ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 6

Июнь 2023

БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 6, 2023

Резистом *Streptomyces rimosus* – резервуар генов устойчивости к аминогликозидным антибиотикам
М.Г. Алексеева, Н.Н. Рудакова, А.В. Ратькин, Д.А. Мавлетова, В.Н. Даниленко 891

Рекомбинантные эндопептидазы IdeS И IdeZ и возможный потенциал их применения
И.С. Бокша, В.Г. Лунин, Т.А. Данилова, М.С. Попонова, Н.Б. Поляков, А.М. Лящук, С.В. Константинова, З.М. Галушкина, Е.В. Устенко 900

Роль микроРНК в регуляции клеточного ответа на гипоксию (обзор)
М.В. Силина, Д.Ш. Джалилова, О.В. Макарова 913

Эффекты длительного комбинированного введения кетансерина и флуоксетина мышам рекомбинантной линии B6.CBA-D13Mit76C, отличающимся изменённой чувствительностью 5-HT_{1A}-рецепторов
А.С. Цыбко, Е.М. Кондаурова, Е.А. Заливина, В.О. Благиня, В.С. Науменко 933

Молекулярные основы сигнальных процессов, регулируемых сенсорными фоторецепторами криптохромами у растений (обзор)
Г.Я. Фрайкин, Н.С. Беленикина, А.Б. Рубин 947

Природные производные гуанина оказывают PARP-ингибиторное и цитопротекторное действие на модели повреждения кардиомиоцитов при окислительном стрессе
С.И. Шрам, Т.А. Щербакова, Т.В. Абрамова, Э.Ц. Барадиева, А.С. Ефремова, М.С. Смирновская, В.Н. Сильников, В.К. Швядас, Д.К. Нилов 962

Множественные неканонические стэкинг-взаимодействия гетероциклических оснований как один из главных факторов организации третичной структуры РНК
В.Г. Метелев, Е.Ф. Баулин, А.А. Богданов 973

Структурно-функциональные исследования изоформ тропомиозина Tpm4.1 и Tpm2.1
А.С. Логвинов, В.В. Нефёдова, Д.С. Ямпольская, С.Ю. Клейменов, Д.И. Левицкий, А.М. Матюшенко 984

Фитогормоны оказывают влияние на дифференцировочный статус дермальных фибробластов человека путём активации UPR
Е.П. Турищева, М.С. Вильданова, П.А. Вишнякова, Д.К. Матвеева, А.А. Саидова, Г.Е. Онищенко, Е.А. Смирнова 995

Рекомбинантные онколитические штаммы вируса осповакцины (обзор)
Я. Шакиба, П.О. Воробьев, М. Махмуд, А. Хамад, Д.В. Кочетков, Г.М. Юсубалиева, В.П. Баклаушев, П.М. Чумаков, А.В. Липатова 1011

ДИСКУССИЯ

Липоксигеназа гигантской серной бактерии: эволюционное решение для увеличения размера и сложности?
Г.Ф. Куракин 1035

НЕКРОЛОГ

Василий Николаевич Попов 1040

CONTENTS

Vol. 88, Issue 6, 2023

Resistom *Streptomyces rimosus* – A Reservoir of Resistance Genes to Aminoglycoside Antibiotics
M. G. Alekseeva, N. N. Rudakova, A. V. Ratkin, D. A. Mavletova, and V. N. Danilenko 891

Recombinant Endopeptidases IdeS and IdeZ and Their Potential Applications
I. S. Boksha, V. G. Lunin, T. A. Danilova, M. S. Poponova, N. B. Polyakov, A. M. Lyashchuk, S. V. Konstantinova, Z. M. Galushkina, and E. V. Ustenko 900

The Role of microRNA in the Regulation of Cellular Responses to Hypoxia (Review)
M. V. Silina, D. Sh. Dzhalilova, and O. V. Makarova 913

Effects of Chronic Combined Treatment with Ketanserin and Fluoxetine in B6.CBA-D13Mit76C Recombinant Mice with Abnormal 5-HT_{1A} Receptor Functional Activity
A. S. Tsybko, E. M. Kondaurova, E. V. Zalivina, V. O. Blaginya, and V. S. Naumenko 933

Molecular Bases of Signaling Processes Regulated by Cryptochrome Sensory Photoreceptors in Plants (Review)
G. Ya. Fraikin, N. S. Belenikina, and A. B. Rubin 947

Natural Guanine Derivatives Exert PARP-Inhibitory and Cytoprotective Effects in a Model of Cardiomyocyte Damage Under Oxidative Stress
S. I. Shram, T. A. Shcherbakova, T. V. Abramova, E. C. Baradieva, A. S. Efremova, M. S. Smirnovskaya, V. N. Silnikov, V. K. Švedas, and D. K. Nilov 962

Multiple Non-Canonical Base-Stacking Interactions as One of the Major Determinants of RNA Tertiary Structure Organization
V. G. Metelev, E. F. Baulin, and A. A. Bogdanov 973

Structural and Functional Studies of Tropomyosin Isoforms Tpm4.1 and Tpm2.1
A. S. Logvinov, V. V. Nefedova, D. S. Yampolskaya, S. Y. Kleymenov, D. I. Levitsky, and A. M. Matyushenko 984

Phytohormones Affect the Differentiation of Human Dermal Fibroblasts Via UPR Activation
E. P. Turishcheva, M. S. Vildanova, P. A. Vishnyakova, D. K. Matveeva, A. A. Saidova, G. E. Onishchenko, and E. A. Smirnova 995

Recombinant Strains of Oncolytic Vaccinia Virus for Cancer Immunotherapy (Review)
Y. Shakiba, P. O. Vorobyev, M. Mahmoud, A. Hamad, D. V. Kochetkov, G. M. Yusubalieva, V. P. Baklaushev, P. M. Chumakov, and A. V. Lipatova 1011

DISCUSSION

Lipoxygenase in a Giant Sulfur Bacterium: an Evolutionary Solution for Size and Complexity?
G. Kurakin 1035

OBITUARY

Vasily Nikolaevich Popov 1040

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 891 – 899

УДК 577.152

РЕЗИСТОМ *Streptomyces rimosus* – РЕЗЕРВУАР ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДНЫМ АНТИБИОТИКАМ

© 2023 М.Г. Алексеева*, Н.Н. Рудакова, А.В. Ратькин, Д.А. Мавлетова, В.Н. Даниленко

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: alekseevamg@mail.ru

Поступила в редакцию 16.03.2023
После доработки 20.04.2023
Принята к публикации 20.04.2023

Изучение аминогликозидацетилтрансфераз у актинобактерий рода *Streptomyces* является составной частью исследования почвенных бактерий как основного резервуара и возможного источника генов лекарственной устойчивости. Ранее нами в штамме *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (продуценте окситетрациклина), устойчивом к большинству природных аминогликозидных антибиотиков (АГ), были идентифицированы и биохимически охарактеризованы 3 аминогликозидфосфотрансферазы, которые обусловливают устойчивость к канамицину, неомицину, паромомицину, стрептомицину и гигромицину В. В представленной работе было показано, что устойчивость к остальным АГ у данного штамма связана с наличием фермента аминогликозидацетилтрансферазы, относящейся к подсемейству AAC(2'). Индуцирование экспрессии гена, обозначенного нами как *aac(2')-If*, в клетках *Escherichia coli* определяет устойчивость к широкому спектру природных АГ (неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину и паромомицину) и к повышению минимальных ингибирующих концентраций данных антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: множественная лекарственная устойчивость, *Streptomyces rimosus*, аминогликозидацетилтрансферазы, МИК аминогликозидных антибиотиков.

DOI: 10.31857/S0320972523060015, **EDN:** EDCRBD

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость к антибиотикам является одной из самых больших проблем в современной медицине и глобальной угрозой для здравоохранения, обусловленных катастрофическим распространением клинических штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Окружающая среда является крупнейшим источником и резервуаром резистентности – почвенные, водные, атмосферные, связанные с животными и искусственные экосистемы содержат элементы устойчивости к антибиотикам [1, 2]. Возможность передачи генетических элементов устойчивости между бактериями в смешанных популяциях приводит к увеличению горизонтального переноса, появлению и селекции устойчивых форм бактерий. Гены устойчивости к антибиотикам гипотетически берут начало в бактериях, относящихся к роду *Streptomyces*, которые являются продуцентами широкого спектра антибиотиков и значительным резервуаром генов устойчивости к антибиотикам в почвах [3, 4].

Множественная лекарственная устойчивость к аминогликозидным антибиотикам (АГ) обусловлена наличием в геномах бактерий модифицирующих ферментов, относящихся к трем подклассам: аминогликозидфосфотрансферазам (APH), аминогликозид-3-N-ацетилтрансферазам (AAC) и аминогликозиднуклеотидилтрансферазам (ANT). Индуцирование синтеза ферментов, модифицирующих аминогликозиды, представляет собой стратегию выживания устойчивых к антибиотикам бактерий [4, 5]. Ферменты APH и AAC идентифицированы и охарактеризованы в основном у штаммов-продуцентов аминогликозидов, таких как *Streptomyces griseus* (продуцент стрептомицина), *Streptomyces kanamyceticus* (продуцент

Принятые сокращения: АГ – аминогликозидные антибиотики; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; AAC – аминогликозидацетилтрансферазы; APH – аминогликозидфосфотрансферазы.

* Адресат для корреспонденции.

канамицина), *Streptomyces fradiae* (продуцент неомицина). Данные штаммы устойчивы и к другим АГ, продуцентами которых они не являются. Также было показано широкое распространение множественной устойчивости к АГ у АГ-непродуцирующих актиномицетов [6, 7].

В то же время первичный биоинформатический анализ показал, что гены, аннотированные как *aph* и *aac*, широко представлены во многих геномах актинобактерий рода *Streptomyces*. При этом ферменты, обусловливающие устойчивость к АГ, в настоящее время мало изучены – некоторые из них связаны с устойчивостью к антибиотикам, остальные имеют другие функции, в том числе могут участвовать в коммуникациях с другими почвенными организмами. Поэтому важной задачей является выявление и характеристика новых ферментов, участвующих в устойчивости к аминогликозидным антибиотикам [6, 8].

