 139-150, <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0262-139>.
- Van Loo, P. L. P., Mol, J. A., Koolhaas, J. M., Van Zutphen, B. F. M., and Baumans, V. (2001) Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size, *Physiol. Behav.*, **72**, 675-683, [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00425-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00425-5).
- Poole, T. B., and Morgan, H. D. (1973) Differences in aggressive behaviour between male mice (*Mus musculus* L.) in colonies of different sizes, *Anim. Behav.*, **21**, 788-795, [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(73\)80105-8](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(73)80105-8).
- Baranyi, J., Bakos, N., and Haller, J. (2005) Social instability in female rats: the relationship between stress-related and anxiety-like consequences, *Physiol. Behav.*, **84**, 511-518, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.01.005>.
- Cao, W. Y., Hu, Z. L., Xu, Y., Zhang, W. J., Huang, F. L., Qiao, X. Q., Cui, Y. H., Wan, W., Wang, X. Q., Liu, D., Dai, R. P., Li, F., and Li, C. Q. (2017) Role of early environmental enrichment on the social dominance tube test at adulthood in the rat, *Psychopharmacology (Berl)*, **234**, 3321-3334, <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4717-3>.
- Brown, K. J., and Grunberg, N. E. (1995) Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females, *Physiol. Behav.*, **58**, 1085-1089, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02043-8).

13. Smitha, K. K., and Mukkadan, J. K. (2014) Effect of different forms of acute stress in the generation of reactive oxygen species in albino Wistar rats, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **58**, 229-232.
14. Delaroque, C., Chervy, M., Gewirtz, A. T., and Chassaing, B. (2021) Social overcrowding impacts gut microbiota, promoting stress, inflammation, and dysglycemia, *Gut Microbes*, **13**, 2000275, <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2000275>.
15. Uarquin, D. G., Meyer, J. S., Cardenas, F. P., and Rojas, M. J. (2016) Effect of overcrowding on hair corticosterone concentrations in juvenile male Wistar rats, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, **55**, 749-755.
16. Лосева Е. В., Логинова Н. А., Мезенцева М. В., Клодт П. М., Кудрин В. С. (2013) Иммунологические показатели крови и уровни моноаминов в мозге крыс, содержащихся в условиях хронической скученности, *Бюлл. exper. биол. и мед.*, **155**, 464-467.
17. Chen, P., and Hong, W. (2018) Neural circuit mechanisms of social behavior, *Neuron*, **98**, 16-30, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>.
18. Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Falkner, A. L., and Lin, D. (2017) Ventromedial hypothalamus and the generation of aggression, *Front. Systems Neurosci.*, **11**, 94, <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00094>.
19. Wang, F., Kessels, H. W., and Hu, H. (2014) The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy, *Trends Neurosci.*, **37**, 674-682, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.07.005>.
20. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0>.
21. Fan, Z., Zhu, H., Zhou, T., Wang, S., Wu, Y., and Hu, H. (2019) Using the tube test to measure social hierarchy in mice, *Nat. Protoc.*, **14**, 819-831, <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0116-4>.
22. Suchomelova, L., Thompson, K. W., Baldwin, R. A., Niquet, J., and Wasterlain, C. G. (2023) Interictal aggression in rats with chronic seizures after an early life episode of status epilepticus, *Epilepsia Open*, **8**, S82-S89, <https://doi.org/10.1002/epi4.12734>.
23. Paxinos, G., and Watson, C. (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier Academic Press, 210 p.
24. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
25. Павлова И. В., Брошевицкая Н. Д. (2024) Влияние содержания крыс в условиях повышенной скученности на тревожность и условнорефлекторный страх, *Журн. высш. нервн. деят.*, **74**, 421-434, <https://doi.org/10.31857/S004446772403005X>.
26. Barker, T. H., George, R. P., Howarth, G. S., Whittaker, A. L. (2017) Assessment of housing density, space allocation and social hierarchy of laboratory rats on behavioural measures of welfare, *PLoS One.*, **12**, e0185135, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185135>.
27. Lin, E. J., Sun, M., Choi, E. Y., Magee, D., Stets, C. W., and Dusing, M. J. (2015) Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. *Psychoneuroendocrinology*, **51**, 318-330, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.007>.
28. Daniels, W. M. U., Pietersen, C. Y., Carstens, M. E., Daya, S., and Stein, D. (2000) Overcrowding induces anxiety and causes loss of serotonin 5HT-1a receptors in rats, *Metab. Brain Disease*, **15**, 287-295, <https://doi.org/10.1023/a:1011123208674>.
29. Botelho, S., Estanislau, C., and Morato, S. (2007) Effects of under and overcrowding on exploratory behavior in the elevated plus-maze, *Behav. Processes*, **74**, 357-362, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2006.12.006>.
30. Князева С. И., Логинова Н. А., Лосева Е. В. (2012) Уровень тревожности и изменение массы тела при скученности у крыс, *Бюлл. exper. биол. и мед.*, **154**, 7-10.
31. Лосева Е. В. (2021) Психосоциальный стресс перенаселенности (скученности): негативные последствия для организма человека и грызунов, *Интегра. Физиол.*, **2**, 33-40, <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-33-40>.
32. Лосева Е. В., Саркисова К. Ю., Логинова Н. А., Кудрин В. С. (2015) Депрессивное поведение и содержание моноаминов в структурах мозга у крыс при хронической скученности, *Бюл. Эксперим. Биол. Мед.*, **159**, 304-307.
33. Yang, C. R., Bai, Y. Y., Ruan, C. S., Zhou, H. F., Liu, D., Wang, X. F., Shen, L. J., Zheng, H. Y., and Zhou, X. F. (2015) Enhanced aggressive behaviour in a mouse model of depression, *Neurotox. Res.*, **27**, 129-142, <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9498-4>.
34. Брошевицкая Н. Д., Павлова И. В., Зайченко М. И. (2022) Ранний провоспалительный стресс влияет на социальное поведение взрослых крыс: эффекты пола и базового уровня интерлейкина 1-бета в крови, *Нейрохимия*, **39**, 279-287, <https://doi.org/10.31857/S1027813322030025>.
35. Win-Shwe, T. T., Kyi-Tha-Thu, C., Fujitani, Y., Tsukahara, S., and Hirano, S. (2021) Perinatal exposure to diesel exhaust-origin secondary organic aerosol induces autism-like behavior in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 538, <https://doi.org/10.3390/ijms22020538>.

36. Gadek-Michalska, A., Bugajski, A. J., and Bugajski, J. (2008) Prostaglandins and interleukin-1beta in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic phenylephrine under basal and stress conditions, *J. Physiol. Pharmacol.*, **59**, 563-575.
37. Гаврилов В. В., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В., Александров Ю. И., Гуляева Н. В. (2021) Хронические социальные стрессы изоляции и скученности у крыс по-разному влияют на научение инструментальному поведению и состояние гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, *Журн. высш. нервн. деят.*, **71**, 710-719, <https://doi.org/10.31857/S004446772105004X>.
38. Павлова И. В., Брошевицкая Н. Д. (2023) Влияние активации иммунной системы в раннем онтогенезе на агрессивность и сексуальную мотивацию у взрослых крыс Вистар, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **109**, 1476-1488, <https://doi.org/10.31857/S0869813923100084>.
39. Butler, R. G. (1980) Population size, social behaviour, and dispersal in house mice: a quantitative investigation, *Anim. Behav.*, **28**, 78-85, [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(80\)80010-8](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80010-8).
40. Gadek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., and Bugajski, J. (2016) Psychosocial stress inhibits additional stress-induced hyperexpression of NO synthases and IL-1b in brain structures, *Pharmacol. Rep.*, **68**, 1178-1196, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.09.003>.
41. Pallé, A., Zorzo, C., Luskey, V. E., McGreevy, K. R., Fernández, S., and Trejo, J. L. (2019) Social dominance differentially alters gene expression in the medial prefrontal cortex without affecting adult hippocampal neurogenesis or stress and anxiety-like behavior, *FASEB J.*, **33**, 6995-7008, <https://doi.org/10.1096/fj.201801600R>.
42. Zhang, C., Zhu, H., Ni, Z., Xin, Q., Zhou, T., Wu, R., Gao, G., Gao, Z., Ma, H., Li, H., He, M., Zhang, J., Cheng, H., and Hu, H. (2022) Dynamics of a disinhibitory prefrontal microcircuit in controlling social competition, *Neuron*, **110**, 516-531.6, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.034>.
43. Zhou, T., Zhu, H., Fan, Z., Wang, F., Chen, Y., Liang, H., Yang, Z., Zhang, L., Lin, L., Zhan, Y., Wang, Z., and Hu, H. (2017) History of winning remodels thalamo-PFC circuit to reinforce social dominance, *Science*, **357**, 162-168, <https://doi.org/10.1126/science.aak9726>.
44. Park, M. J., Seo, B. A., Lee, B., Shin, H. S., and Kang, M. G. (2018) Stress-induced changes in social dominance are scaled by AMPA-type glutamate receptor phosphorylation in the medial prefrontal cortex, *Sci. Rep.*, **8**, 15008, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33410-1>.
45. Das, S., Deuri, S. K., Sarmah, A., Pathak, K., Baruah, A., Sengupta, S., Mehta, S., Avinash, P. R., Kalita, K. N., and Hazarika, J. (2016) Aggression as an independent entity even in psychosis – the role of inflammatory cytokines, *J. Neuroimmunol.*, **292**, 45-51, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.012>.
46. Alperina, E., Idova, G., Zhukova, E., Zhanaeva, S., and Kozhemyakina, R. (2019) Cytokine variations within brain structures in rats selected for differences in aggression, *Neurosci. Lett.*, **692**, 193-198, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.012>.
47. Idova, G. V., Markova, E. V., Gevorgyan, M. M., Alperina, E. L., and Zhukova, E. N. (2016) Changes in production of cytokines by C57Bl/6J mouse spleen during aggression provoked by social stress, *Bull. Experim. Biol. and Med.*, **160**, 679-682, <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3248-y>.
48. Audet, M.-C., Mangano, E. N., and Anisman, H. (2010) Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity, *Front. Behav. Neurosci.*, **4**, 1-12, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00156>.
49. Takahashi, A., Flanigan, M. E., McEven, B. S., and Russo, S. J. (2018) Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models, *Front. Behav. Neurosci.*, **12**, 56-62, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00056>.
50. Hiadlovská, Z., Mikula, O., Macholán, M., Hamplová, P., Vošlajerová, B., Bimová, B., and Daniszová, K. (2015) Shaking the myth: body mass, aggression, steroid hormones, and social dominance in wild house mouse, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **223**, 16-26, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.033>.
51. Fonberg, E. (1988) Dominance and aggression, *Int. J. Neurosci.*, **41**, 201-213, <https://doi.org/10.3109/00207458808990726>.
52. Xie, Y., Chen, X., Li, Y., Chen, S., Liu, S., Yu, Z., and Wang, W. (2022) Transforming growth factor-b1 protects against LPC-induced cognitive deficit by attenuating pyroptosis of microglia via NF-κB/ERK1/2 pathways, *J. Neuroinflamm.*, **19**, 194, <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02557-0>.
53. Mitchell, K., Shah, J. P., Tsytsikova, L. V., Campbell, A. M., Affram, K., and Symes, A. J. (2014) LPS antagonism of TGF-β signaling results in prolonged survival and activation of rat primary microglia, *J. Neurochem.*, **129**, 155-168, <https://doi.org/10.1111/jnc.12612>.
54. Kapoor, M., and Chinnathambi, S. (2023) TGF-β1 signalling in Alzheimer's pathology and cytoskeletal reorganization: a specialized Tau perspective, *J. Neuroinflamm.*, **20**:72. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02751-8>.
55. Xin, W., Pan, Y., Wei, W., Gerner, S. T., Huber, S., Juenemann, M., Butz, M., Bähr, M., Huttner, H. B., and Doepfner, T. R. (2023) TGF-β1 decreases microglia-mediated neuroinflammation and lipid droplet accumulation in an *in vitro* stroke model, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 17329, <https://doi.org/10.3390/ijms242417329>.

56. Su, C., Miao, J., and Guo, J. (2023) The relationship between TGF- β 1 and cognitive function in the brain, *Brain Res. Bull.*, **205**, 110820, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.110820>.
57. Fidilio, A., Grasso, M., Caruso, G., Musso, N., Begni, V., Privitera, A., Torrisi, S. A., Campolongo, P., Schiavone, S., Tascadda, F., Leggio, G. M., Drago, F., Riva, M. A., and Caraci, F. (2022) Prenatal stress induces a depressive-like phenotype in adolescent rats: The key role of TGF- β 1 pathway, *Front. Pharmacol.*, **13**, 1075746, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1075746>.

THE INFLUENCE OF LONG-TERM HOUSING IN OVERCROWDING ON THE SOCIAL BEHAVIOR OF RATS AND THE EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH NEUROINFLAMMATION

I. V. Pavlova*, N. D. Broshevitskaya, A. A. Potekhina, and A. M. Shvadchenko

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; e-mail: pavlovm@mail.ru*

The effect of long-term housing in overcrowding on the social behavior of adult male Wistar rats was studied. From 30 to 180 postnatal day (PND) the rats lived in standard conditions for 5 individuals (360 cm² per rat, group of STD), or in crowded conditions for 15 individuals in cages (120 cm² per rat, group of CROW). Starting from 100 PND, the behavior of rats was studied in social preference test, social dominance tube test and in the resident intruder test for aggressive behavior. After decapitation of rats by 180 PND, brain samples from the amygdala, dorsal hippocampus, ventromedial hypothalamus and medial prefrontal cortex were taken for subsequent analysis of the expression of *IL-1 β* , *TNF*, *TGF- β 1*, *IL-6* mRNA genes using a real-time polymerase chain reaction. Compared with the STD group, rats of CROW group had a shorter interaction time with a social object in the social preference test. Males of the CROW group had more wins in the tube test compared to the STD group, as well as more attacks in the resident intruder test. The expression of *IL-1 β* in the hippocampus and medial prefrontal cortex was significantly increased in the rats of the CROW group, as well as the expression of *TGF- β 1* in the hippocampus, amygdala and prefrontal cortex was increased. The social stress of overcrowding led to an increase in social dominance, aggressiveness and decreased sociability. Changes in social behavior in the CROW rats were accompanied by an increase in the expression of the proinflammatory cytokine *IL-1 β* and the anti-inflammatory cytokine *TGF- β 1* in a number of brain structures, which can be considered, respectively, as a manifestation of neuroinflammation and compensatory processes.

Keywords: overcrowding, social dominance tube test, resident-intruder test, social preference test, pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF, IL-6, anti-inflammatory cytokine TGF- β 1

СОСТАВ БЕЛКОВ ЭКЗОСОМ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ, АССОЦИИРОВАН С КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ В ПОСТИНСУЛЬТНОМ ПЕРИОДЕ

© 2024 Т.А. Дружкова¹, М.Ю. Жанина^{1,2}, Е.Е. Владимирова³,
А.Б. Гехт^{1,4}, Н.В. Гуляева^{1,2*}

¹ ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева»
Департамента здравоохранения города Москвы,
115419 Москва, Россия; электронная почта: nata_gul@ihna.ru

² ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии» РАН,
117485 Москва, Россия

³ ГБУЗ «Городская клиническая больница имени Кончаловского»
Департамента здравоохранения города Москвы, 124489 Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
119049 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.07.2024

После доработки 08.08.2024

Принята к публикации 01.09.2024

Ишемический инсульт (ИИ) и последующие нервно-психические расстройства являются одними из ведущих причин инвалидности во всем мире. Ранее было предложено несколько стратегий использования экзосом для оценки риска заболеваний, связанных с ИИ. Целью данной работы являлась оценка белков экзосом сыворотки крови пациентов в хроническом постинсультном периоде и поиск их ассоциаций с развитием постинсультных умеренных когнитивных нарушений (УКН). Сравнительный количественный протеомный анализ сывороточных экзосом пациентов без постинсультных УКН (19, средний возраст $52,0 \pm 8,1$ года) и пациентов с постинсультными УКН (11, средний возраст $64,8 \pm 5,6$ года) выявил достоверные различия в уровнях 62 белков из 186 идентифицированных. У пациентов с УКН, по сравнению с пациентами без УКН, в хроническом постинсультном периоде наблюдались повышенные уровни белков, ассоциированных с иммунной системой, и пониженные уровни белков, участвующих в липидном обмене. Полученные данные позволяют предположить, что более высокий уровень активации иммунной системы у пациентов в отдаленном периоде после ИИ может быть одним из факторов риска развития постинсультных когнитивных расстройств, и указывают на участие экзосомального транспорта в этих процессах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экзосомы, сыворотка крови, ишемический инсульт, масс-спектрометрия, протеомный анализ, постинсультные когнитивные нарушения, иммунная система.

DOI: 10.31857/S0320972524090065 EDN: JJVNN0

ВВЕДЕНИЕ

Постинсультные нервно-психические расстройства являются одной из ведущих причин инвалидности во всем мире [1, 2]. Ишемия головного мозга запускает сложную последовательность патофизиологических процессов. Их нарушение в восстановительный период может привести к

вторичным повреждениям головного мозга и, как следствие, к отсроченным психоневрологическим изменениям у пациентов, переживших ишемический инсульт (ИИ) [3]. В проведенных ранее исследованиях получены данные о связи между ИИ и повышенным риском развития когнитивных нарушений в последующие годы [4, 5]. Показано, что постинсультное снижение когнитивных

Принятые сокращения: Апо – аполиipoprotein; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ИИ – ишемический инсульт; КМА – комплекс мембранной атаки; УКН – умеренные когнитивные нарушения.

* Адресат для корреспонденции.

функций часто сопровождается продолжительной активацией системы воспаления, вызванной ишемией [6, 7]. Зачастую повышенные уровни провоспалительных молекул, белков каскада комплемента и ряда интерлейкинов в крови ассоциированы с последующим снижением когнитивных способностей пациентов после инсульта [8, 9]. К сожалению, показатели, выявляемые в крови, не позволяют в полной мере оценить степень активности нейровоспалительных процессов, которые происходят в мозге как в остром периоде, так и в отдаленные сроки после любого фокального повреждения, включая инсульт. Такой анализ, доступный при использовании моделей инсульта на животных, требует более специфических подходов при исследованиях в клинике.

Все большее число исследований подтверждает ведущую роль функциональных взаимодействий между нейронами, микроглией, астроцитами, олигодендроцитами, сосудистыми перicyтами, внеклеточным матриксом, эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов в ограничении повреждающего влияния на нейроны и регуляции процессов восстановления после инсульта [10, 11]. Сложные взаимодействия между различными типами клеток в головном мозге и на периферии активируют восстановление сосудов, контролируют реакцию на нейровоспаление и проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), способствуя адаптивно-компенсаторным перестройкам структур мозга в постинсультном периоде [12].

В силу своей способности преодолевать ГЭБ, изолировать от периферического кровообращения клеточно-специфические белки и транспортировать их экзосомы являются естественными компонентами межклеточной передачи биологической информации, а их состав может служить потенциальным биомаркером многих неврологических заболеваний [13]. Уникальные профили белков и различных классов РНК, присутствующих в циркулирующих внеклеточных везикулах, были неоднократно идентифицированы в крови лиц с различными нейродегенеративными заболеваниями [14–19]. Экзосомы принято считать продуктом эндолизосомальной системы, где они образуются в результате отщуривания везикул с цитоплазматическим содержимым внутрь поздних эндосом. Размер экзосом составляет около 30–150 нм, они состоят из липидной двуслойной мембранной структуры, заключающей в себе функциональное содержимое, включая РНК, ДНК, белки, липиды и различные метаболиты [20].

В одном из исследований было показано, что экзосомы участвуют в регуляции физиологических и патологических процессов после ИИ, способствуя реорганизации и восстановлению

структур головного мозга после повреждения [21]. Получены данные об участии экзосом в длительной нейропротекции после инсульта, а также в неврологическом восстановлении, регенерации нервов и регуляции периферических иммунных реакций [22]. Предполагается, что экзосомы играют роль в активации ангиогенеза и нейрогенеза, а также в ремоделировании дендритов после повреждения мозга [23]. Была предложена концепция, предполагающая, что экзосомы и их содержимое участвуют в ретроградной передаче сигналов через синапсы, осуществляя межклеточный обмен белками и РНК в нейронных сетях [24].

В последние годы исследование экзосом биологических жидкостей человека происходит очень активно. Информация о белковом составе везикул, в том числе экзосом, накапливается и постоянно обновляется в базе данных Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org/>), а данные о белковом составе экзосом различного происхождения и присутствующих в них РНК и липидах аккумулируются также в базе ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>).

Анализ механизмов, лежащих в основе патогенеза ИИ, привел к разработке стратегий использования экзосом в диагностике и лечении этой патологии [25, 26]. В настоящее время исследования, связанные с ролью экзосом в развитии отсроченных постинсультных нервно-психических расстройств, единичны. Между тем углубление понимания потенциальной роли экзосомального транспорта в механизмах, приводящих к вторичному повреждению мозга, оцененное на разных сроках заболевания, включая хронический постинсультный период, позволит с большей точностью прогнозировать исходы ИИ, а также выявить молекулярные мишени для разработки новых подходов к лечению и реабилитации постинсультных осложнений. В рамках этой глобальной задачи целью данного исследования была оценка протеомного профиля экзосом сыворотки крови пациентов после ИИ в хроническом постинсультном периоде и анализ его ассоциаций с развитием эмоциональных и когнитивных нарушений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование были включены 30 пациентов (23 мужчины, 7 женщин), госпитализированных в ГКБ им. Кончаловского (Москва) в 2022–2023 гг. с острым ИИ, согласившихся участвовать в исследовании и пришедших на контрольное обследование через год и более после инсульта. Пациенты соответствовали следующим критериям: возраст – 45–80 лет; ИИ головного

мозга полушарной локализации, не затрагивающих лимбические структуры; легкая и средняя тяжесть ИИ (баллы по шкале NIHSS < 15 при поступлении в больницу); поступление в стационар не позже 48 ч после ИИ; способность заполнить психометрические шкалы. Критериями исключения были: наличие в анамнезе инсульта, черепно-мозговой травмы с остаточными очаговыми изменениями на КТ/МРТ; наличие в анамнезе когнитивных и депрессивных нарушений; острые и хронические соматические и гормональные заболевания; алкогольная или наркотическая зависимость. Для оценки неврологического, эмоционального и когнитивного статуса пациентов на 3–7 день после госпитализации и при последующем визите использовались следующие диагностические шкалы: Шкала инсульта национального института здоровья (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS) [27]; Монреальская когнитивная шкала (Montreal Cognitive Assessment, MoCA) [28]; Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS) [29]. Информированное согласие на участие в исследовании было подписано каждым испытуемым.

Подготовка биологических образцов для анализа. Забор крови из локтевой вены у пациентов проводили во время контрольного визита через год и позже после ИИ в утренние часы натощак в вакуумные системы с активатором свертывания для получения сыворотки крови с последующим центрифугированием при 2000 g 15 мин при 4 °C.

Для выделения экзосом из сыворотки крови использовали наборы EXO-Prep for Exosome Isolation from Plasma and Serum, НВМ-EXP-B5 («HansaBioMed Life Sciences OÜ», Эстония) в соответствии с инструкцией производителя. Количество экзосом в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа при помощи наборов ExoTEST™ for Extracellular Vesicle immunocapture and quantification from human serum, НВМ-RTK-POS («HansaBioMed Life Sciences OÜ») в соответствии с инструкцией производителя.

Для удаления загрязняющих компонентов была проведена экстракция белков в системе хлороформ/метанол по следующему протоколу. К исходным образцам выделенной фракции экзосом в объеме 100 мкл добавляли 400 мкл метанола (99,8%), перемешивали 30 сек. Добавляли 100 мкл хлороформа (99,5%), перемешивали 30 сек. Далее, добавляли 300 мкл воды, перемешивали 30 сек. Смесь центрифугировали в течение 2 мин при 14 000 g. Удаляли надосадочную жидкость и к нижней фракции добавляли 400 мкл метанола, перемешивали в течение 30 сек, центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 g, удаляли су-

пернатант. Осадок высушивали при комнатной температуре.

Полученный осадок экзосомальной фракции крови пациентов и растворенный по инструкции производителя стандарт экзосом НВМ-PES-100 («HansaBioMed Life Sciences OÜ») лизировали в кратном объеме буфера, содержащего 10% sodium dodecylsulfate (SDS) в 50 мМ бикарбоната триэтиламмония (triethylammonium bicarbonate, TEAB). На гидролиз белков трипсином брали по 50 мкг белка для образцов экзосом, выделенных из крови пациентов, и все доступное количество (93 мкг) – для образца-стандарта экзосом. В супернатантах определяли общую концентрацию пептидов методом колориметрического анализа с использованием набора Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay Kit («Thermo Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Пептиды высушивали и растворяли в 0,1%-ной муравьиной кислоте до конечной концентрации 0,3 мкг/мкл.

Хромато-масс-спектрометрия образцов и идентификация белков. Полученные пептиды разделяли с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific»). Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX («Thermo Scientific»), как описано ранее [30]. Идентификацию белков проводили при помощи программного обеспечения MaxQuant v. 2.0.3.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda [31].

Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека в UniProt (UP000005640; <https://www.uniprot.org/>). Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков устанавливали пороговую величину FDR (False Discovery Rate), равную 0,01. Белки рассматривали в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено по крайней мере два пептида.

Для количественной оценки белков проводили мечение пептидов с использованием 10-плексного набора тандемных массовых меток (TMT). Полученные пептиды анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Перед проведением хромато-масс-спектрометрии с использованием TMT-меток проводили обессоливание образцов с использованием наконечников Pierce C18 Tips. Меченые TMT пептиды разделяли с использованием системы ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLCnano. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX, как описано ранее [30].

Идентификацию белков проводили при помощи программного обеспечения MaxQuant v.2.0.3.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda [31]. Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека в UniProt. Параметры были заданы в соответствии с рекомендациями Yu et al. [32]. Для сравнительного количественного анализа при помощи TMT-меток проводилась дополнительная нормализация. Нормализацию проводили для всех линий (пулов) мечения.

Дальнейший анализ данных, полученных в ходе идентификации и дополнительной нормализации, проводили в программе Perseus v.2.0.11. Для количественной оценки содержания белков в программу загружали величины нормализованной интенсивности «NormRIC». Данные фильтровали, удаляя возможные белки-контаминанты, ложноположительные идентификации, оставляли в анализе только белки, которые были идентифицированы по двум и более пептидам. Группы белков, не имеющие 85% достоверных значений нормализованной интенсивности «NormRIC» хотя бы в одной экспериментальной группе, были удалены. Хромато-масс-спектрометрический анализ был выполнен на базе ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н. Ореховича, Москва.

Статистический анализ. Статистическая обработка и визуализация данных были проведены в программах STATISTICA 10.0 (StatSoftInc., Tulsa, OKUSA) и в среде программирования R с использованием встроенных и дополнительных пакетов (heatmap2, ggplot2 и др). Нормальность распределения определяли при помощи тестов Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Для сравнения двух количественных несвязанных выборок с нормальным распределением данных был использован *t*-тест Стьюдента. Для поиска различий в частотах встречаемости различных признаков использовали точный тест Фишера. Результаты в таблицах представлены как среднее и стандартная ошибка среднего. Корреляции считали при помощи теста Пирсона, если распределение нормальное, и при помощи теста Спирмена – если распределение ненормальное. При $p < 0,05$ различия считали достоверными; при $p < 0,1$ различия рассматривали как тенденцию к достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика пациентов. Из пациентов, которые пришли на контрольный визит через год и более после ИИ, были сформированы две группы на основе порогового балла 26 по шкале MoCA: пациенты с когнитивными симптомами (оценка по шкале MoCA < 25 , $n = 11$) и пациенты

без когнитивных симптомов (оценка по шкале MoCA ≥ 26 , $n = 19$). Все пациенты с когнитивными симптомами имели умеренные когнитивные нарушения (УКН, по шкале MoCA > 17).

Социально-демографические данные и клинико-лабораторные показатели пациентов представлены в табл. 1. Группы пациентов не различались по уровню образования, сопутствующей патологии, отмеченной в анамнезе, локализации и латерализации инсульта очага. Следует отметить, что группа пациентов с УКН в среднем оказалась достоверно старше ($64,8 \pm 5,7$ года против $52,0 \pm 8,0$ лет у пациентов без УКН).

Показатели NIHSS, указывающие на неврологический дефицит, статистически не различались между пациентами с УКН и пациентами без УКН как в остром периоде ($4,2 \pm 2,3$ против $5,1 \pm 1,9$; $p < 0,61$), так и во время контрольного визита (пациенты без УКН – $3,4 \pm 3,1$ (4 [0,5; 5,0]) против пациентов с УКН – $1,3 \pm 1,8$ (1 [0; 3]; $p < 0,06$).

Показатели по шкале MoCA у пациентов с последующим УКН в остром периоде уже были несколько ниже по сравнению с пациентами без УКН ($21,6 \pm 4,2$ против $26,5 \pm 3,4$; $p < 0,01$). Значительно более выраженные различия по шкале MoCA ($p < 0,00001$) были отмечены у этих пациентов на момент контрольного визита (табл. 1).

Показатели HADS в остром периоде ИИ достоверно не различались между пациентами с последующими УКН и без таких нарушений ($2,4 \pm 1,8$ против $2,6 \pm 1,5$; $p < 0,58$). Достоверно более высокие баллы HADS ($p < 0,01$) у пациентов с УКН, по сравнению с пациентами без УКН, были отмечены на момент контрольного визита через год после ИИ, что свидетельствует не только о снижении когнитивного статуса у этих пациентов, но и о наличии депрессивных симптомов, развившихся в постинсультном периоде (табл. 1).

Стандартные лабораторные показатели через год после ИИ не различались между пациентами сравниваемых групп, в том числе количество белка на частицу (экзосому). При этом у пациентов с выявленными УКН в отдаленном постинсультном периоде наблюдался более высокий уровень содержания экзосом в сыворотке крови ($p < 0,04$) по сравнению с пациентами без УКН (табл. 1).

Чтобы проверить, влияет ли возраст на количество экзосом у обследованных пациентов, вся выборка, независимо от когнитивного статуса, была разделена по возрасту на две группы с использованием медианы возраста: пациенты до 57 лет ($52,5$ [46,0; 55,0]) и пациенты старше 57 лет ($63,0$ [63,0; 69,0]). Между группами, разделенными по возрасту, не было выявлено достоверных различий в уровнях экзосом сыворотки крови ($5,7$ [5,1; 5,8] и $6,1$ [5,8; 8,8] на $\text{мл} \times 10^9$ соответственно). В то же время в группе пациентов старше 57 лет

Таблица 1. Основные социально-демографические и клинико-лабораторные показатели

Показатель	Пациенты без УКН (n = 19)	Пациенты с УКН (n = 11)	Значение p
Возраст, годы	52,0 ± 8,1	64,8 ± 5,7	0,0001
Пол (мужской/женский), n	14/5	9/2	1
Образование (среднее/высшее), n	12/7	9/2	0,42
Дислипидемия (да/нет), n	10/9	5/6	1
Гипертония (да/нет), n	16/3	11/0	0,28
Курение (да/нет), n	9/10	5/6	1
Локализация (средняя/задняя мозговая артерия), n	12/7	6/5	0,71
Латерализация (правосторонняя/левосторонняя), n	11/8	3/8	0,14
Баллы по шкале MoCA	27,5 ± 1,2	23,5 ± 2,5	0,00001
Баллы по шкале HADS тревога	3,1 ± 1,7	2,8 ± 2,1	0,73
Баллы по шкале HADS депрессия	1,7 ± 1,6	4,3 ± 3,1	0,01
Глюкоза, ммоль/литр	5,75 ± 0,78	5,68 ± 0,72	0,82
Холестерин, мкмоль/литр	5,2 ± 1,2	4,33 ± 0,80	0,05
Протромбиновый индекс, %	104,0 ± 11,0	103,2 ± 4,2	0,85
Лейкоциты, 10 ⁹ /мл	6,8 ± 1,9	6,8 ± 0,7	0,97
Лимфоциты, %	32,6 ± 14,3	30,7 ± 11,3	0,72
Нейтрофилы, %	51,2 ± 18,9	58,3 ± 13,4	0,31
Количество экзосом, 10 ⁹ /мл	5,3 ± 0,9	8,0 ± 3,7	0,04
Количество белка на частицу, мг/мл	6,8 ± 3,8	6,2 ± 1,9	0,69

Примечание. Данные для возраста, шкал, лабораторных показателей и характеристик экзосом представлены в виде $M \pm SD$.

наблюдалась значимая отрицательная корреляционная связь между количеством экзосом сыворотки крови и возрастом ($R = -0,78$; $p = 0,002$). В более молодой группе пациентов (до 57 лет) эта корреляция отсутствовала ($R = -0,17$, $p = 0,55$). Полученные данные свидетельствуют о том, что более высокие уровни экзосом в сыворотке крови у пациентов с УКН не были связаны с их старшим возрастом.

Белки экзосом сыворотки крови у пациентов с ИИ. Для проверки чистоты выделенной фракции экзосом было проведено сравнение белковых профилей экзосом пациентов с ИИ и коммерческого стандарта экзосом. Чтобы избежать расхождений из-за синонимичных изоформ белка в образцах пациентов и в стандарте, для сравнительного анализа использовали названия генов. Было показано, что ~75% белков из образцов экзосом сыворотки крови пациентов совпали

с белковым профилем стандартного образца экзосом НВМ-PES-100, что свидетельствует о приемлемом качестве выделения внеклеточных везикул (экзосом) из сыворотки крови пациентов с ИИ. Большинство белков, выделенных из экзосомальной фракции пациентов в хроническом постинсультном периоде, были связаны с иммунной системой, липидным обменом и коагуляционным гомеостазом.

Количественный сравнительный анализ белков экзосом сыворотки крови пациентов с УКН и без УКН. На рис. 1 представлена тепловая карта, демонстрирующая результаты иерархической кластеризации белков и образцов пациентов с постинсультными УКН и без УКН. Иерархическая кластеризация привела к разделению выборок на основе белковых профилей пациентов с УКН и без УКН.