Ранее было установлено, что штамм *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (продуцент окситетрациклина) обладает устойчивостью к большинству природных АГ. В штамме *S. rimosus* ATCC 10970 нами были идентифицированы и биохимически охарактеризованы аминогликозидфосфотрансферазы: APH(3')-VIII, APH(3'')-Id и AphSR2, обусловливающие устойчивость к канамицину, неомицину, паромомицину, стрептомицину и гигромицину B. Получены пространственные структуры APH(3')-VIII и APH(3'')-Id (в апоформе и в комплексе со стрептомицином и ADP) [9–13].

В настоящей работе проводилась идентификация в геноме *S. rimosus* ATCC 10970 аминогликозидацетилтрансфераз, которые потенциально могут обусловливать устойчивость штамма к АГ. Мы идентифицировали фермент, относящийся к описанному ранее подсемейству, обозначенный нами как AAC(2')-If. При клонировании гена, кодирующего данный фермент, в клетках *Escherichia coli* установлено, что он определяет устойчивость к широкому спектру природных АГ; были определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) аминогликозидных антибиотиков для клеток *E. coli*, экспрессирующих *aac(2′)-If*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, векторы, среды и условия культивирования. В работе использовали штаммы: *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 [14], *E. coli* DH5a (F^-, Ф 80 ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169) («Promega», США) [15], *E. coli* BL21(DE3) (F^-, dcm, ompT, hsdS($r_B^-m_B^-$), gal λ (DE3)) («Novagen», США) [16] и *E. coli* NiCo21(DE3) (can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int:: i21 Δnin5) («New England Biolabs», США) [17]. Для клонирования использовали экспрессионные векторы pET16b и pET32a («Novagen») [16], содержащие His-Tag в *N*-концевой области для выделения и очистки рекомбинантных белков.

Штамм *S. rimosus* ATCC 10970 выращивали на жидкой среде YEME, содержащей 25% сахарозы [18]. Для выращивания клеток *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон), твердые среды содержали 2% (*w*/*v*) агара [19]. Для обеспечения селективного роста клеток, содержащих плазмиды, добавляли ампициллин (100 мкг/мл).

Манипуляции с ДНК. Геномную ДНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970 выделяли методом, изложенным в руководстве Kieser et al. [18]. Выделение плазмидной ДНК, получение компетентных клеток *E. coli*, трансформацию и анализ рекомбинантных плазмид проводили стандартными методами [19]. Фрагмент ДНК, кодирующий AAC(2')-If *S. rimosus*, амплифицировали с геномной ДНК с использованием набора Phusion High-Fidelity PCR Master Mix («Thermo Fisher Scientific», Литва) на минициклере PTC-0150 («MJ Research Inc.», США). Для амплификации были сконструированы олигонуклеотиды: AAC-SrN1 и AAC-SrC1 – для клонирования гена *aac(2′)-If* в плазмиду pET16b по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI и олигонуклеотиды: AAC-SrN2 и AAC-SrC2 – для клонирования гена *aac(2′)-If* в плазмиду pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе («Синтол», Россия), представлены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'*
AAC-SrN1	tcgtcatatgatgaccgacgcacacccccct
AAC-SrC1	agccggatcctaccagacgtccccact
AAC-SrN2	tcgcggatccatgaccgacgcacacccccct
AAC-SrC2	ccgcaagcttctaccagacgtccccac

* Сайты для эндонуклеаз рестрикции выделены подчеркиванием.

Экспрессия гена *aac(2′)-If* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в *E. coli*. Клетки *E. coli*, содержащие плазмиды pET16b:*aac(2′)-If* и pET32a:*aac(2′)-If*, выращивали на качалке в жидкой среде (L-бульон) с ампициллином при 37 °C до оптической плотности 0,6 при 625 нм (~2 ч), затем индуцировали экспрессию добавлением изопропил-D-тиогалактозида (ИПТГ) до финальной концентрации 0,5 и 1,0 мМ. Далее проводили культивирование при 28 °C в течение 18 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием (3000 *g*, 10 мин, 4 °C) и хранили в морозильной камере при –20 °C. Клетки размораживали и суспендировали в буфере для образцов, содержащем 62,5 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 5% глицерина, 2% 2-меркаптоэтанола, 0,1% SDS и 0,001% бромфенолового синего, затем нагревали при 95 °C в течение 10 мин. Растворимую фракцию белков анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном Ds-Na-ПААГ с использованием маркера молекулярной массы белков SM0441 («Fermentas», Литва). В качестве контроля анализировали растворимые фракции белков штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащих плазмиды pET16b и pET32a без вставки.

Анализ устойчивости к аминогликозидным антибиотикам. Антимикробная активность для клеток *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих AAC(2')-If, определялась как МИК с использованием двух методов: метода диффузии с использованием стандартных дисков и метода линейных разведений. В качестве контроля анализировали клети *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиду pET32a.

Для диско-диффузионного метода [20] чашки с LB-агаром, содержащим 10 мкг/мл ИПТГ, инокулировали путем равномерного покрытия их бактериальными культурами в концентрации 10^5–10^6 КОЕ/мл. Бумажные диски, содержащие АГ, помещали на чашки с LB-агаром, инкубировали при 37 °C в течение 18 ч, затем измеряли диаметры зон вокруг дисков, в которых отсутствовал рост клеток.

МИК для аминогликозидных антибиотиков определяли методом разведения в бульоне в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [21]. Клетки *E. coli* выращивали в 2 мл бульона Мюллера–Хинтона (MHB) до плотности 0,3 при 625 нм для адаптации к стандарту 0,5 McFarland (мера плотности культуры; он соответствует значению $1{,}5 \times 10^8$ КОЕ/мл), а затем разбавляли до конечной плотности 10^5–10^6 КОЕ/мл. В пробирки, содержащие 2-кратные разведения антибиотиков в 2 мл MHB, добавляли по 100 мкл культуры клеток. Для индуцирования экспрессии AAC(2')-If в пробирки добавляли IPTG (100 мкМ). После культивирования в течение 18 ч при 25 °C определяли значения МИК как самые низкие концентрации АГ, которые приводили к полному ингибированию роста (что определялось спектрофотометрически при 625 нм).

Биоинформатический анализ. Последовательности аминогликозидацетилтрансфераз (AAC) штамма *S. rimosus* ATCC 10970 были получены из базы данных NCBI. Для сравнения их с известными по литературе AAC использовали программы Blastp [22]; для сопоставления с последовательностями белков, представленных в базе данных PDB, с известными 3D-структурами – SAS [23]; для множественных выравниваний аминокислотных последовательностей использовали алгоритм ClustalW [24].

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоинформатический анализ аминогликозидацетилтрансфераз штамма *S. rimosus* ATCC 10970. В геноме штамма ATCC 10970 [14] аннотировано 13 генов N-ацетилтранфераз семейства GNAT с номерами локусов генов: SRIM_009260; SRIM_011135; SRIM_012310; SRIM_018100; SRIM_020380; SRIM_020760; SRIM_025200; SRIM_029930; SRIM_030810; SRIM_033455; SRIM_038510; SRIM_040130; SRIM_040160. Все выявленные N-ацетилтранферазы содержат домены «NAT_SF» и сайты связывания с коэнзимом А.

Сравнение аминокислотных последовательностей всех выявленных в *S. rimosus* ферментов N-ацетилтранфераз с последовательностями известных ранее аминогликозидацетилтрансфераз, относящихся к подсемействам AAC(1), AAC(3), AAC(2') и AAC(6'), с использованием программ BLAST и SAS показало, что только один из них (SRIM_030810) имеет степень идентичности 52,1% с AAC(2')-Ic *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank: CCP42991.1, Код PDB: 1m44) и 50,0% – с AAC(2')-Id *Mycolicibacterium smegmatis* (GenBank: AIU12332.1, Код PDB: 7crm).

Для подсемейства AAC(2') в настоящее время идентифицирован только один подкласс AAC(2')-I. Ген, кодирующий AAC(2')-Ia, был обнаружен в хромосоме условно-патогенной бактерии *Providencia stuartii*, AAC(2')-Ib идентифицирован у *Mycolicibacterium fortuitum*,

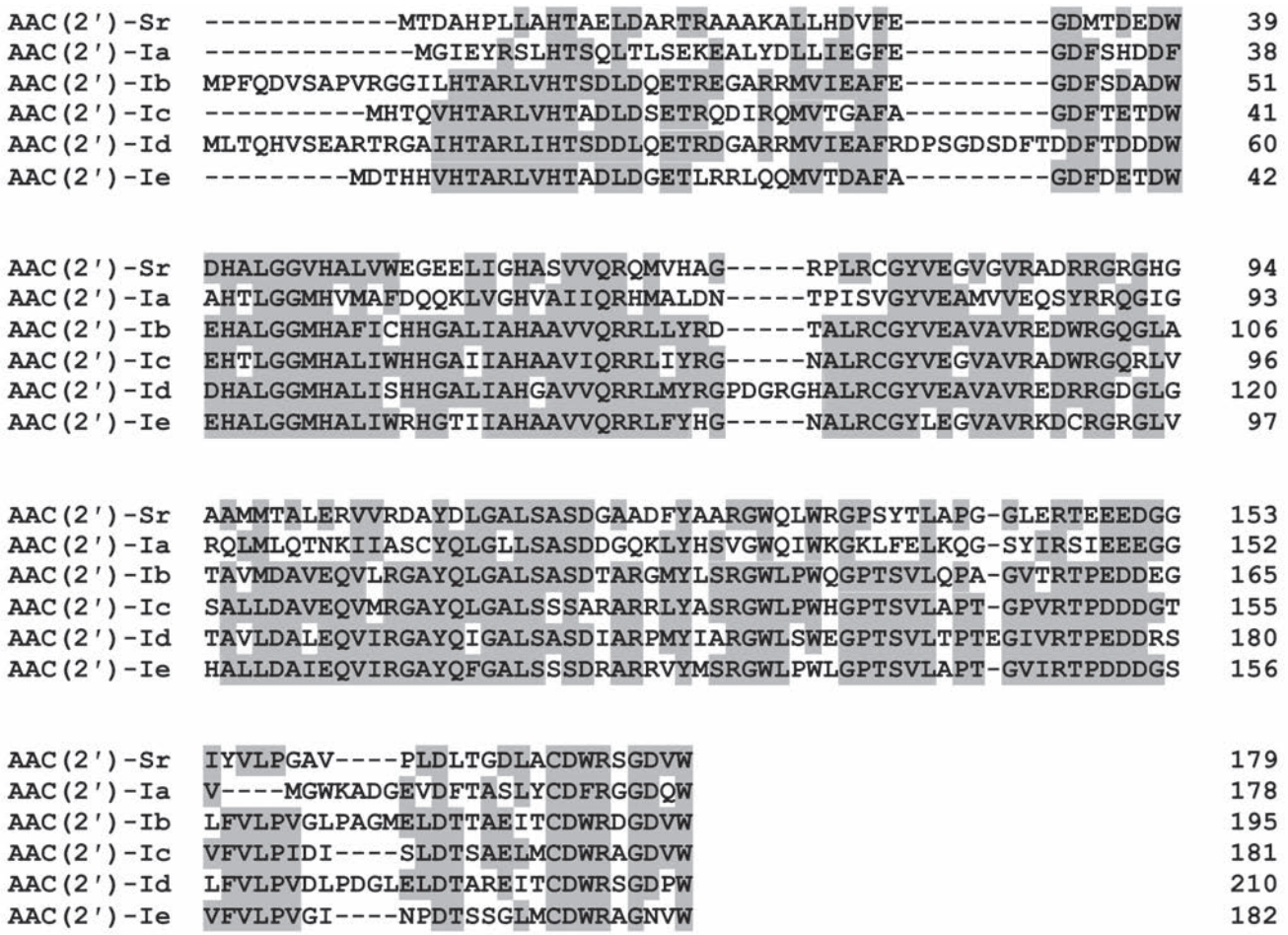

Рис. 1. Выравнивание последовательностей AAC(2')-If (AAC(2')-Sr) с AAC(2')-Ia *P. stuartii*, AAC(2')-Ib *M. fortuitum*, AAC(2')-Ic *M. tuberculosis*, AAC(2')-Id *M. smegmatis* и AAC(2')-Ie *M. leprae*. Консервативные аминокислоты, характерные для AAC(2')-I, выделены серым цветом

AAC(2')-Ic – у *M. tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*, AAC(2')-Id – у *M. smegmatis*, AAC(2')-Ie – у *Mycobacterium leprae*. Ферменты подсемейства AAC(2') способны как к N-, так и к O-ацетилированию многих аминогликозидных субстратов: канамицина, паромомицина, гентамицина, амикацина и тобрамицина [25–27].

Степень идентичности (сходства) аминокислотных последовательностей между SRIM_030810 (AAC(2')-Sr) и AAC(2')-Ia, AAC(2')-Ib, AAC(2')-Ic, AAC(2')-Id, AAC(2')-Ie составляет 36,5 (64,9)%; 51,7 (80,1)%; 51,2 (78,5)%; 48,2 (72,8)% и 48,6 (74,6)% соответственно. Выравнивание последовательностей (рис. 1) показывает, что AAC(2')-Sr содержит все консервативные аминокислоты [28], характерные для последовательностей ферментов подсемейства AAC(2'), поэтому мы обозначили этот фермент как AAC(2')-If.

Клонирование гена *aac(2′)-If* в *E. coli* и анализ экспрессии. На первом этапе проводили клонирование гена *aac(2′)-If* в составе экспрессионного вектора pET16b. Для изучения экспрессии гена *aac(2′)-If* в *E. coli* проводили выращивание штаммов BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащих рекомбинантную плазмиду pET16b:*aac(2′)-If*, в жидкой среде LB с индукцией ИПТГ, затем клетки осаждали центрифугированием и анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном Ds-Na-ПААГ. Анализ электрофореграммы показал, что ген *aac(2′)-If* не экспрессируется в *E. coli* в составе экспрессионного вектора pET16b.

В связи с этим проводили клонирование гена *aac(2′)-If* в составе экспрессионного вектора pET32a, содержащего последовательность гена тиоредоксина в *N*-концевой области. Полученные результаты (рис. 2) показали, что в клетках штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3) наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 37 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка AAC(2')-If в сумме с молекулярной массой белка линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин. Максимальная экспрессия гена *aac(2′)-If* была установлена в штамме *E. coli* BL21(DE3).

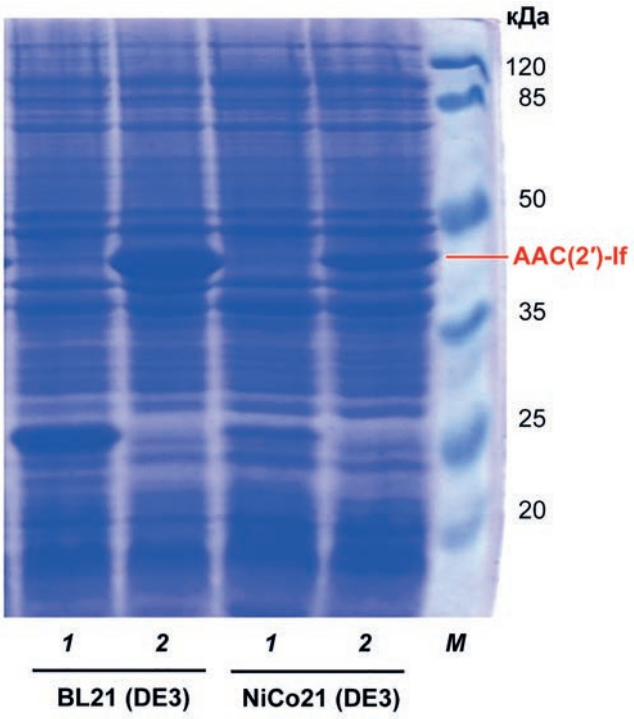

Рис. 2. Электрофореграмма растворимой фракции белков AAC(2')-If штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащих плазмиды: *1* – pET32a, *2* – pET32a:*aac(2′)-If*; *M* – маркер молекулярной массы белков SM0441

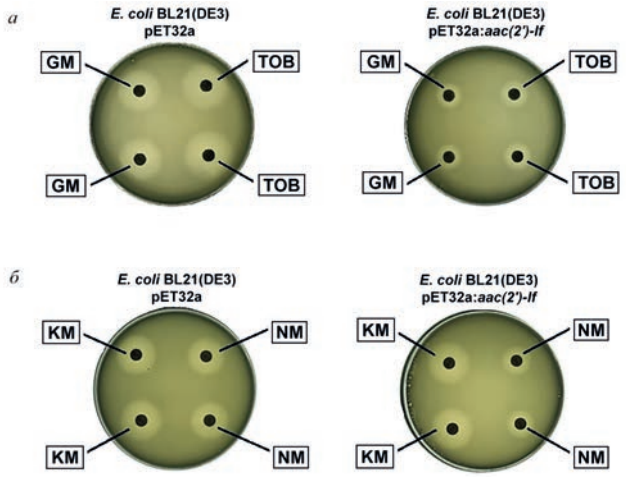

Рис. 3. Анализ спектра устойчивости клеток *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих ген *aac(2′)-If*, к АГ методом стандартных дисков: *а* – к гентамицину и тобрамицину; *б* – к канамицину и неомицину. KM – канамицин; NM – неомицин; GM – гентамицин; TOB – тобрамицин

Исследование спектра и уровня устойчивости *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a:*aac(2′)-If*, к аминогликозидным антибиотикам. Для определения спектра устойчивости клеток *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих ген *aac(2′)-If*, к АГ мы использовали метод стандартных дисков. Установлено, что экспрессия гена *aac(2′)-If* обеспечивает устойчивость клеток *E. coli* BL21(DE3) к широкому спектру природных АГ: неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину и паромомицину (табл. 2, рис. 3). Полученные результаты согласуются с биоинформатическим анализом, согласно которому данный ген отнесен к подсемейству AAC(2').

Мы определили МИК АГ с использованием метода 2-кратных разведений антибиотиков

Таблица 2. Исследование спектра устойчивости *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a:*aac(2′)-If*, к аминогликозидным антибиотикам

Антибиотики		BL21(DE3) pET32a	BL21(DE3) pET32a:*aac(2′)-If*
Название	концентрация, мкг/диск	диаметр зоны, мм*	
Канамицин	30	21 ± 0,5	21 ± 0,5
Неомицин	30	20 ± 0,5	# 15 ± 0,5
Паромомицин	10	17 ± 0,5	# 7 ± 0,5
Стрептомицин	10	22 ± 0,5	22 ± 0,5
Гентамицин	10	22 ± 0,5	# 15 ± 0,5
Тобрамицин	10	26 ± 0,5	# 17 ± 0,5
Сизомицин	10	25 ± 0,5	# 19 ± 0,5
Амикацин	30	24 ± 0,5	24 ± 0,5

Примечание. * Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений ± стандартные отклонения.
Достоверное отличие от контроля (BL21(DE3) pET32a), $p < 0,01$.

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) аминогликозидных антибиотиков

АГ-антибиотик	Штаммы *E. coli*; МИК, мкг/мл*	
	BL21(DE3) pET32a	BL21(DE3) pET32a:*aac(2′)-If*
Гентамицин	4 ± 1	80 ± 2#
Сизомицин	4 ± 1	64 ± 2#
Паромомицин	16 ± 2	250 ± 5#
Тобрамицин	8 ± 2	120 ± 4#
Неомицин	16 ± 2	120 ± 4#
Канамицин	16 ± 2	16 ± 2
Стрептомицин	16 ± 2	16 ± 2

Примечание. * Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений ± стандартные отклонения.

Достоверное отличие от контроля (BL21(DE3) pET32a), $p < 0{,}01$.

в жидкой среде. Полученные результаты (табл. 3) показывают, что индукция экспрессии гена *aac(2′)-If* приводит к 20-кратному увеличению МИК гентамицина – с 4 до 80 мкг/мл. Аналогичные изменения наблюдались для сизомицина, паромомицина и тобрамицина (15–16-кратное увеличение МИК) и неомицина (7,5-кратное увеличение МИК). Таким образом, идентифицированный нами фермент AAC(2')-If, индуцируемый в клетках *E. coli*, активен *in vivo* и эффективно защищает клетки от данных антибиотиков.