Таблица 2. Белки системы комплемента и системы свертывания крови, уровни которых были достоверно повышены в экзосомальных фракциях пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН

Белок	Белковая группа ID	Пациенты без УКН; n = 19		Пациенты с УКН; n = 11		Значение p	Ген
		М	SD	М	SD		
Комплемент C5	P01031	0,225	0,048	0,301	0,053	0,0003	C5
Комплемент C1r	A0A3B3ISR2	0,219	0,072	0,322	0,074	0,0009	C1R
Фактор комплемента CFHR2, связанный с H2	A0A3B3IQ51	0,229	0,065	0,304	0,075	0,008	CFHR2
Комплемент цепи C1q B	D6R934	0,239	0,040	0,284	0,033	0,004	C1QB
Комплемент C3	P01024	0,231	0,055	0,294	0,060	0,007	C3
Комплемент C7	P10643	0,249	0,024	0,279	0,024	0,003	C7
C4b-связывающий белок	P20851	0,227	0,063	0,300	0,069	0,007	C4BPB
Альфа-цепь C4b-связывающего белка	P04003	0,224	0,055	0,294	0,057	0,003	C4BPA
Фактор комплемента H	P08603	0,224	0,054	0,302	0,084	0,004	CFH
Комплемент C1s	P09871	0,220	0,069	0,318	0,076	0,001	C1S
Комплемент субкомпонента C1q, субъединица A	P02745	0,236	0,057	0,292	0,067	0,02	C1QA
Комплемент C2	B4DQI1	0,188	0,074	0,246	0,070	0,04	C2
Молекула CD5	O43866	0,241	0,055	0,291	0,033	0,01	CD5L
Комплемент субкомпонента C1q, субъединица C	P02747	0,229	0,078	0,296	0,068	0,02	C1QC
Белок S	A0A3B3ISJ1	0,233	0,055	0,299	0,051	0,003	PROS1
Фактор фон Виллебранда	P04275	0,214	0,047	0,320	0,052	0,00001	VWF
Фибулин 1	P23142	0,241	0,064	0,303	0,042	0,007	FBLN1

Таблица 3. Иммуноглобулины, уровни которых были достоверно повышены в экзосомальных фракциях пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН

Белок	Белковая группа ID	Пациенты без УКН; n = 19		Пациенты с УКН; n = 11		Значение p	Ген
		М	SD	М	SD		
Предшественник J-цепи иммуноглобулина	P01591	0,232	0,046	0,308	0,044	0,0001	IGJ; JCHAIN
Иммуноглобулин капша переменный 4-1	P06312	0,240	0,036	0,293	0,034	0,0004	IGKV4-1
Иммуноглобулин капша константа	P01834	0,232	0,039	0,295	0,041	0,0003	IGKC
Иммуноглобулин капша переменный 2D-29	A0A5H1ZRS9	0,232	0,069	0,303	0,053	0,007	IGKV A18; IGKV2D-29

Таблица 3 (окончание)

Белок	Белковая группа ID	Пациенты без УКН; n = 19		Пациенты с УКН; n = 11		Значение p	Ген
		M	SD	M	SD		
Иммуноглобулин тяжелый константа альфа-1	P01876	0,234	0,047	0,292	0,064	0,009	<i>IGHA1</i>
Иммуноглобулин лямбда константа 2	P0DOY2	0,235	0,058	0,297	0,040	0,004	<i>IGLC2</i>
Иммуноглобулин тяжелый переменный 1-69	P01742	0,223	0,059	0,303	0,062	0,002	<i>IGHV1-69</i>
Иммуноглобулин тяжелый константа гамма 1	P01857	0,230	0,058	0,300	0,045	0,002	<i>IGHG1</i>
Иммуноглобулин капша переменный 1D-33	A0A2Q2TTZ9	0,239	0,042	0,290	0,034	0,002	<i>IGKV1D-33</i>
Иммуноглобулин тяжелый переменный 3/OR16-12	A0A075B7B8	0,239	0,066	0,298	0,045	0,01	<i>IGHV3OR16-12</i>
Иммуноглобулин тяжелый переменный 3-49	A0A0A0MS15	0,235	0,078	0,301	0,064	0,02	<i>IGHV3-49</i>
Иммуноглобулин капша переменный 3D-20	A0A0C4DH25	0,239	0,054	0,297	0,061	0,01	<i>IGKV3D-20</i>
Иммуноглобулин тяжелый переменный 5-51	A0A0C4DH38	0,240	0,044	0,284	0,062	0,03	<i>IGHV5-51</i>
Иммуноглобулин капша переменный 1-6	A0A0C4DH72	0,236	0,066	0,300	0,058	0,01	<i>IGKV1-6</i>
Иммуноглобулин тяжелый переменный 3-72	A0A4W8ZXM2	0,235	0,047	0,285	0,051	0,01	<i>IGHV3-72</i>
Иммуноглобулин капша переменный 2D-28	A0A5H1ZRS2	0,246	0,033	0,278	0,031	0,01	<i>IGKV2D-28</i>
Иммуноглобулин капша переменный 1D-39	P04432	0,240	0,031	0,272	0,035	0,01	<i>IGKV1D-39</i>
Иммуноглобулин капша переменный 1-5	P01602	0,244	0,058	0,288	0,041	0,03	<i>IGKV1-5</i>
Иммуноглобулин капша переменный 3-20	P01619	0,243	0,047	0,289	0,052	0,02	<i>IGKV3-20</i>
Иммуноглобулин капша переменный 3-15	P01624	0,239	0,060	0,291	0,038	0,01	<i>IGKV3-15</i>
Иммуноглобулин лямбда переменный 1-47	P01700	0,236	0,074	0,301	0,042	0,01	<i>IGLV1-47</i>
Иммуноглобулин лямбда переменный 3-30	P01768	0,234	0,082	0,307	0,066	0,02	<i>IGV3-30</i>
Иммуноглобулин тяжелый переменный 3-43D	P0DP04	0,245	0,043	0,281	0,025	0,02	<i>IGHV3-43D</i>

Таблица 4. Белки, связанные с липидным обменом, с пониженным уровнем в экзосомальных фракциях пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН

Белок	Белковая группа ID	Пациенты без УКН; n = 19		Пациенты с УКН; n = 11		Значение p	Ген
		М	SD	М	SD		
Сывороточный амилоид А2, А4	A0A096LPE2	0,279	0,075	0,198	0,032	0,002	SAA2–SAA4
Аполипопротеин С-I (АпоС-I)	K7ER19	0,301	0,101	0,192	0,071	0,004	APOC1
Аполипопротеин А-I (АпоА-I)	P02647	0,290	0,069	0,220	0,038	0,004	APOA1
Аполипопротеин М (АпоМ)	O95445	0,288	0,066	0,212	0,045	0,002	APOМ
Белок, связывающий ретинол 4	Q5VY30	0,282	0,068	0,221	0,048	0,015	RBP4
Аполипопротеин Е (АпоЕ)	P02649	0,297	0,104	0,182	0,043	0,002	APOE
Аполипопротеин С-III (АпоС-III)	B0YIW2	0,300	0,162	0,181	0,074	0,03	APOC3
Аполипопротеин С-IV (АпоС-IV)	K7ER74 P55056	0,293	0,159	0,183	0,073	0,04	APOC4– APOC2
Аполипопротеин L-I (АпоL-I)	O14791	0,274	0,048	0,231	0,044	0,02	APOL1
Аполипопротеин Н (АпоН)	P02749	0,277	0,059	0,229	0,026	0,02	APOH
Аполипопротеин В (АпоВ)	P04114	0,286	0,085	0,207	0,092	0,03	APOB
Аполипопротеин А-IV (АпоА-IV)	P06727	0,285	0,092	0,219	0,027	0,03	APOA4
Кластерин	P10909	0,278	0,061	0,231	0,033	0,03	CLU
Параоксоназа 1	P27169	0,290	0,069	0,213	0,047	0,003	PON1
Калликрейн В1	P03952	0,276	0,047	0,240	0,030	0,029	KLKB1
Фактор свертывания крови II, тромбин	P00734	0,277	0,047	0,228	0,032	0,005	F2
Инсулиноподобный фактор роста	P35858	0,264	0,071	0,207	0,042	0,021	IGFALS
Гиалуроновый связывающий белок 2	Q14520	0,276	0,040	0,239	0,029	0,012	HABP2
Пренилцистеиноксидаза 1	Q9UNG3	0,280	0,082	0,213	0,045	0,019	PCYOX1
Транстретин	A0A087WT59	0,277	0,042	0,237	0,041	0,018	TTR

ции пациентов с УКН. Корреляционный анализ белков экзосомальной фракции пациентов с УКН выявил отрицательную связь между уровнем фактора фон Виллебранда и уровнем иммуноглобулина каппа варибельного 4-1 ($R = -0,7$; $p = 0,04$).

В табл. 3 представлены иммуноглобулины, уровень которых был достоверно выше в экзосомальных фракциях пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН.

Количество экзосом в сыворотке крови было отрицательно связано с уровнем иммуноглобулина тяжелого варибельного 3-43D ($R = -0,77$; $p = 0,02$)

и положительно – с уровнем иммуноглобулина тяжелого варибельного 1-46 ($R = 0,74$; $p = 0,02$).

В табл. 4 представлены белки, связанные с липидным обменом и имеющие пониженный уровень в экзосомальной фракции пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН.

Более 70% белков, имеющих пониженные уровни в экзосомальной фракции пациентов с УКН, по сравнению с пациентами без УКН, были связаны с липидным обменом. Различия между группами были выявлены по уровням сывороточного амилоида А2, А4, а также по ряду аполипо-

Таблица 5. Корреляции уровней белков экзосом пациентов с УКН с психометрическими показателями

Шкала	Белковая группа ID/название белка	R ²	Значение p
HADS	P01834/иммуноглобулин капша константа	0,8	0,019
HADS	P06312/иммуноглобулин капша переменный 4-1	0,8	0,015
MoCA	P01834/иммуноглобулин капша константа	0,8	0,009
MoCA	P02647/АпоА-I	0,8	0,006
MoCA	P06312/иммуноглобулин капша переменный 4-1	0,7	0,03
HADS	P01024/комплемент С3	0,9	0,003

протеинов высокой плотности (АпоА-I, АпоА-IV, АпоС-I, АпоС-III, АпоL-I). Известно, что пониженное содержание АпоА-I связывают с низким уровнем и замедленным выведением холестерина из сосудов. Анализ белковых связей в экзосомальной фракции пациентов с УКН выявил положительную корреляцию уровня АпоА-I с уровнем иммуноглобулина капша переменного 3-20 ($R = 0,9$; $p = 0,0003$) и отрицательную корреляцию уровня АпоС-I с уровнем молекулы CD5, участвующей в комплемент-зависимой цитотоксичности и регуляции активации комплемента ($R = -0,8$; $p = 0,004$).

Уровни АпоМ и ретинол-связывающего белка 4 (RBP4) из семейства липокалинов также были снижены у пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН. У пациентов с УКН была выявлена положительная корреляция уровня АпоМ с уровнями тромбина ($R = 0,6$; $p = 0,05$) и калликреина В1 ($R = 0,7$; $p = 0,002$) и положительная корреляция уровня RBP4 с уровнем иммуноглобулина тяжелого переменного 3-43D ($R = 0,8$; $p = 0,01$).

В экзосомальной фракции пациентов с УКН наблюдался пониженный уровень параоксоназы 1 (PON1), по сравнению с пациентами без УКН, и была выявлена положительная корреляционная связь между уровнями PON1 и АпоС-IV ($R = 0,8$; $p = 0,009$).

Различия между группами пациентов были найдены также по уровням белков, регулирующих и/или входящих в состав хиломикрон, а также липопротеинов низкой и очень низкой плотности (АпоС-IV, АпоВ, АпоН, АпоЕ). У пациентов с УКН была найдена отрицательная корреляционная связь уровня АпоЕ с уровнем иммуноглобулина тяжелого константа мю ($R = -0,8$; $p = 0,002$).

Кроме того, в экзосомальной фракции пациентов с УКН, по сравнению с пациентами без УКН, был выявлен пониженный уровень кластерина 1 и показана его отрицательная корреляция с уровнем С7-компонента комплемента, входящим в КМА ($R = -0,9$; $p = 0,0016$), которая соответствует представлению о роли кластерина как ингибитора КМА.

У пациентов с УКН также были выявлены более низкие уровни сериновых протеаз, по сравнению с пациентами без УКН, включая тромбин, который является важным компонентом свертывающей системы крови, калликреин В1, связанный с контактной активацией свертывания крови, и белок, связывающий гиалуроновую кислоту, который участвует в клеточной адгезии и негативно регулирует целостность сосудов. Уровень транстиретина также был снижен в экзосомальной фракции пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН.

Корреляции уровня экспрессии белков экзосом с психометрическими шкалами для оценки эмоционального и когнитивного статуса пациентов. Корреляционный анализ уровней белков экзосом в объединенной популяции пациентов с ИИ с показателями шкал оценки эмоционального и когнитивного статуса показал лишь слабые связи шкалы HADS с уровнями иммуноглобулина капша переменного 1-5 ($R = 0,4$; $p = 0,04$), АпоМ ($R = 0,5$; $p = 0,01$) и АпоА-I ($R = 0,4$; $p = 0,04$). Напротив, у пациентов с УКН были обнаружены: сильная положительная корреляция показателей шкалы HADS с уровнем С3-компонента комплемента ($R = 0,9$; $p = 0,003$), сильная положительная корреляция показателей шкал HADS и MoCA с уровнями экзосомальных иммуноглобулинов, сильная положительная корреляция между баллами по шкале MoCA и уровнем АпоА-I ($R = 0,8$; $p = 0,006$) (табл. 5). При этом уровень АпоА-I положительно коррелировал с уровнем иммуноглобулина капша переменного 3-20 ($R = 0,9$; $p = 0,0003$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Восстановление после ИИ часто затруднено последующим психоневрологическим ухудшением состояния пациентов. Известно, что ИИ чаще встречается у пожилых людей, и пожилой возраст существенно влияет на исходы инсульта [33]. Полученные результаты еще раз подтверждают это,

поскольку при обследовании пациентов в хроническом постинсультном периоде позднее года после ИИ в группу с выявленными когнитивными и эмоциональными изменениями попали люди старшего возраста. Старение связано с иммунной дисрегуляцией, характеризующейся высоким уровнем циркулирующих провоспалительных медиаторов, которые могут способствовать возрастному снижению когнитивных функций и усугублению хронических заболеваний [34]. Данные исследований подтверждают связь между нейровоспалением и когнитивной дисфункцией в позднем возрасте [35], указывая на то, что нейровоспаление может быть одной из причин более неблагоприятного нейропсихиатрического прогноза у пожилых людей после ИИ по сравнению с более молодыми пациентами. В то же время получены другие данные, свидетельствующие о том, что молодые пациенты с ИИ часто сталкиваются с более высоким риском постинсультной деменции по сравнению с пожилыми пациентами. Этот риск увеличивается примерно в 2 раза, по сравнению с общей популяцией, и остается стабильно высоким даже через 10 лет после инсульта [36].

Ранее было показано, что инсульт не только индуцирует местную нейровоспалительную реакцию, но и оказывает существенное влияние на системный иммунитет на всех стадиях заболевания, от начала до отдаленных исходов [37]. В настоящее время принято считать, что воспаление участвует в патогенезе постинсультных когнитивных нарушений. В ранее проведенных исследованиях была выявлена связь между концентрациями системных воспалительных биомаркеров крови через 36 месяцев после ИИ и постинсультными когнитивными нарушениями [8]. Также были продемонстрированы роль экзосом в опосредовании иммунных и воспалительных реакций и участие экзосом в развитии заболеваний с воспалительным компонентом [38]. Ряд исследований свидетельствуют о том, что экзосомы переносят в головной мозг воспалительные белки, генерируемые на периферии, что приводит к активации микроглии и астроцитов и инициирует хроническое нейровоспаление [39, 40]. В хроническом постинсультном периоде нами был выявлен достоверно более высокий уровень экзосом в крови пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН. При этом повышенный уровень экзосом в крови у пациентов с УКН не был обусловлен их старшим возрастом. Полученные данные, включая корреляции между количеством экзосом в сыворотке крови и уровнями иммуноглобулинов и белков системы комплемента в экзосомальных образцах пациентов с УКН, позволяют предположить, что у этих пациентов может быть более выраженная постинсультная активация системного иммуните-

та по сравнению с пациентами без УКН. В экзосомальной фракции пациентов с УКН также были выявлены более высокие уровни фактора фон Виллебранда, комплемент C4b-связывающего белка S, витамина K-зависимого белка и активированного кофактора C-белка, которые участвуют в активации тромбоза, способствуя аберрантной и избыточной активации иммунотромбоза [41]. Показано, что воспаление и коагуляция обладают способностью усиливать друг друга, вместе усугубляя повреждения, вызванные ИИ, и способствуя вторичным осложнениям после ИИ [42]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что неблагоприятный психоневрологический исход в хроническом периоде после ИИ может быть обусловлен вторичным повреждением головного мозга вследствие повышенной активации иммунной системы, которое реализуется при участии экзосомального транспорта и сильнее выражено у пожилых пациентов. Ранее было показано, что белки системы комплемента, являющейся одной из основных эффекторов врожденной иммунной системы, играют заметную роль в постинсультном восстановлении [9]. В проведенном нами исследовании экзосомы пациентов с УКН имели достоверно более высокие уровни белков системы комплемента (C3, C5, C7, C2, C1q, C1r, C1s, C4b), фактора H, а также молекулы CD5, участвующей в комплемент-зависимой цитотоксичности и регуляции активации комплемента по сравнению с пациентами без таких нарушений.

Нерегулируемая или чрезмерная активация белков системы комплемента может вызывать синаптическую дисфункцию и способствовать усилению воспалительных реакций в головном мозге [41]. Предыдущие клинические исследования указывают на повышенные уровни белков комплемента, особенно комплемента C3 и продуктов его трансформации C3a и C5b-9, в образцах плазмы/сыворотки крови после ишемии. Важно отметить, что наличие комплемента C1q, C4d, C3c, C9 и MAC/C5 было выявлено посмертно в ишемизированных областях головного мозга у пациентов с инсультом [42]. Более того, было обнаружено, что повышенный уровень белков системы комплемента, вероятно, предсказывает риск неблагоприятного исхода у пациентов с инсультом. Повышенный уровень комплемента C3 плазмы крови у пациентов с эмболическим, ишемическим или криптогенным инсультом был ассоциирован с худшими неврологическими исходами через 3 месяца и 2 года после инсульта [43, 44]. Недавно проведенное исследование молодых пациентов с ИИ (18–50 лет) показало, что уровень комплемента C3в плазме крови ассоциирован с прогнозом через 3 месяца после ИИ [45]. Кроме того, установлено, что генетическая изменчи-

вость гена комплемента C3 ассоциирована с ИИ, в частности с криптогенным инсультом [42]. Эти результаты свидетельствуют о том, что уровень системного комплемента C3 может быть потенциальным предиктором исхода после ИИ.

Результаты нашего исследования в целом согласуются с этими данными и позволяют предположить участие экзосомального транспорта в комплемент-зависимых механизмах, связанных с исходами после ИИ. Ранее было показано, что астроциты являются основным источником белков системы комплемента, особенно комплемента C3, в головном мозге и способны экспрессировать рецепторы C3aR и C5aR. Микроглия также может экспрессировать рецепторы комплемента CR1, CR3, CR4, C3aR и C5aR. Кроме того, микроглия продуцирует C3 и фактор Н [46]. В экспериментальном исследовании было обнаружено, что экзосомы крови в некоторых случаях способны прогрессивно накапливать периферические провоспалительные медиаторы и пересекать ГЭБ для прайминга и активации микроглии через C3aR-зависимые механизмы. Авторы предположили, что белки системы комплемента в экзосомах крови определяют исходы инсульта, воздействуя на глиальные клетки [47].

Известно, что C3 является центральным компонентом всех путей комплемента, активация которых привлекает иммунные клетки и модулирует иммунный ответ, опосредуя последующее нейровоспаление [48]. В этом отношении полученные данные о повышенном уровне белков системы комплемента, в частности C3, в экзосомальной фракции у пациентов с УКН могут быть важны для понимания патогенеза отсроченных эмоциональных и когнитивных нарушений после инсульта.

В проведенном исследовании было показано снижение уровней белков, связанных с липидным обменом, в экзосомальной фракции пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН. Разница между группами была обнаружена для сывороточного амилоида A2, A4, который, по данным некоторых авторов, тесно связан с воспалением (хотя его биологическая функция в этом процессе до конца не изучена [49]), а также для различных групп аполипопротеинов. Выявленные корреляции уровней ряда Апо с уровнями иммуноглобулинов и регуляторов активности каскада комплемента в экзосомальных фракциях, а также с показателями психометрических шкал косвенно указывают на многокомпонентный механизм постинсультных изменений у пациентов с УКН и участие экзосом в этих процессах. Действительно, в экзосомальных фракциях пациентов с УКН уровень АпоА-I положительно коррелировал с уровнем иммуноглобулина капша вариабельного 3-20

($R = 0,9$; $p = 0,0003$) и с показателями когнитивной шкалы МоСА ($R = 0,8$; $p = 0,006$). Уровень АпоС-I был отрицательно связан с уровнем молекулы CD5, задействованной в регуляции активности каскада комплемента ($R = -0,8$; $p = 0,004$), а уровень АпоЕ был ассоциирован с уровнем иммуноглобулина тяжелого константа мю ($R = -0,8$; $p = 0,002$). Ранее было показано, что АпоЕ, кроме ключевой роли в транспорте холестерина и других липидов, обладает провоспалительными свойствами [50, 51], поэтому нельзя исключать его вовлеченность в снижение комплексного постинсультного воспалительного ответа у пациентов с УКН.

У пациентов с УКН наблюдался более низкий уровень кластерина по сравнению с пациентами без УКН. Кластерин участвует в ряде каскадов, включая апоптоз и регуляцию комплемент-опосредованного лизиса клеток, являясь ингибитором КМА [52], что подтверждается выявленной отрицательной корреляцией уровня кластерина с уровнем C7 ($R = -0,9$; $p = 0,0016$). Более низкий уровень кластерина в экзосомах пациентов с УКН, по сравнению с пациентами без УКН, может быть важен для понимания комплемент-зависимых механизмов вторичного повреждения головного мозга с участием экзосомального транспорта.

Уровни белков АпоМ и RBP4 из семейства липокалинов, которые связывают и транспортируют малые липофильные белки, также были снижены у пациентов с УКН по сравнению с пациентами без УКН. Положительная корреляция между уровнями RBP4 и иммуноглобулина тяжелого вариабельного 3-43D ($R = 0,8$; $p = 0,01$) может свидетельствовать об участии RBP4 в механизмах многокомпонентного воспаления в процессе постинсультного восстановления. Некоторые исследования показали, что RBP4 может играть роль в иницировании эндотелиального воспаления [53].

Связи, обнаруженные между уровнями аполипопротеинов и белков иммунной системы, а также выявленные корреляции C3-компонента комплемента и ряда иммуноглобулинов, присутствующих в экзосомальной фракции пациентов с УКН, с показателями психометрических шкал подтверждают сложный, многокомпонентный механизм, задействованный в формировании постинсультных психоневрологических осложнений, и предполагают участие экзосомального транспорта в этих процессах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ белков экзосом сыворотки крови пациентов с постинсультным умеренным когнитивным снижением и без нару-

шений выявил различия в уровнях 62 белков из 186 идентифицированных. У пациентов с УКН, по сравнению с пациентами без УКН, были обнаружены более высокие уровни белков, ассоциированных с иммунной системой, и сниженные уровни белков, участвующих в липидном обмене. Эмоциональные и когнитивные нарушения в хроническом постинсультном периоде были выявлены у пациентов старшего возраста и, согласно корреляционному анализу, были ассоциированы с повышенными уровнями комплемента С3 и ряда иммуноглобулинов и сниженным уровнем аполипопротеина А-I в экзосомальной фракции сыворотки крови. Предполагается, что экзосомы, высвобождаемые периферическими иммунными клетками в хроническом постинсультном периоде, могут пересекать ГЭБ и активировать глиальные клетки через белки системы комплемента, способствуя вторичному повреждению мозга. Выводы и предположения, сделанные в данной работе, требуют проверки и подтверждения в дальнейших исследованиях.

Ограничения исследования. Полученные в работе результаты ограничены данными, основанными на оценке экзосомальной фракции сыворотки крови сравнительно небольшой когорты пациентов, переживших ИИ и обследованных через относительно длительный период после фокального повреждения мозга. В течение этого периода на исследованные показатели могли влиять и другие потенциальные процессы, которые мы не имели возможности контролировать и/или учесть при анализе полученных данных. Ограничением также является отсутствие аналогичных исследований, проведенных на биоматериале контрольной выборки людей сходного возраста без ИИ, что позволило бы исключить влияние

процесса старения на выявленные различия, связанные с когнитивными нарушениями.

Вклад авторов. Концептуализация – Н.Г.; методология – Т.Д., Е.В., М.Ж.; валидация – Т.Д., М.Ж.; визуализация – М.Ж.; формальный анализ – М.Ж.; исследование – Е.В., М.Ж., Т.Д.; курирование данных – Т.Д.; написание (подготовка первоначального проекта – Т.Д., М.Ж.; рецензирование и редактирование – Н.Г.; надзор – А.Г., Н.Г.; администрирование проекта – А.Г., Н.Г. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-20112).

Благодарности. Авторы приносят благодарность сотрудникам ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н. Ореховича за подготовку и выполнение хромато-масс-спектрометрического анализа предоставленных проб и помощь в обработке и интерпретации полученных результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Исследование соответствовало принципам Хельсинской декларации и было одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева» Департамента здравоохранения города Москвы (№ 42, 23 августа 2019 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в данном исследовании.

Доступность данных. В статью включены все данные, полученные и проанализированные в рамках данного исследования. Первичные данные могут быть предоставлены автором, ответственным за переписку, при обоснованном запросе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robinson, R. G., and Jorge, R. E. (2016) Post-stroke depression: a review, *Am. J. Psychiatry*, **173**, 221-231, <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15030363>.
2. He, A., Wang, Zu., Wu, X., Sun, W., Yang, K., and Feng, W. (2023) Incidence of post-stroke cognitive impairment in patients with first-ever ischemic stroke: a multicenter cross-sectional study in China, *Lancet Reg. Health West. Pacific*, **33**, 100687, <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2023.100687>.
3. Sexton, E., McLoughlin, A., Williams, D. J., Merriman, N. A., and Donnelly, N. (2019) Systematic review and meta-analysis of the prevalence of cognitive impairment no dementia in the first year post-stroke, *Eur. Stroke J.*, **4**, 160-171, <https://doi.org/10.1177/2396987318825484>.
4. Sachdev, P. S., Lipnicki, D. M., Crawford, J. D., Wen, W., and Brodaty, H. (2014) Progression of cognitive impairment in stroke/TIA patients over 3 years, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, **85**, 1324-1330, <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-306776>.
5. Altieri, M., Di Piero V., Pasquini, M., Gasparini, M., Vanacore, N., and Vicenzini, E. (2004) Delayed poststroke dementia: a 4-year follow-up study, *Neurology*, **62**, 2193-2197, <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000130501.79012.1A>.
6. Rothenburg, L. S., Herrmann, N., Swardfager, W., Black, S. E., Tennen, G., and Kiss, A. (2010) The relationship between inflammatory markers and post stroke cognitive impairment, *J. Geriatr. Psychiatr. Neurol.*, **23**, 199-205, <https://doi.org/10.1177/08919887103735>.

7. Narasimhalu, K., Lee, J., Leong, Y.-L., Ma, L., De Silva, D. A., and Wong, M.-C. (2015) Inflammatory markers and their association with post stroke cognitive decline, *Int. J. Stroke*, **10**, 513-518, <https://doi.org/10.1111/ijvs.12001>.
8. Sandvig, H. V., Aam, S., Alme, K. N., Askim, T., Beyer, M. K., Ellekjær, H., Ihle-Hansen, H., Lydersen, S., Mollnes, T. E., Munthe-Kaas, R., Næss, H., Saltvedt, I., Seljeseth, Y. M., Thingstad, P., Wethal, T., and Knapskog, A. B. (2023) Plasma inflammatory biomarkers are associated with poststroke cognitive impairment: the Nor-COAST study, *Stroke*, **54**, 1303-1311, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.041965>.
9. Chen, W., Li, C., Liang, W., Li, Y., Zou, Z., Xie, Y., Liao, Y., Yu, L., Lin, Q., Huang, M., Li, Z., and Zhu, X. (2022) The roles of optogenetics and technology in neurobiology: a review, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 867863, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.867863>.
10. Ozaki, T., Nakamura, H., and Kishima, H. (2019) Therapeutic strategy against ischemic stroke with the concept of neurovascular unit, *Neurochem. Int.*, **126**, 246-251, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.022>.
11. Tuo, Q. Z., Zhang, S. T., and Lei, P. (2022) Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications, *Med. Res. Rev.*, **42**, 259-305, <https://doi.org/10.1002/med.21817>.
12. Walsh, J., Tozer, D. J., Sari, H., Hong, Y. T., Drazyk, A., and Williams, G. (2021) Microglial activation and blood-brain barrier permeability in cerebral small vessel disease, *Brain*, **144**, 1361-1371, <https://doi.org/10.1093/brain/awab003>.
13. Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., and Li, P. (2020) Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications, *Int. J. Nanomed.*, **15**, 6917-6934, <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>.
14. Goetzl, E. J., Mustapic, M., Kapogiannis, D., Eitan, E., Lobach, I. V., Goetzl, L., Schwartz, J. B., and Miller, B. L. (2016) Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease, *FASEB J.*, **30**, 3853-3859, <https://doi.org/10.1096/fj.201600756R>.
15. Winston, C. N., Goetzl, E. J., Akers, J. C., Carter, B. S., Rockenstein, E. M., Galasko, D., Masliah, E., and Rissman, R. A. (2016) Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile, *Alzheimers Dement. (Amst)*, **3**, 63-72, <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2016.04.001>.
16. Badhwar, A., and Haqqani, A. S. (2020) Biomarker potential of brain-secreted extracellular vesicles in blood in Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement. (Amst)*, **12**, e12001, <https://doi.org/10.1002/dad2.12001>.
17. Chan, L., Chung, C. C., Chen, J. H., Yu, R. C., and Hong, C. T. (2021) Cytokine profile in plasma extracellular vesicles of Parkinson's disease and the association with cognitive function, *Cells*, **10**, 604, <https://doi.org/10.3390/cells10030604>.
18. Abner, E. L., Elahi, F. M., Jicha, G. A., Mustapic, M., Al-Janabi, O., Kramer, J. H., Kapogiannis, D., and Goetzl, E. J. (2020) Endothelial-derived plasma exosome proteins in Alzheimer's disease angiopathy, *FASEB J.*, **34**, 5967-5974, <https://doi.org/10.1096/fj.202000034R>.
19. Brenna, S., Altmeppen, H. C., Mohammadi, B., Rissiek, B., Schlink, F., and Ludewig, P. (2020) Characterization of brain-derived extracellular vesicles reveals changes in cellular origin after stroke and enrichment of the prion protein with a potential role in cellular uptake, *J. Extracell. Vesicles*, **9**, 1809065, <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1809065>.
20. Doyle, L. M., and Wang, M. Z. (2029) Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis, *Cells*, **8**, 727, <https://doi.org/10.3390/cells8070727>.
21. Hong, S. B., Yang, H., Manaenko, A., Lu, J., Mei, Q., and Hu, Q. (2019) Potential of exosomes for the treatment of stroke, *Cell. Transpl.*, **28**, 662-670, <https://doi.org/10.1177/0963689718816990>.
22. Lee, E. C., Ha, T.W., Lee, D.-H., Hong, D.-Y., Park, S.-W., Lee, J. Y., Lee, M. R., and Oh, J. S. (2022) Utility of exosomes in ischemic and hemorrhagic stroke diagnosis and treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8367, <https://doi.org/10.3390/ijms23158367>.
23. Venkat, P., Chen, J., and Chopp, M. (2018) Exosome-mediated amplification of endogenous brain repair mechanisms and brain and systemic organ interaction in modulating neurological outcome after stroke, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **38**, 2165-2178, <https://doi.org/10.1177/0271678X18782789>.
24. Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., and Bodon, G. (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity, *Mol. Cell Neurosci.*, **46**, 409-418, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>.
25. Bang, O. Y., and Kim, E. H. (2019) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle therapy for stroke: challenges and progress, *Front. Neurol.*, **10**, 211, <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00211>.
26. Zagrean, A. M., Hermann, D. M., Opris, I., Zagrean, L., and Popa-Wagner, A. (2018) Multicellular crosstalk between exosomes and the neurovascular unit after cerebral ischemia. Therapeutic implications, *Front. Neurosci.*, **12**, 811, <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00811>.
27. Lyden, P. (2017) Using the national institutes of health stroke scale: a cautionary tale, *Stroke*, **48**, 513-519, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015434>.

28. Nasreddine, Z. S., Phillips, N. A., Bedirian, V., Charbonneau, S., and Whitehead, V. (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **53**, 695-699, <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>.
29. Zigmond, A. S., and Snaith, R. P. (1983) The hospital anxiety and depression scale, *Acta Psychiatr. Scand.*, **67**, 361-370, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x>.
30. Novikova, S.E., Farafonova, T. E., Tikhonova, O. V., Shushkova, N. A., Pyatnitsky, M. A., Zgoda, V. G., Ponomarenko, E. A., Lisitsa, A. V., Grigoryev, A.I., Tutelyan, V. A., and Archakov, A. I. (2020) Mass-spectrometric MRM analysis of FDA-verified proteins in the blood plasma of healthy volunteers, *Biomed. Khim.*, **66**, 294-316, <https://doi.org/10.18097/PBMC20206604294>.
31. Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics, *Nat. Protoc.*, **11**, 2301-2319, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
32. Yu, S.-H., Kyriakidou, P., and Cox, J. (2020) Isobaric matching between runs and novel PSM-level normalization in MaxQuant strongly improve reporter ion-based quantification, *J. Proteome Res.*, **19**, 3945-3954, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00209>.
33. Chen, R. L., Balami, J. S., Esiri, M. M., Chen, L. K., and Buchan, A. M. (2010) Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence, *Nat. Rev. Neurol.*, **6**, 256-265, <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.36>.
34. Chung, H. Y., Kim, D. H., Lee, E. K., Chung, K. W., Chung, S., Lee, B., Seo, A. Y., Chung, J. H., Jung, Y. S., Im, E., Lee, J., Kim, N. D., Choi, Y. J., Im, D. S., and Yu, B. P. (2018) Redefining chronic inflammation in aging and age-related diseases: proposal of the senoinflammation concept, *Aging Dis.*, **10**, 367-382, <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0324>.
35. Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., and Cotman, C. W. (2012) Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study, *J. Neuroinflamm.*, **9**, 179, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-179>.
36. Corraini, P., Henderson, V. W., Ordning, A. G., Pedersen, L., Horváth-Puhó, E., and Sørensen, H. T. (2017) Long-term risk of dementia among survivors of ischemic or hemorrhagic stroke, *Stroke*, **48**, 180-186, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015242>.
37. Simats, A., and Liesz, A. (2022) Systemic inflammation after stroke: implications for post-stroke comorbidities, *EMBO Mol. Med.*, **14**, e16269, <https://doi.org/10.15252/emmm.202216269>.
38. Chan, B. D., Wong, W. Y., Lee, M. M., Cho, W. C., Yee, B. K., Kwan, Y. W., and Tai, W. C. (2019) Exosomes in inflammation and inflammatory disease, *Proteomics*, **19**, e1800149, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800149>.
39. Ozansoy, M., Mikati, H., Velioglu, H. A., and Yulug, B. (2022) Exosomes: a missing link between chronic systemic inflammation and Alzheimer's disease? *Biomed. Pharmacother.*, **159**, 114161, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114161>.
40. De Rivero Vaccari, J. P., Brand, F., Adamczak, S., Lee, S. W., Perez-Barcena, J., and Wang, M. Y. (2016). Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury, *J. Neurochem.*, **136 (Suppl. 1)**, 39-48, <https://doi.org/10.1111/jnc.13036>.
41. Ryan, T. A.J., and O'Neill, L. A. J. (2022) Innate immune signaling and immunothrombosis: new insights and therapeutic opportunities, *Eur. J. Immunol.*, **52**, 1024-1034, <https://doi.org/10.1002/eji.202149410>.
42. Ma, Y., Liu, Y., Zhang, Z., and Yang, G. Y. (2019) Significance of complement system in ischemic stroke: a comprehensive review, *Aging Dis.*, **10**, 429-462, <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0119>.
43. Stokowska, A., Olsson, S., Holmegaard, L., Jood, K., Blomstrand, C., Jern, C., and Pekna, M. (2013) Cardioembolic and small vessel disease stroke show differences in associations between systemic C3 levels and outcome, *PLoS One*, **8**, e72133, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072133>.
44. Stokowska, A., Olsson, S., Holmegaard, L., Jood, K., Blomstrand, C., and Jern, C. (2011) Plasma C3 and C3a levels in cryptogenic and large-vessel disease stroke: associations with outcome, *Cerebrovasc. Dis.*, **32**, 114-122, <https://doi.org/10.1159/000328238>.
45. Zhang, B., Yang, N., and Gao, C. (2015) Is plasma C3 and C4 levels useful in young cerebral ischemic stroke patients? Associations with prognosis at 3 months, *J. Thromb. Thrombol.*, **39**, 209-214, <https://doi.org/10.1007/s11239-014-1100-7>.
46. Olsson, S., Stokowska, A., Holmegaard, L., Jood, K., Blomstrand, C., and Pekna, M. (2011) Genetic variation in complement component C3 shows association with ischaemic stroke, *Eur. J. Neurol.*, **18**, 1272-1274, <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03377.x>.
47. Duggan, M. R., Lu, A., Foster, T. C., Wimmer, M., and Parikh, V. (2022) Exosomes in age-related cognitive decline: mechanistic insights and improving outcomes, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 834775, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.834775>.
48. Mocco, J., Mack, W. J., Ducruet, A. F., Sosunov, S. A., Sughrue, M. E., Hassid, B. G., Nair, M. N., Laufer, I., Komotar, R. J., Claire, M., Holland, H., Pinsky, D. J., and Connolly, E. S. Jr. (2006) Complement component C3

- mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia, *Circ. Res.*, **99**, 209-217, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000232544.90675.42>.
49. Jumeau, C., Awad, F., Assrawi, E., Cobret, L., Duquesnoy, P., Giurgea, I., Valeyre, D., Grateau, G., Amselem, S., Bernaudin, J. F., and Karabina, S. A. (2019) Expression of *SAA1*, *SAA2* and *SAA4* genes in human primary monocytes and monocyte-derived macrophages, *PLoS One*, **14**, e0217005, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217005>.
 50. Ali, K., Middleton, M., Puré, E., and Rader, D. J. (2005) Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response *in vivo*, *Circ. Res.*, **9**, 922-927, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000187467.67684.43>.
 51. Zhang, H. L., Wu, J., and Zhu, J. (2010) The immune-modulatory role of apolipoprotein E with emphasis on multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis, *Clin. Dev. Immunol.*, **2010**, 186813, <https://doi.org/10.1155/2010/186813>.
 52. Massri, M., Toonen, E. J. M., Sarg, B., Kremser, L., Grasse, M., Fleischer, V., Torres-Quesada, O., Hengst, L., Skjoedt, M.-O., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Garred, P., Orth-Höller, D., Prohászka, Z., and Würzner, R. (2024) Complement C7 and clusterin form a complex in circulation, *Front. Immunol.*, **15**, 1330095, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1330095>.
 53. Farjo, K. M., Farjo, R. A., Halsey, S., Moiseyev, G., and Ma, J. X. (2012) Retinol-binding protein 4 induces inflammation in human endothelial cells by an NADPH oxidase- and nuclear factor kappa B-dependent and retinol-independent mechanism, *Mol. Cell Biol.*, **32**, 5103-5115, <https://doi.org/10.1128/MCB.00820-12>.