Таким образом, оба исследования показывают, что идентифицированный нами у *S. rimosus* ATCC 10970 фермент AAC(2')-If придает бактериям устойчивость к АГ: гентамицину, тобрамицину, неомицину, паромомицину и сизомицину, и не оказывает влияния на устойчивость к канамицину и стрептомицину.

На основании полученных результатов мы можем предполагать, что гентамицин, тобрамицин, неомицин, паромомицин и сизомицин являются субстратами для идентифицированного нами фермента AAC(2')-If.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате предыдущих исследований нами выявлены 3 фермента APH (APH(3')-VIII, APH(3")-Id и AphSR2), обусловливающих устойчивость к АГ: канамицину, неомицину, паромомицину, стрептомицину и гигромицину B. Однако ранее было показано, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 устойчив ко всем природным АГ. В связи с этим фактом было сделано предположение, что устойчивость к АГ у данного штамма может быть обусловлена не только APH, но и другими ферментами, такими как AAC.

Анализ генома *S. rimosus* ATCC 10970 [14] позволил нам выявить 13 генов, кодирующих N-ацетитранферазы семейства GNAT, содержащих домены «NAT_SF» и сайты связывания с коэнзимом A. На основании сходства аминокислотных последовательностей выявленных N-ацетитраназ с последовательностями описанных ранее аминогликозидацетилтрансфераз только одна из них была отнесена к известному подсемейству AAC(2').

Ферменты подсемейства AAC(2') ранее были идентифицированы в хромосоме условно-патогенной бактерии *P. stuartii* и у микобактерий [25–27]. Множественное выравнивание последовательностей показало, что AAC(2')-Sr содержит все консервативные аминокислоты, характерные для последовательностей ферментов подсемейства AAC(2') [28], поэтому мы обозначили этот фермент как AAC(2')-If. Мы клонировали ген *aac(2′)-If* в *E. coli*. Оценка устойчивости к АГ показала, что индукция синтеза фермента AAC(2')-If обусловливает устойчивость *E. coli* к широкому спектру природных АГ: неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину и паромомицину, что согласуется с биоинформатическим анализом, согласно которому данный фермент отнесен к подсемейству AAC(2').

Происхождение AAC можно проследить до видов микробов из окружающей среды, представляющих собой обширный резервуар для новых и появляющихся ферментов резистентности, которые в настоящее время недостаточно изучены. Индукция синтеза ферментов, модифицирующих АГ, представляет собой стратегию выживания устойчивых к антибиотикам бактерий. AAC относятся к moonlighting-белкам, т.е. проявляют полифункциональные свойства. Так, у микобактерий AAC вносят частичный вклад в устойчивость к АГ и могут выполнять другие функции, в частности, способствовать ацетилированию белков клеточной стенки и пептидогликана, что объясняет широкую субстратную специфичность AAC-ферментов [26].

Впервые понятие «резистом» было введено D'Costa et al. [29] в 2006 г. при исследовании генов устойчивости к антибиотикам почвенных

бактерий рода *Streptomyces* – продуцентов большинства антибиотиков. Значительно ранее один из авторов данной статьи проводил исследования распространения и механизмов устойчивости к антибиотикам среди коллекции различных видов актинобактерий рода *Streptomyces* [30]. Штамм *S. rimosus* ATCC 10970 (продуцент окситетрациклина) обратил на себя внимание как яркий представитель, обладающий тотальной устойчивостью ко всем природным АГ [31]. В то время активно обсуждалась гипотеза происхождения и эволюции генов устойчивости к антибиотикам, обобщенная в более поздней работе Davies и Davies [32].

Позднее понятие «резистом» стали использовать для характеристики микробиомов различных экологических систем: почв, водных резервуаров, воздуха, растений, сельскохозяйственных животных, продуктов питания и человека. Резистом кишечника человека представляется наиболее уязвимым для здоровья источником генов лекарственной устойчивости [33, 34].

Известно, что гены устойчивости к антибиотикам легко передаются между группами бактерий различных микробиомов с помощью мобильных генетических элементов и других систем переноса генетического материала, включая внеклеточные везикулы [2, 35, 36].

В представленной работе в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 нами идентифицирован новый AAC-фермент, имеющий сходство с микобактериальными ферментами, относящимися к подсемейству AAC(2'). При этом важные вопросы взаимодействия резистомов между собой, приводящие к горизонтальному переносу генов антибиотикоустойчивости, требуют дальнейших исследований. Обмен генами устойчивости к антибиотикам между почвенными бактериями и клиническими патогенами возможен путем прямого обмена между почвенными микробами и патогенами человека или путем непрямой передачи через микробиоту кишечника человека, что подчеркивает клиническое значение почвенного резистома [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая данные, полученные авторами в ранее опубликованных [9–13] и представленной работах, нами в штамме *S. rimosus* ATCC 10970, не являющемся продуцентом АГ, идентифицировано 3 фермента APH и фермент AAC(2')-If, обусловливающие устойчивость штамма ко всем природным АГ.

Представленные исследования открывают новые возможности для изучения распространения и особенностей экспрессии генов, определяющих природную устойчивость к АГ у актинобактерии рода *Streptomyces*.

В рамках дальнейшей работы предполагается выделение рекомбинантного белка AAC(2')-If, получение пространственных структур для выявления каталитически важных структурных мотивов, сравнительный анализ полученных пространственных структур с известными структурами аминогликозидацетилтрансфераз других видов бактерий (в том числе патогенных).

Вклад авторов. В.Н. Даниленко – концепция и руководство работой; М.Г. Алексеева и Н.Н. Рудакова – проведение экспериментов; М.Г. Алексеева, А.В. Ратькин и Д.А. Мавлетова – обсуждение результатов исследования; М.Г. Алексеева – написание текста; Д.А. Мавлетова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0092-2022-003; тема «Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека»: «Микробиом кишечника человека: иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал», подтема «Распространение и функции генов аминогликозид ацетилтрансфераз в микробиоме почв и человека».

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. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., and Blair, J. M. A. (2022) Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited, *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 280-295, doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.
2. Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., and Dantas, G. (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens, *Science*, **337**, 1107-1111, doi: 10.1126/science.1220761.
3. Surette, M. D., and Wright, G. D. (2017) Lessons from the environmental antibiotic resistome, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 309-329, doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093420.

4. Ogawara, H. (2019) Comparison of antibiotic resistance mechanisms in antibiotic-producing and pathogenic bacteria, *Molecules*, **24**, 3430, doi: 10.3390/molecules24193430.
5. Ramirez, M. S., and Tolmasky, M. E. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes, *Drug. Resist. Updat.*, **13**, 151-171, doi: 10.1016/j.drup.2010.08.003.
6. Hotta, K. (2021) Basic and applied research on multiple aminoglycoside antibiotic resistance of actinomycetes: an old-timer's recollection, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, kuab059, doi: 10.1093/jimb/kuab059.
7. Heinzel, P., Werbitzky, O., Distler, J., and Piepersberg, W. (1988) A second streptomycin resistance gene from Streptomyces griseus codes for streptomycin-3"-phosphotransferase. Relationships between antibiotic and protein kinases, *Arch. Microbiol.*, **150**, 184-192, doi: 10.1007/BF00425160.
8. Perry, J. A., Westman, E. L., and Wright, G. D. (2014) The antibiotic resistome: what's new? *Curr. Opin. Microbiol.*, **21**, 45-50, doi: 10.1016/j.mib.2014.09.002.
9. Елизаров С. М., Алексеева М. Г., Новиков Ф. Н., Чилов Г. Г., Маслов Д. А., Штиль А. А., Даниленко В. Н. (2012) Идентификация сайтов фосфорилирования аминогликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus*, *Биохимия*, **77**, 1504-1512.
10. Boyko, K. M., Gorbacheva, M. A., Korzhenevskiy, D. A., Alekseeva, M. G., Mavletova, D. A., Zakharevich, N. V., Elizarov, S. M., Rudakova, N. N., Danilenko, V. N., and Popov, V. O. (2016) Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **477**, 595-601, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.097.
11. Алексеева М. Г., Рудакова Н. Н., Захаревич Н. В., Мавлетова Д. А., Бойко К. М., Николаева А. Ю., Корженевский Д. А., Даниленко В. Н. (2018) Новый ген аминогликозидфосфотрансферазы *aph(3″)-Id* из *Streptomyces rimosus* ATCC10970, кодирующий устойчивость к стрептомицину, *Генетика*, **54**, 1228-1232, doi: 10.1134/S001667581810003X.
12. Alekseeva, M. G., Boyko, K. M., Nikolaeva, A. Y., Mavletova, D. A., Rudakova, N. N., Zakharevich, N. V., Korzhenevskiy, D. A., Ziganshin, R. H., Popov, V. O., and Danilenko, V. N. (2019) Identification, functional and structural characterization of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(3")-Id from *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, *Arch. Biochem. Biophys.*, **671**, 111-122, doi: 10.1016/j.abb.2019.06.008.
13. Рудакова Н. Н., Алексеева М. Г., Захаревич Н. В., Мавлетова Д. А., Даниленко В. Н. (2020) Аминогликозидфосфотрансфераза AphSR2 *Streptomyces rimosus* ATCC 10970: зависимость устойчивости к антибиотикам от серин-треониновых протеинкиназ PkSR1 и PkSR2, *Генетика*, **56**, 119-124.
14. Algora-Gallardo, L., Schniete, J. K., Mark, D. R., Hunter, I. S., and Herron, P. R. (2021) Bilateral symmetry of linear streptomycete chromosomes, *Microb. Genom.*, **7**, 000692, doi: 10.1099/mgen.0.000692.
15. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, **96**, 23-28, doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.
16. Mierendorf, R., Yeager, K., and Novy, R. (1994) Innovations, *Newslett. Novagen*, **1**, 1-3.
17. Bolanos-Garcia, V. M., and Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1304-1313, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.027.
18. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich UK, 613 pp.
19. Sambrook, J., Fritsch, E. E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 479 pp.
20. Barry, A. L., and Thornsberry, C. (1993) *Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures* (Murray, P., ed.) Washington D.C, ASM Press, pp. 112-137.
21. Wiekler, M. A. (2015) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
22. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Milburn, D., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1998) Sequences annotated by structure: a tool to facilitate the use of structural information in sequence analysis, *Protein Eng.*, **11**, 855-859, doi: 10.1093/protein/11.10.855.
24. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948, doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
25. Hegde, S. S., Javid-Majd, F., and Blanchard, J. S. (2001) Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 45876-45881, doi: 10.1074/jbc.M108810200.
26. Sanz-García, F., Anoz-Carbonell, E., Pérez-Herrán, E., Martín, C., Lucía, A., Rodrigues, L., and Aínsa, J. A. (2019) Mycobacterial aminoglycoside acetyltransferases: a little of drug resistance, and a lot of other roles, *Front. Microbiol.*, **10**, 46, doi: 10.3389/fmicb.2019.00046.