SERUM EXOSOME PROTEIN COMPOSITION IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS IS ASSOCIATED WITH COGNITIVE IMPAIRMENT IN THE POST-STROKE PERIOD

T. A. Druzhkova¹, M. Yu. Zhanina^{1,2}, E. E. Vladimirova³,
A. B. Guekht^{1,4}, and N. V. Gulyaeva^{1,2*}

¹ *Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry,
115419 Moscow, Russia; e-mail: nata_gul@ihna.ru*

² *Department of Functional Biochemistry of Nervous System,
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia*

³ *M. P. Konchalovsky City Clinical Hospital, 124489 Moscow, Russia*

⁴ *Pirogov Russian National Research Medical University, 119049 Moscow, Russia*

Ischemic stroke (IS) and subsequent neuropsychiatric disorders are among the leading causes of disability worldwide. Several strategies have been previously proposed to utilize exosomes to assess the risk of IS-related diseases. The aim of this work was to evaluate serum exosome proteins of IS patients in the chronic post-stroke period and to search for their associations with the development of post-stroke moderate cognitive impairment (MCI). Comparative quantitative proteomic analysis of serum exosomes of patients without poststroke MCI (19 patients mean age 52.0 ± 8.1 years) and patients with post-stroke MCI (11 patients, mean age 64.8 ± 5.6 years) revealed significant differences in the levels of 62 proteins out of 186 identified. Increased levels of proteins associated with the immune system and decreased levels of proteins involved in lipid metabolism were observed in patients with MCI compared to patients without MCI in the chronic post-stroke period. The obtained data suggest that a higher level of immune system activation in patients in the distant period after IS may be one of the risk factors for the development of post-stroke cognitive disorders and suggest the participation of exosomal transport in these processes.

Keywords: exosomes, serum, ischemic stroke, mass spectrometry, proteomic analysis, post-stroke cognitive impairment, immune system

НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗЫ, ОСНОВАННЫЙ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЕРМЕАБИЛИЗОВАННЫХ АДГЕЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК

© 2024 С.И. Шрам^{1*}, Т.А. Щербакова², Т.В. Абрамова³, М.С. Смирновская⁴,
А.И. Баландина^{1,5}, А.В. Куликов⁶, В.К. Швядас^{2,7}, В.Н. Сильников³,
Н.Ф. Мясоедов¹, Д.К. Нилов²

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: shram.img@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119992 Москва, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, Россия

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

⁵ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
факультет биотехнологии и промышленной экологии, 125047 Москва, Россия

⁶ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы,
Медицинский институт, 117198 Москва, Россия

⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.01.2024

После доработки 03.05.2024

Принята к публикации 10.06.2024

Ингибиторы поли(ADP-рибоза)-полимеразы (PARP) рассматриваются в качестве перспективных фармакологических агентов для лечения целого ряда заболеваний. В последнее время были выявлены разнообразные факторы и механизмы регуляции каталитической активности PARP и показано, что некоторые из них могут существенно влиять на эффективность действия ингибиторов данного фермента. В связи с этим актуальна разработка новых моделей и методов, отражающих клеточный контекст, в котором функционирует PARP. В представленной работе для исследования реакции поли(ADP-рибозил)ирования (PARилирования) предложено использовать необратимо пермеабилizованные дигитонином адгезированные клетки, что позволяет сохранить ядерную локализацию PARP и задавать необходимые концентрации субстрата (NAD⁺) и тестируемых соединений в клетке. Особенность подхода заключается в том, что перед пермеабилizацией клеточная PARP переводится в связанное с ДНК состояние в условиях, предотвращающих преждевременную инициацию реакции PARилирования. Исследования выполнены на культуре кардиомиобластов крысы H9c2. Анализ активности PARP в пермеабилizованных клетках проводили путём измерения иммунофлуоресценции образующегося продукта – поли(ADP-рибозы). Метод апробирован при исследовании PARP-ингибиторного действия классического ингибитора 3-аминобензамида, а также ряда новых производных 7-метилгуанина. Обнаружено, что одно из них, 7,8-диметилгуанин, является более сильным ингибитором по сравнению с 7-метилгуанином, что объясняется дополнительным гидрофобным контактом с белком. Предложенный подход открывает новые перспективы для изучения механизмов регуляции активности PARP в клетке и может быть использован для высокопроизводительного скрининга веществ при поиске новых ингибиторов PARP.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: поли(ADP-рибоза)-полимераза, ингибитор, 7-метилгуанин, 7,8-диметилгуанин, химический синтез пуринов, адгезированные клетки, пермеабилizация клеток, дигитонин, кардиомиобласты, молекулярный докинг.

DOI: 10.31857/S0320972524090079 EDN: JJTFXZ

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Поли(ADP-рибозил)ирование (PARилирование) белков представляет собой посттрансляционную модификацию гистонов и других ядерных белков, которая способствует выживанию клеток в условиях постоянного воздействия генотоксических агентов [1–4]. Образование полимера ADP-рибозы (PAR) происходит путём ADP-рибозилирования остатков Asp, Glu, Lys, Ser белков-мишеней (стадия инициации) и последующего удлинения цепи за счёт формирования двух типов гликозидной связи, обеспечивающих элонгацию и ветвление полимера [5, 6]. Удивительно, что все эти реакции катализирует один фермент – поли(ADP-рибоза)-полимераза (PARP, КФ 2.4.2.30), использующий NAD^+ в качестве донора ADP-рибозильных групп. В настоящее время выявлено множество белков, подвергающихся PARилированию, однако основными мишенями являются гистоны (трансмодификация) и сама PARP (автомодификация) [1, 7]. Среди 17 представителей семейства PARP человека только четыре катализируют синтез PAR – PARP1, PARP2, PARP5a и PARP5b. При этом по содержанию в клетке и активности PARP1 и PARP2 значительно превосходят остальные белки семейства [8, 9].

Основным регулятором активности PARP1/2 являются участки ДНК, содержащие определённые типы повреждений. Связывание PARP1/2 с такими сайтами приводит к реорганизации структуры фермента и его активации [5]. В норме функция PARP1/2 в клетке прежде всего связана с поддержанием целостности генома за счёт участия в различных механизмах репарации ДНК [2, 10]. Кроме того, эти белки выполняют важную роль в реорганизации структуры хроматина, регуляции экспрессии генов и ядерно-цитоплазматического транспорта [3, 11, 12]. Однако при ряде патологий, связанных прежде всего с окислительным стрессом и воспалением, активация PARP1/2 играет негативную роль и может приводить к гибели клеток и усилению продукции провоспалительных факторов [13–15]. Установлено участие PARP1/2 в патогенезе таких заболеваний, как инсульт, инфаркт миокарда, диабет, анафилактический шок, нейродегенеративные расстройства, астма [16–19]. Перечисленные выше функции системы PARилирования делают её весьма привлекательной мишенью для терапии ряда заболеваний. Наибольший прогресс достигнут в применении ингибиторов PARP1/2 для лечения онкологических заболеваний. В этом случае их терапевтическое действие достигается за

счёт снижения ДНК-репарирующего потенциала опухолевых клеток [20–23].

Одним из этапов создания новых ингибиторов PARP является физический скрининг синтезированных соединений с целью получения объективных данных об их эффективности (степени ингибирования, значений IC_{50} и K_i). Такие данные могут быть сопоставлены с результатами молекулярного докинга и использованы для проведения дальнейшего рационального дизайна. В настоящее время хорошо отработаны и коммерчески доступны системы скрининга ингибиторов на основе очищенных рекомбинантных белков PARP и коротких двуцепочечных ДНК в качестве активаторов PARилирования. Такая упрощённая система удобна для высокопроизводительного скрининга, однако она не учитывает некоторые механизмы регуляции активности PARP в клетке. В частности, было показано, что кинетика реакции сильно отличается при функционировании PARP в комплексах со свободной ДНК и с нуклеосомной ДНК [24]. Кроме того, PARP подвергается целому ряду посттрансляционных модификаций, которые влияют на её активность и белок-белковые взаимодействия [25]. Поэтому весьма актуальной была бы возможность применять, наряду с обычными системами скрининга ингибиторов PARP, также и более сложные, максимально воспроизводящие клеточный контекст.

Тестирование ингибиторов PARP с использованием живых клеток позволяет учесть клеточный контекст, однако из-за сложности определения внутриклеточных концентраций NAD^+ и ингибитора расчёт истинных показателей эффективности ингибитора сильно затруднён. В представленной работе мы предлагаем компромиссный вариант тест-системы, основанный на применении для анализа активности PARP пермеабелизованных адгезированных клеток и лишённый недостатков перечисленных выше подходов. Необходимые реагенты (субстрат, тестируемые соединения, другие низкомолекулярные соединения) могут легко проникать в пермеабелизованные клетки, что позволяет стандартизировать условия проведения реакции PARилирования. Ранее уже были описаны методы анализа активности PARP с применением пермеабелизованных клеток, получаемых как в результате длительного холодового шока в гипотонической среде [26, 27], так и с дополнительным использованием мягкого детергента дигитонина [28, 29]. Все они касались работы с суспендированными клетками и предполагали использование радиоизотопного метода анализа PAR. Здесь мы впервые описываем оригинальный

Принятые сокращения: ФСБ – фосфатно-солевой буфер; PAR – поли(ADP-рибоза); PARилирование – поли(ADP-рибозил)ирование; PARP – поли(ADP-рибоза)-полимераза.

метод определения активности PARP в пермеабилizованных адгезированных клетках, имеющий ряд принципиальных отличий от описанных ранее. Важной особенностью данного метода является то, что клеточная PARP при пермеабилзации и при запуске реакции PARилирования находится в виде комплекса с ДНК в местах её повреждения естественными агентами – активными формами кислорода.

Предложенный нами подход апробирован при исследовании эффективности действия классического ингибитора PARP 3-аминобензамида, а также ряда метильных производных 7-метилгуанина – перспективного конкурентного ингибитора PARP, обладающего противоопухолевой активностью [30–33].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки кардиомиобластов эмбриона крысы H9c2 были получены из коллекции клеточных культур ATCC («LGC Standards», Великобритания). Для работы с клеточными культурами использовали стерильную пластиковую посуду производства «SPL» (Республика Корея), эмбриональную сыворотку крови телёнка («HyClone», США), 0,05%-ный раствор трипсин-ЭДТА («Gibco», США), а также среды и солевые растворы производства «ПанЭко» (Россия). Для получения и анализа пермеабилizованных клеток использовали желатин, дигитонин, параформальдегид, Хёхст 33258 («Sigma-Aldrich», США) и гомодимер этидия III («Biotium», США). Для анализа активности PARP использовали мышинные антитела к PAR («Santa Cruz Biotechnology», США) и козы антимышинные антитела, меченные красителем Alexa 488 («Abcam», Великобритания). Декамерный палиндромный дезоксиолигонуклеотид CGGAATCCG (олиго-ДНК) был синтезирован компанией «Евроген» (Россия).

В работе использовали ингибиторы PARP PJ34 («Tocris Bioscience», Великобритания), 3-аминобензамид и 7-метилгуанин («Sigma-Aldrich»). 7,8-Диметилгуанин, 7,9-диметилгуанин, 3,7-диметилгуанин, N²,7-диметилгуанин и N²,N²,7-триметилгуанин синтезировали в данной работе, подробное описание методик дано в Приложении (рис. S1–S4).

Клетки H9c2 культивировали в пластиковых культуральных флаконах (25 см² или 75 см²) при 37 °С в атмосфере 5%-ного CO₂ в среде DMEM, содержащей эмбриональную сыворотку телёнка (10%; здесь и далее в этом разделе в скобках указаны конечные концентрации реагентов), L-глутамин (2 мМ) и антибиотики (50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина). При проведении

экспериментов с клеточными культурами в 4-, 24-луночные планшеты высевали по 15 тыс. клеток на лунку в 500 мкл среды, а в 48-луночные планшеты – по 6 тыс. клеток на лунку в 200 мкл среды и растили в течение 48 ч в указанных выше условиях. С целью улучшения адгезии клеток поверхность роста предварительно покрывали желатином. Для этого в лунки 4- и 24-луночных планшетов вносили по 250 мкл, а в лунки 48-луночного планшета – по 150 мкл стерильного 0,5%-ного раствора желатина в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4 (ФСБ). Через 30 мин раствор желатина удаляли, и планшеты оставляли на 1 ч 15 мин без крышки, причём последние 15 мин – под УФ-светом. Все процедуры выполняли в стерильных условиях. Подсчёт клеток производили с использованием автоматизированного счётчика клеток TC20 («Bio-Rad», США).

Пермеабилзацию клеток проводили следующим образом. Культуры клеток H9c2 растили в 4- или 24-луночных планшетах, как указано выше, после чего ростовую среду заменяли на 300 мкл охлаждённого до 0 °С гипотонического раствора (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ Na₂ЭДТА, 4 мМ MgCl₂, 30 мМ β-меркаптоэтанол, pH 7,8), содержащего дигитонин (35 мкМ). После выдерживания планшета в течение 5 мин в ледяной бане клетки промывали 600 мкл охлаждённого гипотонического раствора (2 раза по 5 мин при 0 °С). Для оценки эффективности пермеабилзации клеток лунки планшета промывали 700 мкл раствора Хэнкса (5 мин при 37 °С), после чего проводили окрашивание клеток в 250 мкл раствора ядерного красителя гомодимера этидия III (2,5 мкМ, в растворе Хэнкса) в течение 10 мин при 37 °С. Затем клетки промывали 500 мкл раствора Хэнкса (5 мин при 37 °С) и проводили микрофлуоресцентный анализ гомодимера этидия III.

Анализ активности PARP в пермеабилizованных клетках проводили в 48-луночных планшетах. В оптимизированной нами схеме перед пермеабилзацией клетки преинкубировали в течение 1 ч в присутствии высокоаффинного ингибитора PARP PJ34 (5 мкМ) при 37 °С в атмосфере 5%-ного CO₂ в 200 мкл среды DMEM, отличающейся от ростовой более низкой концентрацией эмбриональной сыворотки телёнка (1%). Затем, не удаляя из среды PJ34, вносили 16,3 мкл 13,25 мМ раствора H₂O₂ (конечная концентрация H₂O₂ – 1 мМ), среду перемешивали и планшет оставляли на 5 мин при комнатной температуре. Далее проводили пермеабилзацию клеток, как описано выше, с той разницей, что объёмы всех использованных растворов уменьшали в 2,5 раза (вследствие разных рабочих объёмов 4-/24-луночных и 48-луночных планшетов). После обработки клеток дигитонином их дважды промывали гипотониче-

ским раствором, первый раз в присутствии PJ34 (5 мкМ), а второй раз без него. Полученные пермеабилizованные клетки дополнительно дважды (5 мин при 0 °С) промывали 240 мкл реакционного буфера (50 мМ Tris-HCl, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ β-меркаптоэтанол, pH 7,8). Затем клетки преинкубировали 5 мин при 25 °С в 120 мкл того же буфера, содержащего в случае необходимости олиго-ДНК (50 мкг/мл) или тестируемые в качестве ингибиторов PARP соединения. Реакцию PARилирования инициировали внесением в реакционную смесь 5 мкл стокового 250 мкМ водного раствора NAD⁺ (конечная концентрация NAD⁺ – 10 мкМ), после чего реакционную смесь перемешивали и планшет оставляли на 10 мин при 25 °С. В конце инкубации проводили замену реакционной смеси на 120 мкл 4%-ного раствора параформальдегида в ФСБ. Фиксацию клеток проводили в течение 10 мин при комнатной температуре. Иммунофлуоресцентный анализ PAR в клетках проводили, как было описано нами ранее [33]. Для контрастирования ядер в лунки вносили по 120 мкл раствора Хёхста 33258 (0,25 мкг/мл в ФСБ) и через 8 мин клетки промывали 300 мкл ФСБ (3 раза по 5 мин при комнатной температуре). Затем в лунки вносили по 140 мкл ФСБ и проводили микрофлуоресцентный анализ красителей Alexa 488 (иммунофлуоресценция PAR) и Хёхста.

Все микроскопические исследования проводили на автоматизированном микроскопе LionHeart FX («Biotek», США), оснащённом программным обеспечением Gen5, с использованием объективов Olympus Plan Fluorite Phase с увеличением 10× (NA 0,3; WD 10 мм) и 20× (NA 0,45; WD 6,6–7,8 мм). При анализе большого числа объектов (клеток, ядер) использовали режим монтажа серии снимков, получаемых при съёмке выбранной области. Микрофлуоресцентный анализ проводили в каналах DAPI (флуоресценция Хёхста) и GFP (флуоресценция меченных Alexa 488 вторичных антител при анализе PAR). Использование программного обеспечения Gen5 позволяло проводить быструю и полностью автоматизированную обработку серии флуоресцентных снимков (монтаж снимков, вычитание фоновой флуоресценции, деконволюцию, выделение маски ядер) и количественный анализ интенсивности иммунофлуоресценции PAR в отдельных ядрах. Динамический диапазон показателя интенсивности флуоресценции (число градаций серого) в одном пикселе равнялся 2¹⁶.

Оценка эффективности ингибирования PARP исследуемыми веществами производилась на основании значений уровня PAR в 1–2 тыс. ядер в трёх независимых образцах (сестринских культурах). Расчёт значений IC₅₀ проводили с использованием программы SigmaPlot («Systat Software Inc.», США), как было описано ранее [31].

Трёхмерные структуры исследуемых соединений были сгенерированы с помощью программы ACD/ChemSketch («Advanced Chemistry Development Inc.», Канада). Докинг молекул в активный центр модели PARP1, полученной в предыдущей работе [34], осуществляли с помощью программы Lead Finder 2112 в режиме «extra precision» [35, 36]. Для визуализации полученных моделей комплексов использовали программу VMD 1.9 [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение препаратов пермеабилizованных адгезированных клеток, приемлемых для анализа активности PARP. Эксперименты проводили на культурах клеток кардиомиобластов H9c2. В качестве пермеабилizующего агента использовали дигитонин – природный гликозид, образующий мицеллы в водных растворах [38–40]. Его пермеабилizующее действие связано с селективным удалением холестерина из внешнего слоя плазматической мембраны, что приводит к образованию в мембране пор диаметром 8–20 нм, через которые могут легко диффундировать молекулы массой до 200 кДа [41]. При этом в умеренных концентрациях (40–150 мкг/мл) дигитонин не влияет на целостность цитоскелета и внутриклеточных мембран, лишённых холестерина, включая митохондриальную и ядерную мембраны [38, 42].

Необходимо было подобрать условия, при которых значительная часть клеток становится проницаемой, и при этом они остаются прикреплёнными к поверхности роста. Степень пермеабилizации клеток определяли по проникновению и накоплению в клетках ядерного красителя гомодимера этидия III, который не проникает в клетки с интактной плазматической мембраной. Проведённые нами исследования показали, что оптимальными условиями для пермеабилizации клеток H9c2 являются 5-минутная обработка дигитонином в концентрации 35 мкМ (43 мкг/мл) в гипотоническом растворе при 0 °С. В этих условиях происходила пермеабилizация всех клеток (рис. 1, г–е), и при этом не наблюдалось открепления существенного числа клеток с поверхности роста (рис. S5). В отсутствие дигитонина пермеабилizация клеток не происходила (рис. 1, а–в, рис. S5, а–в).

Сравнение разных протоколов анализа активности PARP в пермеабилizованных адгезированных клетках. Изначально для анализа активности PARP в пермеабилizованных адгезированных клетках H9c2 мы попытались использовать модификацию метода, ранее описанного для суспендированных клеток [29], с той разницей,

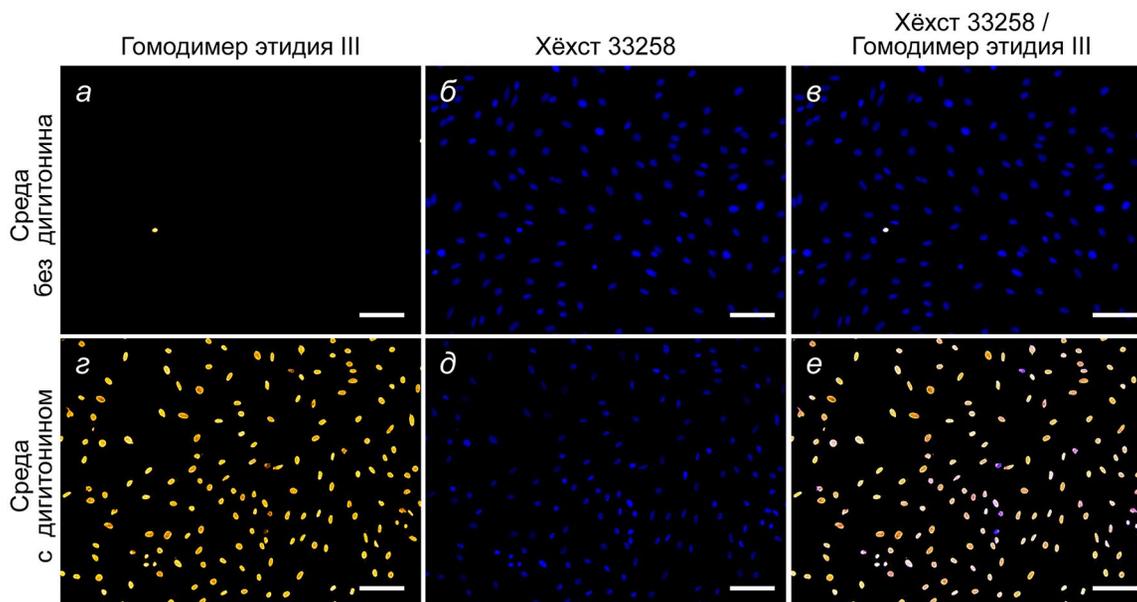


Рис. 1. Пермеабилзация клеток H9c2 дигитонином. *a–в* – Гипотонический раствор без дигитонина. *z–e* – Гипотонический раствор с дигитонином (35 мкМ). Ядра пермеабиллизованных клеток окрашены гомодимером этидия III (*a, в, z, e*). Длина масштабной планки соответствует 100 мкм. Объектив 10×

что вместо радиоизотопного способа анализа PAR использовали микрофлуорометрический. Для активации PARP использовали двунитевую олиго-ДНК с тупыми концами, а для инициации реакции – экзогенно вносимый NAD^+ в концентрации 10 мкМ. Оказалось, что при использовании данного метода иммунофлуоресценция PAR обнаруживалась в основном в ядре и характеризовалась наличием отдельных ярких фокусов флуоресценции, однако её средний уровень был слишком низким, что весьма затрудняло количественную оценку эффектов ингибиторов (рис. 2, *a, u, k*, рис. S6).

В качестве альтернативного способа активации PARP было предложено обрабатывать клетки H_2O_2 , как это делали ранее при анализе активности PARP в интактных клетках [33]. Инкубацию клеток с H_2O_2 проводили до пермеабилзации в присутствии известного высокоаффинного ингибитора PARP, PJ34, в насыщающей концентрации (рис. 3 и рис. S6, *a*). Пермеабилзацию и отмывку клеток от дигитонина и эндогенного NAD^+ также выполняли в присутствии PJ34. Такие манипуляции приводили к возникновению множественных повреждений клеточной ДНК и прочному связыванию комплекса PARP–PJ34 с повреждёнными участками ДНК. На заключительном этапе пермеабиллизованные клетки тщательно отмывали от PJ34, что приводило к переходу фермента в каталитически активное состояние. Полное удаление PJ34 и эндогенного NAD^+ из пермеабиллизованных клеток подтверждается тем, что выполнение дополнительных промывок не приводило к возрастанию активности PARP, а инкубация

клеток в реакционной среде без NAD^+ не приводила к возрастанию уровня PAR в клетках (рис. 2, вариант клеточного препарата 4). Восстановление активности PARP в пермеабиллизованных клетках после удаления из среды PJ34 указывает на обратимый характер действия этого ингибитора. Реакцию PARилирования проводили при низкой концентрации NAD^+ (10 мкМ) и умеренной температуре (25 °C), что позволяло избежать слишком быстрого протекания реакции и снизить конкуренцию NAD^+ с тестируемым соединением за связывание с PARP.

Проведённый сравнительный анализ показал, что при использовании обновлённого протокола уровень PAR в клетке был значительно выше, чем в случае первоначального, а иммунофлуоресценция PAR имела строгую ядерную локализацию (рис. 2, *b, u, k*, рис. S6, *b*). Обнаружено, что внесение в реакционную смесь олиго-ДНК приводило к снижению уровня активности PARP (рис. 2, *v, u, k*), видимо, за счёт конкуренции олиго-ДНК с повреждённой клеточной ДНК за PARP, а также более низкой активности PARP в комплексе с олиго-ДНК (по сравнению с комплексом с повреждённой клеточной ДНК). Для анализа остаточной активности определяли медианные значения уровня PAR (рис. 2, *u*) в трёх независимых образцах (препаратах, полученных из сестринских культур), из которых затем рассчитывали среднее значение уровня PAR (рис. 2, *k*). Оптимизированная схема пермеабилзации и анализа активности PARP в пермеабиллизованных адгезированных клетках представлена на рис. 3.

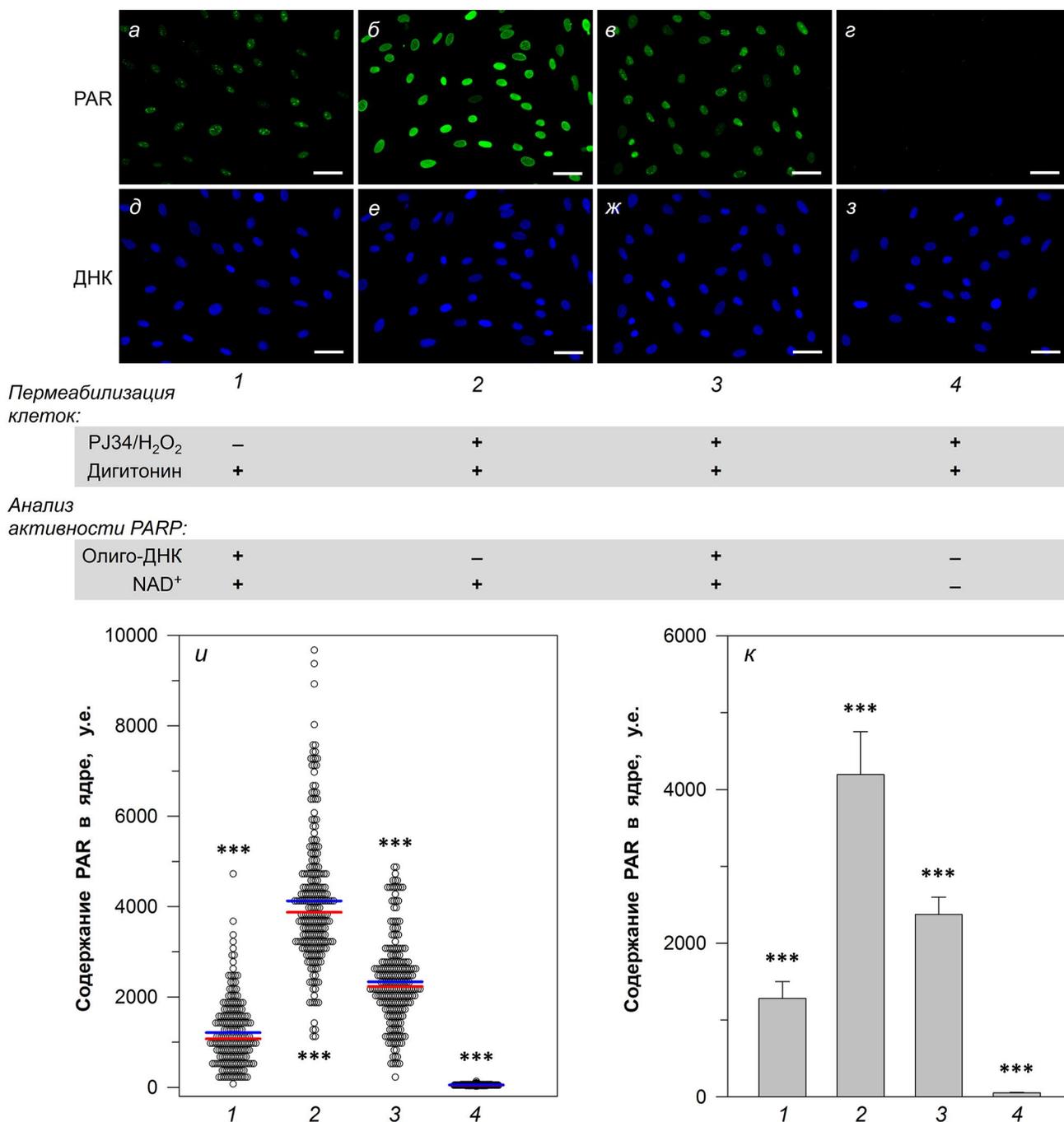


Рис. 2. Влияние предварительной обработки клеток PJ34 и H₂O₂ на активность PARP в пермеабиллизованных дигитонином клетках H9c2. а-з – Микрофлуоресцентный анализ содержания PAR в ядрах клеток (1–4 – различные варианты анализируемых препаратов). Длина масштабной планки соответствует 50 мкм. Объектив 20×. u – Результаты количественного анализа PAR в отдельных ядрах. Число проанализированных ядер: 198 (1), 236 (2), 229 (3), 144 (4). Средние и медианные значения отражены синей и красной линиями соответственно. к – Варьирование значений уровня PAR при анализе отдельных микрофлуоресцентных снимков разных препаратов (среднее ± стандартное отклонение; n = 6). Концентрации реагентов: PJ34 – 5 мкМ, H₂O₂ – 1 мМ, дигитонин – 35 мкМ, олиго-ДНК – 50 мкг/мл, NAD⁺ – 10 мкМ; время инкубации с H₂O₂ – 5 мин; время инкубации с NAD⁺ – 5 мин. *** p < 0,001 между всеми парами образцов (дисперсионный анализ ANOVA/апостериорный анализ Бонферрони)

Интересно было выяснить, как соотносятся уровни PARилированных белков в пермеабиллизованных и интактных клетках при максимально унифицированных протоколах анализа (рис. S6). В случае интактных клеток реакция PARилиро-

вания инициируется сразу после возникновения повреждений ДНК и образования активного комплекса PARP–ДНК за счёт вовлечения в этот процесс эндогенного NAD⁺. В стандартный протокол анализа активности PARP в пермеабиллизованных

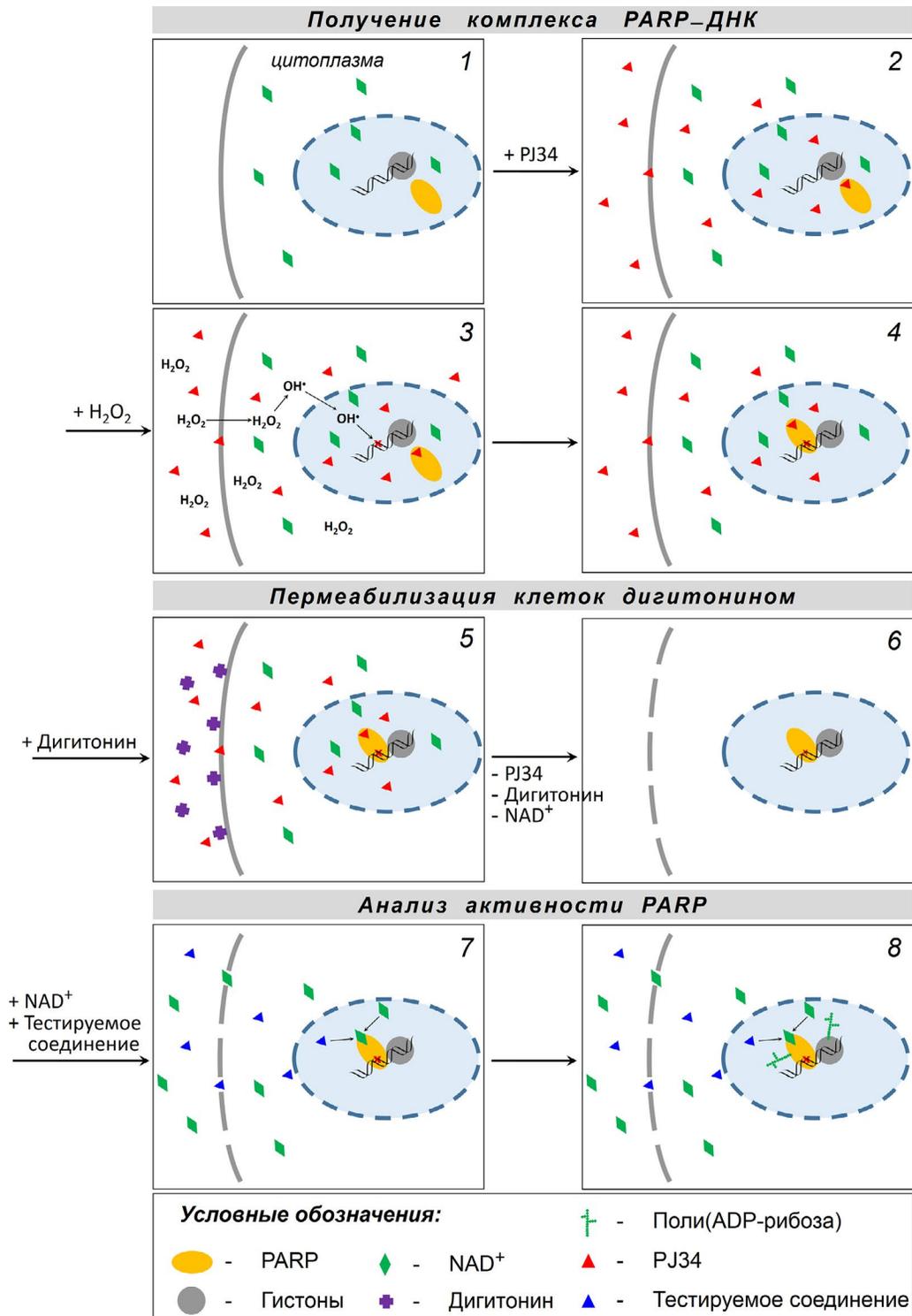


Рис. 3. Оптимизированная схема анализа активности PARP в пермеабилзованных адгезированных клетках. 1 – Адгезированные интактные клетки; 2 – преинкубация с PJ34 (5 мкМ, 1 ч, 37 °С, 5% CO₂); 3 – обработка H₂O₂ (1 мМ, 5 мин, 25 °С); 4 – образование комплекса PARP-ДНК; 5 – пермеабилзация дигитонином (35 мкМ, 5 мин, 0 °С); 6 – отмывка от дигитонина, PJ34 и эндогенного NAD⁺; 7 – инкубация пермеабилзованных клеток с экзогенным NAD⁺ (10 мкМ) и тестируемым соединением (2–10 мин, 25 °С); 8 – PARилирование белков

клетках вносили только одно изменение – концентрацию NAD⁺ повышали до 300 мкМ (соответствует уровню физиологических концентраций в клетке). Было показано, что при соблюдении этих условий за 5 мин инкубации в пермеабилзован-

ных клетках накапливается в среднем в 2,3 раза больше PAR, чем в интактных клетках (рис. S6, б), что может быть связано как с различиями в скорости реакции, так и степени PARилирования белков.

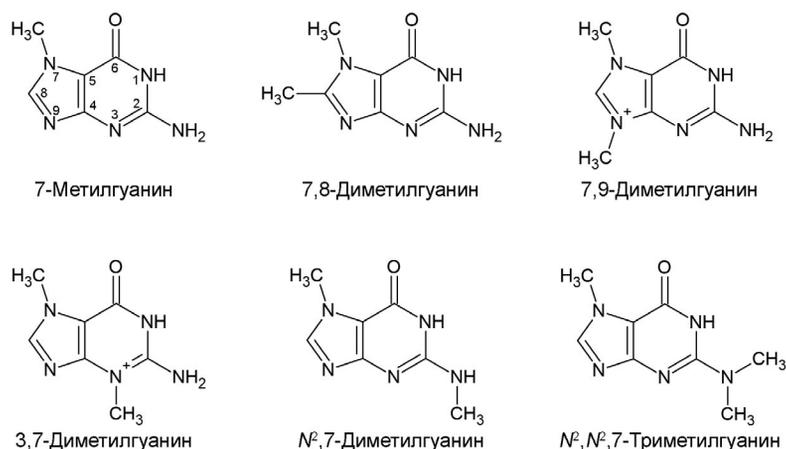


Рис. 4. Химические структуры 7-метилгуанина и его производных

Оценка эффективности PARP-ингибиторного действия соединений с использованием пермеабелизованных адгезированных клеток. Типичные кинетические кривые, получаемые при использовании предложенного метода анализа активности PARP (рис. S7), имели характерный для реакции PARилирования вид [31]. Внесение в реакционную смесь классического ингибитора 3-аминобензамида (используется в качестве положительного контроля при поиске и тестировании новых ингибиторов PARP) приводило к замедлению скорости реакции, но не влияло на вид получаемой зависимости. Расчётное значение IC_{50} для 3-аминобензамида составило 9,6 мкМ.

Предложенный метод также был использован нами для исследования эффективности

PARP-ингибиторного действия ряда производных 7-метилгуанина, содержащих дополнительные метильные группы в разных положениях (рис. 4). Проведённый на начальном этапе скрининг соединений в концентрации 150 мкМ показал, что положение метильных групп оказывает большое влияние на их PARP-ингибиторную активность (табл. 1). Внесение дополнительной метильной группы в положение 8 приводило к усилению ингибиторной активности. Анализ концентрационных зависимостей показал, что значение IC_{50} для 7,8-диметилгуанина в 1,6 раз ниже, чем для 7-метилгуанина (табл. 1 и рис. 5). В то же время замещение в положениях 3 и 9 значительно снижало ингибиторную активность производного 7-метилгуанина.

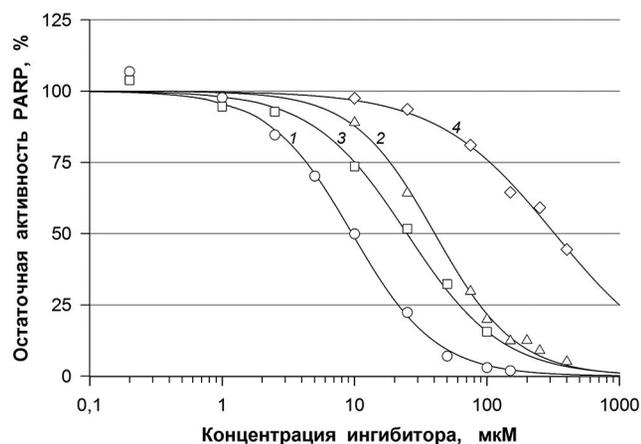


Рис. 5. Концентрационные зависимости ингибирования PARP тестируемыми соединениями в пермеабелизованных клетках H9c2. Обозначения: 1 – 3-аминобензамид; 2 – 7-метилгуанин; 3 – 7,8-диметилгуанин; 4 – N²,7-диметилгуанин. Условия: NAD⁺ – 10 мкМ; время инкубации – 10 мин; концентрации 3-аминобензамида и 7,8-диметилгуанина – 0,2, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 мкМ; концентрации 7-метилгуанина и N²,7-диметилгуанина – 10, 25, 75, 100, 150, 200, 250, 400 мкМ

Таблица 1. Эффективность PARP-ингибиторного действия производных гуанина в тест-системе с пермеабелизованными клетками H9c2

Соединение	Остаточная активность PARP при концентрации соединения 150 мкМ, %	IC_{50} , мкМ
3-Аминобензамид	1,8 ± 0,1	9,6 ± 0,3
7-Метилгуанин	12,3 ± 1,0	40,3 ± 1,5
7,8-Диметилгуанин	4,5 ± 0,1	24,9 ± 1,8
7,9-Диметилгуанин	83,5 ± 5,3	-
3,7-Диметилгуанин	85,0 ± 6,0	-
N ² ,7-Диметилгуанин	64,5 ± 4,2	323,6 ± 21,1
N ² ,N ² ,7-Триметилгуанин	91,8 ± 5,1	-

Примечание. Концентрация NAD⁺ – 10 мкМ, время инкубации – 10 мин.

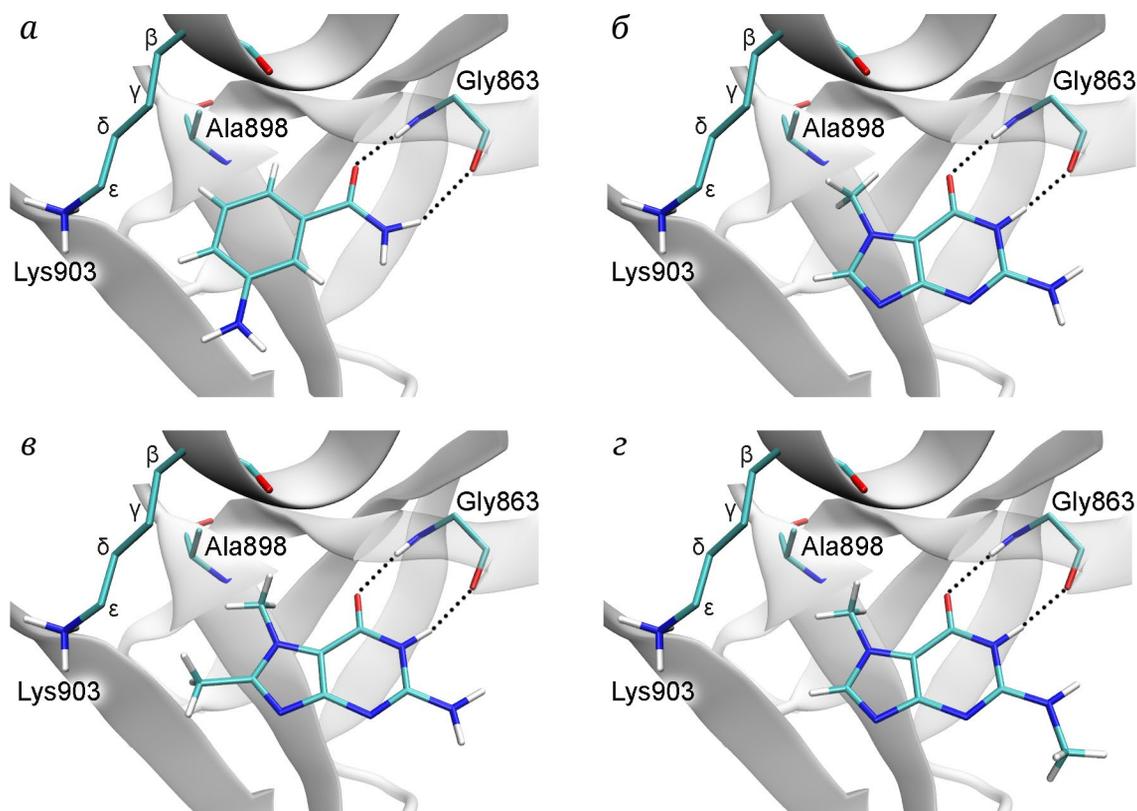


Рис. 6. Моделирование связывания ингибиторов в активном центре PARP1. *а* – 3-Аминобензамид; *б* – 7-метилгуанин; *в* – 7,8-диметилгуанин; *г* – $N^2,7$ -диметилгуанин. Неполлярные атомы водорода аминокислотных остатков не показаны. Пунктирными линиями обозначены ключевые водородные связи с Gly863

3-Аминобензамид является структурным миметиком никотинамидной группы субстрата NAD^+ . Как показывает молекулярное моделирование, 3-аминобензамид образует в активном центре PARP1 две водородные связи с остатком Gly863, гидрофобный контакт с боковой цепью Ala898, а также π -стэкинг с боковой цепью Tyr907 (рис. 6, *а*; остаток Tyr907 не показан). Данные взаимодействия характерны для субстрата, о чём можно судить по кристаллической структуре PARP1 с аналогом NAD^+ бензамидадениндинуклеотидом [43]. 7-Метилгуанин ($IC_{50} = 40,3$ мкМ) также вступает в вышеперечисленные взаимодействия с моделью PARP1 (рис. 6, *б*), что согласуется с его конкурентным характером действия [31]. Метильная группа в положении 7 необходима для обеспечения плотного контакта с остатком Ala898. 7,8-Диметилгуанин ($IC_{50} = 24,9$ мкМ) обладает более высокой активностью по сравнению с 7-метилгуанином за счёт дополнительного гидрофобного контакта метильной группы в положении 8 с C^ϵ -атомом боковой цепи Lys903 (рис. 6, *в*).

Низкую ингибиторную активность 7,9-диметилгуанина и 3,7-диметилгуанина можно объяснить депротонированием N1-атома амидной группы в условиях катализируемой реакции (pH = 7,8): потеря протона приводит к нарушению

водородных связей и эффективного взаимодействия с остатком Gly863 (рис. S8). $N^2,7$ -Диметилгуанин также обладает более слабым ингибиторным эффектом ($IC_{50} = 323,6$ мкМ) по сравнению с 7-метилгуанином: его гидрофобный N^2 -метильный заместитель экспонирован в раствор и не образует контактов с белком, что является неблагоприятным фактором для связывания (рис. 6, *г*). Наконец, $N^2,N^2,7$ -триметилгуанин имеет наиболее низкую ингибиторную активность среди протестированных производных. В его аминогруппе замещены оба атома водорода, что стерически препятствует взаимодействию молекулы с остатком Gly863 (с помощью докинга не удалось получить адекватную модель взаимодействия с белком).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее Grube et al. был описан метод анализа активности PARP в клетках Molt-3 (Т-клеточная лимфома человека), основанный на инкубации пермеабилizованных гипотоническим шоком клеток с радиоактивно меченым NAD^+ и олиго-ДНК [26]. Позже этот метод был несколько модифицирован Muiras et al., которые использовали

дигитонин для пермеабиллизации лимфобластных клеток, иммортализованных вирусом Эпштейна–Барр [29]. В представленной работе мы попытались применить данный подход для анализа PARP-ингибиторной активности соединений в культурах адгезированных клеток. При воспроизведении методики активность PARP в пермеабиллизованных кардиомиобластах крысы H9c2 оказалась довольно низкой, что затрудняло количественный анализ эффективности действия ингибиторов. Для повышения чувствительности метода и его унифицирования с протоколом, использовавшимся ранее для интактных клеток [33], было предложено до проведения пермеабиллизации подвергать клетки кратковременной инкубации с H_2O_2 в присутствии высокоаффинного ингибитора PARP (PJ34) в насыщающей концентрации. Это позволяло предотвратить вовлечение эндогенного NAD^+ в реакцию PARилирования после связывания PARP с повреждённой ДНК. После пермеабиллизации клетки многократно промывали, что приводило к удалению низкомолекулярных веществ, включая дигитонин, эндогенный NAD^+ и PJ34. Таким образом, на момент внесения экзогенного NAD^+ для запуска реакции PARилирования все молекулы PARP были прочно связаны с ДНК и находились в активированном состоянии (известно, что значения констант диссоциации комплекса PARP1/2–ДНК находятся в диапазоне 1–10 нМ [44–47]).

При использовании такого модифицированного протокола наблюдали существенно более высокий уровень активности PARP по сравнению с исходной методикой. Мы предполагаем, что наблюдаемые различия связаны с тем, что PARP1/2 в составе комплекса с клеточной ДНК обладает большей активностью по сравнению с комплексом с олиго-ДНК. Это подтверждается рядом работ, в которых исследовалось влияние нуклеосомного контекста на каталитические свойства PARP [24, 44, 48]. В случае комплексообразования PARP с повреждённой ДНК, помимо автомодификации, наблюдается также трансмодификация гистонов, которая регулируется фактором PARилирования гистонов HRF1 и, возможно, другими белковыми факторами [24, 49, 50].

Разработанный нами метод анализа активности PARP в пермеабиллизованных адгезированных клетках был апробирован для оценки PARP-ингибиторной активности соединений на примере референсного ингибитора 3-аминобензамида, а также ряда метильных производных природного ингибитора 7-метилгуанина. В результате выявлены положения, модификации по которым приводят как к потере активности, свойственной исходной структуре, так и к усилению эффективности действия. Было обнаружено, что 7,8-диме-

тилгуанин более эффективен, чем 7-метилгуанин, что объясняется дополнительным гидрофобным контактом с белком.

Полученные результаты подтверждают возможность использования разработанного метода в качестве хорошей альтернативы применяемым в настоящее время стандартным методам анализа ингибиторов PARP. Он сочетает преимущества двух подходов, основанных на использовании изолированных белков PARP и интактных клеток, а именно: возможность определения истинных показателей эффективности ингибиторного действия тестируемых соединений и максимальный учёт клеточного контекста при проведении анализа. Следует также отметить, что комбинированное исследование ингибиторов PARP с применением пермеабиллизованных и интактных клеток в перспективе позволит оценивать не только эффективность ингибиторного действия исследуемых соединений, но и их способность накапливаться в живой клетке.

Таким образом, предложенный подход значительно расширяет возможности изучения функционирования PARP в клеточном контексте и может быть применён для разработки протокола высокопроизводительного скрининга синтетических и природных ингибиторов PARP.

Вклад авторов. С.И. Шрам и Д.К. Нилов – концепция и руководство работой, написание текста; С.И. Шрам, Т.А. Щербакова, Т.В. Абрамова, М.С. Смирновская, А.И. Баландина, А.В. Куликов, Д.К. Нилов – проведение экспериментов; В.К. Швядас, В.Н. Сильников, Н.Ф. Мясоедов – обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследования, касающиеся синтеза метильных производных гуанина, анализа их PARP-ингибиторной активности и молекулярного моделирования, выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10072). Исследования, касающиеся разработки метода анализа активности PARP в пермеабиллизованных адгезированных клетках, проведены в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Благодарности. В работе использовано оборудование Курчатовского геномного центра (НИЦ «Курчатовский институт»).

Конфликт интересов. Д.К. Нилов и В.К. Швядас являются авторами патента на использование 7-метилгуанина для подавления ферментативной активности PARP.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., and Hottiger, M. O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 789-829, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-05>.
2. Шиловский Г. А., Хохлов А. Н., Шрам С. И. (2013) Система поли(ADP-рибозил)ирования белков: роль в поддержании стабильности генома и детерминации продолжительности жизни, *Биохимия*, **78**, 473-487.
3. Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W. L. (2017) PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes, *Genes Dev.*, **31**, 101-126, <https://doi.org/10.1101/gad.291518.116>.
4. Kamaletdinova, T., Fanaei-Kahrani, Z., and Wang, Z. Q. (2019) The enigmatic function of PARP1: from PARylation activity to PAR readers, *Cells*, **8**, 1625, <https://doi.org/10.3390/cells8121625>.
5. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>.
6. Нилов Д. К., Пушкарев С. В., Гущина И. В., Манасарян Г. А., Кирсанов К. И., Швядас В. К. (2020) Моделирование фермент-субстратных комплексов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 человека, *Биохимия*, **85**, 116-125, <https://doi.org/10.31857/S0320972520010091>.
7. Jungmichel, S., Rosenthal, F., Altmeyer, M., Lukas, J., Hottiger, M. O., and Nielsen, M. L. (2013) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribosylation) targets in different genotoxic stress responses, *Mol. Cell*, **52**, 272-285, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.026>.
8. Hoch, N. C., and Polo, L. M. (2019) ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease, *Genet. Mol. Biol.*, **43**, e20190075, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0075>.
9. Manasaryan, G., Suplatov, D., Pushkarev, S., Drobot, V., Kuimov, A., Švedas, V., and Nilov, D. (2021) Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in poly(ADP-ribose) polymerase family proteins, *Cancers (Basel)*, **13**, 1201, <https://doi.org/10.3390/cancers13061201>.
10. Lavrik, O. I. (2020) PARPs' impact on base excision DNA repair, *DNA Repair (Amst.)*, **93**, 102911, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102911>.
11. Gibson, B. A., and Kraus, W. L. (2012) New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 411-424, <https://doi.org/10.1038/nrm3376>.
12. Grimaldi, G., and Corda, D. (2019) ADP-ribosylation and intracellular traffic: an emerging role for PARP enzymes, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 357-370, <https://doi.org/10.1042/BST20180416>.
13. Van Wijk, S. J., and Hageman, G. J. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 81-90, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.021>.
14. Virág, L., Robaszkiewicz, A., Rodriguez-Vargas, J. M., and Oliver, F. J. (2013) Poly(ADP-ribose) signaling in cell death, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1153-1167, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.007>.
15. Liu, S., Luo, W., and Wang, Y. (2022) Emerging role of PARP-1 and Parthanatos in ischemic stroke, *J. Neurochem.*, **160**, 74-87, <https://doi.org/10.1111/jnc.15464>.
16. Pacher, P., and Szabó, C. (2007) Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors, *Cardiovasc. Drug Rev.*, **25**, 235-260, <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2007.00018.x>.
17. Narne, P., Pandey, V., Simhadri, P. K., and Phanithi, P. B. (2017) Poly(ADP-ribose)polymerase-1 hyperactivation in neurodegenerative diseases: the death knell tolls for neurons, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **63**, 154-166, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.11.007>.
18. Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Bürkle, A., Chiarugi, A., Clark, R. S., Curtin, N. J., Cuzzocrea, S., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Haskó, G., Liaudet, L., Moroni, F., Pacher, P., Radermacher, P., Salzman, A. L., Snyder, S. H., Soriano, F. G., Strosznajder, R. P., Sümegi, B., Swanson, R. A., and Szabo, C. (2018) Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 192-222, <https://doi.org/10.1111/bph.13748>.
19. Ke, Y., Wang, C., Zhang, J., Zhong, X., Wang, R., Zeng, X., and Ba, X. (2019) The role of PARPs in inflammation-and metabolic-related diseases: molecular mechanisms and beyond, *Cells*, **8**, 1047, <https://doi.org/10.3390/cells8091047>.
20. Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J., and Bolderson, E. (2020) PARP inhibitors: clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 564601, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564601>.
21. Slade, D. (2020) PARP and PARG inhibitors in cancer treatment, *Genes Dev.*, **34**, 360-394, <https://doi.org/10.1101/gad.334516.119>.
22. Bruin, M. A. C., Sonke, G. S., and Beijnen, J. H. (2022) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PARP inhibitors in oncology, *Clin. Pharmacokinet.*, **61**, 1649-1675, <https://doi.org/10.1007/s40262-022-01167-6>.

23. Flippot, R., Patrikidou, A., Aldea, M., Colomba, E., Lavaud, P., Albigès, L., Naoun, N., Blanchard, P., Terlizzi, M., Garcia, C., Bernard-Tessier, A., Fuerea, A., Di Palma, M., Escudier, B., Lorient, Y., Baciarello, G., and Fizazi, K. (2022) PARP inhibition, a new therapeutic avenue in patients with prostate cancer, *Drugs*, **82**, 719-733, <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01703-5>.
24. Kurgina, T. A., Moor, N. A., Kutuzov, M. M., Naumenko, K. N., Ukraintsev, A. A., and Lavrik, O. I. (2021) Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities, *Commun. Biol.*, **4**, 1259, <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02780-0>.
25. Piao, L., Fujioka, K., Nakakido, M., and Hamamoto, R. (2018) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 functions by post-translational modifications, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **23**, 13-26, <https://doi.org/10.2741/4578>.
26. Grube, K., Küpper, J. H., and Bürkle, A. (1991) Direct stimulation of poly(ADP-ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers, *Anal. Biochem.*, **193**, 236-239, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90015-l](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90015-l).
27. Шрам С. И., Шиловский Г. А., Хохлов А. Н. (2006) Поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1 и старение: изучение возможной связи в экспериментах на стационарных клеточных культурах, *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, **141**, 567-571.
28. Althaus, F. R., Lawrence, S. D., Sattler, G. L., and Pitot, H. C. (1982) ADP-ribosyltransferase activity in cultured hepatocytes. Interactions with DNA repair, *J. Biol. Chem.*, **257**, 5528-5535, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83809-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83809-7).
29. Muiras, M. L., Müller, M., Schächter, F., and Bürkle, A. (1998) Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **76**, 346-354, <https://doi.org/10.1007/s001090050226>.
30. Nilov, D., Maluchenko, N., Kurgina, T., Pushkarev, S., Lys, A., Kutuzov, M., Gerasimova, N., Feofanov, A., Švedas, V., Lavrik, O., and Studitsky, V. M. (2020) Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2159, <https://doi.org/10.3390/ijms21062159>.
31. Кургина Т. А., Шрам С. И., Кутузов М. М., Абрамова Т. В., Щербаклова Т. А., Мальцева Е. А., Поройков В. В., Лаврик О. И., Швядас В. К., Нилов Д. К. (2022) Ингибиторное действие 7-метилгуанина и его метаболита 8-гидрокси-7-метилгуанина на поли(АДФ-рибоза)полимеразу 1 человека, *Биохимия*, **87**, 794-803, <https://x/10.31857/S0320972522060070>.
32. Kirsanov, K., Fetisov, T., Antoshina, E., Trukhanova, L., Gor'kova, T., Vlasova, O., Khitrovo, I., Lesovaya, E., Kulbachevskaya, N., Shcherbakova, T., Belitsky, G., Yakubovskaya, M., Švedas, V., and Nilov, D. (2022) Toxicological properties of 7-methylguanine, and preliminary data on its anticancer activity, *Front. Pharmacol.*, **13**, 842316, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842316>.
33. Шрам С. И., Щербаклова Т. А., Абрамова Т. В., Барадиева Э. Ц., Ефремова А. С., Смирновская М. С., Сильников В. Н., Швядас В. К., Нилов Д. К. (2023) Природные производные гуанина оказывают PARP-ингибиторное и цитопротекторное действие на модели повреждения кардиомиоцитов при окислительном стрессе, *Биохимия*, **88**, 962-972, <https://doi.org/10.31857/S0320972523060064>.
34. Gushchina, I. V., Polenova, A. M., Suplatov, D. A., Švedas, V. K., and Nilov, D. K. (2020) vsFilt: a tool to improve virtual screening by structural filtration of docking poses, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**, 3692-3696, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00303>.
35. Stroganov, O. V., Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Kulkov, V., and Chilov, G. G. (2008) Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 2371-2385, <https://doi.org/10.1021/ci800166p>.
36. Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Zeifman, A. A., Stroganov, O. V., Kulkov, V., and Chilov, G. G. (2012) Lead Finder docking and virtual screening evaluation with Astex and DUD test sets, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **26**, 725-735, <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9549-y>.
37. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
38. Fiskum, G., Craig, S. W., Decker, G. L., and Lehninger, A. L. (1980) The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3430-3434, <https://doi.org/10.1073/pnas.77.6.3430>.
39. Schulz, I. (1990) Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes, *Methods Enzymol.*, **192**, 280-300, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)92077-q](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)92077-q).
40. Esparis-Ogando, A., Zurzolo, C., and Rodriguez-Boulan, E. (1994) Permeabilization of MDCK cells with cholesterol binding agents: dependence on substratum and confluency, *Am. J. Physiol.*, **267**, C166-C176, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.1.C166>.
41. Sudji, I. R., Subburaj, Y., Frenkel, N., García-Sáez, A. J., and Wink, M. (2015) Membrane disintegration caused by the steroid saponin digitonin is related to the presence of cholesterol, *Molecules*, **20**, 20146-20160, <https://doi.org/10.3390/molecules201119682>.

42. Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors, *J. Cell Biol.*, **111**, 807-816, <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.807>.
43. Langelier, M. F., Zandarashvili, L., Aguiar, P. M., Black, B. E., and Pascal, J. M. (2018) NAD⁺ analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains, *Nat. Commun.*, **9**, 844, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03234-8>.
44. Clark, N. J., Kramer, M., Muthurajan, U. M., and Luger, K. (2012) Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32430-32439, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397067>.
45. Sukhanova, M. V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M. M., Anarbaev, R. O., Curmi, P. A., Hamon, L., and Lavrik, O. I. (2015) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging, *Nucleic Acids Res.*, **44**, e60, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1476>.
46. Riccio, A. A., Cingolani, G., and Pascal, J. M. (2016) PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1691-1702, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1376>.
47. Kutuzov, M. M., Belousova, E. A., Kurgina, T. A., Ukraintsev, A. A., Vasil'eva, I. A., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2021) The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosylation) to base excision repair in the nucleosomal context, *Sci. Rep.*, **11**, 4849, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84351-1>.
48. Kim, M. Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J. T., and Kraus, W. L. (2004) NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1, *Cell*, **119**, 803-814, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.002>.
49. Palazzo, L., Suskiewicz, M. J., and Ahel, I. (2021) Serine ADP-ribosylation in DNA-damage response regulation, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **71**, 106-113, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.07.005>.
50. Алемасова Е. Э., Науменко К. Н., Суханова М. В., Лаврик О. И. (2022) Роль УВ-1 в регуляции процесса поли(АДФ-рибозил)ирования, катализируемого поли(АДФ-рибоза)полимеразами, *Усп. Биол. Хим.*, **62**, 63-98.

A NEW APPROACH FOR STUDYING POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE INHIBITORS USING PERMEABILIZED ADHERENT CELLS

**S. I. Shram^{1*}, T. A. Shcherbakova², T. V. Abramova³, M. S. Smirnovskaya⁴,
A. I. Balandina^{1,5}, A. V. Kulikov⁶, V. K. Švedas^{2,7}, V. N. Silnikov³,
N. F. Myasoedov¹, and D. K. Nilov²**

¹ National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: shram.img@yandex.ru

² Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119992 Moscow, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia

⁵ Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology, 125047 Moscow, Russia

⁶ RUDN University, Medical Institute, 117198 Moscow, Russia

⁷ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119234 Moscow, Russia

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors have been proposed as pharmacological agents in the treatment of various diseases. Recently, factors and mechanisms responsible for regulating PARP catalytic activity have been identified, some of which can significantly influence the effectiveness of inhibitors of this enzyme. In this regard, it is important to develop new models and methods that would reflect the cellular context in which PARP functions. We proposed to use digitonin-permeabilized adherent cells to study poly(ADP-ribosylation) reaction (PARylation) in order to maintain the nuclear localization of PARP and to control the concentrations of its substrate (NAD⁺) and tested compounds in the cell. A specific feature of the approach is that before permeabilization, cellular PARP is converted to the DNA-bound state under conditions preventing premature initiation of the PARylation reaction.

Experiments were carried out in rat H9c2 cardiomyoblasts. The activity of PARP in permeabilized cells was analyzed by measuring the immunofluorescence of the reaction product poly(ADP-ribose). The method was verified in the studies of PARP inhibition by the classic inhibitor 3-aminobenzamide and a number of new 7-methylguanine derivatives. One of them, 7,8-dimethylguanine, was found to be a stronger inhibitor compared to 7-methylguanine, due to a formation of additional hydrophobic contact with the protein. The proposed approach opens up new prospects for studying the mechanisms of PARP activity regulation in cells and can be used in high-throughput screening of PARP inhibitors.

Keywords: poly(ADP-ribose) polymerase, inhibitor, 7-methylguanine, 7,8-dimethylguanine, chemical synthesis of purines, adherent cells, cell permeabilization, digitonin, cardiomyoblasts, molecular docking

Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР, КРОСС-РЕАКТИВНЫЙ К SPR-ГОМОЛОГИЧНЫМ ЭПИТОПАМ КОРОНАВИРУСОВ

© 2024 Я.В. Сердюк, К.В. Зорникова, Д.В. Дианов, Н.О. Иванова,
В.Д. Давыдова, Е.И. Фефелова, Т.А. Ненашева,
С.А. Шитиков, А.В. Боголюбова*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
125167 Москва, Россия; электронная почта: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2024

После доработки 26.07.2024

Принята к публикации 09.08.2024

Пандемия COVID-19, начавшаяся вследствие быстрого распространения нового коронавируса SARS-CoV-2, способствовала повышению интереса к изучению Т-клеточного иммунного ответа. Было показано, что поликлональный и кросс-реактивный Т-клеточный ответ к сезонным коронавирусам и другим штаммам SARS-CoV-2 снижает тяжесть заболевания. В данной работе был изучен иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп SPRWYFYYL из нуклеокапсидного белка вируса SARS-CoV-2, для иммунного ответа на который характерно формирование высокоомологичных (конвергентных) рецепторов, встречающихся в репертуарах Т-клеточных рецепторов (ТКР) разных людей. Этот эпитоп относится к высококонсервативным пептидам, редко мутирующим в новых штаммах SARS-CoV-2 и гомологичным с эпитопами из сезонных коронавирусов. Существует предположение, что именно наличие кросс-реактивного ответа на гомологичные пептиды способствует снижению тяжести заболевания COVID-19, которое, однако, ставится под сомнение другими исследователями, предполагающими, что низкая аффинность кросс-реактивных рецепторов снижает силу иммунного ответа. Целью данного исследования была оценка влияния аминокислотных замен в эпитопе SPR на аффинность связывания со специфичным Т-клеточным рецептором. Для этого было проведено обогащение антигенспецифических клеток рестимуляцией антигенным пептидом из образцов четырех доноров, перенесших COVID-19, и проведено секвенирование репертуаров ТКР. Полученный SPR-специфичный репертуар β -цепей ТКР характеризовался большим разнообразием последовательностей, чем репертуар α -цепей, однако в репертуарах всех четырех доноров были обнаружены публичные рецепторы, три из которых были клонированы и использованы для получения репортерной линии Jurkat E6-1 TPR. Лишь для одного из трех рецепторов были продемонстрированы способность к активации пептидом SPR и распознавание мутантного гомолога LPRWYFYU из сезонных коронавирусов с той же аффинностью, что и пептида дикого типа. Это свидетельствует о том, что наличие мутации не повлияло на силу иммунного ответа, что может объяснить высокую частоту и положительный вклад кросс-реактивного ответа на эпитоп SPR в протекание инфекции COVID-19.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, SARS-CoV-2, Т-клеточный рецептор, Т-клеточный эпитоп, Т-клеточный репертуар, кросс-реактивность.

DOI: 10.31857/S0320972524090086 EDN: JJRWYB

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19, начавшаяся вследствие быстрого распространения по всему миру новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, способ-

ствовала изучению Т-клеточного иммунного ответа на вирусы, принципов его формирования и механизмов, лежащих в основе распознавания эпитопов. Наиболее важным звеном клеточного иммунного ответа на вирусные инфекции являются цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты, поскольку они непосредственно участвуют в элиминации зараженных вирусом клеток. Было показано, что тяжесть заболевания зависит от количества CD8⁺-клеток [1], а пролонгированный

Принятые сокращения: МПК – мононуклеары периферической крови; ТКР – Т-клеточный рецептор; HLA – человеческий лейкоцитарный антиген.

* Адресат для корреспонденции.

иммунный ответ на вирус SARS-CoV-2 коррелирует с клональным разнообразием первичного ответа Т-лимфоцитов [2]. Одним из важных факторов противовирусного иммунного ответа может быть наличие Т-клеток, кросс-реактивных к сезонным коронавирусам [3–5], которые обнаруживаются примерно у 20% людей, не болевших COVID-19 [6]. Эти клетки, вероятно, могут защищать от заражения даже при непосредственном близком контакте с зараженным человеком [3]. Большинство эпитопов, вызывающих кросс-реактивный ответ, происходят из белков нуклеокапсида (N) и белка ORF1a [6, 7]. Так, N-белки вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1 гомологичны на 90%. Степень гомологии белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 и сезонных коронавирусов (OC43, 229E, NL63 и HKU-1) составляет ~40% [8]. При этом в новых штаммах SARS-CoV-2 N-белок относится к наиболее часто мутирующим последовательностям вируса, однако мутации в N-концевом участке практически не встречаются [9, 10].

Наиболее иммунодоминантным эпитопом в контексте N-белка является эпитоп N_{105–113} (SPRWYFYYL), презентующийся в HLA-B*07:02 [11]. Эпитоп SPR индуцирует иммунный ответ у 80% носителей аллели HLA-B*07:02 (<https://www.mckayspcb.com/SARS2TcellEpitopes/>), перенесших COVID-19, а также у иммунологически не скримпированных доноров [12]. Есть две теории, объясняющие высокую иммунодоминантность SPR. Согласно одной из них, ответ на эпитоп SPR происходит в основном за счет кросс-реактивных Т-клеток, специфичных к сезонным коронавирусам [13, 14]. Последовательность эпитопа SPR у вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1 полностью гомологична, от OC43 и HKU-1 она отличается одним аминокислотным остатком (LPRWYFYYL), тремя аминокислотными остатками – от 229E (SPKLNHFYYL) и четырьмя – от NL63 (PPKVHNFYYL) [15]. Согласно второй теории, иммунодоминантность обеспечивается высокой частотой наивных предшественников Т-клеток с относительно разнообразным репертуаром $\alpha\beta$ Т-клеточных рецепторов [16]. Согласно исследованию Nguyen et al. [17], средняя частота SPR-специфичных CD8⁺-клеток в крови пациентов, которые перенесли COVID-19, составляет $6,88 \times 10^{-4}$, в то время как у пациентов, не зараженных COVID-19, этот показатель равен $3,00 \times 10^{-5}$. Таким образом, частота SPR-специфичных клеток в крови не болевших COVID-19 доноров даже выше, чем частота клеток, специфичных к другим иммунодоминантным эпитопам в крови пациентов в острой фазе заболевания: так, для иммунодоминантного эпитопа S_{269–277} (YLQPRTFLL) этот показатель составляет примерно $1,3 \times 10^{-5}$ [18]. Однако анализ образцов крови, взятых до начала панде-

мии, показал, что SPR-специфичная популяция в основном состоит из наивных CD8⁺-клеток с фенотипом CCR7⁺CD27⁺CD45RA⁺, в отличие от образцов от пациентов после инфекции, где преобладают SPR-специфичные Т-клетки центральной памяти с фенотипом CCR7⁺CD27⁺CD45RA⁻ [17]. Таким образом, можно предположить, что высокая иммунодоминантность SPR обеспечивается за счет большого числа наивных Т-клеток и разнообразного репертуара ТКР [15, 17].