27. Bassenden, A. V., Dumalo, L., Park, J., Blanchet, J., Maiti, K., Arya, D. P., and Berghuis, A. M. (2021) Structural and phylogenetic analyses of resistance to next-generation aminoglycosides conferred by AAC(2') enzymes, *Sci. Rep.*, **11**, 11614, doi: 10.1038/s41598-021-89446-3.
28. Aínsa, J. A., Pérez, E., Pelicic, V., Berthet, F. X., Gicquel, B., and Martín, C. (1997) Aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2′)-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2′)-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*, *Mol. Microbiol.*, **24**, 431-441, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.3471717.x.
29. D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006) Sampling the antibiotic resistome, *Science*, **311**, 374-377, doi: 10.1126/science.1120800.
30. Даниленко В. Н., Пузынина Г. Г., Ломовская Н. Д. (1977) Множественная антибиотикорезистентность актиномицетов, *Генетика*, **13**, 1831-1842.
31. Потехин И. А., Даниленко В. Н. (1985) Детерминант устойчивости к канамицину *Streptomyces rimosus*: амплификация в составе хромосомы и обратимая генетическая нестабильность, *Молекулярная биология*, **19**, 805-817.
32. Davies, J., and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74**, 417-433, doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
33. Crits-Christoph, A., Hallowell, H. A., Koutouvalis, K., and Suez, J. (2022) Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome, *Gut Microbes*, **14**, 2055944, doi: 10.1080/19490976.2022.2055944.
34. Lee, K., Raguideau, S., Sirén, K., Asnicar, F., Cumbo, F., Hildebrand, F., Segata, N., Cha, C. J., and Quince, C. (2023) Population-level impacts of antibiotic usage on the human gut microbiome, *Nat. Commun.*, **14**, 1191, doi: 10.1038/s41467-023-36633-7.
35. Ellabaan, M. M. H., Munck, C., Porse, A., Imamovic, L., and Sommer, M. O. A. (2021) Forecasting the dissemination of antibiotic resistance genes across bacterial genomes, *Nat. Commun.*, **12**, 2435, doi: 10.1038/s41467-021-22757-1.
36. MacNair, C. R., and Tan, M. W. (2023) The role of bacterial membrane vesicles in antibiotic resistance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1519**, 63-73, doi: 10.1111/nyas.14932.
37. Jeong, C. S., Hwang, J., Do, H., Cha, S. S., Oh, T. J., Kim, H. J., Park, H. H., and Lee, J. H. (2020) Structural and biochemical analyses of an aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase from *Mycolicibacterium smegmatis*, *Sci. Rep.*, **10**, 21503, doi: 10.1038/s41598-020-78699-z.

RESISTOM *Streptomyces rimosus* – A RESERVOIR OF RESISTANCE GENES TO AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS

M. G. Alekseeva*, N. N. Rudakova, A. V. Ratkin, D. A. Mavletova, and V. N. Danilenko

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: alekseevamg@mail.ru

The study of aminoglycoside acetyltransferases in actinobacteria of the genus *Streptomyces* is an integral part of the study of soil bacteria as the main reservoir and possible source of drug resistance genes. Previously, in the strain *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 (producing oxyteteracycline), which is resistant to most natural aminoglycoside antibiotics, we have identified and biochemically characterized 3 aminoglycoside phosphotransferases, which cause resistance to kanamycin, neomycin, paromomycin, streptomycin, and hygromycin B. In the presented work, it was shown that resistance to other AGs in this strain is associated with the presence of the enzyme aminoglycoside acetyltransferase, belonging to the AAC(2') subfamily. Induction of the expression of the gene, designated by us as *aac(2′)-If*, in *Escherichia coli* cells determines resistance to a wide range of natural aminoglycoside antibiotics (neomycin, gentamicin, tobramycin, sisomycin, and paromomycin) and to an increase in the minimum inhibitory concentrations of these antibiotics.

Keywords: multidrug resistance, *Streptomyces rimosus*, aminoglycoside acetyltransferase, MICs for aminoglycoside antibiotics

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 900 – 912

УДК 577.151;579.01/08;571.27

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ IdeS И IdeZ И ВОЗМОЖНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2023 И.С. Бокша[1,2]*, В.Г. Лунин[1], Т.А. Данилова[1], М.С. Попонова[1], Н.Б. Поляков[1], А.М. Лящук[1], С.В. Константинова[1], З.М. Галушкина[1], Е.В. Устенко[1]

[1] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, 123098 Москва, Россия; электронная почта: boksha_irina@mail.ru*

[2] *ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», 115522 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 30.03.2023
После доработки 14.04.2023
Принята к публикации 15.04.2023

Эндопептидазы IdeS и IdeZ – факторы вирулентности стрептококков, специфически расщепляющие тяжёлые цепи IgG, интересны с точки зрения биотехнологии, медицины и ветеринарии. Гены *ideS* и *ideZ* (в случае *ideS* ген клонирован из коллекционного штамма *Streptococcus pyogenes*, в случае *ideZ* – синтетический из *Streptococcus zooepidemicus*) клонированы и экспрессированы в системе гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli*, в аминокислотную последовательность каждой эндопептидазы введён аффинный домен 6His-tag. Ферменты IdeS и IdeZ выделены и очищены металл-аффинной хроматографией. Полученные IdeS и IdeZ гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле и активны в отношении IgG человека и различных видов животных. Специфичность расщепления IgG человека эндопептидазами IdeS и IdeZ подтверждена методом электрофореза в полиакриламидном геле. Продемонстрировано применение рекомбинантной IdeZ для иммунологического анализа мыта лошадей (диагностики и определения титра специфических антител в крови). Таким образом, кроме применения в медицине и биотехнологии, IdeZ может применяться в ветеринарии и санитарной микробиологии для диагностики инфекций, вызываемых *Streptococcus equi* и *S. zooepidemicus*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантные эндопептидазы, IdeS, IdeZ, расщепление IgG, мыт лошадей, иммуноферментный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523060027, **EDN:** EDQMNB

ВВЕДЕНИЕ

Наблюдаемое ныне широкое распространение устойчивых к антибиотикам бактериальных патогенов, вызванное зачастую неоправданным и неправильным применением антибиотиков в медицине и ветеринарии, а также в производстве продуктов питания, лишает нас возможности вести эффективную борьбу с патогенами. Обычные инфекции теперь всё чаще приводят к летальному исходу из-за неэффективности антибиотиков вследствие резистентности к ним микроорганизмов. Лучшее понимание механизмов взаимодействия между бактериальными патогенами и организмами-хозяевами на молекулярном уровне необходимо для разработки альтернативных стратегий лечения и профилактики бактериальных инфекций. Этими стратегиями будущего могут стать разработки новых защитных вакцин, усилителей иммунитета организма-хозяина, а также поиск блокаторов факторов вирулентности. Поэтому иммунные реакции организма-хозяина и соответствующие стратегии, возникшие для уклонения от них и «используемые» микроорганизмами для избегания обнаружения и элиминации, представляют собой важную и интересную область исследований.

Один из ярких примеров – секреция патогенными стрептококками ряда протеолитических ферментов, действие которых нарушает нормальное функционирование IgG. Так, патоген человека *Streptococcus pyogenes* секретирует ферменты EndoS, SpeB и IdeS. EndoS гидролизует консервативный *N*-концевой гликан тяжёлых цепей IgG человека [1], что снижает их сродство к большинству рецепторов IgG-Fc [2]. SpeB – неспецифическая протеаза, расщепляющая в числе других субстратов

* Адресат для корреспонденции.

также и IgG [3]. Кроме того, *S. pyogenes* секретирует эндопептидазу IdeS, которая с высокой специфичностью расщепляет все 4 подкласса IgG человека в нижней части шарнирной области тяжёлой цепи с образованием $F(ab)_2$-фрагмента, полностью сохраняющего антигенсвязывающую активность, и димерного Fc-фрагмента [4, 5]. Как следствие, антитела IgG, расщепленные IdeS, оказываются лишёнными способности связываться с рецептором IgG-Fc и активировать систему комплемента.

Среди всех перечисленных факторов вирулентности *S. pyogenes* наиболее изучена IdeS, поскольку она является важнейшим антифагоцитарным фактором [5, 6]. Изучен механизм расщепления этой эндопептидазой молекул IgG [7]. Расщепление происходит в два этапа [8, 9]. Первый этап, значительно превосходящий по скорости последующую стадию, приводит к эффективному расщеплению одной из двух тяжёлых цепей с образованием иммуноглобулиновой молекулы (scIgG), сохраняющей целой одну из тяжёлых цепей. Такого расщепления уже оказывается достаточно для того, чтобы иммуноглобулин утратил свои функции [9]. Молекула scIgG менее чувствительна к расщеплению IdeS, чем молекула IgG с двумя целыми тяжёлыми цепями, и расщепление молекулы scIgG происходит в 100 раз медленнее, чем IgG, с образованием одного фрагмента $F(ab')_2$ и одного фрагмента Fc [9].