Наличие кросс-реактивного ответа на SPR и другие консервативные эпитопы, такие как NSP12_{4859–4867} (RQLLFVVEV) и NSP12_{4515–4523} (TMADLVYAL), ассоциировано с более легким течением COVID-19 [17, 19]. В то же время в других исследованиях было показано, что ТКР, специфичные к гомологичным эпитопам сезонных коронавирусов, имеют низкую аффинность к эпитопам SARS-CoV-2 [20, 21]. Наличие кросс-реактивных ТКР может мешать вовлечению наивных Т-клеток с потенциально более высокоаффинным рецептором в иммунный ответ и снижать эффективность противовирусного ответа [22]. Тем не менее показано, что более 80% эпитоп-специфичных клеток, сформировавшихся после инфекции COVID-19 или вакцинации против SARS-CoV-2, способны к кросс-реактивному ответу на эпитопы из других штаммов SARS-CoV-2 [23, 24]. Некоторые мутации приводят к потере связывания с презентующей молекулой HLA (человеческого лейкоцитарного антигена) [25] или ослаблению активации CD8⁺-клеток [26]. При этом было показано, что разные эпитопы вызывают формирование репертуара ТКР с разным уровнем разнообразия вариационного участка CDR3 [2], что также может влиять на устойчивость эпитоп-специфичного ответа к мутациям. Так, для иммуногенных эпитопов YLQ и S_{448–456} (NYNYLYRLF), вызывающих формирование репертуара с высокой долей публичных последовательностей, были обнаружены мутации, не влияющие на связывание пептида с презентующим HLA, но снижающие ответ CD8⁺-клеток [27, 28].

Таким образом, изучение архитектуры Т-клеточного репертуара, формирующегося на конкретный эпитоп SARS-CoV-2, и влияние аминокислотных замен, появляющихся в его структуре в процессе эволюции вируса или присутствующих в сезонных коронавирусах, может помочь в понимании механизмов иммунологического ускользания новых вариантов коронавируса и разработке более эффективных вакцин. В этой работе было проведено изучение Т-клеточного ответа на эпитоп SPR и высокогомологичные ему пептиды и определено влияние отдельных аминокислотных замен на связывание комплекса МНС–пептид с публичным ТКР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, все доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании (протокол № 150, 02.07.2020). Для работы были использованы образцы венозной крови четырех доноров (трех женщин и одного мужчины) возрастом от 21 до 45 лет (медианный возраст – 27,5), перенесших заболевание COVID-19 средней тяжести. Тяжесть заболевания определялась в соответствии с классификацией, используемой Национальными Институтами Здравоохранения Соединенных Штатов Америки (www.covid19treatmentguidelines.nih.gov).

Образцы были получены в период с августа 2020 года по апрель 2021 года через 27–66 (среднее = 45,5) дней после появления симптомов новой коронавирусной инфекции методом венепункции в пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА («Sarstedt», Германия). МПК были выделены методом центрифугирования венозной крови в градиенте плотности Ficoll (1,077 г/мл; «ПанЭко», Россия) (400 g, 30 мин). Далее, клетки промывали фосфатно-солевым буфером («Thermo Fisher Scientific», США), содержащим 2 мМ ЭДТА («Amresco», США), и замораживали по 10×10^6 клеток в эмбриональной телячьей сыворотке («Capricorn», Германия), содержащей 7% ДМСО («Sigma-Aldrich», Германия).

HLA-генотипирование образцов. Для всех доноров было проведено генотипирование аллелей HLA с помощью набора One Lambda ALLType («Thermo Fisher Scientific»), который использует мультиплексную ПЦР для амплификации полных последовательностей генов HLA-A/B/C и генов HLA-DRB1/3/4/5/DQB1 от экзона 2 до 3' нетранслируемой области. Полученные библиотеки были секвенированы с использованием платформы MiSeq («Illumina», США). Данные были проанализированы при помощи программного обеспечения One Lambda HLA TypeStream Visual Software (версия 2.0.0.27232) и сопоставлены с базой данных IPD-IMGT/HLA 3.39.0.0.

Постановка *in vitro* эпителио-специфических клеточных культур Т-лимфоцитов. Для постановки эпителио-специфических клеточных культур МПК доноров были разморожены и далее разделены на контрольную лунку (без добавления пептида) и 3–5 целевых лунок по 3×10^6 клеток в лунку 24-луночного культурального планшета для суспензионных культур («Nest», Китай) в 1 мл культуральной среды RPMI 1640 («Thermo Fisher Scientific»), содержащей 10% человеческой сыворотки, 1 мМ пирувата натрия («Thermo Fisher Scientific»), 500 ед./мл IL-7, 80 ед./мл IL-15 и

50 ед./мл IL-2 («Miltenyi Biotec», Германия). Конечный объем в лунке составлял 2 мл. Пептид SRP, разведенный в ДМСО, добавляли в целевые лунки на 0 день инкубации с финальной концентрацией 10 нг/мл. Клетки инкубировали в течение 10–12 дней, замену половины культуральной среды проводили на 3, 5 и 7 дни культивации.

Производство биотинилированных комплексов МНС I-пептид. Все использованные химикаты аналитического класса были приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich», за исключением ЭДТА, азида натрия («Amresco»), хлорида натрия («Малиновое озеро», Россия) и коктейля ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific»). Растворимый HLA, загруженный пептидом, был получен путем сворачивания *in vitro* телец включения *Escherichia coli*, как было описано ранее [29], с модификациями [30]. Вкратце, тяжелые (HLA с меткой биотинилирования) и легкие (бета-2 микрोगлобулин) цепи человека были экспрессированы в штамме *E. coli* BL21(DE3) pLysS в тельцах включения. Пептиды, легкие и тяжелые цепи смешивали и правильно свернутые комплексы очищали методом гель-фильтрации с использованием сорбента Superdex 75 pg 16/600 («Cytiva», США) и Tris-буферного физиологического раствора (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl; pH 8,0) в качестве подвижной фазы. Комплексы биотинилировали биотин лигазой собственного производства и очищали методом гель-фильтрации с использованием сорбента Superdex 75 pg 10/300 («Cytiva»). Биотинилированные мономеры концентрировали до конечной концентрации 0,4–1,0 мг/мл и хранили в 20%-ном глицерине, содержащем 0,1% азида натрия, 0,1 мМ ЭДТА и коктейль ингибиторов протеаз. Плазмиды, кодирующие HLA и бета-2 микрोगлобулин, были любезно предоставлены Тоном Шумахером (The Netherlands Cancer Institute, Амстердам, Нидерланды).

Проточная сортировка эпителио-специфических Т-клеток. На 10–12 день культивирования клетки окрашивали при помощи флуоресцентных антител CD3-AF700 («Sony», Япония), CD8-FITC («Sony»), 7AAD («Sony») и тетрамерным комплексом пептид-МНС, конъюгированным со стрептавидин-R-фикоэритрином («Thermo Fisher Scientific»), как было описано ранее [31]. Стратегия выделения целевой популяции клеток МНС-тетрамер⁺/CD3⁺/CD8⁺ приведена на рисунке П1 в Приложении 1. Окрашивание считалось положительным, если количество клеток МНС-тетрамер⁺/CD3⁺/CD8⁺ превышало 0,03–0,4%. Далее, Т-клеточную фракцию сортировали в лизирующий реагент Trizol («Thermo Fisher Scientific») с использованием клеточного сортера FACSAria III («BD Biosciences», США). От каждого донора было получено 3–5 образцов, содержащих по 500–6000 тетрамер-положительных клеток.

Секвенирование репертуаров ТКР. Библиотеки для секвенирования α - и β -цепей ТКР тетрамер-положительных фракций клеток, а также тотальной фракции нестимулированных МПК донора p1489 были приготовлены, как было описано ранее [32]. Кратко, клетки лизировали реагентом Trizol («Thermo Fisher Scientific»), РНК выделяли при помощи Phasemaker («Thermo Fisher Scientific»). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием реагента SMARTScribe Reverse Transcriptase («TaKaRa», Япония) по протоколу производителя. Количество ДНК-продукта увеличивали при помощи двух раундов ПЦР. Очистку продукта на всех этапах осуществляли при помощи Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter», США). Оценку качества РНК и ДНК проводили при помощи системы капиллярного электрофореза Agilent («Agilent», США), концентрацию РНК и ДНК измеряли при помощи флуориметра Qubit4 («Thermo Fisher Scientific»). Секвенирование проводили с использованием секвенатора MiSeq («Illumina»). Полученные данные были проанализированы при помощи программ MIXCR [33], MIGES [34] и VDJtools [35]. Полученные данные представлены в табл. П1 в Приложении 2. Анализ результатов секвенирования и поиск пар α - и β -цепей осуществляли с использованием языков программирования R (версия 4.0.0) и Python (версия 3.9.1). Поиск гомологичных эпитоп-специфичных клонотипов с максимальным расстоянием Хемминга, равным 1, проводили с использованием программного пакета VDJmatch с учетом V-гена. Графы гомологии были созданы при помощи пакета «igraph» версия 1.2.6. α - и β -цепи ТКР были составлены в пары на основании их относительной частоты и/или совместной встречаемости в образцах, полученных от одних и тех же доноров. Из пар α - и β -цепей ТКР были выбраны три последовательности:

- (1) TRAV13-1 | TRAJ13 | CAASIGPGGYQKVTF – TRBV28 | TRBJ2-2 | CASSWLTGTNGELFF;
- (2) TRAV10 | TRAJ31 | CVVSVEARLMF – TRBV11-2 | TRBJ1-1 | CASSLDRGRAQCKNTEAFF;
- (3) TRAV9-2 | TRAJ6 | CALPGGGSYIPTF – TRBV7-2 | TRBJ2-3 | ASSWKLGPDTQYF.

Получение трансгенного ТКР. Плазмиду конструировали из модулей, кодирующих α - и β -цепи Т-клеточного рецептора, разделенных последовательностью 2А-пептида, для обеспечения их эквивалентной экспрессии. Вариабельные фрагменты α и β были амплифицированы из библиотек секвенирования, J-сегменты достроены с помощью синтетических олигонуклеотидов, фланкированных сайтами BpI. Модули, содержащие константные участки, были получены ранее.

Для быстрого клонирования ТКР в лентивирусный вектор третьего поколения pLAVE-cPPT (под

контролем промотора EF1a), полученного на основе вектора pLenti6 («Thermo Fisher Scientific»), применяли систему сборки Golden Gate с использованием эндонуклеазы рестрикции BpI («Thermo Fisher Scientific») и лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific») с последующей трансформацией компетентных клеток NEB® Stable Competent *E. coli*. Плазмидная ДНК была выделена набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo Fisher Scientific») в соответствии с рекомендациями производителя. Выбор рабочего клона был осуществлен по результатам ПЦР-скрининга колоний и рестрикции плазмидной ДНК рестриктазой HindIII («Thermo Fisher Scientific»). Подтверждение последовательности плазмидной ДНК проводили по методу Сэнгера.

Наработка лентивирусных частиц. Для получения лентивирусных частиц проводили трансфекцию клеточной линии HEK293T трансферной плазмидой, содержащей целевую вставку, упаковочными лентивирусными плазмидами ViraPower («Thermo Fisher Scientific»): pLP1 (кодирует структурные белки вириона, а также ферменты ревертазу и интегразу), pLP2 (содержит последовательность белка экспорта не сплайсированной геномной мРНК Rev) и pLP-VSVG (кодирует белок оболочки – гликопротеин G вируса везикулярного стоматита). В качестве сред использовали DMEM («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США), содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Sartorius», Германия) и Opti-MEM («Gibco», «Thermo Fisher Scientific»). Трансфекцию проводили с помощью линейного полиэтиленimina (PEI) 25K («Polysciences», США).

Супернатант, содержащий лентивирусные частицы, собирали через 72 ч, пропускали через фильтр PES (диаметр пор – 0,45 мкм; «Sarstedt») и концентрировали центрифугированием в течение 16 ч при 4000 g. Далее, супернатант собирали, ресуспендировали в IMDM («Gibco», «Thermo Fisher Scientific»), аликвотировали и замораживали. Хранили аликвоты при –80 °С.

Титрование лентивируса и получение клеточных линий с трансгенным ТКР. Для определения количества инфекционно активных вирусных частиц, способных трансдуцировать клетку и экспрессировать трансген (TU), проводили титрование полученных лентивирусов с использованием клеточной линии Jurkat E6.1 TPR CD8⁺ (производная клеточной линии Т-клеточного лейкоза Jurkat); репортеры: активированный ядерный фактор Т-клеток NFAT (зеленый флуоресцентный белок, GFP), ядерный фактор NF- κ B (синий флуоресцентный белок, CFP) и активирующий белок AP-1 (красный флуоресцентный белок, mCherry) [36].

TU оценивали по экспрессии маркера CD3⁺ методом проточной цитометрии (антитела CD3-AF700; «Sony», Япония). Далее, проводили

лентивирусную трансдукцию с таким соотношением инфекционно-активных вирусных частиц к клеткам (MOI), которое обеспечивает не более 20% трансдукции, тем самым снижая вероятность множественных интеграций. Трансгенные клетки обогащали с использованием клеточной сортировки на приборе FACS Aria III. После сортировки клетки культивировали в среде IMDM, содержащей 10% FBS. Чистота полученных популяций E6.1 TPR CD3⁺-клеток была не менее 95%.

Поиск гомологичных пептидов. Для поиска гомологичных пептидов использовали базы данных (<https://gisaid.org/>, <https://t-cov.hse.ru/>), а также литературные данные [37, 38]. Афинность связывания пептидов с HLA-B*07:02 оценивали при помощи программы NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>).

Анализ взаимодействия комплекса пептид-МНС с ТКР. Отобранные пептиды (чистота $\geq 95\%$) синтезировали («Permic Co., Ltd», Китай), после чего проводили анализ их взаимодействия с ТКР, экспрессируемый репортерной клеточной линией Jurkat E6-1 TPR, как описано ранее [28].

Трансгенные клетки Jurkat E6-1 TPR инкубировали в течение 20–24 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ совместно с клетками K562 (производная миелоидной клеточной линии), трансгенными по аллели *HLA B*07:02:01:01* в соотношении 1 : 2 в 200 мкл среды IMDM, содержащей 10% FBS в лунках 96-луночного планшета («Sarstedt»), содержащих серийные разведения пептида (финальные концентрации: 100; 20; 4; 0,8; 0,16; 0,032; 0,0064; 1,28e-4; 2,56e-4; 0,512e-4; 0,1024e-4 мкМ/мл), в трех независимых повторах. Среду без добавления пептида использовали в качестве отрицательного контроля. После инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером («Thermo Fisher Scientific») и окрашивали флуоресцентным антителом CD8-APC («BD Biosciences»); жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания клеток флуоресцентным красителем Alexa Fluor 750 NHS Ester («Thermo Fisher Scientific»). Активацию Т-клеток пептидом оценивали по экспрессии eGFP, регулируемой промотором NFAT, и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра MACSQuant Analyser 10 («Miltenyi Biotec», Германия).

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ репертуаров тетрамер-положительных клеток, полученных от четырех доноров, позволил идентифицировать 1533 уникальные

последовательности α - и 301 уникальную последовательность β -цепей ТКР, специфичных к комплексу HLA-B*07:02-SPR. При этом α -цепи характеризовались большей публичностью и пересекались как между образцами одного донора, так и между образцами из разных доноров, в то время как β -цепи пересекались только между образцами одного человека (рис. 1, а). Всего было обнаружено 452 (23%) последовательности α - и 44 (12%) последовательности β -цепей, которые встречались более чем в 1 образце.

Сорок одна эпитоп-специфичная α -цепь и семь β -цепей были обнаружены в тотальном репертуаре МПК пациента p1489, большая часть этих последовательностей не пересекалась с публичными данными, взятыми из ранее опубликованных статей [12, 39] и баз аннотированных Т-клеточных рецепторов VDJdb (<https://vdjdb.cdr3.net/>) (рис. 1, б). В тотальном репертуаре α -цепей пациента p1489 также присутствовали 24 последовательности, охарактеризованные как SPR-специфичные в литературе и VDJdb, однако не обнаруженные в эпитоп-специфичных фракциях (рис. 1, б). Эти последовательности были длиннее тех, которые впоследствии обогатились в клеточных культурах, однако их длина была в пределах нормальных значений в 13–15 а.о., характерных для рецепторов, распознающих эпитопы длиной 9–10 а.о. [40] (рис. 1, в), а их частота в тотальном репертуаре p1489 была ниже, чем тех, которые были обнаружены в клеточных культурах, и составляла в среднем $1,44 \times 10^{-5}$ и $1,3 \times 10^{-4}$ соответственно (рис. 1, з). Интересно отметить, что в тотальном репертуаре α -цепей p1489 также были обнаружены клонотипы, полученные из SPR-специфичных клеток трех других доноров, при этом частота таких клонотипов практически не отличалась. Репертуар β -цепей был более уникальным для каждого донора, а последовательности встречались в тотальном репертуаре в среднем с частотой в $4,3 \times 10^{-5}$ (рис. 1, д).

Несмотря на относительно низкую публичность полученных последовательностей, для некоторых из них удалось обнаружить гомологи с одной аминокислотной заменой в публичных данных. Всего было обнаружено 1848 последовательностей CDR3 α - и 1038 CDR3 β -цепей, из которых 632 (34%) и 195 (19%) соответственно вошли в состав кластеров гомологии. Для обеих цепей было характерно наличие доминантных генов *TRAV* и *TRBV* (рис. 1, е).

Подбор наиболее вероятных пар α - и β -цепей осуществляли с учетом встречаемости этих цепей одновременно в различных образцах одного и/или нескольких доноров, частоты этих цепей в образце и принадлежности β -цепи к кластеру, построенному на основании сходства последо-

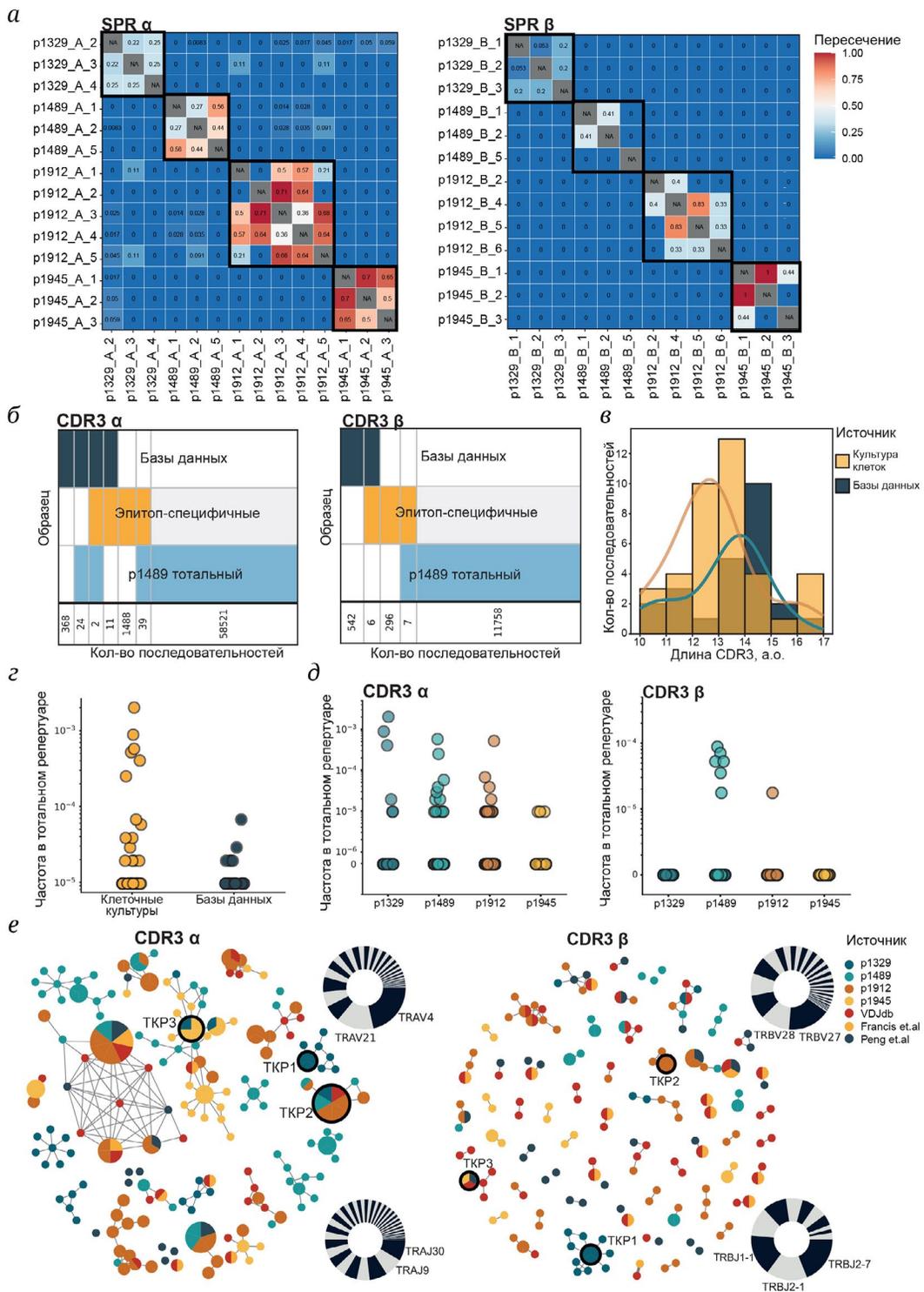


Рис. 1. Гомология SPR-специфичных репертуаров ТКР. *а* – Доля CDR3 α- (слева) и β-цепей (справа), пересекающихся между образцами. Рамками выделены образцы, полученные из одного донора. *б* – Пересечение между последовательностями CDR3 α- (слева) и β-цепей (справа), обнаруженными в публичных данных, SPR-специфичных клеточных культурах и тотальном репертуаре p1489. *в* – Длина CDR3 из SPR-специфичных клеточных культур p1489 (желтый) или публичных данных (синий) в тотальном репертуаре. *г* – Частота CDR3 из SPR-специфичных клеточных культур p1489 (желтый) или публичных данных (синий), обнаруженных в тотальном репертуаре. *д* – Частота SPR-специфичных клонотипов в тотальном репертуаре доноров. *е* – Кластеризация CDR3 α- (слева) и β-цепей (справа) ТКР. Каждая вершина представляет собой уникальную последовательность CDR3, размер круга пропорционален количеству идентичных последовательностей, линии соединяют последовательности, различающиеся на 1 аминокислотную замену. Цветом обозначены доноры, экспериментальные статьи и базы данных, из которых были взяты последовательности CDR3. Показаны кластеры, содержащие ≥ 5 (CDR3α) и ≥ 2 (CDR3β) членов. Использование V- и J-генов представлено в виде круговых диаграмм; а.о. – аминокислотный остаток

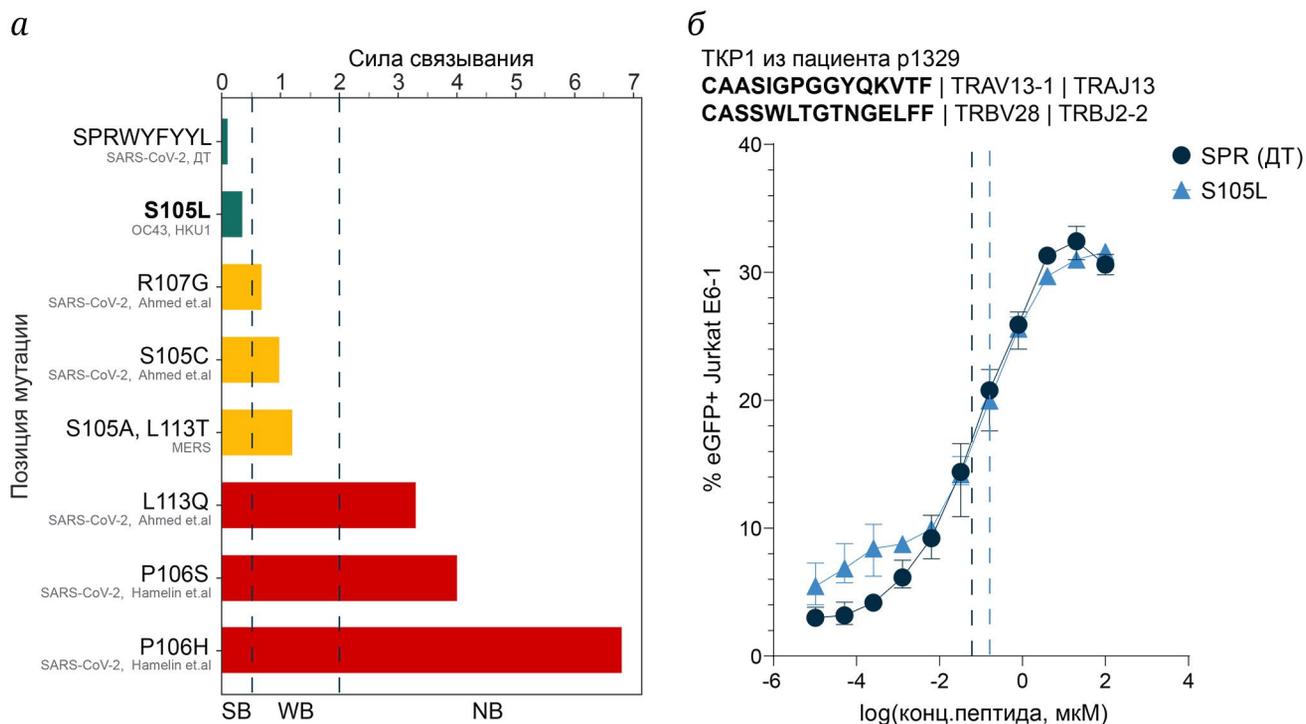


Рис. 2. Влияние мутаций в эпитопе SPR на презентацию в HLA и распознавание SPR-специфичными Т-клетками. *а* – Предсказанная при помощи NetMHCpan 4.1 аффинность связывания пептида дикого типа (ДТ) SPR и его гомологов с HLA-B*07:02. Зеленым обозначены варианты с высокой силой связывания (SB; ранг < 0,5); желтым – варианты со слабой аффинностью (WB; ранг 0,5–2); красным – варианты, не способные к презентации в данной HLA (NB; ранг > 2). Гомолог, выбранный для анализа кросс-реактивного ответа, выделен жирным шрифтом. *б* – Кривая титрования для определения функциональной avidности SPR-специфичного ТКР1 к пептиду дикого типа (синий) и мутантному пептиду S105L (голубой). На графике отображена средняя доля клеток eGFP⁺ и стандартное отклонение; EC₅₀ отмечено прерывистой линией

вательностей CDR3. В результате было отобрано 3 ТКР, распознающих комплекс HLA-B*07:02-SPR (рис. 1, *е*).

Анализ литературы [37, 38] и баз данных, содержащих информацию о мутациях в новых штаммах вируса SARS-CoV-2, позволил обнаружить 7 гомологичных пептидов с 1–2 аминокислотными заменами. Среди этих пептидов только один вариант – S105L из сезонных коронавирусов HCoV-OC42 и HCoV-HKU1 – имел высокую предсказанную аффинность связывания и был выбран для дальнейшего анализа. В трех других гомологичных пептидах (R107G и S105C, несущие редкие закрепившиеся мутации, а также S105A и L113T из вируса MERS) мутации ослабили силу связывания с HLA-B*07:02, а еще в трех вариантах (L113Q, P106S, P106H), которые также являются редкими, мутации полностью нарушили связывание с HLA (рис. 2, *а*).

Для проверки функциональной активности ТКР, специфичных к комплексу HLA-B*07:02-SPR или HLA-B*07:02-S105L, был проведен анализ активации репортерной клеточной линии Jurkat E6-1 TPR, несущей один из идентифицированных ТКР в ответ на различные концентрации SPR или мутантного пептида S105L. Из трех

ТКР, идентифицированных на предыдущем этапе, только один (ТКР1), полученный путем анализа эпитоп-специфичных клеточных культур МПК донора p1329, продемонстрировал способность к активации трансгенных Jurkat E6-1 TPR пептидом дикого типа (SPR). Этот ТКР также распознавал родственные эпитопы со сравнимой функциональной avidностью (EC₅₀) для обоих эпитопов: 0,07 мкМ для SPRWYFYYL (ДТ) и 0,14 мкМ для LPRWYFYYL (S105L). Таким образом, полученный ТКР высокоспецифичен для вируса SARS-CoV-2 и потенциально может участвовать в иммунном ответе на сезонные коронавирусы OC43 и HKU-1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо известно, что на вирусные эпитопы может формироваться Т-клеточный репертуар с различной степенью гомологии ТКР [2]. Функциональное преимущество такого иммунного ответа остается малоизученным, однако было показано, что публичные клонотипы имеют более высокую вероятность V(D)J-рекомбинации и кросс-реактивность с другими заболеваниями. Вирус SARS-CoV-2 способен к постепенному накоплению мутаций,

часть из которых приводит к ускользанию от иммунного надзора за счет потери связывания с презентующим HLA или снижения avidности взаимодействия со специфическими Т-клетками [41]. В последнем случае кросс-реактивность может способствовать сохранению иммунного ответа на мутировавший антиген.

В данной работе мы изучили репертуар SPR-специфичных CD8⁺-клеток, полученных из крови четырех пациентов, перенесших COVID-19 и имеющих аллель *HLA-B*07:02*. Т-клеточный иммунный ответ на этот иммунодоминантный эпитоп характеризовался высоким разнообразием α - и β -цепей, однако, несмотря на то что уникальных α -цепей было обнаружено больше, чем β -цепей, количество публичных последовательностей среди α -цепей также было выше, что можно объяснить меньшим разнообразием α -цепей в целом [42]. Интересно отметить, что в тотальном репертуаре p1489 были обнаружены последовательности α -цепей, охарактеризованные как SPR-специфичные в публичных данных, но не обнаруженные в эпитоп-специфичных клеточных культурах. Вероятно, отсутствие этих цепей в эпитоп-специфичных клеточных культурах можно объяснить их низкой частотой в тотальном репертуаре, из-за чего клетки, несущие данный рецептор, могли не попасть в клеточную культуру. Другой вероятной причиной может быть наличие данных цепей в рецепторах, специфичных к другим эпитопам, или низкая аффинность к SPR, которая не позволила клеткам с данным рецептором пролиферировать в клеточной культуре достаточно эффективно в ответ на стимуляцию экзогенным пептидом. Тем не менее средняя частота эпитоп-специфичных клонотипов составила $1,3 \times 10^{-4}$ для α -цепи и $4,3 \times 10^{-5}$ – для β -цепи, что примерно в 10 раз больше, чем для других иммунодоминантных эпитопов, например, YLQ, KCY, KTF и ALW [2], и согласуется с литературными данными о высокой частоте SPR-специфичных клонотипов.

Мы подтвердили наблюдение о том, что SPR-специфичный репертуар характеризуется относительно низкой гомологией последовательностей ТКР. Тем не менее нам удалось определить несколько последовательностей, формирующих кластеры гомологии с SPR-специфичными последовательностями, полученными из эпитоп-специфичных клеточных культур четырех доноров и/или обнаруженными в публичных данных. Мы отобрали 3 потенциальных ТКР, которые далее были трансдуцированы в репортерную клеточную линию Jurkat E6-1 TPR. Несмотря на то что подбор пар α - и β -цепей осуществлялся с учетом их частоты встречаемости в одних и тех же образцах, только один из выбранных ТКР продемонстрировал способность к распознаванию

пептида SPR. Вероятно, это связано с тем, что одна α -цепь может формировать ТКР с несколькими β -цепями и наоборот, что повышает частоту их встречаемости, однако не гарантирует наличие их в одном ТКР.

Единственный функциональный ТКР распознавал пептид SPR и его мутантную форму LPRWYFYYL из сезонных коронавирусов OC43 и HKU1 с EC₅₀, равной 0,07 мкМ и 0,14 мкМ соответственно. Эти значения были значительно выше, чем функциональная avidность для большинства Т-клеточных эпитопов, в том числе и из нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2 [43, 44]. Это объясняет высокую частоту кросс-реактивных ТКР в образцах доноров, не болевших COVID-19. Интересно отметить, что другие мутации в эпитопе SPR, обнаруженные нами в публичных данных, ослабляли или полностью нарушали связывание пептида с HLA-B*07:02. Это отличает SPR-специфичные ТКР от рецепторов к другим иммунодоминантным пептидам. Так, было показано, что ТКР, специфичные к иммунодоминантному и часто мутирующему эпитопу S₂₆₉₋₂₇₇ YLQPRTFLL, не распознавали ни мутантные формы пептида, ни гомологичные пептиды из сезонных коронавирусов. В то же время ТКР, специфичные к более консервативному и менее иммуногенному S₁₀₀₀₋₁₀₀₈ RLQSLQTYV, были способны к распознаванию мутантных вариантов, но не гомологичных эпитопов из сезонных коронавирусов [28]. ТКР, специфичные к часто мутирующему пептиду S₄₄₈₋₄₅₆ NYNYLYRLE, формирующему репертуар с большой долей публичных последовательностей, распознавали только 2 из 4 мутантных вариантов [27]. Два ТКР, специфичных к другому иммунодоминантному эпитопу из белка нуклеокапсида N₃₆₁₋₃₆₉ KTFPPTEPK, формирующему разнообразный репертуар с высокой длительностью персистенции специфичных Т-клеток [2], распознавали только часть мутантных пептидов [43]. Для других эпитопов не было показано взаимосвязи между разнообразием репертуара и способностью распознавать мутантные формы пептидов [45]. Однако следует учитывать, что на результат в значительной степени может повлиять и выбор рецептора: так, в исследовании Minervina et al. [27] мутантные формы более консервативного пептида ORF1ab₁₆₃₇₋₁₆₄₆ TTDPSFLGRY, формирующего менее публичный репертуар, распознавались также хорошо, как и пептид дикого типа, однако в работе De Silva et al. [45] все 5 изученных мутантных вариантов приводили к снижению активации Т-клеток. А в уже упомянутой ранее работе Hu et al. [43] KTF-специфичные рецепторы распознавали разные мутантные варианты с разной аффинностью. Вероятно, это может объяснить эволюционное преимущество более разнообраз-

ного репертуара, позволяющего с большей вероятностью найти рецептор, способный к распознаванию мутантного варианта.

Другим объяснением устойчивости иммунного ответа к определенным мутациям в эпитопе может быть геометрия взаимодействия ТКР–пептид–HLA. Были созданы кристаллические структуры ТКР, специфичных к эпитопам YLQ [25, 28, 46], RLQ [28, 47] и LLLD [44], благодаря которым было показано, что у разных ТКР, вне зависимости от их специфичности, может различаться вовлеченность разных CDR-регионов во взаимодействие с HLA и пептидом. И, вероятно, ТКР, имеющие больше контактов с HLA, чем с пептидом, более устойчивы к мутациям.

Таким образом, несколько механизмов могут обеспечивать устойчивость иммунного ответа к мутациям. Во-первых, Т-клеточный иммунный ответ на SARS-CoV-2 возникает сразу на несколько эпитопов [48] и маловероятно, что одна мутация может повлиять на общую силу ответа [48]. Во-вторых, большая часть эпитопов вызывает формирование крайне разнообразного репертуара [49], что коррелирует с сохранением ответа на этот эпитоп [2] и позволяет с большей вероятностью распознавать мутантные формы пептида. В-третьих, многие пептиды могут представляться в нескольких HLA, и потеря связывания с одним HLA может не влиять на связывание с другим [50]. Однако в таком случае остается непонятным, почему до 10% всех вирус-специфичных ТКР являются публичными или крайне гомологичными [51]. Возможно, высокая частота встречаемости гомологичных последовательностей может объясняться высокими вероятностями V(D)J-рекомбинации и сборки данного рецептора [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе мы продемонстрировали, что репертуар ТКР, специфичных к эпитопу SPR, характеризуется высокой частотой специфич-

ских последовательностей, относительно низкой гомологией, высоким разнообразием и частотой α -цепей и β -цепей. SPR-специфичные рецепторы способны к кросс-реактивному распознаванию пептидов из сезонных коронавирусов, и изучаемая мутация (замена серина на лейцин) эпитопа SPR не влияет на силу иммунного ответа. Эти особенности SPR-специфичного репертуара могут объяснить иммунодоминантность SPR у доноров, перенесших COVID-19, и высокую частоту кросс-реактивного ответа на эпитоп SPR у доноров, не болевших COVID-19. Однако влияние степени гомологичности репертуара на способность распознавать мутантные формы пептидов и влиять на ускользание вируса от иммунного надзора требует дальнейшего изучения.

Вклад авторов. А.В. Боголюбова, К.В. Зорникова, Я.В. Сердюк – формулирование гипотезы, планирование проекта; Я.В. Сердюк, К.В. Зорникова, Д.В. Дианов, Н.О. Иванова, В.Д. Давыдова, Е.И. Фелелова, Т.А. Ненашева – получение и анализ экспериментальных данных; Я.В. Сердюк, К.В. Зорникова, Д.В. Дианов, Н.О. Иванова, В.Д. Давыдова, Е.И. Фелелова – написание текста; С.А. Шитиков, А.В. Боголюбова – редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00395).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике, Хельсинской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, F., Hou, H., Yao, Y., Wu, S., Huang, M., Ran, X., Zhou, H., Liu, Z., and Sun, Z. (2020) Systemically comparing host immunity between survived and deceased COVID-19 patients, *Cell Mol. Immunol.*, **17**, 875-877, <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0483-y>.
2. Zornikova, K. V., Khmelevskaya, A., Sheetikov, S. A., Kiryukhin, D. O., Shcherbakova, O. V., Titov, A., Zvyagin, I. V., and Efimov, G. A. (2022) Clonal diversity predicts persistence of SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response, *Commun. Biol.*, **5**, 1351, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04250-7>.
3. Titov, A., Shaykhutdinova, R., Shcherbakova, O. V., Serdyuk, Y. V., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Maleeva, A. V., Khmelevskaya, A., Dianov, D. V., Shakirova, N. T., Malko, D. B., Shkurnikov, M., Nersisyan, S., Tonevitsky, A., Khamaganova, E., Ershov, A. V., Osipova, E. Y., Nikolaev, R. V., Pershin, D. E., Vedmedskia, V. A., Maschan, M., Ginanova, V. R., and Efimov, G. A. (2022) Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2, *JCI Insight*, **7**, e157699, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.157699>.

4. Schullien, I., Kemming, J., Oberhardt, V., Wild, K., Seidel, L. M., Killmer, S., Sagar, Daul, F., Salvat Lago, M., Decker, A., Luxenburger, H., Binder, B., Bettinger, D., Sogukpinar, O., Rieg, S., Panning, M., Huzly, D., Schwemmle, M., Kochs, G., Waller, C. F., Nieters, A., Duerschmied, D., Emmerich, F., Mei, H. E., Schulz, A. R., Llewellyn-Lacey, S., Price, D. A., Boettler, T., Bengsch, B., Thimme, R., Hofmann, M., and Neumann-Haefelin, C. (2021) Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells, *Nat. Med.*, **27**, 78-85, <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01143-2>.
5. Minervina, A. A., Komech, E. A., Titov A., Bensouda Koraichi, M., Rosati, E., Mamedov, I. Z. Franke, A., Efimov, G. A., Chudakov, D. M., Mora, T., Walczak, A. M., Lebedev, Y. B., and Pogorelyy, M. V. (2021) Longitudinal high-throughput TCR repertoire profiling reveals the dynamics of T-cell memory formation after mild COVID-19 infection, *eLife*, **10**, e63502, <https://doi.org/10.7554/eLife.63502>.
6. Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., De Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., and Sette, A. (2020) Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals, *Cell*, **181**, 1489-1501.e15, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>.
7. Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M., Wendisch, D., Georg, P., Kurth, F., Hippenstiel, S., Dingeldey, M., Kruse, B., Fauchere, F., Baysal, E., Mangold, M., Henze, L., Lauster, R., Mall, M. A., Beyer, K., Röhmel, J., Voigt, S., Schmitz, J., Miltenyi, S., Demuth, I., Müller, M. A., Hocke, A., Witzenzath, M., Suttorp, N., Kern, F., Reimer, U., Wenschuh, H., Drosten, C., Corman, V. M., Giesecke-Thiel, C., Sander, L. E., and Thiel, A. (2020) SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19, *Nature*, **587**, 270-274, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>.
8. Zhang, B., Tian, J., Zhang, Q., Xie, Y., Wang, K., Qiu, S., Lu, K., and Liu, Y. (2022) Comparing the nucleocapsid proteins of human coronaviruses: structure, immunoregulation, vaccine, and targeted drug, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 761173, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.761173>.
9. Abbasian, M. H., Mahmanzar, M., Rahimian, K., Mahdavi, B., Tokhanbigli, S., Moradi, B., Sisakht, M. M., and Deng, Y. (2023) Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions, *J. Transl. Med.*, **21**, 152, <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03996-w>.
10. Ferretti, A. P., Kula, T., Wang, Y., Nguyen, D. M. V., Weinheimer, A., Dunlap, G. S., Xu, Q., Nabils, N., Perullo, C. R., Cristofaro, A. W., Whitton, H. J., Virbasius, A., Olivier, K. J., Buckner, L. R., Alistar, A. T., Whitman, E. D., Bertino, S. A., Chattopadhyay, S., and MacBeath, G. (2020) Unbiased screens show CD8⁺ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein, *Immunity*, **53**, 1095-1107.e3, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.006>.
11. Panikkar, A., Lineburg, K. E., Raju, J., Chew, K. Y., Ambalathingal, G. R., Rehan, S., Swaminathan, S., Crooks, P., Le Texier, L., Beagley, L., Best, S., Solomon, M., Matthews, K. K., Srihari, S., Neller, M. A., Short, K. R., Khanna, R., and Smith, C. (2022) SARS-CoV-2-specific T cells generated for adoptive immunotherapy are capable of recognizing multiple SARS-CoV-2 variants, *PLoS. Pathog.*, **18**, e1010339, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010339>.
12. Francis, J. M., Leistritz-Edwards, D., Dunn, A., Tarr, C., Lehman, J., Dempsey, C., Hamel, A., Rayon, V., Liu, G., Wang, Y., Wille, M., Durkin, M., Hadley, K., Sheena, A., Roscoe, B., Ng, M., Rockwell, G., Manto, M., Gienger, E., Nickerson, J., MGH COVID-19 Collection and Processing Team, Moarefi, A., Noble, M., Malia, T., Bardwell, P. D., Gordon, W., Swain, J., Skoberne, M., Sauer, K., Harris, T., Goldrath, A. W., Shalek, A. K., Coyle, A. J., Benoist, C., and Pregibon, D. C. (2022) Allelic variation in class I HLA determines CD8⁺ T cell repertoire shape and cross-reactive memory responses to SARS-CoV-2, *Sci. Immunol.*, **7**, eabk3070, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abk3070>.
13. Mateus, J., Grifoni, A., Tarke, A., Sidney, J., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Burger, Z. C., Rawlings, S. A., Smith, D. M., Phillips, E., Mallal, S., Lammers, M., Rubiro, P., Quiambao, L., Sutherland, A., Yu, E. D., da Silva Antunes, R., Greenbaum, J., Frazier, A., Markmann, A. J., Premkumar, L., de Silva, A., Peters, B., Crotty, S., Sette, A., and Weiskopf, D. (2020) Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans, *Science*, **370**, 89-94, <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>.
14. Ng, K. W., Faulkner, N., Cornish, G. H., Rosa, A., Harvey, R., Hussain, S., Ulferts, R., Earl, C., Wrobel, A. G., Benton, D. J., Roustan, C., Bolland, W., Thompson, R., Agua-Doce, A., Hobson, P., Heaney, J., Rickman, H., Paraskevopoulou, S., Houlihan, C. F., Thomson, K., Sanchez, E., Shin, G. Y., Spyer, M. J., Joshi, D., O'Reilly, N., Walker, P. A., Kjaer, S., Riddell, A., Moore, C., Jebson, B. R., Wilkinson, M., Marshall, L. R., Rosser, E. C., Radziszewska, A., Peckham, H., Ciurtin, C., Wedderburn, L. R., Beale, R., Swanton, C., Gandhi, S., Stockinger, B., McCauley, J., Gambin, S. J., McCoy, L. E., Cherepanov, P., Nastouli, E., and Kassiotis, G. (2020) Preexisting and *de novo* humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans, *Science*, **370**, 1339-1343, <https://doi.org/10.1126/science.abe1107>.
15. Lineburg, K. E., Grant, E. J., Swaminathan, S., Chatzileontiadou, D. S. M., Szeto, C., Sloane, H., Panikkar, A., Raju, J., Crooks, P., Rehan, S., Nguyen, A. T., Lekieffre, L., Neller, M. A., Tong, Z. W. M., Jayasinghe, D., Chew, K. Y., Lobos, C. A., Halim, H., Burrows, J. M., Riboldi-Tunnichiffe, A., Chen, W., D'Orsogna, L., Khanna, R., Short, K. R.,

- Smith, C., and Gras, S. (2021) CD8⁺ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope cross-react with selective seasonal coronaviruses, *Immunity*, **54**, 1055-1065.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.006>.
16. Nguyen, V. T., Nguyen, M. Q., Le, N. T., Nguyen, T. N. H., and Huynh, G. (2021) Predictors of intention to get a COVID-19 vaccine of health science students: a cross-sectional study, *RMHP Volume*, **14**, 4023-4030, <https://doi.org/10.2147/RMHP.S328665>.
17. Nguyen, T. H. O., Rowntree, L. C., Petersen, J., Chua, B. Y., Hensen, L., Kedzierski, L., Van De Sandt, C. E., Chaurasia, P., Tan, H.-X., Habel, J. R., Zhang, W., Allen, L. F., Earnest, L., Mak, K. Y., Juno, J. A., Wragg, K., Mordant, F. L., Amanat, F., Krammer, F., Mifsud, N. A., Doolan, D. L., Flanagan, K. L., Sonda, S., Kaur, J., Wakim, L. M., Westall, G. P., James, F., Mouhtouris, E., Gordon, C. L., Holmes, N. E., Smibert, O. C., Trubiano, J. A., Cheng, A. C., Harcourt, P., Clifton, P., Crawford, J. C., Thomas, P. G., Wheatley, A. K., Kent, S. J., Rossjohn, J., Torresi, J., and Kedzierska, K. (2021) CD8⁺ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope display high naive precursor frequency and TCR promiscuity, *Immunity*, **54**, 1066-1082.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.009>.
18. Habel, J. R., Nguyen, T. H. O., Van De Sandt, C. E., Juno, J. A., Chaurasia, P., Wragg, K., Koutsakos, M., Hensen, L., Jia, X., Chua, B., Zhang, W., Tan, H.-X., Flanagan, K. L., Doolan, D. L., Torresi, J., Chen, W., Wakim, L. M., Cheng, A. C., Doherty, P. C., Petersen, J., Rossjohn, J., Wheatley, A. K., Kent, S. J., Rowntree, L. C., and Kedzierska, K. (2020) Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 24384-24391, <https://doi.org/10.1073/pnas.2015486117>.
19. Nesterenko, P. A., McLaughlin, J., Tsai, B. L., Burton Sojo, G., Cheng, D., Zhao, D., Mao, Z., Bangayan, N. J., Obusan, M. B., Su, Y., Ng, R. H., Chour, W., Xie, J., Li, Y.-R., Lee, D., Noguchi, M., Carmona, C., Phillips, J. W., Kim, J. T., Yang, L., Heath, J. R., Boutros, P. C., and Witte, O. N. (2021) HLA-A*02:01 restricted T cell receptors against the highly conserved SARS-CoV-2 polymerase cross-react with human coronaviruses, *Cell Rep.*, **37**, 110167, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110167>.
20. Bacher, P., Rosati, E., Esser, D., Martini, G. R., Saggau, C., Schiminsky, E., Dargvainiene, J., Schröder, I., Wieters, I., Khodamoradi, Y., Eberhardt, F., Vehreschild, M. J. G. T., Neb, H., Sonntagbauer, M., Conrad, C., Tran, F., Rosenstiel, P., Markewitz, R., Wandinger, K.-P., Augustin, M., Rybniker, J., Kochanek, M., Leypoldt, F., Cornely, O. A., Koehler, P., Franke, A., and Scheffold, A. (2020) Low-avidity CD4⁺ T cell responses to SARS-CoV-2 in unexposed individuals and humans with severe COVID-19, *Immunity*, **53**, 1258-1271.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.016>.
21. Dykema, A. G., Zhang, B., Woldemeskel, B. A., Garliss, C. C., Cheung, L. S., Choudhury, D., Zhang, J., Aparicio, L., Bom, S., Rashid, R., Caushi, J. X., Hsiue, E. H.-C., Cascino, K., Thompson, E. A., Kwaa, A. K., Singh, D., Thapa, S., Ordonez, A. A., Pekosz, A., D'Alessio, F. R., Powell, J. D., Yegnasubramanian, S., Zhou, S., Pardoll, D. M., Ji, H., Cox, A. L., Blankson, J. N., and Smith, K. N. (2021) Functional characterization of CD4⁺ T cell receptors crossreactive for SARS-CoV-2 and endemic coronaviruses, *J. Clin. Invest.*, **131**, e146922, <https://doi.org/10.1172/JCI146922>.
22. Niessl, J., Sekine, T., and Buggert, M. (2021) T cell immunity to SARS-CoV-2, *Semin. Immunol.*, **55**, 101505, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101505>.
23. Tarke, A., Coelho, C. H., Zhang, Z., Dan, J. M., Yu, E. D., Methot, N., Bloom, N. I., Goodwin, B., Phillips, E., Mallal, S., Sidney, J., Filaci, G., Weiskopf, D., da Silva Antunes, R., Crotty, S., Grifoni, A., and Sette, A. (2022) SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron, *Cell*, **185**, 847-859.e11, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.015>.
24. Tarke, A., Sidney, J., Methot, N., Yu, E. D., Zhang, Y., Dan, J. M., Goodwin, B., Rubiro, P., Sutherland, A., Wang, E., Frazier, A., Ramirez, S. I., Rawlings, S. A., Smith, D. M., Da Silva Antunes, R., Peters, B., Scheuermann, R. H., Weiskopf, D., Crotty, S., Grifoni, A., and Sette, A. (2021) Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4⁺ and CD8⁺ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals, *Cell Rep. Med.*, **2**, 100355, <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100355>.
25. Dolton, G., Rius, C., Hasan, M. S., Wall, A., Szomolay, B., Behiry, E., Whalley, T., Southgate, J., Fuller, A., Morin, T., Topley, K., Tan, L. R., Goulder, P. J. R., Spiller, O. B., Rizkallah, P. J., Jones, L. C., Connor, T. R., and Sewell, A. K. (2022) Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope, *Cell*, **185**, 2936-2951.e19, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.002>.
26. Xiao, C., Mao, L., Wang, Z., Gao, L., Zhu, G., Su, J., Chen, X., Yuan, J., Hu, Y., Yin, Z., Xie, J., Ji, W., Niu, H., Gao, F., Luo, O. J., Xiao, L., Wang, P., and Chen, G. (2022) SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 caused HLA-A2* CD8⁺ T cell epitope mutations for impaired cellular immune response, *iScience*, **25**, 103934, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103934>.
27. Minervina, A. A., Pogorelyy, M. V., Kirk, A. M., Crawford, J. C., Allen, E. K., Chou, C.-H., Mettelman, R. C., Allison, K. J., Lin, C.-Y., Brice, D. C., Zhu, X., Vegesana, K., Wu, G., Trivedi, S., Kottapalli, P., Darnell, D., McNeely, S., Olsen, S. R., Schultz-Cherry, S., Estep, J. H., the SJTRC Study Team, Gaur, A., Hoffman, J., Mori, M., Tang, L.,

- Tuomanen, E., Webby, R., Hakim, H., Hayden, R. T., Hijano, D. R., Bajracharya, R., Awad, W., Van De Velde, L.-A., Clark, B. L., Wilson, T. L., Souquette, A., Castellaw, A., Dallas, R. H., Hodges, J., Gowen, A., Russell-Bell, J., Sparks, J., Wittman, D. E., Fabrizio, T. P., Cherry, S., Roubidoux, E. K., Cortez, V., Freiden, P., Wohlgemuth, N., Whitt, K., McGargill, M. A., Wolf, J., and Thomas, P. G. (2022) SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8⁺ T cells, *Nat. Immunol.*, **23**, 781-790, <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01184-4>.
28. Wu, D., Kolesnikov, A., Yin, R., Guest, J. D., Gowthaman, R., Shmelev, A., Serdyuk, Y., Dianov, D. V., Efimov, G. A., Pierce, B. G., and Mariuzza, R. A. (2022) Structural assessment of HLA-A2-restricted SARS-CoV-2 spike epitopes recognized by public and private T-cell receptors, *Nat. Commun.*, **13**, 19, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27669-8>.
29. Garboczi, D. N., Hung, D. T., and Wiley, D. C. (1992) HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3429-3433, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3429>.
30. Shomuradova, A. S., Vagida, M. S., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Kiryukhin, D., Titov, A., Peshkova, I. O., Khmelevskaya, A., Dianov, D. V., Malasheva, M., Shmelev, A., Serdyuk, Y., Bagaev, D. V., Pivnyuk, A., Shcherbinin, D. S., Maleeva, A. V., Shakirova, N. T., Pilunov, A., Malko, D. B., Khamaganova, E. G., Biderman, B., Ivanov, A., Shugay, M., and Efimov, G. A. (2020) SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors, *Immunity*, **53**, 1245-1257.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.004>.
31. Vdovin, A. S., Filkin, S. Y., Yefimova, P. R., Sheetikov, S. A., Kapranov, N. M., Davydova, Y. O., Egorov, E. S., Khamaganova, E. G., Drovok, M. Y., Kuzmina, L. A., Parovichnikova, E. N., Efimov, G. A., and Savchenko, V. G. (2016) Recombinant MHC tetramers for isolation of virus-specific CD8⁺ cells from healthy donors: Potential approach for cell therapy of posttransplant cytomegalovirus infection, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1371-1383, <https://doi.org/10.1134/S0006297916110146>.
32. Zvyagin, I. V., Mamedov, I. Z., Tatarinova, O. V., Komech, E. A., Kurnikova, E. E., Boyakova, E. V., Brilliantova, V., Shelikhova, L. N., Balashov, D. N., Shugay, M., Sycheva, A. L., Kasatskaya, S. A., Lebedev, Y. B., Maschan, A. A., Maschan, M. A., and Chudakov, D. M. (2017) Tracking T-cell immune reconstitution after TCRαβ/CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children, *Leukemia*, **31**, 1145-1153, <https://doi.org/10.1038/leu.2016.321>.
33. Bolotin, D. A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I. Z., Putintseva, E. V., and Chudakov, D. M. (2015) MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling, *Nat. Methods*, **12**, 380-381, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>.
34. Shugay, M., Britanova, O. V., Merzlyak, E. M., Turchaninova, M. A., Mamedov, I. Z., Tuganbaev, T. R., Bolotin, D. A., Staroverov, D. B., Putintseva, E. V., Plevova, K., Linnemann, C., Shagin, D., Pospisilova, S., Lukyanov, S., Schumacher, T. N., and Chudakov, D. M. (2014) Towards error-free profiling of immune repertoires, *Nat. Methods*, **11**, 653-655, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2960>.
35. Shugay, M., Bagaev, D. V., Turchaninova, M. A., Bolotin, D. A., Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Pogorelyy, M. V., Nazarov, V. I., Zvyagin, I. V., Kirgizova, V. I., Kirgizov, K. I., Skorobogatova, E. V., and Chudakov, D. M. (2015) Vdjtools: unifying post-analysis of T cell receptor repertoires, *PLoS Comput. Biol.*, **11**, e1004503, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004503>.
36. Roskopf, S., Leitner, J., Paster, W., Morton, L. T., Hagedoorn, R. S., Steinberger, P., and Heemskerk, M. H. M. (2018) A Jurkat 76 based triple parameter reporter system to evaluate TCR functions and adoptive T cell strategies, *Oncotarget*, **9**, 17608-17619, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24807>.
37. Hamelin, D. J., Fournelle, D., Grenier, J.-C., Schockaert, J., Kovalchik, K. A., Kubiniok, P., Mostefai, F., Duquette, J. D., Saab, F., Sirois, I., Smith, M. A., Pattijn, S., Soudeyns, H., Decaluwe, H., Hussin, J., and Caron, E. (2022) The mutational landscape of SARS-CoV-2 variants diversifies T cell targets in an HLA-supertype-dependent manner, *Cell Systems*, **13**, 143-157.e3, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2021.09.013>.
38. Ahmed, S. F., Sohail, M. S., Quadeer, A. A., and McKay, M. R. (2022) Identification of potential SARS-CoV-2 CD8⁺ T cell escape mutants, *Vaccines*, **10**, 542, <https://doi.org/10.3390/vaccines10040542>.
39. Peng, Y., Felce, S. L., Dong, D., Penkava, F., Mentzer, A. J., Yao, X., Liu, G., Yin, Z., Chen, J.-L., Lu, Y., Wellington, D., Wing, P. A. C., Dominey-Foy, D. C. C., Jin, C., Wang, W., Hamid, M. A., Fernandes, R. A., Wang, B., Fries, A., Zhuang, X., Ashley, N., Rostron, T., Waugh, C., Sopp, P., Hublitz, P., Beveridge, R., Tan, T. K., Dold, C., Kwok, A. J., Rich-Griffin, C., Dejnirattisa, W., Liu, C., Kurupati, P., Nassiri, I., Watson, R. A., Tong, O., Taylor, C. A., Kumar Sharma, P., Sun, B., Curion, F., Revale, S., Garner, L. C., Jansen, K., Ferreira, R. C., Attar, M., Fry, J. W., Russell, R. A., COMBAT Consortium, Stauss, H. J., James, W., Townsend, A., Ho, L.-P., Klenerman, P., Mongkolsapaya, J., Screaton, G. R., Dendrou, C., Sansom, S. N., Bashford-Rogers, R., Chain, B., Smith, G. L., McKeating, J. A., Fairfax, B. P., Bowness, P., McMichael, A. J., Ogg, G., Knight, J. C., and Dong, T. (2022) An immunodominant NP105-113-B*07:02 cytotoxic T cell response controls viral replication and is associated with less severe COVID-19 disease, *Nat. Immunol.*, **23**, 50-61, <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01084-z>.

40. Carter, J. A., Preall, J. B., Grigaityte, K., Goldfless, S. J., Jeffery, E., Briggs, A. W., Vigneault, F., and Atwal, G. S. (2019) Single T cell sequencing demonstrates the functional role of $\alpha\beta$ TCR pairing in cell lineage and antigen specificity, *Front. Immunol.*, **10**, 1516, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01516>.
41. Kombe, A. J., Biteghe, F. A. N., Ndoutoume, Z. N., and Jin, T. (2022) CD8⁺ T-cell immune escape by SARS-CoV-2 variants of concern, *Front. Immunol.*, **13**, 962079, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962079>.
42. Kitaura, K., Shini, T., Matsutani, T., and Suzuki, R. (2016) A new high-throughput sequencing method for determining diversity and similarity of T cell receptor (TCR) α and β repertoires and identifying potential new invariant TCR α chains, *BMC Immunol.*, **17**, 38, <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0177-5>.
43. Hu, C., Shen, M., Han, X., Chen, Q., Li, L., Chen, S., Zhang, J., Gao, F., Wang, W., Wang, Y., Li, T., Li, S., Huang, J., Wang, J., Zhu, J., Chen, D., Wu, Q., Tao, K., Pang, D., and Jin, A. (2022) Identification of cross-reactive CD8⁺ T cell receptors with high functional avidity to a SARS-CoV-2 immunodominant epitope and its natural mutant variants, *Genes Diseases*, **9**, 216-229, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.05.006>.
44. Choy, C., Chen, J., Li, J., Gallagher, D. T., Lu, J., Wu, D., Zou, A., Hemani, H., Baptiste, B. A., Wichmann, E., Yang, Q., Ciffelo, J., Yin, R., McKelvy, J., Melvin, D., Wallace, T., Dunn, C., Nguyen, C., Chia, C. W., Fan, J., Ruffolo, J., Zukley, L., Shi, G., Amano, T., An, Y., Meirelles, O., Wu, W. W., Chou, C.-K., Shen, R.-F., Willis, R. A., Ko, M. S. H., Liu, Y.-T., De, S., Pierce, B. G., Ferrucci, L., Egan, J., Mariuzza, R., and Weng, N.-P. (2023) SARS-CoV-2 infection establishes a stable and age-independent CD8⁺ T cell response against a dominant nucleocapsid epitope using restricted T cell receptors, *Nat. Commun.*, **14**, 6725, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42430-z>.
45. De Silva, T. I., Liu, G., Lindsey, B. B., Dong, D., Moore, S. C., Hsu, N. S., Shah, D., Wellington, D., Mentzer, A. J., Angyal, A., Brown, R., Parker, M. D., Ying, Z., Yao, X., Turtle, L., Dunachie, S., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Maini, M. K., Ogg, G., Knight, J. C., Peng, Y., Rowland-Jones, S. L., and Dong, T. (2021) The impact of viral mutations on recognition by SARS-CoV-2 specific T cells, *iScience*, **24**, 103353, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103353>.
46. Chaurasia, P., Nguyen, T. H. O., Rowntree, L. C., Juno, J. A., Wheatley, A. K., Kent, S. J., Kedzierska, K., Rossjohn, J., and Petersen, J. (2021) Structural basis of biased T cell receptor recognition of an immunodominant HLA-A2 epitope of the SARS-CoV-2 spike protein, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101065, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101065>.
47. Wu, D., Efimov, G. A., Bogolyubova, A. V., Pierce, B. G., and Mariuzza, R. A. (2023) Structural insights into protection against a SARS-CoV-2 spike variant by T cell receptor diversity, *J. Biol. Chem.*, **299**, 103035, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103035>.
48. Grifoni, A., Sidney, J., Vita, R., Peters, B., Crotty, S., Weiskopf, D., and Sette, A. (2021) SARS-CoV-2 human T cell epitopes: adaptive immune response against COVID-19, *Cell Host Microbe*, **29**, 1076-1092, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.010>.
49. Chen, G., Yang, X., Ko, A., Sun, X., Gao, M., Zhang, Y., Shi, A., Mariuzza, R. A., and Weng, N. (2017) Sequence and structural analyses reveal distinct and highly diverse human CD8⁺ TCR repertoires to immunodominant viral antigens, *Cell Rep.*, **19**, 569-583, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.072>.
50. Nersisyan, S., Zhiyanov, A., Shkurnikov, M., and Tonevitsky, A. (2022) T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D883-D887, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab701>.
51. Huisman, W., Hageman, L., Lebourg, D. A. T., Khmelevskaya, A., Efimov, G. A., Roex, M. C. J., Amsen, D., Falkenburg, J. H. F., and Jedema, I. (2022) Public T-cell receptors (TCRs) revisited by analysis of the magnitude of identical and highly-similar TCRs in virus-specific T-cell repertoires of healthy individuals, *Front. Immunol.*, **13**, 851868, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.851868>.

T-CELL RECEPTOR CROSS-REACTIVE TO SPR HOMOLOGOUS EPITOPES OF CORONAVIRUSES

**Y. V. Serdyuk, K. V. Zornikova, D. V. Dianov, N. O. Ivanova, V. D. Davydova,
E. I. Fefelova, T. A. Nenasheva, S. A. Sheetikov, and A. V. Bogolyubova***

*National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation,
125167 Moscow, Russia; e-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com*

The COVID-19 pandemic, initiated by the rapid spread of the novel SARS-CoV-2 coronavirus, has increased interest in the study of the T-cell immune response. A polyclonal and cross-reactive T-cell response to seasonal coronaviruses and other SARS-CoV-2 strains have been shown to reduce

disease severity. In this study, we investigated the immunodominant T-cell epitope SPRWYFYFYYL from the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 virus. The immune response to this epitope is characterized by the formation of highly homologous (convergent) receptors found in the T-cell receptor (TCR) repertoires of different individuals. This epitope belongs to highly conserved peptides that are rarely mutated in new strains of SARS-CoV-2 and are homologous to epitopes from seasonal coronaviruses. There is a suggestion that the presence of cross-reactive responses to homologous peptides contributes to reduced COVID-19 disease severity. However, other investigators have questioned this, suggesting that low affinity receptors reduce the strength of the immune response. The aim of this study was to evaluate the effect of amino acid substitutions in the SPR epitope on the affinity of binding to a specific T-cell receptor. To this end, antigen-dependent cellular expansions were performed on samples from four COVID-19-transfected donors and TCR repertoires were sequenced. The resulting SPR-specific β -chain TCRs had greater sequence diversity than that of α -chains, but public receptors were also present in all four donor repertoires, three of which were cloned and used to generate a Jurkat E6-1 TPR cell line. Only for one of the three receptors we demonstrated the ability to be activated by the SPR peptide and recognized the mutant LPRWYFYFYY homologous from seasonal coronaviruses with the same affinity as the wild-type peptide. This indicates that the presence of the mutation did not affect the strength of the immune response, which may explain why the cross-reactive response to the SPR epitope is so frequent and contributes positively to COVID-19 infection.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, T-cell receptor, T-cell epitope, T-cell repertoire, cross-reactivity

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК МОЗГА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

© 2024 И.Б. Филиппенков^{1*}, Н.Ю. Глазова^{1,2}, Е.А. Себенцова^{1,2}, В.В. Ставчанский¹, Л.А. Андреева¹, Н.Ф. Мясоедов¹, Н.Г. Левицкая^{1,2}, С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия; электронная почта: filippenkov-ib.img@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.07.2024

После доработки 23.08.2024

Принята к публикации 02.09.2024

Синтетические пептиды обладают широким спектром клинических эффектов. Особый интерес представляют пептиды на основе аденокортикотропного гормона (АКТГ) как в качестве уже используемых, так и потенциальных препаратов для предотвращения последствий широкого круга патологических и стрессовых состояний, включая ишемию головного мозга. Однако требуется изучить их влияние на клетки мозга в нормальных физиологических условиях, в том числе для понимания рисков их применения. В работе мы использовали высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-Seq) для выявления дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в лобной коре интактных крыс, получающих внутрибрюшинное введение АКТГ-подобных пептидов АКТГ(4–7)PGP (семакс) и АКТГ(6–9)PGP или физиологический раствор. Через 22,5 ч после первого введения семакса и АКТГ(6–9)PGP мы выявили 258 и 228 ДЭГ соответственно с порогом $> 1,5$ и $P_{adj} < 0,05$. Были выявлены метаболические пути, характеризующие как общее, так и специфическое влияние каждого из пептидов на транскриптом. Оба пептида преимущественно вызвали снижение экспрессии генов, связанных с иммунной системой. Одновременно при сравнении эффектов АКТГ(6–9)PGP относительно семакса были выявлены ДЭГ, которые характеризовали основные различия эффектов пептидов. Эти гены, в основном снизившие свою экспрессию, были ассоциированы с системами нейросигнализации и регуляции ионных каналов. Наши данные показывают, как различия в структуре производных АКТГ связаны с изменением транскриптома клеток мозга после воздействия данных родственных пептидов. Результаты свидетельствуют о том, что при изучении влияния регуляторных пептидов на транскриптом при патологии необходимо учитывать их действие в нормальных физиологических условиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АКТГ-подобные пептиды, RNA-Seq, транскриптом, экспрессия генов, генные сети.

DOI: 10.31857/S0320972524090094 EDN: JJQNJG

ВВЕДЕНИЕ

Пептиды представляют собой уникальный класс фармацевтически значимых соединений с высокой биосовместимостью, низкой иммуногенностью, мягким действием и минимальными побочными эффектами [1–5]. В частности, большое внимание привлекают пептиды на основе аденокортикотропного гормона (АКТГ) для

создания нейропротективных препаратов [6–9]. Известно, что α -меланоцитстимулирующий гормон (α -МСГ), аминокислотная последовательность которого соответствует последовательности фрагмента АКТГ (1–13), оказывает выраженное противовоспалительное, нейрогенное и нейропротекторное действие на моделях ишемического инсульта [10, 11]. На основе фрагментов АКТГ удалось создать пептиды полностью свободные от гормональной активности. Так, синтетический пептид АКТГ(4–7)PGP (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro),

* Адресат для корреспонденции.

известный как семакс, уже применяется для лечения широкого круга патологических и стрессовых состояний, включая острый ишемический инсульт, в качестве нейропротекторного препарата, обладающего терапевтическим эффектом без развития лекарственной зависимости или синдрома отмены [12]. Семакс способен проходить через гематоэнцефалический барьер, в том числе при внутривенном введении [13]. Использование С-концевого трипептида Pro-Gly-Pro (PGP) в структуре семакса увеличивает продолжительность его действия по сравнению с исходным фрагментом АКТГ(4–7). Семакс оказывает ноотропное действие, стимулируя процессы обучения, внимания и формирования памяти [14]. Кроме того, семакс был успешно использован при лечении сосудистых, токсико-аллергических и воспалительных заболеваний зрительного нерва параллельно с основной нейротрофической и противовоспалительной терапией [15]. Аналог семакса, синтетический пептид АКТГ(6–9)PGP (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro), также обладает ноотропными эффектами, в особенности влияя на процессы обучения [16–18]. Более того, этот пептид повышал жизнеспособность культивируемых корковых нейронов [18] и защищал клетки линии SH-SY5Y от пероксидной и цианидной цитотоксичности [19]. В настоящее время АКТГ(6–9)PGP проходит доклинические испытания и, на наш взгляд, имеет большие перспективы клинического использования.