Примечательно, что IdeS уже нашла применение в качестве биофармацевтического средства. Биомедицинское применение эндопептидазы IdeS основано на высокоспецифичном расщеплении IgG при прямом введении IdeS пациентам в кровь [4]. Например, её применяют для расщепления IgG при аутоиммунных состояниях человека [10]. Также IdeS проходит клинические испытания в области нефрологии в качестве препарата, предотвращающего гуморальную реакцию отторжения у больных после трансплантации почки [11, 12]. Такой терапевтический подход уже нашёл применение при гломерулонефрите [13] и других заболеваниях почек [11]. В 2021 г. начата вторая фаза клинических испытаний IdeS при трансплантации почки у пациентов 18–70 лет [14], это международное исследование проводится США, Швецией и Францией.

В отличие от *S. pyogenes*, патогенного стрептококка группы A, атакующего исключительно человека, патогенные стрептококки группы C поражают животных и иногда – человека. Первый из двух рассматриваемых в нашей работе стрептококков группы C – патогенов животных – *Streptococcus equi* – характеризуется узким спектром хозяев (поражает непарнокопытных), а второй – *Streptococcus zooepidemicus* – встречается у многих животных, включая непарнокопытных, а также у человека. Идентичность последовательностей ДНК штаммов *S. equi*, *S. zooepidemicus* и *S. pyogenes* составляет около 80% [15].

Актуальность изучения *S. equi* и *S. zooepidemicus* обусловлена не только тем, что оба эти вида вызывают «мыт» лошадей – остро протекающее, часто с тяжёлым течением и гибелью, быстро распространяющееся заболевание, поражающее иногда более 80% молодняка – жеребят и молодых лошадей. Важно, что *S. zooepidemicus*, ранее считавшийся оппортунистическим комменсалом, оказался способным вызывать острое инфекционное заболевание не только у лошадей, но также и у других млекопитающих, включая людей [16].

У *S. equi* и *S. zooepidemicus* были идентифицированы и охарактеризованы эндопептидазы IdeZ и IdeE – гомологи IdeS *S. pyogenes* [17]. Оба эти фермента (IdeZ и IdeE) тоже эффективно расщепляют иммуноглобулины класса IgG (включая IgG человека), содержащие субстратный участок LLGGP, что свидетельствует о сходстве субстратной специфичности с IdeS. IdeE является гомологом IdeZ (сходство достигает 86%) и EndoS *S. pyogenes* (70% сходства). Кроме того, у *S. equi* обнаружен ген ideE2, кодирующий дополнительную внеклеточную эндопептидазу IdeE2, сходную по последовательности с IdeE и IdeZ и также расщепляющую IgG. Более того, у *S. zooepidemicus* найден гомологичный белок IdeZ2.

По механизму действия IdeS, IdeZ и IdeE относятся к цистеиновым протеиназам [4]. Среди других прокариотических цистеиновых протеиназ IdeS уникальна тем, что, во-первых, она секретируется в зрелой активной форме и не подвергается процессингу, во-вторых, она обладает высокой специфичностью к своему субстрату IgG и расщепляет его в единственном месте – шарнирной области после остатка глицина-236 обеих тяжёлых цепей, в-третьих, её активность не ингибируется типичным ингибитором цистеиновых протеиназ E-64 [5]. Обе эндопептидазы – IdeS и IdeZ – расщепляют IgG человека [16].

Цели настоящей работы – получение рекомбинантных IdeS и IdeZ и оценка их ферментативной активности в отношении IgG человека; выявление и определение титров антител к IdeZ в крови лошадей, переболевших и не болевших мытом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все манипуляции генной инженерии (выделение гена, кодирующего IdeS, из штамма *S. pyogenes* Dochez NY 5 (тип 10), синтез гена, кодирующего IdeZ, из *S. equi* subsp. *zooepidemicus* [17], получение генетических конструкций) проводили по стандартным протоколам, описанным ранее [18].

Экспрессия генов и выращивание микроорганизма-продуцента. Клонирование, выращивание и отбор трансгенных *E. coli* клонов-продуцентов рекомбинантных белков проводили так же, как описано ранее [18].

На рис. 1, *а* Приложения представлена электрофоретическая картина экстрактов белков клеток-продуцентов IdeS и IdeZ до и после индукции изопропилтиогалактозидом.

Экстракт клеток, образцы которых нагружали на дорожки *1* или *2*, готовили следующим образом: суспензию клеток в среде культивирования (1,5 мл) осаждали центрифугированием (при 5000 *g*), полученный осадок клеток суспендировали в 100 мкл раствора 8 М мочевины в воде, добавляли к нему (1 : 1 по объёму) 2-кратный буферный раствор Лэммли с дитиотреитолом (ДТТ) для нанесения образцов на гель, на каждую дорожку полиакриламидного геля (ПААГ) наносили 8 мкл полученного образца.

Разрушение биомассы трансгенных микроорганизмов-продуцентов, выделение и очистка рекомбинантных белков из клеток продуцентов. Ферменты IdeS и IdeZ выделяли однотипно. Биомассу бактериальных клеток, осаждённых центрифугированием из культуральной среды, хранили при –20 °С. Разрушение биомассы проводили в «лизирующем буферном растворе»: 0,5 М NaCl, 1% (*w*/*v*) Triton X-100, 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ $MgCl_2$, 10 Ед./мл раствора нуклеазы-бензоназы (выделена и очищена в лаборатории Биологически активных наноструктур НИЦ ЭМ им. Гамалеи) и 100 мкг/мл лизоцима («Panreac-AppliChem», Германия). Соотношение клеточной биомассы (мг) и «лизирующего буферного раствора» (мл) составляло 1 : 10. Лизис клеток проводили 25 мин при комнатной температуре на шейкере. Обработку ультразвуком суспензии лизированных клеток проводили в течение 5 мин при амплитуде 60% (по 2 с, с 2-секундными интервалами) на льду, используя установку Bandelin Sonopuls (HD2070) с микронасадкой («Bandelin», Германия). Центрифугировали суспензию при 22 000 *g* 15 мин при 4 °С, пробы белка из полученных после центрифугирования «осадка» и «супернатанта» отбирали и проводили электрофорез в 15%-ном ПААГ для того, чтобы определить, в какой из этих фракций содержится целевой белок.

Колоночную аффинную хроматографию проводили на сорбенте WorkBeads 40 Ni («BioWorks», Швеция), объём сорбента в колонке – 2 мл суспензии, перед проведением хроматографии белка колонка была уравновешена 15 мМ раствором имидазол-HCl (pH 8,0). Перед нанесением на колонку раствор белка разбавляли, добавляя к нему имидазол-HCl (pH 8,0) до конечной концентрации имидазола – 15 мМ. Градиент концентрации имидазола в элюирующем буферном растворе был от 15 мМ до 1 М, также в элюирующий раствор был добавлен 0,5 М NaCl. Хроматографию проводили, используя BioLogic LP («Bio-Rad», США).

Оценку наличия ферментативной активности – способности IdeS и IdeZ расщеплять IgG человека – проводили с купленным в аптеке фармпрепаратом «Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл» («Микроген», Россия).

Иммунологические тесты. Образцы крови лошадей, переболевших и не болевших мытом (со слов владельцев и ветеринаров, ставивших диагноз), были любезно предоставлены владельцами лошадей нескольких частных конюшен Подмосковья. Всего было собрано 18 образцов крови лошадей в возрасте от 1 года до 25 лет. Кровь (объёмом 5 мл) собирали летом 2022 г. в дневное время после утренних прогулок лошадей (в одно и то же время суток – как от переболевших, так и от не болевших мытом) в вакутейнеры без добавок, отделяли сыворотки после формирования тромба-сгустка при температуре окружающей среды (30 °С), полученные сыворотки замораживали при –20 °С и хранили до анализа, размораживая непосредственно перед постановкой экспериментов. Для дальнейшего хранения при 4 °С и проведения повторных анализов в размороженные сыворотки добавляли азид натрия (до конечной концентрации 0,04%).

Иммуноблоттинг проводили в стандартных условиях, нагружая 2 мкг белка IdeZ на каждую дорожку при электрофорезе, перед проведением которого проводилась обработка IdeZ прогреванием при 95 °С в течение 5 мин в 2-кратном «буферном растворе для образцов» по Лэммли с восстановителем ДТТ. После процедуры электроблоттинга белка IdeZ на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra («Amersham», Швеция) её окрашивали для контроля качества и равномерности переноса

раствором Красного Понсо, блокировали раствором 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (Bovine Serum Albumin Fraction V, «Panreac-AppliChem») в 20 мМ Tris-HCl, (pH 7,5), содержащем 0,025% (*v/v*) Tween-20 и 0,15 М NaCl, в течение ночи. После этого мембрану разрезали на полоски (в направлении вдоль дорожек геля), и каждую полоску обрабатывали отдельно сыворотками от разных лошадей (все в одинаковом разведении 1 : 100 в том же буфере) при комнатной температуре (25 °С) в течение 1 ч. Затем полоски промывали и обрабатывали вторичными антителами кролика к IgG лошади (разведение 1 : 1000), конъюгированными с пероксидазой хрена («ИМТЕК», Россия) в течение 1 ч, после чего проводили пероксидазную реакцию с субстратами – диаминобензидином и перекисью водорода.

При постановке твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) использовали иммунологические планшеты («Costar», США). Все операции проводили в стандартных условиях постановки ИФА, кроме одной дополнительной – предварительной термоинактивации IdeZ. Для этого перед сорбцией на иммунологический планшет раствор IdeZ прогревали 15 мин при 60 °С. Сорбцию IdeZ из раствора в концентрации 5 или 10 мкг/мл в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,5) на иммунологический планшет проводили в течение ночи при 4 °С (или 1 ч при комнатной температуре).

Места неспецифической сорбции блокировали раствором (1 мг/мл) бычьего сывороточного альбумина (Albumin bovine RIA grade, «Sigma», США) в 10 мМ K/Na-фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 0,137 М NaCl и 0,027 М KCl, (pH7,5), с добавлением 0,1% (*v/v*) Tween-20. В том же растворе готовили разведения лошадиных сывороток, начиная от 1 : 250 или 1 : 500, исходя из различий в интенсивности окраски зоны при иммуноблоттинге, с шагом 1/2 – 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 16 000, 1 : 32 000. В качестве вторичных антител использовали те же антитела кролика к IgG лошади, конъюгированные с пероксидазой хрена, что и в случае иммуноблоттинга, в разведении 1 : 5000. Для построения кривых титрования использовали онлайн-программу Arigo (https://www.arigobio.com/elisa-analysis), с её же помощью находили характеристики кривых титрования, т.е. титры сывороток.