В последние годы транскриптомика стала эффективным подходом для изучения механизмов патологических процессов при различных заболеваниях и поиска молекулярных мишеней для их медикаментозного лечения. Полногеномные методы анализа транскриптома, включая микрочипы и высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-Seq), дают сведения об экспрессии отдельных генов и позволяют идентифицировать сигнальные пути, нарушение которых приводит к развитию многих заболеваний. Существует множество примеров использования транскриптомики для изучения механизмов действия ряда пептидов, в том числе орексина-А [20], VR-10 [21], семаглутида [22], имеющих значение для медицины. Нами ранее с помощью полногеномного анализа также было изучено влияние семакса на транскриптом мозга крыс в условиях моделей церебральной ишемии [23–25]. В одном

из последних исследований мы изучили влияние двух АКТГ-подобных пептидов – семакса и АКТГ(6–9)PGP – на транскриптом мозга через 4,5 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии (tMCAO) у крыс [26]. Данные пептиды представляют собой гибриды фрагментов АКТГ и глипролина Pro-Gly-Pro. В их структуру входили перекрывающиеся участки аминокислотной последовательности (рис. 1, а). Для анализа нами был выбран участок фронтальной коры, который содержал как здоровую ткань, так и способные к восстановлению клетки пенумбры (рис. 1, б). Мы показали, что как семакс, так и АКТГ(6–9)PGP могут частично предотвращать изменения в профилях экспрессии генов нейросигнализации и иммунной системы, нарушенных действием ишемии через 4,5 ч после tMCAO. При этом было выявлено и различное действие пептидов в отношении преимущественно генов иммунной системы [26]. Таким образом, в результате проделанной работы мы выявили сходство и различие эффектов АКТГ-подобных пептидов на транскриптом в ранние часы после экспериментальной ишемии в зависимости от их структуры.

В настоящем исследовании впервые была поставлена цель изучить влияние родственных АКТГ-подобных пептидов на транскриптом клеток фронтальной коры мозга крыс в условиях физиологической нормы, в том числе для понимания рисков их использования. С помощью RNA-Seq мы проанализировали изменения профиля экспрессии генов участка фронтальной коры крыс после трехкратного внутрибрюшинного введения семакса и АКТГ(6–9)PGP. Был выявлен общий эффект снижения экспрессии генов иммунной системы под действием семакса и АКТГ(6–9)PGP в участке фронтальной коры у крыс, что может лежать в основе иммуномодулирующего и нейропротективного эффектов данных пептидов. Также были выяснены специфические эффекты для каждого из пептидов на транскриптом, прежде всего, относящиеся к активности генов систем нейросигнализации и регуляции ионных каналов. Спрогнозирована генная сеть, иллюстрирующая вовлеченность метаболических систем клетки в проявление влияния АКТГ-подобных пептидов на клетки мозга. Таким образом, полученные данные показывают, как различия в структуре родственных пептидов связаны с молекулярно-

Принятые сокращения: ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены; КП1–КП4 – кластеры путей, характеризующих эффекты пептидов; *Gapdh* – ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; NA – «норма + АКТГ(6–9)PGP»; NS – «норма + семакс»; NV – «норма + физраствор»; *Padj* – значение вероятности *p*, скорректированное с поправкой Бенджамини–Хохберга; PGP – Pro-Gly-Pro; pMCAO – необратимая окклюзия средней мозговой артерии; RIN – показатель целостности РНК (RNA integrity number); RNA-Seq – высокопроизводительное секвенирование РНК; *Rpl3* – ген 60S-рибосомного белка L3; tMCAO – обратимая окклюзия средней мозговой артерии; АКТГ – адренкортикотропный гормон; АКТГ(4–7)PGP – Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, семакс; АКТГ(6–9)PGP – His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro.

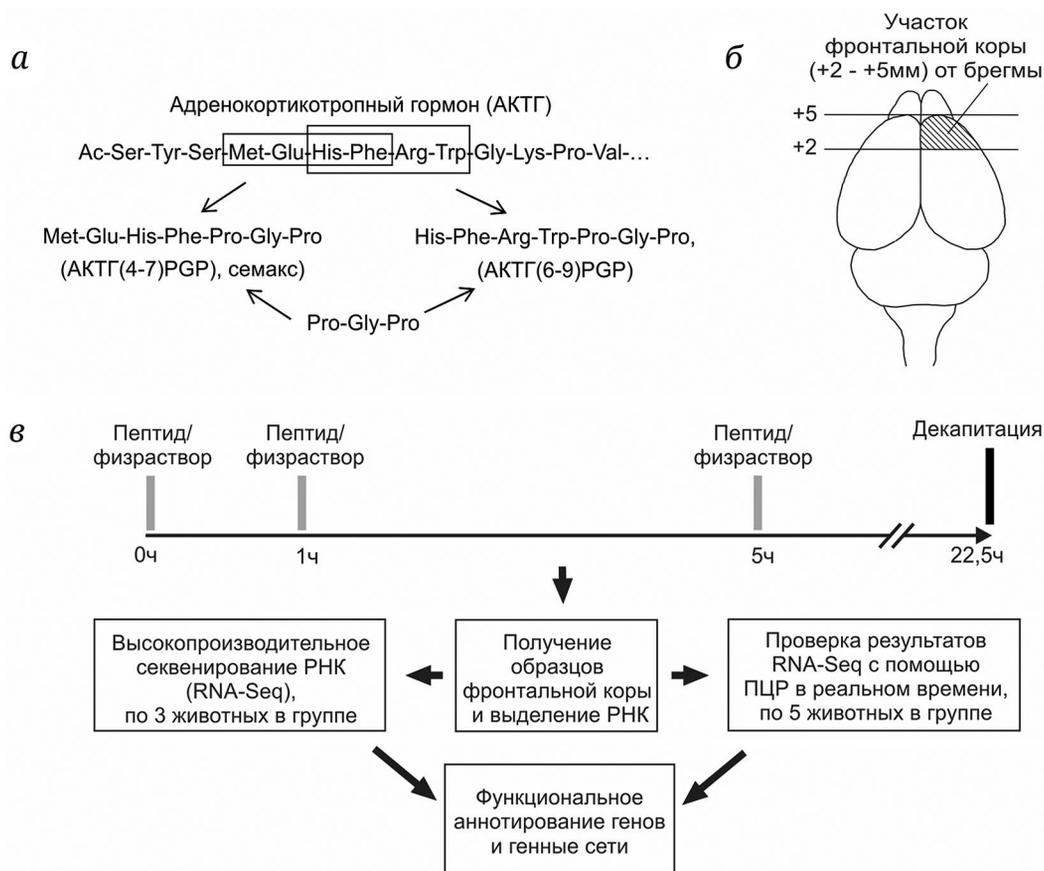


Рис. 1. Структура пептидов АКТГ(4–7)PGP (семакс) и АКТГ(6–9)PGP (а). Схематическое изображение среза мозга крысы с указанием штриховкой локализации участка лобной коры, взятого для секвенирования РНК (б). Схема исследования (в)

генетическими механизмами их действия в мозге в нормальных физиологических условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Белых 2-месячных самцов крыс Wistar массой 200–250 г содержали при 12-часовом цикле смены дня и ночи при температуре 22–24 °С со свободным доступом к пище и воде. Животные были случайным образом разделены на три группы: «норма + физраствор» (NV); «норма + семакс» (NS); «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA). Каждая группа включала по 5 животных. Схема исследования представлена на рис. 1, в.

Пептиды и их введение. АКТГ(4–7)PGP (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, семакс) и АКТГ(6–9)PGP (His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro) были синтезированы в Лаборатории молекулярной фармакологии пептидов НИЦ «Курчатовский институт».

Все животные получали трехразовые внутривенные инъекции пептидов (100 мкг на 1 кг массы животного) или физиологического раствора с интервалами в 1 ч и 4 ч. Объем разовой инъекции составлял 100 мкл на 100 г массы

животного. Физиологический раствор вводили в эквивалентном объеме в соответствующие сроки. Время, дозировка и способ введения пептидов были выбраны на основе предыдущих исследований [23–25, 27–30]. Животных выводили из эксперимента методом декапитации через 22,5 ч после первой инъекции.

Получение ткани. Из мозга крыс была извлечена область фронтальной коры (участок +2)–(+5) мм от брегмы), соответствующая области, содержащей жизнеспособные клетки и клетки с ишемическим повреждением у животных, подвергнутых tMCAO, как описано ранее [26]. На рис. 1, б показано схематическое изображение среза мозга с указанием локализации участка лобной коры, взятого для секвенирования РНК. Образцы данной ткани помещали в раствор RNAlater на 24 ч при 0 °С, а затем хранили при –70 °С.

Получение РНК. Из полученных образцов участка фронтальной коры крыс была выделена тотальная РНК при помощи реагента Trizol («Invitrogen» и «Thermo Fisher Scientific», США), согласно рекомендации производителя. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой 1 («Thermo Fisher Scientific») в присутствии ингибитора

Таблица 1. Характеристика праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность праймеров (5'-3'): прямой (F), обратный (R)	RefSeq	Длина (п.н.)	E ± SE
<i>Rt1-Da</i>	F: AGATGCCAATGTGATTCCAGAGGT R: ACAAACAACCCGAGAACA	NM_001008847	360	1,93 ± 0,03
<i>Rt1-Db1</i>	F: TCTGCTCTGTGAGTGACTTCTA R: GAAGTCCAGTCTCCATTT	NM_001008884	119	2,07 ± 0,06
<i>Rt1-Ba</i>	F: TGTGGAGGTCAAGACGACATT R: AAAGCAGATGAGGGTGT	NM_001008831	344	1,92 ± 0,03
<i>Cxcl13</i>	F: TCTACTGGCCATCTGCCTCC R: TAATACTTCTGCTTCGGACAAAT	NM_001017496	257	1,99 ± 0,05
<i>Cxcl9</i>	F: AGTCCGTTGCTCTATTCTCTCA R: TCTTTTGCTTTTCTTTTGGCT	NM_145672	294	2,03 ± 0,11
<i>Fos</i>	F: TGAAGAGGAAGAGAAACGGAGA R: ACTCTGGGGTGGTAGCCTCA	NM_022197.2	302	1,89 ± 0
<i>Drd1</i>	F: CATAGAGACGGTGAGCATTA R: TGTGTGTGACAGGTTGGAT	NM_012546	251	1,96 ± 0
<i>Drd2</i>	F: CCAGGATTGCCAAGTTCTT R: TTGACGGCACTGTTGACATA	NM_012547	262	1,95 ± 0
<i>Gapdh</i>	F: ACTTACCCACGGCAAGTTCAACG R: GTAGACTCCACGACATACTCAGCAC	NM_017008.4	148	2,01 ± 0,03
<i>Rpl3</i>	F: ATGGGTCCTTGGGCTTCTTG R: CACAATACCCACAACCACCA	NM_198753.2	239	1,90 ± 0,03

Примечание. E ± SE – эффективность ПЦР ± стандартная ошибка среднего; RefSeq – идентификатор референсной нуклеотидной последовательности мРНК; п.н. – пары нуклеотидов.

РНКаз RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific») в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли на приборе BioAnalyser с помощью RNA 6000 Nano Kit («Agilent», США). Показатель целостности РНК (RNA integrity number, RIN) был не менее 9.

Полногеномное секвенирование РНК (RNA-Seq). Фракцию полиА РНК получали из тотальной РНК при помощи олигоТ магнитных шариков Dynabeads® mRNA Purification Kit («Ambion», США). Далее, из полиА РНК были приготовлены библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® mRNA Library Prep Reagent Set («NEB», США). Концентрацию библиотек определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit 2.0 («Thermo Fisher Scientific»). Распределение длин фрагментов библиотеки проводили при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit («Agilent»). RNA-Seq проводили на приборе HiSeq1500 («Illumina», США) с генерацией не менее 10 млн коротких чтений длиной 1 × 50 нуклеотидов. Для RNA-Seq каждая группа (NV, NS и NA) включала по 3 животных (рис. 1, в).

Обработка результатов RNA-Seq. Для картирования и подсчета количества прочтений были использованы программы Tophat и Cufflinks. Уровень экспрессии генов рассчитывался как число фрагментов на килобазу, отнесенное на миллион прочтений (fragments per kilobase per million reads, FPKM) с использованием программы Cuffdiff. Дифференциально экспрессированными генами (ДЭГ) считались только те гены, которые изменили уровень своей экспрессии больше чем в 1,5 раза. Значимыми считались различия, имеющие значение вероятности *p* (*t*-тест), скорректированное с поправкой Бенджамини–Хохберга (*Padj*) < 0,05.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК). Синтез кДНК проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкг РНК, с использованием реагентов набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB», Литва) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа мРНК использовали праймеры Oligo(dT)₁₈.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Синтезированная кДНК была использована в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красите-

лем SYBR Green I («Евроген», Россия). Праймеры были подобраны с помощью Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) и синтезированы компанией «Евроген» (табл. 1). Амплификацию кДНК проводили на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System («Applied Biosystems», США), как описано ранее [16]. Каждая группа включала по 5 животных (рис. 1, в).

Обработка результатов ПЦР в реальном времени. Каждый образец кДНК анализировали трижды. Из трех повторных измерений было рассчитано среднее значение порогового цикла (Ct). Уровень мРНК гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*Gapdh*) и гена 60S-рибосомного белка L3 (*Rpl3*) был использован для нормализации результатов ПЦР. Одиночные пики на кривых плавления свидетельствовали, что при амплификации с каждой парой используемых праймеров синтезировался единственный продукт ПЦР. Расчеты были проведены с использованием Relative Expression Software Tool (REST) 2005 software [31]. Для оценки содержания исследуемых мРНК относительно мРНК генов сравнения была использована формула:

$$E^{Ct(\text{ref})} / E^{Ct(\text{tar})}, \quad (1)$$

где E – эффективность ПЦР-реакции; Ct(tar) – средняя величина порогового цикла амплификации (Ct) для исследуемых РНК; $E^{Ct(\text{ref})}$ – среднее геометрическое E^{Ct} для мРНК генов сравнения (*Gapdh* и *Rpl3*).

Эффективности ПЦР оценивали с использованием амплификации серии стандартных разведений кДНК. Значения эффективностей для всех реакций ПЦР находились в пределах 1,89–2,07 (табл. 1). При сравнении групп данных между собой статистически значимыми считались различия со значением вероятности $p < 0,05$ (two-sided Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test). Дополнительную обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel.

Анализ функциональных аннотаций генов. Программы для аннотации, визуализации и интегрированного обнаружения (DAVID v2021) [32] и для анализа обогащения наборов генов (GSEA) [33] использовались при аннотировании функций ДЭГ. При сравнении групп данных статистически значимые различия учитывали с вероятностью $Padj < 0,05$ (с поправкой Бенджамини–Хохберга в DAVID v2021 и FDR – в GSEA).

Иерархический кластерный анализ. Иерархический кластерный анализ ДЭГ проводился с использованием Heatmaper [34].

Генные сети. Программное обеспечение Cytoscape 3.9.2 использовалось для визуализации регуляторной сети [35].

Другие расчеты и построения, включая графики «Volcano-plot», были построены с помощью Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft, США).

Доступность данных и материалов. Данные RNA-Seq были депонированы в базу данных Sequence Read Archive под кодом доступа PRJNA1086759 (<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA1086759?reviewer=fbc3pamv9qhevsbek8nug5oh75>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

RNA-Seq-анализ влияния АКТГ-подобных пептидов на транскриптом участка фронтальной коры крыс. В результате RNA-Seq были получены данные об изменении уровня мРНК под действием семакса и АКТГ(6–9)PGP для 17 367 генов крысы. Графики «volcano-plot» иллюстрируют различия в экспрессии мРНК между группами NS относительно (vs.) NV (рис. 2, а) и NA vs. NV (рис. 2, б). Мы обнаружили 258 ДЭГ (кратность $> 1,5$; $Padj < 0,05$) под действием семакса в группе NS vs. NV. Из них 105 генов (*Lefty2*, *Bc1*, *Pisma8*, *ErbB4*, *Kcnh5* и др.) повысили уровень экспрессии и 153 гена понизили его (*Cyp4a8*, *Nphs1*, *Prlr*, *Trim31*, *Cd247* и др.). Величины дифференциальной экспрессии перечисленных генов представлены на рис. 2, в. Также мы обнаружили 228 ДЭГ под действием АКТГ(6–9)PGP в группе NA vs. NV. Из них 44 гена, в том числе *Lefty2*, *Bc1*, *Pisma8*, *Morf411*, *Cdc6*, повысили уровень экспрессии и 184 гена, включая *Mis18a*, *Plac8*, *Nphs1*, *Prlr*, *Cd247*, понизили его. Величины дифференциальной экспрессии перечисленных генов представлены на рис. 2, г.

Для проверки результатов RNA-Seq на расширенной выборке животных мы использовали ПЦР в реальном времени. В анализ были взяты гены, изменившие экспрессию в соответствии с критерием отбора $Padj < 0,05$ (*Cxcl9*, *Cxcl13*, *Rt1-Ba*, *Rt1-Da*, *Rt1-Db1*) и $p < 0,05$ (*Fos*, *Drd1*, *Drd2*) в сравнении NS vs. NV. Результаты ПЦР в реальном времени адекватно соответствовали результатам RNA-Seq и проиллюстрированы на рис. П1 в Приложении 1.

Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением семакса и АКТГ(6–9)PGP крысам. На следующем этапе нами было проведено сравнение спектров ДЭГ, изменивших уровень мРНК под действием семакса (NS vs. NV) и АКТГ(6–9)PGP (NA vs. NV) в участке фронтальной коры крыс. На рис. 3, а в форме диаграммы Венна показан 161 ДЭГ, обнаруженные в обоих сравнениях. Все гены сопоставлено изменили уровень как в ответ на семакс, так и АКТГ(6–9)PGP в участке фронтальной коры крыс. На диаграммах Венна

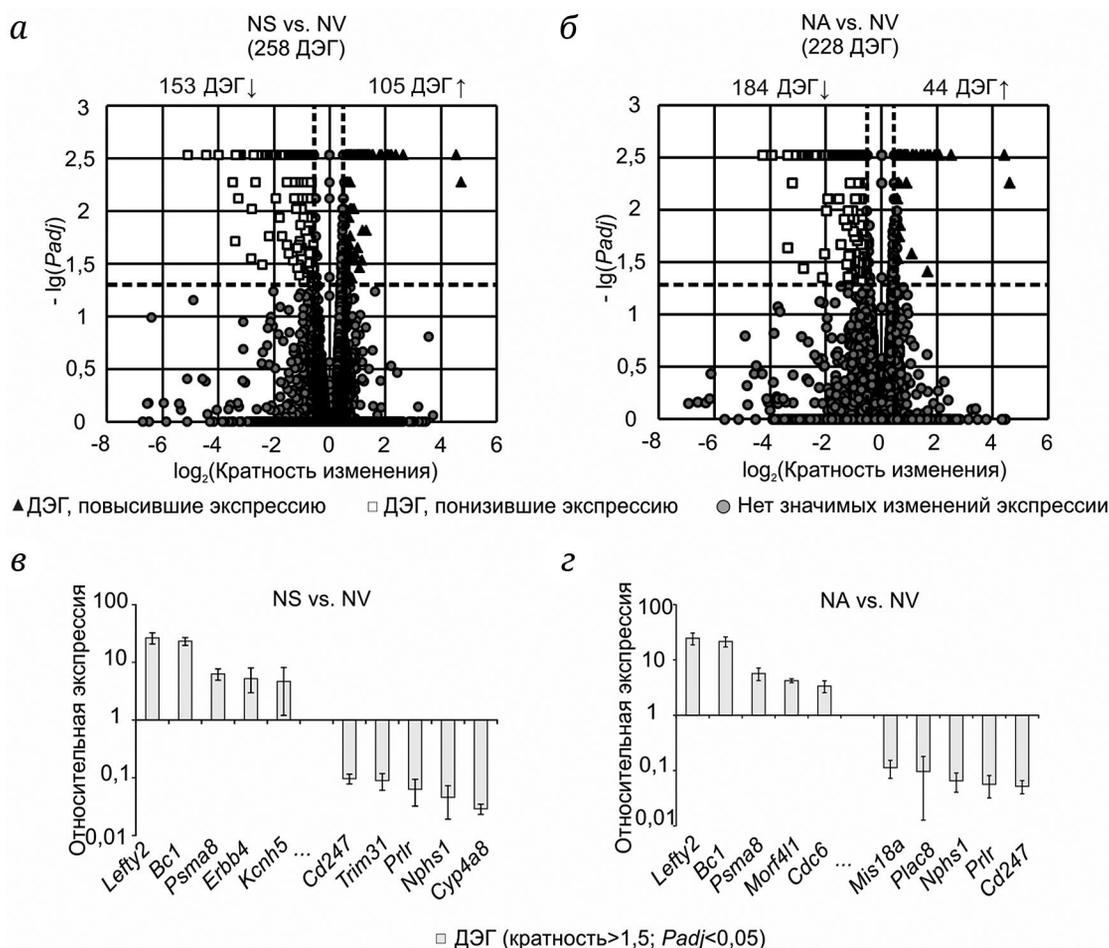


Рис. 2. RNA-Seq-анализ влияния семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс. Графики «volcano-plot» иллюстрируют различия в экспрессии мРНК между группами «норма + семакс» (NS) и «норма + физраствор» (NV) (а), а также «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA) и «норма + физраствор» (NV) (б). Представлено по 10 ДЭГ, которые продемонстрировали наибольшее кратное изменение экспрессии в сравнениях NS vs. NV (в) и NA vs. NV (г). В каждую группу сравнения входило по 3 животных. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего

показаны ДЭГ, только повысившие (рис. 3, б) и только понизившие (рис. 3, в) уровень мРНК в изучаемых группах сравнения. Так, в числе повысивших экспрессию ДЭГ в обеих группах сравнения с максимальной кратностью изменений выявлены, в частности, гены *Lefty2*, *Bc1*, *Psma8*, *Morf4l1*, *Slc1a2*, а в числе понизивших экспрессию – *Cd247*, *Trnm31*, *Prlr*, *Nphs1*, *Plac8*, *Mx2* (рис. 3, г).

Были выявлены также гены, которые изменили экспрессию в ответ на введение только одного из пептидов. Для семакса было 97 таких генов (рис. 3, а), в первые 10 генов с максимальной кратностью изменений вошли гены *ErbB4*, *Kcnh5*, *Lnpep*, *Fzd3*, *Casna1e* из числа повысивших и *Nek8*, *Sla*, *Fos*, *Klhl14*, *Gzmb* из числа понизивших экспрессию в NS vs. NV (рис. 3, д). Для АКТГ(6–9)PGP – 67 генов, которые были в числе изменивших экспрессию в сравнении NA vs. NV, но не входили в число ДЭГ в сравнении NS vs. NV (рис. 3, а). Среди них гены *Nr4a2*, *Etaa1*, *Strn3*, *Cnr2*, *Ifit2*, *Eif4ebp3*,

Trh, *Eya2*, *Cd68*, *Ifi35* были в числе первых 10 генов с максимальной кратностью изменений экспрессии в NA vs. NV (рис. 3, е).

Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением АКТГ(6–9)PGP крысам относительно действия семакса. В условиях эксперимента в участке фронтальной коры крыс после введения АКТГ(6–9)PGP по сравнению с группой животных, получавшей семакс (NA vs. NS), мы выявили 36 ДЭГ (3 повысивших и 33 снизивших экспрессию). График «volcano plot» иллюстрирует различия в экспрессии мРНК между группами NA и NS (рис. 4, а). Отдельно 10 генов (*Cacng8*, *Fos*, *Arc*, *Slc1a2*, *Lmbrd2*, *Fzd3*, *Slc9a7*, *Kcnh5*, *Lnpep*, *ErbB4*) с максимальной кратностью изменений экспрессии в сравнении NA vs. NS показаны на рис. 4, б.

Величины дифференциальной экспрессии всех ДЭГ, выявленных при действии изучаемых пептидов в NS vs. NV, NA vs. NV и NA vs. NS, представлены в табл. П1 в Приложении 2. Результаты

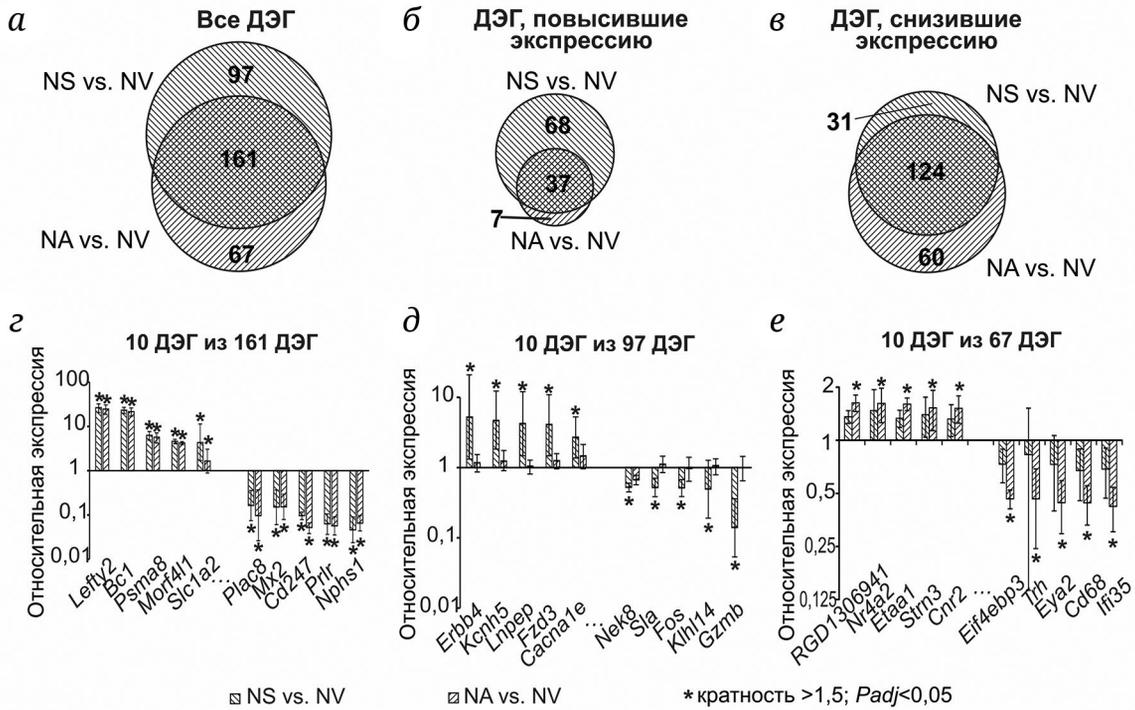


Рис. 3. Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением семакса и АКТГ(6–9)PGP. Диаграммы Венна (а–в) иллюстрируют результаты, полученные для двух попарных сравнений «норма + семакс» (NS) vs. «норма + физраствор» (NV) и «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA) vs. «норма + физраствор» (NV): для всех ДЭГ (а), только для повысивших экспрессию (б) и только для понизивших экспрессию (в). Числа в пересечении различных наборов генов на диаграмме Венна указывают количество ДЭГ (кратность > 1,5; Padj < 0,05) по данным RNA-Seq. Показаны величины относительной экспрессии для 10 генов из каждого сегмента на диаграмме Венна (панель а): гены с наибольшим кратным изменением экспрессии в NS vs. NV и лежат в пределах пересечения наборов ДЭГ (г); ДЭГ с наибольшим кратным изменением экспрессии в NS vs. NV, но не являющиеся ДЭГ в NA vs. NV (д); ДЭГ с наибольшим кратным изменением экспрессии в NA vs. NV, но не являющиеся ДЭГ в NS vs. NV (е). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего

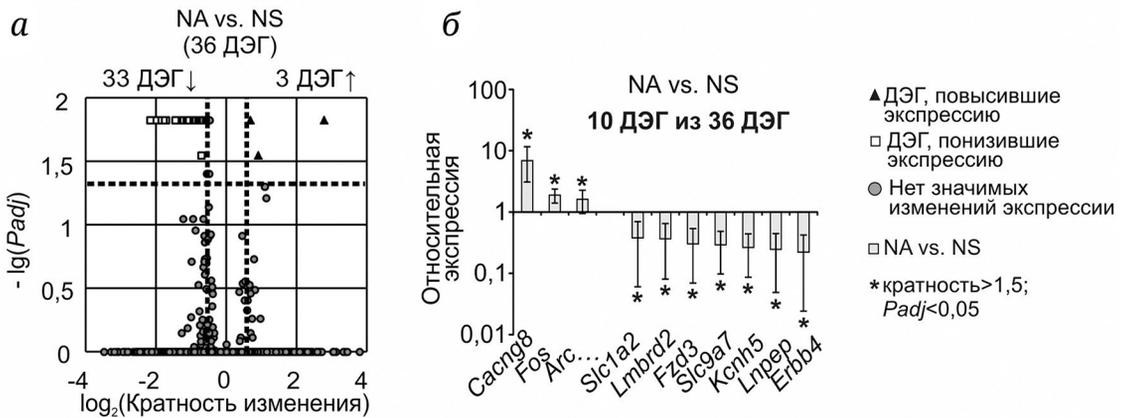


Рис. 4. Сравнение результатов RNA-Seq в экспериментах с введением АКТГ(6–9)PGP относительно действия семакса. График «volcano-plot» иллюстрирует различия в экспрессии мРНК между группами «норма + АКТГ(6–9)PGP» (NA) и «норма + семакс» (NS) (а). Представлены 10 генов, которые продемонстрировали наибольшее кратное изменение экспрессии в сравнении NA vs. NS (кратность > 1,5; Padj < 0,05) по данным RNA-Seq (б)

иерархического кластерного анализа этих генов проиллюстрированы на рис. П2 в Приложении 1, выражая как общие, так и специфические черты действия каждого из пептидов на транскриптом участка фронтальной коры крыс.

Функциональные аннотации ДЭГ, связанных с влиянием АКТГ-подобных пептидов. Списки ДЭГ, полученные на предыдущем этапе, были обработаны нами в программе анализа функционального обогащения DAVID v2021. Было выяв-

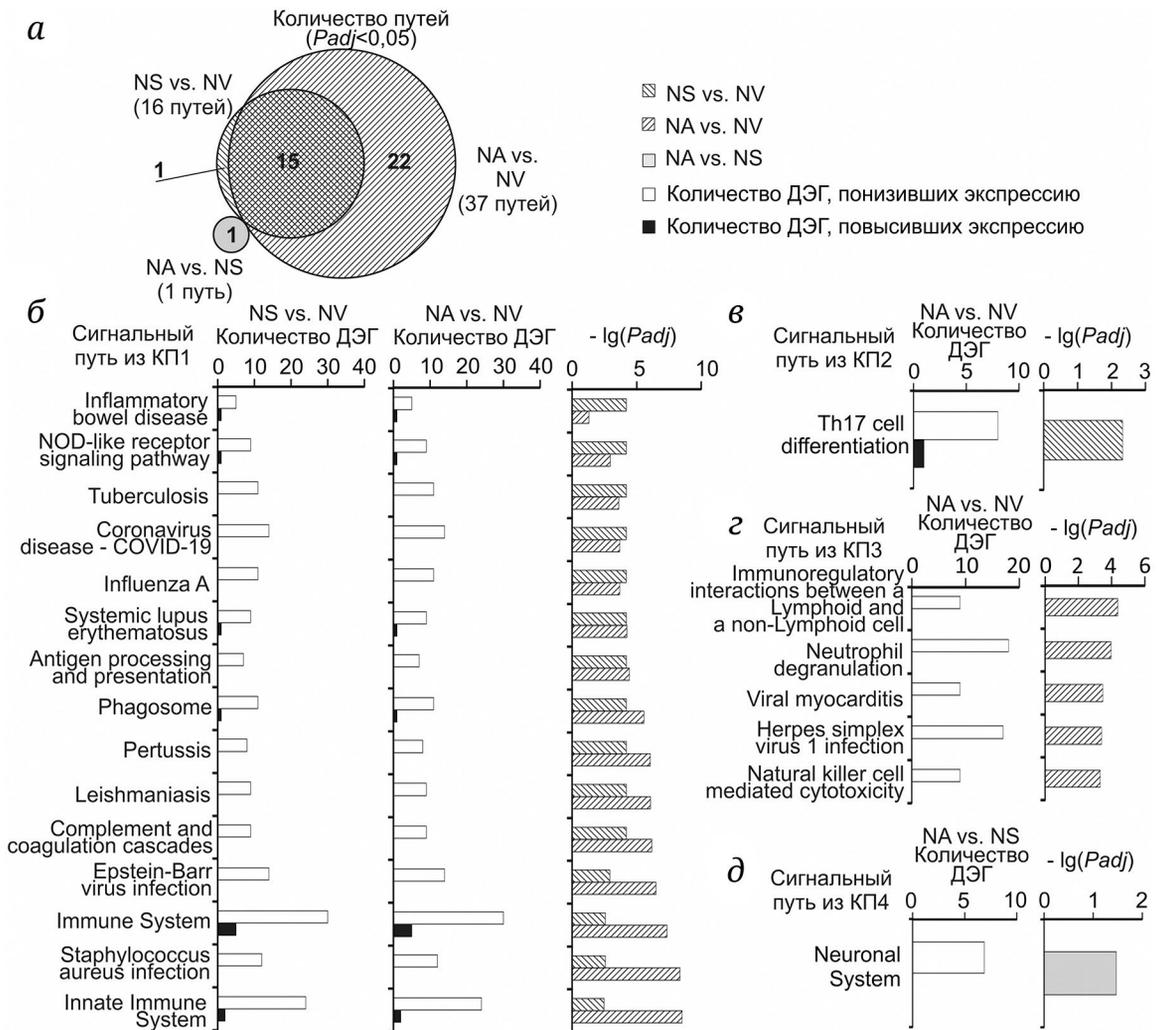


Рис. 5. Сигнальные пути, связанные с влиянием семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс. Анализ проводился с помощью программы DAVID v2021. Схематическое сравнение аннотаций (путей), связанных с ДЭГ, полученных в трех парных сравнениях NS vs. NV, NA vs. NV и NA vs. NS в форме диаграммы Венна (а). Количество аннотаций указано цифрами в сегментах диаграммы. Показаны сигнальные пути, лежащие в сегментах на диаграмме Венна: общие для сравнений NS vs. NV и NA vs. NV (б), а также специфичные для сравнений NS vs. NV (в), NA vs. NV (г) и NA vs. NS (д). На панелях (б), (в) и (д) показаны все пути, лежащие в соответствующем сегменте на диаграмме Венна, а на панели (г) – только 5 из 22 путей с минимальной величиной P_{adj} (значение p , скорректированное с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга) в NA vs. NV. Для каждого пути представлены значения P_{adj} , а также количество повысивших и понизивших экспрессию генов в соответствующем попарном сравнении. Для анализа были выбраны только ДЭГ и пути с $P_{adj} < 0,05$. В каждую группу сравнения входило по 3 животных. Inflammatory bowel disease – воспалительное заболевание кишечника; NOD-like receptor signaling pathway – сигнальный путь NOD-подобного рецептора; Tuberculosis – туберкулез; Coronavirus disease – COVID-19 (коронавирусная болезнь); Influenza A – грипп А; Systemic lupus erythematosus – системная красная волчанка; Antigen processing and presentation – обработка и презентация антигена; Phagosome – фагосома; Pertussis – коклюш; Leishmaniasis – лейшманиоз; Complement and coagulation cascades – каскады комплемента и коагуляции; Epstein-Barr virus infection – инфекция вируса Эпштейна–Барр; Immune System – иммунная система; Staphylococcus aureus infection – инфекция золотистого стафилококка; Innate Immune System – врожденная иммунная система; Th17 cell differentiation – дифференцировка клеток Т-хелперов 17; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell – иммунорегуляторные взаимодействия между лимфоидными и нелимфоидными клетками; Neutrophil degranulation – дегрануляция нейтрофилов; Viral myocarditis – вирусный миокардит; Herpes simplex virus 1 infection – инфекция вируса простого герпеса 1; Natural killer cell mediated cytotoxicity – цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами; Neuronal System – нейронная система

лено 1, 16 и 37 сигнальных путей, аннотированных в терминах баз данных KEGG PATHWAYS и REACTOME PATHWAYS и ассоциированных с ДЭГ в

группах сравнения NA vs. NS, NS vs. NV и NA vs. NV соответственно (рис. 5, а). Так, в группе сравнения NS vs. NV наибольшей значимостью обладали

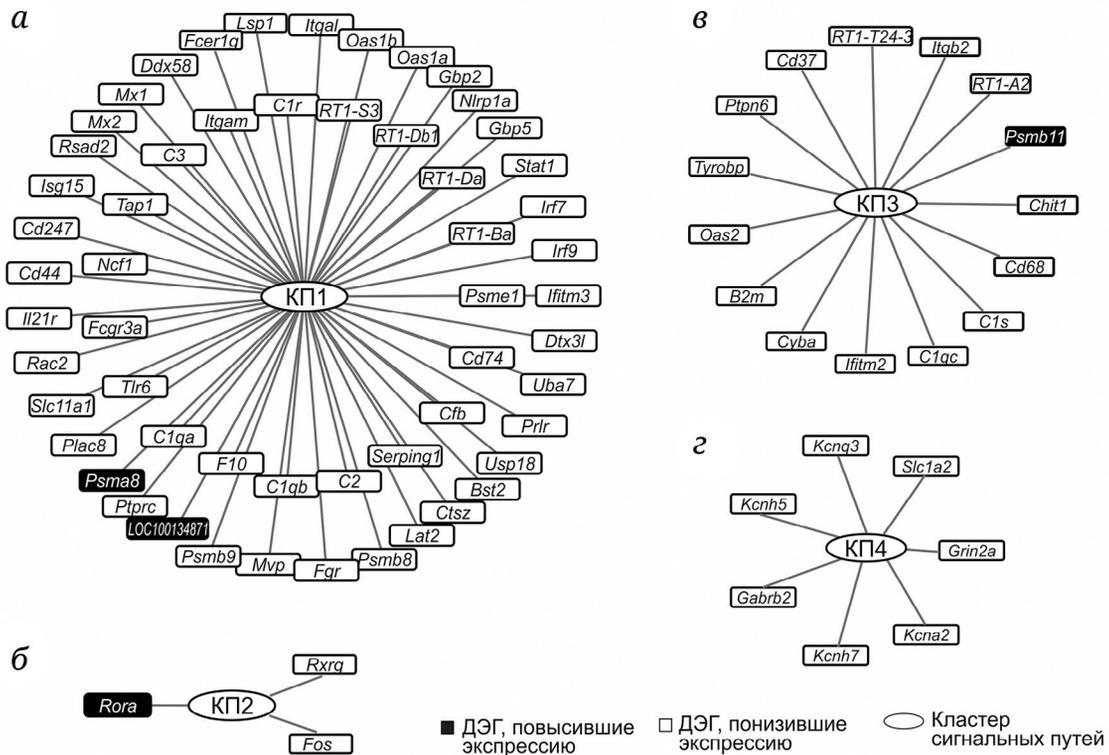


Рис. 6. Сети, отражающие общие и специфичные эффекты семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс. Показаны только гены, которые изменили экспрессию под действием как семакса, так и АКТГ(6–9)PGP (NS vs. NV и NA vs. NV) (а); только под действием семакса (NS vs. NV), но не АКТГ(6–9)PGP (NA vs. NV) (б); только под действием АКТГ(6–9)PGP (NA vs. NV), но не семакса (NS vs. NV) (в); под действием АКТГ(6–9)PGP относительно семакса (NA vs. NS) (г). Данные группы генов (а–г) вовлечены в презентацию КП1–КП4 соответственно. На схемах гены представлены в прямоугольных блоках, окрашенных в соответствии с дифференциальной экспрессией генов в группах сравнения – NS vs. NV (а и б), NA vs. NV (в), NA vs. NS (г). Пути обозначены белыми овалами. Линии, соединяющие гены и пути, указывают на участие белковых продуктов генов в функционировании пути. Программа DAVID v2021 использовалась для аннотирования функций ДЭГ в терминах путей из баз данных KEGG и REACTOME. Сеть была построена с использованием Cytoscape 3.9.2

пути, связанные с иммунным и воспалительным ответом, включая путь системы комплемента и коагуляции (Complement and coagulation cascades). В число наиболее значимых сигнальных путей в группе сравнения NA vs. NV были системы комплемента и коагуляции, врожденная иммунная система (Innate Immune System), иммунная система (Immune System), также системы, связанные с иммунной. Все перечисленные пути были связаны преимущественно с понизившими экспрессию ДЭГ как в сравнении NS vs. NV, так и в NA vs. NV и входили в 15 путей, являющихся общими для действия обоих пептидов (рис. 5, а и б). Эти пути, характеризующие общее влияние семакса и АКТГ(6–9)PGP на транскриптом участка фронтальной коры крыс, были обозначены нами как первый кластер путей (КП1).

Семакс в группе сравнения NS vs. NV был связан с модуляцией активности пути клеточной дифференцировки Т-хелперов 17 (Th17 cell differentiation). Этот путь не был выявлен в случае АКТГ(6–9)PGP в сравнении NA vs. NV (рис. 5, а и в)

и был отнесен нами ко второму кластеру путей (КП2). Вместе с тем специфичными для действия АКТГ(6–9)PGP были 22 пути (рис. 5, а) – третий кластер путей (КП3). Среди них дегрануляция нейтрофилов (Neutrophil degranulation), вирусный миокардит (Viral myocarditis) и цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами (Natural killer cell mediated cytotoxicity) были в числе 5 путей с максимальной значимостью ассоциации (рис. 5, г).

При изучении влияния АКТГ(6–9)PGP в сравнении с семаксом (NA vs. NS) была выявлена ассоциация ДЭГ с путем нейронной системы (Neuronal System), отнесенным нами к четвертому кластеру путей (КП4) (рис. 5, а и д). Другой инструмент, GSEA, который предоставляет информацию об обогащении с использованием более мягкого статистического подхода (FDR, $q < 0,05$), в сравнении NA vs. NS выявил 7 путей, прежде всего, связанных с активностью систем передачи нервного импульса – нейронная система, потенциалзависимые калиевые каналы (Voltage gated Potassium

channels), передача через химические синапсы (Transmission across Chemical Synapses) и другие.

Генные сети, характеризующие общее и специфическое влияние АКТГ-подобных пептидов на транскриптом участка фронтальной коры крыс. На рис. 6 представлены генные сети, характеризующие вовлеченность генов в презентацию сигнальных путей, отнесенных нами к кластерам путей, характеризующих эффекты пептидов (КП1–КП4) в соответствии с диаграммой Венна (рис 5, а). В презентации этих путей участвовало 98 генов, которые изменили экспрессию хотя бы в одной из групп сравнения (NS vs. NV, NA vs. NV, NA vs. NS).

КП1 характеризовал общие эффекты семакса и АКТГ(6–9)PGP (рис. 6, а). В кластер вошли 56 генов, которые изменили экспрессию как под действием семакса, так и АКТГ(6–9)PGP, причем изменение экспрессии этих генов в сравнениях NS vs. NV и NA vs. NV было сонаправлено. Гены преимущественно понизили экспрессию под действием пептидов (рис. 6, а). В сеть, связанную с КП1, вошло большинство генов (*Cd247*, *RT1-Ba*, *RT1-Da*, *RT1-Db1*, *Stat1* и др.), которые кодировали белки, участвующие в презентации путей из нескольких кластеров. Вместе с тем были и гены, связанные только с одним из кластеров путей. Из них было 13 генов (*Cfb*, *F10*, *Gbp2*, *Gbp5*, *Isg15*, *Lat2*, *Lsp1*, *Ncf1*, *Nlrp1a*, *Prlr*, *Tlr6*, *Usp18*), которые участвовали только в презентации путей из КП1.

КП2 включал только один путь клеточной дифференцировки Т-хелперов 17, отражая специфические эффекты семакса. В презентации пути участвовало 3 гена (*Rxrg*, *Fos* и *Rora*), из которых только ген *Rora* повысил, а остальные снизили экспрессию в NS vs. NV, не изменив при этом экспрессию в сравнении NA vs. NV (рис. 6, б). Ген *Rxrg*, кодирующий гамма-рецептор ретиноида X, был к тому же единственным геном, связанным с путями только внутри КП2.

КП3 характеризовал специфические эффекты АКТГ(6–9)PGP (рис. 6, в). В кластер вошли 15 генов (*Psmb11*, *RT1-A2*, *Itgb2*, *RT1-T24-3*, *Cd37*, *Ptpn6*, *Tyrobp*, *Oas2*, *B2m*, *Syba*, *Ifitm2*, *C1qc*, *C1s*, *Cd68*, *Chit1*), которые изменили экспрессию в NA vs. NV, но не в NS vs. NV (рис. 6, в). Среди них гены *Spn* и *Cd37* участвовали только во взаимодействиях внутри КП3.

КП4 также характеризовал уникальное влияние АКТГ(6–9)PGP при использовании семакса в качестве пептида сравнения (рис. 6, г). Путь нейронной системы, составляющий КП4, был ассоциирован с 7 генами (*Slc1a2*, *Grin2a*, *Gabbr2*, *Kcna2*, *Kcna3*, *Kcnh7* и *Kcnh5*), которые снизили экспрессию в NA vs. NS (рис. 6, г). Все эти гены (кроме *Grin2a*) были вовлечены только во внутрикластерные взаимодействия в КП4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе с помощью RNA-Seq было изучено влияние двух синтетических АКТГ-подобных пептидов – семакса и АКТГ(6–9)PGP – на транскриптом участка фронтальной коры мозга крыс через 22,5 ч после трехкратного внутрибрюшинного введения. Ранее при изучении влияния данных пептидов на транскриптом гиппокампа через 6 ч после однократного внутрибрюшинного введения крысам мы не наблюдали значимой дифференциальной экспрессии генов [16]. По всей видимости, текущий результат выявления более двух сотен ДЭГ, помимо различий, связанных со специфическими особенностями гиппокампа и лобной коры, вызван как большим количеством введенных пептидов, так и большим временем, прошедшим после их введения. В настоящем исследовании гены, экспрессия которых изменилась в ответ на воздействие пептидов на интактных животных, были кластеризованы по функциональным группам метаболических путей. Оба пептида вызывали преимущественное снижение экспрессии генов, связанных с иммунной системой. Презентацию кластера общих эффектов пептидов (КП1) обеспечивали, прежде всего, гены, кодирующие компоненты главного комплекса гистосовместимости и системы комплемента (*RT1-Ba*, *RT1-Da*, *RT1-Db1*, *RT1-S3*, *C1qa*, *C1r*, *C3*). Как известно, нейропептиды играют существенную роль в регуляции и модулировании иммунного ответа. Среди них такие пептиды, как тахикинины, кальцитонин-ген-связанный пептид, вазоактивный интестинальный полипептид, гипофизарный аденилатциклаза-активирующий полипептид, урокортин, адреномедуллин, соматостатин, кортистатин, грелин, галанин и опиоидные пептиды, в том числе имеющие значение в медицине [36]. Семакс и АКТГ(6–9)PGP характеризуются, прежде всего, как пептиды с нейропротективными эффектами в отношении событий ишемического инсульта и неврологических нарушений [12, 18]. Ранее мы определили, что семакс в мозге крыс модулирует экспрессию генов, кодирующих белки иммунного ответа и медиаторы воспаления в условиях моделей ишемического инсульта – необратимой (рМCAO) и обратимой (тМCAO) фокальной ишемии [23, 24, 37]. Так, под действием семакса с помощью RNA-Seq нами было выявлено подавление экспрессии генов *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* и *Cxcl2* через 24 ч после тМCAO в подкорковых структурах мозга, содержащих очаг повреждения [23, 37]. Также с помощью микрочипов мы выявили снижение экспрессии генов (*C2*, *Cd68*, *RT1-Db1*, *RT1-Ba*, *RT1-A1*, *RT1-CE15*) через 3 ч после рМCAO в лобной коре поврежденного левого полушария крыс под действием семакса [24]. Как показано нами в настоящем исследовании,

многие из перечисленных генов также снижают экспрессию под действием семакса в норме. Интересные результаты были получены нами ранее при изучении влияния семакса и АКТГ(6–9)PGR на транскриптом участка фронтальной коры через 4,5 ч после tMCAO у крыс [26]. Было показано, что пептиды влияют на экспрессию генов иммунной системы, но каждый со своими особенностями. Пептид АКТГ(6–9)PGR преимущественно оказывал компенсаторное действие на экспрессию генов иммунной системы, предотвращая соответствующее влияние ишемии. В то же время отмечалось гетерогенное влияние семакса на экспрессию генов иммунной системы – на одни гены семакс оказывал влияние, противоположное действию ишемии, а на другие – влияние, сонаправленное эффекту самой ишемии [26]. При сравнении транскриптомных профилей генов участка фронтальной коры крыс, полученных через 4,5 ч после tMCAO, и в настоящем исследовании мы заметили только единичные общие гены, модулирование активности которых вызывали пептиды как при ишемии, так и в норме. Обращают на себя внимание 8 генов (*RT1-Ba*, *RT1-Da*, *RT1-Db1*, *Xkr6*, *Clk2*, *Cd74*, *C3*, *Trdn*), которые изменили экспрессию под действием обоих пептидов как в норме, так и при ишемии. Также было обнаружено несколько генов (*Rac2*, *Doc2g*, *Prkd3*, *Pkn3*, *Dnajb14*, *Dlx2*, *Drd2*, *Cdhr1*, *Calb2* и др.), которые изменили экспрессию только при действии одного из пептидов, но как в норме, так и при ишемии. При этом общие гены преимущественно относятся к группе снизивших экспрессию под действием пептидов.

В настоящем исследовании, помимо общего эффекта семакса и АКТГ(6–9)PGR, мы выделили еще 3 кластера сигнальных путей, отражающих специфическое влияние каждого из пептидов. Следует отметить, что были найдены гены, которые участвуют в презентации только путей, относящихся к конкретному кластеру и, вероятно, смогут составлять набор транскриптомных маркеров эффектов пептидов. Семакс в норме влиял на экспрессию генов пути дифференциации Th17, который составлял КП2. Это путь не был выявлен в группе с введением АКТГ(6–9)PGR. Данный путь определяет процесс контроля воспалительных реакций и пластичности иммунной системы [38, 39]. Действие некоторых соединений также приводит к модуляции активности данного пути. Было показано, что блокирование образования клеток Th17 с помощью введения белка V7-N4.Ig эффективно подавляет развитие сахарного диабета у мышей [40]. Кроме того, флувоксамин ингибирует поляризацию и функцию Th1 и Th17, подавляя гликолиз, замедляя аутоиммунное прогрессирование при диабете 1-го типа [41]. Следует отметить, что путь клеточной дифференцировки

T-хелперов 17 был также в числе специфичных для семакса при изучении его влияния на транскриптом участка фронтальной коры через 4,5 ч после tMCAO [26]. В этой связи не исключено, что одними из уникальных мишеней действия семакса могут быть рецепторы V7-N4, регулирующие T-клеточный иммунитет.

Мы показали, что в норме АКТГ(6–9)PGR оказывал влияние на целый спектр из 22 путей, связанных с иммунитетом, на которые семакс не влиял. Среди них пути дегрануляции нейтрофилов, вирусного миокардита, цитотоксичность, опосредованная естественными клетками-киллерами, формирующие КП3. Следует отметить, что АКТГ(6–9)PGR через 4,5 ч после tMCAO вызывал изменения экспрессии генов, связанных с активностью только 4 путей [26]. Кроме того, при сравнении группы с введением АКТГ(6–9)PGR с группой крыс, получавших инъекцию семакса, мы обнаружили 36 генов, которые значительно изменили экспрессию. Эти гены были ассоциированы с активностью систем нейросигнализации, формируя кластер нейронная система (КП4). Только 5 из данных генов (*Slc1a2*, *Phc3*, *Rc3h2*, *Gabrb2*, *Kcna2*) были ДЭГ также и через 4,5 ч после tMCAO в соответствующей группе сравнения, причем сонаправлено снизив экспрессию в обоих случаях. Влияние пептидов, в том числе синтетического происхождения, на активность системы нейросигнализации показано во многочисленных исследованиях [42–48]. Так, пептиды R1-Пер и PP2A-Пер ингибируют взаимодействие рецепторов γ -аминомасляной кислоты с ферментами, участвующими в их фосфорилировании [42, 43]. Нами было показано, что в подкорковых структурах мозга через 24 ч после tMCAO семакс активирует экспрессию генов *Cplx2*, *Chrm1*, *Gabra5*, *Gria3*, *Neurod6*, *Ptk2b*, связанных с передачей нервного импульса [23, 49]. Такой эффект семакса мог быть связан с PGR-фрагментом на его C-конце, так как в соответствующем эксперименте сам пептид PGR значимо повышал экспрессию гена *Gabra5* и при этом не вызывал значимых изменений экспрессии генов кластера нейросигнализации относительно действия семакса [49]. В настоящей работе мы показали различную реакцию генов нейросигнализации на введение пептидов, отличающихся последовательностью АКТГ-фрагмента. В частности, АКТГ(4–5) (Met-Glu) присутствовал только в семаксе, а АКТГ(8–9) (Arg-Trp) присутствовал только в пептиде АКТГ(6–9)PGR. Поэтому проявление специфичных для семакса и АКТГ(6–9)PGR эффектов, как в норме, так и в условиях ишемии, может быть обусловлено уникальными последовательностями из АКТГ в их структурах.

Вопрос о том, как именно семакс и АКТГ(6–9)PGR передают свой эффект на уровень геномной

активности остается во многом не решенным. Рассматривают модель, в которой пептиды или их метаболиты взаимодействуют с аллостерическими сайтами на мембранных рецепторах и обеспечивают передачу сигнала в ядро по системе сигнальных путей, влияя на экспрессию тех или иных генов [50, 51]. Изучение влияния пептидов на экспрессию генов на уровне мРНК дает лишь часть сведений об их молекулярно-генетических эффектах. Важным является изучение роли некодирующих РНК (микроРНК, длинных некодирующих РНК, циклических РНК), а также белков, обеспечивающих процессы регуляции экспрессии генов. Мы полагаем, что дальнейший интегративный молекулярно-генетический и протеомный функциональный анализ в клетках мозга позволит установить регуляторные аспекты, определяющие активность пептидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые изучено влияние двух нейропептидов, производных АКТГ, – семакса и АКТГ(6–9)PGR, отличающихся деталями структуры, на транскриптом клеток мозга у интактных животных. В результате были выявлены гены и метаболические системы, которые характеризуют как общие, так и специфические эффекты пептидов. Полученные результаты способствуют выяснению зависимости нейропротективных эффектов АКТГ-подобных пептидов от их структуры и должны учитываться при изучении их влияния при патологии.

Вклад авторов. И.Б. Филиппенков, Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, Н.Г. Левицкая, Л.В. Дергунова – планирование экспериментов; И.Б. Филиппенков, Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, В.В. Ставчанский, Л.А. Андреева – постановка экспериментов; И.Б. Филиппенков – написание манускрипта; Н.Г. Левицкая, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова – редактирование манускрипта; С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоедов, Л.В. Дергунова – концептуализация и руководство исследованием.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Тематического плана НИОКР НИЦ «Курчатовский институт» 5Ф.5.9 (биоинформатическая обработка данных), а также при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-14-00027; анализ экспрессии генов).

Благодарности. В работе использовали оборудование ресурсных центров НИЦ «Курчатовский институт» и МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы благодарят А.Э. Голубович за помощь в обработке данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики» (Приказ МЗ РФ № 199 от 01.04.2016) и требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента от 22.09.2010.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee, A. C. L., Harris, J. L., Khanna, K. K., and Hong, J. H. (2019) A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2383, <https://doi.org/10.3390/ijms20102383>.
2. Apostolopoulos, V., Bojarska, J., Chai, T. T., Elnagdy, S., Kaczmarek, K., Matsoukas, J., New, R., Parang, K., Lopez, O. P., Parhiz, H., Perera, C. O., Pickholz, M., Remko, M., Saviano, M., Skwarczynski, M., Tang, Y., Wolf, W. M., Yoshiya, T., Zabrocki, J., Zielenkiewicz, P., AlKhazindar, M., Barriga, V., Kelaidonis, K., Sarasia, E. M., and Toth, I. (2021) A global review on short peptides: frontiers and perspectives, *Molecules.*, **26**, 430, <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>.
3. Lubell, W. D. (2022) Peptide-based drug development, *Biomedicines*, **10**, 2037, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10082037>.
4. Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., and Fu, C. (2022) Therapeutic peptides: current applications and future directions, *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **7**, 48, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.
5. Deigin, V. I., Poluektova, E. A., Beniashvili, A. G., Kozin, S. A., and Poluektov, Y. M. (2022) Development of peptide biopharmaceuticals in Russia, *Pharmaceutics*, **14**, 716, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040716>.
6. Starowicz, K., and Przewłocka, B. (2003) The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception, *Life Sci.*, **73**, 823-847, [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00349-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00349-7).
7. Adan, R. A. H., and Gispen, W. H. (1997) Brain melanocortin receptors: from cloning to function, *Peptides*, **18**, 1279-1287, [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00078-8).
8. Catania, A., Gatti, S., Colombo, G., and Lipton, J. M. (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 1-29, <https://doi.org/10.1124/pr.56.1.1>.

9. Cone, R. D. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system, *Nat. Neurosci.*, **8**, 571-578, <https://doi.org/10.1038/nn1455>.
10. Giuliani, D., Minutoli, L., Ottani, A., Spaccapelo, L., Bitto, A., Galantucci, M., Altavilla, D., Squadrito, F., and Guarini, S. (2012) Melanocortins as potential therapeutic agents in severe hypoxic conditions, *Front. Neuroendocrinol.*, **33**, 179-193, <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.04.001>.
11. Wikberg, J. (2001) Melanocortin receptors: new opportunities in drug discovery, *Exp. Opin. Ther. Patents*, **11**, 61, <https://doi.org/10.1517/13543776.11.1.61>.
12. Гусев Е. И., Мартынов М. Ю., Костенко Е. В., Петрова Л. В., Бобырёва С. Н. (2018) Эффективность семакса при лечении больных на разных стадиях ишемического инсульта, *Журн. Неврол. Психиатр.*, **3**, 61-68.
13. Potaman, V. N., Alfeeva, L. Y., Kamensky, A. A., Levitzkaya, N. G., and Nezavibatko, V. N. (1991) N-terminal degradation of ACTH(4-10) and its synthetic analog semax by the rat blood enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 741-746, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80247-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80247-5).
14. Agapova, T. Y., Agniullin, Y. V., Shadrina, M. I., Shram, S. I., Slominsky, P. A., Lymborska, S. A., and Myasoedov, N. F. (2007) Neurotrophin gene expression in rat brain under the action of Semax, an analogue of ACTH 4-10, *Neurosci. Lett.*, **417**, 201-205, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.042>.
15. Полунин Г. С., Нуриева С. М., Баяндин Д. Л., Шеремет Н. Л., Андреева Л. А. (2000) Определение терапевтической эффективности нового отечественного препарата «семакс» при заболеваниях зрительного нерва, *Вестник Офтальмол.*, **116**, 15-18.
16. Filippenkov, I. B., Stavchansky, V. V., Glazova, N. Y., Sebentsova, E. A., Remizova, J. A., Valieva, L. V., Levitskaya, N. G., Myasoedov, N. F., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2021) Antistress action of melanocortin derivatives associated with correction of gene expression patterns in the hippocampus of male rats following acute stress, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 34576218, <https://doi.org/10.3390/ijms221810054>.
17. Vorvul, A. O., Bobyntsev, I. I., Medvedeva, O. A., Mukhina, A. Y., Svishcheva, M. V., Azarova, I. E., Andreeva, L. A., and Myasoedov, N. F. (2022) ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro ameliorates anxiety-like and depressive-like behaviour and gut mucosal microbiota composition in rats under conditions of chronic restraint stress, *Neuropeptides*, **93**, 35487169, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102247>.
18. Бакаева З. В., Сурин А. М., Лизунова Н. В., Згодова А. Е., Красильникова И. А., Фисенко А. П., Фролов Д. А., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., Пинелис В. Г. (2020) Нейропротекторный потенциал пептидов HFRWPGP (ACTH6-9PGP), KKRRPGP, PYRRP в культивируемых корковых нейронах при глутаматной эксайтотоксичности, *Докл. Росс. Акад. Наук Науки о Жизни*, **491**, 62-66, <https://doi.org/10.31857/S2686738920020067>.
19. Akimov, M. G., Fomina-Ageeva, E. V., Dudina, P. V., Andreeva, L. A., Myasoyedov, N. F., and Bezuglov, V. V. (2021) ACTH(6-9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes, *Molecules*, **26**, 1878, <https://doi.org/10.3390/molecules26071878>.
20. Wang, C.-M., Pan, Y.-Y., Liu, M.-H., Cheng, B.-H., Bai, B., and Chen, J. (2017) RNA-seq expression profiling of rat MCAO model following reperfusion Orexin-A, *Oncotarget*, **8**, 113066-113081, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22995>.
21. Tian, R., Deng, A., Pang, X., Chen, Y., Gao, Y., Liu, H., and Hu, Z. (2022) VR-10 polypeptide interacts with CD36 to induce cell apoptosis and autophagy in choroid-retinal endothelial cells: identification of VR-10 as putative novel therapeutic agent for choroid neovascularization (CNV) treatment, *Peptides*, **157**, 170868, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170868>.
22. Zhang, Q., Liu, C., Shi, R., Zhou, S., Shan, H., Deng, L., Chen, T., Guo, Y., Zhang, Z., Yang, G. Y., Wang, Y., and Tang, Y. (2022) Blocking C3d⁺/GFAP⁺ A1 astrocyte conversion with semaglutide attenuates blood-brain barrier disruption in mice after ischemic stroke, *Aging Dis.*, **13**, 943-959, <https://doi.org/10.14336/AD.2021.1029>.
23. Filippenkov, I. B., Stavchansky, V. V., Denisova, A. E., Yuzhakov, V. V., Sevan'kaeva, L. E., Sudarkina, O. Y., Dmitrieva, V. G., Gubsky, L. V., Myasoedov, N. F., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2022) Novel insights into the protective properties of ACTH₍₄₋₇₎PGP (Semax) peptide at the transcriptome level following cerebral ischaemia-reperfusion in rats, *Genes (Basel)*, **11**, 681, <https://doi.org/10.3390/genes11060681>.
24. Medvedeva, E. V., Dmitrieva, V. G., Povarova, O. V., Limborska, S. A., Skvortsova, V. I., Myasoedov, N. F., and Dergunova, L. V. (2014) The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis, *BMC Genomics*, **15**, 228, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-228>.
25. Medvedeva, E. V., Dmitrieva, V. G., Limborska, S. A., Myasoedov, N. F., and Dergunova, L. V. (2017) Semax, an analog of ACTH₍₄₋₇₎, regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats, *Mol. Genet. Genomics*, **292**, 635-653, <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1297-1>.
26. Filippenkov, I. B., Remizova, J. A., Stavchansky, V. V., Denisova, A. E., Gubsky, L. V., Myasoedov, N. F., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2023) Synthetic adrenocorticotrophic peptides modulate the expression pattern of

- immune genes in rat brain following the early post-stroke period, *Genes (Basel)*, **14**, 1382, <https://doi.org/10.3390/genes14071382>.
27. Ashmarin, I., Nezavibatko, V., Levitskaya, N., Koshelev, V., and Kamensky, A. (1995) Design and investigation of an ACTH(4-10) analog lacking D-amino acids and hydrophobic radicals, *Neurosci. Res. Commun.*, **16**, 105-112.
 28. Miasoedova, N. F., Skvortsova, V. I., Nasonov, E. L., Zhuravleva, E. I., Grivennikov, I. A., Arsen'eva, E. L., and Sukhanov, I. I. (1999) Investigation of mechanisms of neuro-protective effect of semax in acute period of ischemic stroke [in Russian], *Zhurn. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **99**, 15-19.
 29. Медведева Е. В., Дмитриева В. Г., Поварова О. В., Лимборская С. А., Скворцова В. И., Мясоедов Н. Ф., Дергунова Л. В. (2014) Трипептид PRO-GLY-PRO влияет на транскриптом коры головного мозга крыс в условиях фокальной ишемии, *Мол. Биол.*, **48**, 277, <https://doi.org/10.7868/S0026898414020128>.
 30. Шубина Т. А., Григорьева М. Е., Ляпина Л. А., Оберган Т. Ю., Мясоедов Н. Ф., Андреева Л. А. (2014) Гипогликемическая и противосвертывающая активность тетрапептида PRO-GLY-PRO-LEU при гиперхолестеринемии, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **158**, 35-39.
 31. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.*, **55**, 611-622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
 32. Huang, D. W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.*, **4**, 44-57, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
 33. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545-15550, <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.
 34. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., and Wishart, D. S. (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W147-W153, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
 35. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.*, **13**, 2498-2504, <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
 36. Pintér, E., Pozsgai, G., Hajna, Z., Helyes, Z., and Szolcsányi, J. (2014) Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **77**, 5-20, <https://doi.org/10.1111/bcp.12097>.
 37. Дергунова Л. В., Дмитриева В. Г., Филиппенков И. Б., Ставчанский В. В., Денисова А. Е., Южаков В. В., Севанькаева Л. Е., Валиева Л. В., Сударкина О. Ю., Губский Л. В., Мясоедов Н. Ф., Лимборская С. А. (2021) Пептидный препарат АКТГ(4-7)PGP (семакс) подавляет транскрипцию генов провоспалительных медиаторов, индуцированную обратимой ишемией мозга крыс, *Мол. Биол.*, **55**, 402-411, <https://doi.org/10.31857/S0026898421010043>.
 38. Bhaumik, S., and Basu, R. (2017) Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response, *Front. Immunol.*, **8**, 254, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00254>.
 39. Zhou, L., Chong, M. M. W., and Littman, D. R. (2009) Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation, *Immunity*, **30**, 646-655, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>.
 40. Lee, I. F., Wang, X., Hao, J., Akhoundsadegh, N., Chen, L., Liu, L., Langermann, S., Ou, D., and Warnock, G. L. (2013) B7-H4.Ig inhibits the development of Type 1 diabetes by regulating Th17 cells in NOD mice, *Cell Immunol.*, **282**, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.03.005>.
 41. Zou, Y., Zhang, J., Sun, F., Xu, Q., Chen, L., Luo, X., Wang, T., Zhou, Q., Zhang, S., Xiong, F., Kong, W., Yang, P., Yu, Q., Liu, S., and Wang, C. Y. (2024) Fluvoxamine inhibits Th1 and Th17 polarization and function by repressing glycolysis to attenuate autoimmune progression in type 1 diabetes, *Mol. Med.*, **30**, 23, <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00791-1>.
 42. Balakrishnan, K., Hleihil, M., Bhat, M.A., Ganley, R. P., Vaas, M., Klohs, J., Zeilhofer, H. U., and Benke, D. (2022) Targeting the interaction of GABA_B receptors with CaMKII with an interfering peptide restores receptor expression after cerebral ischemia and inhibits progressive neuronal death in mouse brain cells and slices, *Brain Pathol.*, **33**, e13099, <https://doi.org/10.1111/bpa.13099>.
 43. Hleihil, M., Balakrishnan, K., and Benke, D. (2022) Protein phosphatase 2A regulation of GABA_B receptors normalizes ischemia-induced aberrant receptor trafficking and provides neuroprotection, *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 1015906, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1015906>.
 44. Chen, M., Zhang, X., Fan, J., Sun, H., Yao, Q., Shi, J., Qu, H., Du, S., Cheng, Y., Ma, S., Zhang, M., and Zhan, S. (2021) Dynorphin A (1-8) inhibits oxidative stress and apoptosis in MCAO rats, affording neuroprotection through NMDA receptor and κ-opioid receptor channels, *Neuropeptides*, **89**, 34298371, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2021.102182>.

45. Paul, S., and Candelario-Jalil, E. (2021) Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies, *Exp. Neurol.*, **335**, 113518, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>.
46. Ballarin, B., and Tymianski, M. (2018) Discovery and development of NA-1 for the treatment of acute ischemic stroke, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **39**, 661-668, <https://doi.org/10.1038/aps.2018.5>.
47. Malyshev, A. V., Sukhanova, I. A., Ushakova, V. M., Zorkina, Y. A., Abramova, O. V., Morozova, A. Y., Zubkov, E. A., Mitkin, N. A., Pavshintsev, V. V., Doronin, I. I., Gedzun, V. R., Babkin, G. A., Sanchez, S. A., Baker, M. D., and Haile, C. N. (2022) Peptide LCGA-17 attenuates behavioral and neurochemical deficits in rodent models of PTSD and depression, *Pharmaceuticals (Basel)*, **15**, 462, <https://doi.org/10.3390/ph15040462>.
48. Shibato, J., Takenoya, F., Yamashita, M., Gupta, R., Min, C. W., Kim, S. T., Kimura, A., Takasaki, I., Hori, M., Shioda, S., and Rakwal, R. (2023) OMICS analyses unraveling related gene and protein-driven molecular mechanisms underlying PACAP 38-induced neurite outgrowth in PC12 cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 4169, <https://doi.org/10.3390/ijms24044169>.
49. Stavchansky, V. V., Filippenkov, I. B., Remizova, J. A., Denisova, A. E., Mozgovoy, I. V., Gubsky, L. V., Myasoedov, N. F., Andreeva, L. A., Limborska, S. A., and Dergunova, L. V. (2022) Insight into glyproline peptides' activity through the modulation of the inflammatory and neurosignaling genetic response following cerebral ischemia-reperfusion, *Genes (Basel)*, **13**, 2380, <https://doi.org/10.3390/genes13122380>.
50. Dergunova, L. V., Filippenkov, I. B., Limborska, S. A., and Myasoedov, N. F. (2023) Neuroprotective peptides and new strategies for ischemic stroke drug discoveries, *Genes (Basel)*, **14**, 953, <https://doi.org/10.3390/genes14050953>.
51. Mannes, M., Martin, C., Menet, C., and Ballet, S. (2022) Wandering beyond small molecules: peptides as allosteric protein modulators, *Trends Pharmacol. Sci.*, **43**, 406-423, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.011>.

CHANGES OF TRANSCRIPTOMIC ACTIVITY IN RAT BRAIN CELLS UNDER THE INFLUENCE OF SYNTHETIC ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE-LIKE PEPTIDES

I. B. Filippenkov^{1*}, N. Y. Glazova^{1,2}, E. A. Sebentsova^{1,2}, V. V. Stavchansky¹,
L. A. Andreeva¹, N. F. Myasoedov¹, N. G. Levitskaya^{1,2},
S. A. Limborska¹, and L. V. Dergunova¹

¹ National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: filippenkov-ib.img@yandex.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Synthetic peptides have a wide range of clinical effects. Of particular interest are peptides based on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) both as already used and as potential drugs for preventing the consequences of cerebral ischemia. However, it is necessary to study the peptide influence on brain cells under normal physiological conditions, including understanding the risks of their use. Here, we used high-throughput RNA sequencing (RNA-Seq) to identify differentially expressed genes (DEGs) in the frontal cortex of rats receiving intraperitoneal administration of ACTH-like peptides ACTH(4-7)PGP (Semax) and ACTH(6-9)PGP or saline. We identified 258 and 228 DEGs, respectively, with a threshold of > 1.5 and $P_{adj} < 0.05$ at 22.5 hours after the first administration of Semax and ACTH(6-9)PGP. Metabolic pathways, characterizing both the general and specific effects of peptides on the transcriptome were identified. Both peptides predominantly caused a decrease in the expression of genes associated with the immune system. At the same time, when comparing the effects of ACTH(6-9)PGP relative to Semax, DEGs were identified that characterized the main differences in the effects of the peptides. These genes were mostly downregulated and associated with neurosignaling systems and regulation of ion channels and characterized differences in the effects of peptides. Our data show how differences in the structure of ACTH derivatives are associated with changes in the brain cell transcriptome following exposure to these related peptides. Furthermore, our results evident that when studying the influence of regulatory peptides on the transcriptome in pathological conditions, it is necessary to take into account their actions under normal physiological conditions.

Keywords: ACTH-like peptides, RNA-Seq, transcriptome, gene expression, gene networks