При исследовании кинетики гидролиза IgG человека эндопептидазой IdeZ реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение максимального времени (120 мин), отбирая пробы через определённые промежутки времени. Отобранные пробы смешивали с холодным буфером для образцов по Лэммли без восстанавливающих агентов и немедленно помещали на лед для остановки реакции. Перед проведением электрофореза (нанесением проб в карманы геля) их прогревали 5 мин при 95 °С. Изображения ПААГ, окрашенных Кумасси R250, обрабатывали в программе GelAnalyzer 19.1. Плотность (интенсивность в пикселях), соответствующую каждой белковой зоне, делили на плотность (интенсивность) зоны, соответствующей IdeZ, присутствующей во всех образцах в одинаковом количестве в качестве стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Конструкция плазмиды, кодирующей эндопептидазу IdeS. Получена плазмида, содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок IdeS *S. pyogenes* с 6His в *N*-концевой области. Аминокислотная последовательность кодируемого плазмидой белка IdeS с 6His-tag на *N*-конце (5–10 а.о.) приведена в табл. 1.

Расчётная молекулярная масса рекомбинантного белка составляет 37,01 кДа, расчётный коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon_{molar}(M^{-1}\cdot см^{-1})$ равен 52 370, предсказанное поглощение при 280 нм раствора с концентрацией 1 мг/мл равно 1,42. На основе этого коэффициента проводили оценку концентрации очищенного белка в растворе.

Конструкция плазмиды, кодирующей эндопептидазу IdeZ. Получена плазмида, содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок IdeZ *S. equi* subsp. *zooepidemicus* с 6His в *N*-концевой области. Плазмида кодирует белок с аминокислотной последовательностью, приведённой в табл. 1: 6His-tag (5–10 а.о.) и IdeZ (13–327 а.о.).

Расчётная молекулярная масса белка 6His-IdeZ составляет 36,87 кДа, расчётный коэффициент экстинкции $\varepsilon_{molar}(M^{-1}\cdot см^{-1})$ равен 52 370, предсказанное поглощение раствора с концентрацией 1 мг/мл составляет 1,42. На основе этого коэффициента проводили оценку концентрации очищенного белка в растворе.

Сравнение онлайн-программами BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq) и Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) аминокис-

Таблица 1. Последовательности рекомбинантных белков IdeS и IdeZ

Белок	Аминокислотные последовательности 5'–3'
IdeS	MRGSHHHHHHGSDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPAKFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITK TFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKEKIEAYLKKHPDKQKIMFGDQELLDVRKVINTKGDQTN SELFNYFRDKAFPGLSARRIGVMPDLVLDMFINGYYLNVYKTQTTDVNRTYQEKDRRGGIFDAVFTRG DQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSNGNLKAIYVT DSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTNKIL
IdeZ	MRGSHHHHHHGSDDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWY DITKVFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVF TRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIY VTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

лотных последовательностей рекомбинантных IdeS и IdeZ показало, что степень идентичности составляет 74% (BLAST) и 72,4% (Needle), а степень сходства (гомология) составляет 86% (BLAST) и 85,8% (Needle).

Выделение и очистку рекомбинантных белков IdeS и IdeZ проводили в одинаковых условиях, при этом в случае IdeS брали 900 мг биомассы продуцента IdeS, а в случае IdeZ брали 525 мг биомассы продуцента IdeZ.

В случае IdeS биомассы брали исходно больше, чем в случае IdeZ, поскольку после разделения суспензии разрушенных клеток центрифугированием на «супернатант» и «осадок» в «супернатанте», который использовали далее для очистки целевых белков (IdeS и IdeZ), оказалась меньшая доля целевого белка (IdeS), чем в случае IdeZ, где целевой белок распределился поровну между «осадком» и «супернатантом» (данные электрофоретических исследований не приведены).

Биомассу в обоих случаях разрушали в 5 мл «лизирующего буфера» (состав см. в разделе «Материалы и методы»).

Поскольку генетические конструкции IdeS и IdeZ были спланированы так, что рекомбинантные белки содержали 6His-tag, их аффинная хроматография на Ni-сорбенте позволила практически за один этап получить гомогенные препараты белков. Хроматографический профиль в случае очистки IdeZ колоночной хроматографией, которая проводилась со скоростью протока 0,4 мл/мин, приведён на рис. 2 Приложения.

В случае очистки IdeS была получена аналогичная картина хроматографической элюции (не приведена).

На рис. 1, *б* Приложения показана картина электрофоретического разделения в ПААГ исходного «супернатанта» и фракций белка IdeZ, не связавшегося с сорбентом, а также элюатов с колонки WorkBeads 40Ni.

Полученные образцы IdeS и IdeZ диализовали против 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5).

Концентрации очищенных IdeS и IdeZ определяли спектрофотометрически по светопоглощению при 280 нм с учётом расчётных коэффициентов экстинкции, приведённых выше. Выход очищенного белка составил 7,95 мг – для IdeS из 900 мг биомассы продуцента и 10,6 мг – для IdeZ из 525 мг биомассы продуцента.

Активность IdeS и IdeZ в отношении IgG человека (см. «Материалы и методы») исследовали в одинаковых условиях. В случае IdeS готовили инкубационные смеси в трёх разных соотношениях фермента и субстрата, для чего к 20 мкл IgG (1 мг/мл) добавляли 20 мкл IdeS в различных концентрациях: 0,085 мг/мл (смесь 1), 0,17 мг/мл (смесь 2), 0,85 мг/мл (смесь 3). Инкубация продолжалась 1 ч при 37 °C. Останавливали реакцию добавлением равного объёма 2-кратного буферного раствора для образцов по Лэммли с восстанавливающим агентом ДТТ и инкубацией в течение 4 мин при 95 °C.

На рис. 3, *а* Приложения приведена картина электрофореза продуктов реакции смесей 1–3. Видно, что в случаях реакционных смесей (1) и (2) произошёл частичный гидролиз IgG, а в случае смеси (3), в которой соотношение концентраций субстрата IgG человека и фермента IdeS составило ≈ 1,17 : 1, реакция протеолиза в данных условиях инкубации прошла практически полностью.

В случае IdeZ готовили инкубационные смеси в четырёх разных соотношениях фермента и субстрата, для чего к 50 мкл IgG (1 мкг/мкл) добавляли 20 мкл IdeZ в различных концентрациях: 0,55 мкг/мкл (смесь 1), 0,055 мкг/мкл (смесь 2), 0,011 мкг/мкл (смесь 3) и 0,006 мкг/мкл (смесь 4).

Инкубацию смесей проводили в течение 1 ч при 37 °C. Останавливали реакцию добав-

лением равного объёма 2-кратного буферного раствора для образцов по Лэммли с восстанавливающим агентом ДТТ и нагревом 4 мин при 95 °С. Картина электрофореза белковых продуктов реакции приведена на рис. 3, *б* Приложения. Видно, что в смесях (2)–(4) произошёл частичный гидролиз IgG, и только при наиболее высокой концентрации IdeZ – в случае смеси (1), в которой соотношение концентраций субстрата IgG и фермента IdeZ составило 4,5 : 1, в данных условиях инкубации гидролиз IgG произошёл практически полностью.

Исследована кинетика гидролиза IgG человека эндопептидазой IdeZ в растворе. Концентрации IgG и IdeZ в реакционной среде составили 0,87 мг/мл и 0,26 мг/мл соответственно.

На рис. 4 Приложения приведено фото электрофоретического разделения в 10%-ном ПААГ, в карманы геля наносили пробы, отобранные из реакционной смеси IgG и IdeZ, инкубированной в течение 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин при температуре 37 °С. Все пробы обрабатывали буферным раствором для образцов без восстанавливающего агента. На дорожке *1* – IgG без IdeZ (контроль).

Как показано на рис. 4 Приложения, в первые 5–10 мин нарастание образования продукта (интенсивность нижней зоны) и исчезновение самой верхней зоны (нерасщеплённые молекулы IgG) происходят с большой скоростью, тогда как окончательное расщепление тяжёлых цепей молекул scIgG (вторая сверху зона) происходит лишь за последующие 1–2 ч.

Параллельно из той же реакционной смеси отбирали пробы и смешивали их с буферным раствором для образцов с восстановителем ДТТ, подвергали электрофорезу в 10%-ном ПААГ, количественно обрабатывали изображение, и при этом кинетика убыли тяжёлых цепей во времени была такого же характера, как представлено на рис. 4 Приложения с пробами, обработанными без ДТТ, и после 1 ч инкубации тяжёлые цепи в геле практически не обнаруживались (данные не приведены).

Выделенные и очищенные IdeZ и IdeS хранили в 50%-ном растворе глицерина в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) при –20 °С. За 3 месяца хранения снижение активности составило не более 5%.

Иммуноблоттинг с рекомбинантной IdeZ и сыворотками крови лошадей. Иммуноблоттинг с очищенным белком IdeZ в качестве антигена был проведён с целью дальнейшего подбора условий твёрдофазного ИФА. Оба анализа (иммуноблоттинг и ИФА) служили целям обнаружения специфичных к IdeZ антител в крови лошадей и определения титров антител.

Иммуноблоттинг позволил, во-первых, убедиться в том, что антитела присутствуют в крови обследованных лошадей и качественно сравнить их титры в сыворотках. При одинаковом разведении сывороток (1 : 100) во всех 18 случаях наблюдалось окрашивание зоны IdeZ, но интенсивность окрашивания белковых зон качественно различалась, следовательно, титры сывороток были различными. Во-вторых, иммуноблоттинг позволил убедиться в том, что при обработке IdeZ нагреванием в течение 4 мин при 95 °С в буферном растворе для образцов по Лэммли при электрофорезе в ПААГ ферментативная активность IdeZ полностью подавляется, но такая обработка не мешает взаимодействию антигена (IdeZ) с антителами в сыворотке крови лошадей и проведению иммуноблоттинга в стандартных условиях с первичными и вторичными антителами (иммуноглобулинами класса IgG, которые расщепляются активной IdeZ). Пример окрашивания (фотография полосок нитроцеллюлозной мембраны) после иммуноблоттинга приведён на рис. 5, *а* Приложения.

Разработка твёрдофазного ИФА с использованием рекомбинантной IdeZ. В разработке твёрдофазного ИФА с целью определения наличия антител к IdeZ в лошадиных сыворотках существенный момент и узкое место – это наличие деградирующей IgG ферментативной активности IdeZ. Проведение ИФА с не инактивированной заранее IdeZ оказалось невозможным из-за расщепления ею иммуноглобулинов, использованных для анализа (данные не приведены). Поскольку было установлено, что при иммуноблоттинге IdeZ сохраняет антигенные свойства, будучи термически обработанной 4 мин при 95 °С в буферном растворе для образцов по Лэммли, для твёрдофазного ИФА тоже была проведена термоинактивация IdeZ. В данном случае обработка 15 мин при 60 °С раствора IdeZ в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,5) оказалась достаточной для полной потери активности IdeZ с сохранением её антигенных свойств, и при этом белок IdeZ оставался в растворённом состоянии в этом буфере.

Пример кривой титрования для образца сыворотки № 3 приведён на рис. 5, *б* Приложения. Кривая построена программой Arigo онлайн, в которой также определены параметры кривой: $R^2 = 1{,}0$; $a = 1{,}593301$; $b = 1{,}105941$; $c = 2599{,}286145$; $d = 0{,}066838$.

Таблица 2. Титры антител к IdeZ в сыворотках лошадей, переболевших и не болевших мытом

Шифр животного	Информация о животных		Титр (разведение сыворотки)
	болели	не болели	
№ 2	♂ 15 лет		1523
№ 3	♂ (Мерин), 16 лет		2599
№ 4	♀ 22 года		659
№ 5	♂ 10 лет		1270
№ 6	♂ (Мерин), 12 лет		1148
№ 7	♂ (Мерин), 7 лет		966
№ 8	♀, 13 лет		526
№ 9	♀, 10 лет		2253
№ 10	♂, 2 года, повышалась температура		8026
№ 11	♂ (Мерин), 4 года, повышалась температура		1114
№ 12	♀, 24 года		447
№ 13		♂, 8 лет	1852
№ 1А		♀, 2 года	634
№ 2А		♂ (Мерин), 12 лет	438
№ 3А		♀, 5 лет	536
№ 4А		♀, 1 год	1025
№ 5А		♀, 20 лет	803
№ 1		♂ (Мерин), 25 лет	10

Кривые титрования сывороток описываются формулой (1):

$$y = d + \frac{a - d}{1 + (x \div c)^b}, \qquad (1)$$

где x – концентрация сыворотки; y – ответ (оптическая плотность); a – теоретический ответ при нулевой концентрации; b – коэффициент наклона; c – точка перегиба (EC_{50}); d – теоретический ответ при бесконечно большой концентрации.

Результаты определения титров антител к IdeZ в сыворотках лошадей, переболевших и не болевших мытом, приведены в табл. 2.

Как видно по результатам, приведённым в табл. 2, титры сывороток практически всех лошадей, как болевших, так и не перенёсших зарегистрированного ветеринарами заболевания, находились в диапазоне определения системы ИФА. У переболевших животных титры были выше, чем у не болевших, при этом у переболевших молодых лошадей титры оказались выше, чем у лошадей старше 20 лет.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в нашей работе рекомбинантные IdeS и IdeZ по свойствам и активности сходны с описанными в литературе [9]. Кинетика расщепления IgG была описана ранее только для IdeS [9], а в нашей работе описана кинетика расщепления IgG человека ферментом IdeZ. Кинетика оказалась сходной: расщепление первой тяжёлой цепи в молекуле IgG происходит быстро, в течение первых

минут инкубации, тогда как для полного расщепления второй цепи требовалось 1–2 ч.

Если рассматривать биотехнологическое применение IdeS и IdeZ, то можно отметить, что, по данным литературы, использование гидролиза IdeS упрощает процедуру расшифровки аминокислотной последовательности моноклональных антител [19]. Кроме того, из данных литературы известно, что расщепление IdeZ иммуноглобулинов также было успешно применено для облегчения идентификации белков с такой посттрансляционной модификацией, как O-GlcNAc [20]. Действительно, идентификация белков, имеющих молекулярные массы в области 50 кДа и предварительно выделенных иммунопреципитацией с антителами, затруднена из-за близости их молекулярной массы к массе полноразмерной тяжёлой цепи иммуноглобулинов. Особенно затруднён масс-спектрометрический анализ гликозилированных O-GlcNAc-белков, причём даже после электрофоретического разделения и вырезания белковых зон из геля анализ сложен, поскольку иммуноглобулиновые молекулы тоже гликозилированы, а области молекулярных масс (50 кДа) перекрываются с тяжёлыми цепями иммуноглобулинов. Благодаря «укорачиванию» IdeZ тяжёлых цепей иммуноглобулинов наложение и перекрытие с ними анализируемых белков в области молекулярной массы 50 кДа исключается.

Другой важнейшей областью применения протеолитических ферментов IdeS и IdeZ, расщепляющих иммуноглобулины человека с высокой специфичностью, является медицина [10]. Недавно было предложено применить IdeS (препарат «imlifidase») в лечении угрожающих жизни гепарин-индуцированной тромбоцитопении (Heparin-induced thrombocytopenia, HIT) и сходных по механизму развития поствакцинальных осложнений после вакцинации от SARS-CoV-2: тромбоза и тромбоцитопении, связанных с наличием в крови пациентов антител к тромбоцитарному фактору 4 (PF-4) [21–23].

Однако при внутривенном введении IdeS в кровь в качестве терапевтического агента для удаления иммуноглобулинов [24] возникает проблема наличия изначально циркулирующего пула антител к IdeS у тех пациентов, которые ранее встречались со стрептококковой инфекцией [25]. Действительно, известно, что большая доля взрослых людей в популяции обладает сформировавшимся пулом антител IgG к IdeS вследствие ранее перенесённой инфекции *S. pyogenes* [26]. При введении в кровь IdeS с терапевтической целью эти циркулирующие анти-IdeS антитела могут увеличивать риск реакций, подобных гиперчувствительности. Фирма «Thermo Fisher Scientific» («Phadia», Швеция) разработала специфическую тест-систему *in vitro* (IdeS-ImmunoCAP) для количественного определения анти-IdeS антител, причём нижний порог чувствительности системы в 7 раз ниже минимального уровня измеряемых в крови людей антител (2 мг/литр). Лица с уровнем антител >15 мг/литр, по данным этой тест-системы, из клинических испытаний исключались.

Логично было бы попытаться разработать системы экстракорпоральной гемокоррекции – расщепления IgG крови вне тела больного – ферментами IdeS или IdeZ, иммобилизованными на сорбентах. Данные нашей работы свидетельствуют о том, что расщепление иммуноглобулинов происходит и в случае «иммобилизованной» IdeZ, т.е. связанной на поверхности лунки иммунологического планшета. Сохранность ферментативной активности в этом случае создала трудности в разработке ИФА, которые удалось преодолеть посредством термоинактивации IdeZ. Мы также наблюдали проявление IgG-расщепляющей активности IdeZ, связанной с Workbeads 40Ni за 6His-tag (данные не приведены). Всё это указывает на возможность применения сорбированных на носителе эндопептидаз IdeS или IdeZ для экстракорпоральной обработки крови с целью частичного расщепления IgG. Применить сорбированную IdeS можно было бы и для элиминации циркулирующих анти-IdeS антител.

Продемонстрированная в нашей работе возможность получения больших количеств рекомбинантных активных IdeS и IdeZ в системе гетерологичной экспрессии в *E. coli* в будущем, возможно, позволит иммобилизовать эти ферменты и создать как аффинный сорбент для проведения гемосорбции и удаления циркулирующих анти-IdeS антител из крови пациентов, так и обеспечить экстракорпоральное расщепление IgG.

Другим подходом в преодолении проблем, возникающих при введении в кровь пациентов IdeS, может быть использование вместо неё IdeZ. Действительно, уже начала реализовываться идея использования IdeZ на пути развития такого направления в медицине, как применение векторов рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (AAV) для генной терапии редких заболеваний. Так, в моделях на мышах и нечеловекообразных приматах (макаках), пассивно иммунизированных человеческой антисывороткой, уже

оценён потенциал IdeZ для элиминирования ранее выработанных и циркулирующих нейтрализующих антител (Nab) против рекомбинантных AAV [27]. Продемонстрирована способность рекомбинантной GST-IdeZ и коммерческой IdeZ («New England Biolabs», США) расщеплять человеческие иммуноглобулины, циркулирующие в крови различных лабораторных животных, в том числе при введении им AAV в печень и сердце, и тем самым смягчать побочное действие генной терапии [27].

Также представляется обширным потенциал применения IdeZ в ветеринарии и санитарной микробиологии. В нашей работе с помощью рекомбинантной IdeZ впервые проведён Вестерн-блоттинг и ИФА-анализ антител к IdeZ в крови лошадей. Обнаружено наличие высоких титров антител к IdeZ у лошадей как переболевших мытом с явными симптомами, так и не болевших, но встречавшихся с инфекцией и/или перенёсших заболевание в лёгкой форме, не зарегистрированной ветеринарами как острое заболевание. Поскольку известно, что IdeZ синтезируют оба стрептококка – *S. equi* и *S. zooepidemicus*, полученные нами данные свидетельствует о том, что заболевание обследованных лошадей могло быть вызвано не только *S. equi*, но и *S. zooepidemicus*. Этот факт настораживает, если учесть высокую активность IdeZ с IgG человека и широкий спектр хозяев *S. zooepidemicus*, и указывает на необходимость подключения генетических тестов (ПЦР-анализов) для дифференциальной диагностики этих стрептококков в случае вспышек заболевания среди лошадей и других животных. Действительно, спектр организмов-хозяев у *S. zooepidemicus* значительно шире, чем у *S. equi* – специфического возбудителя мыта лошадей, и включает человека [28–30], хотя в конюшнях, где были собраны образцы крови для нашего исследования, не было отмечено случаев заражения и заболевания среди людей. Поскольку описаны случаи передачи патогенного *S. zooepidemicus* людям [31, 32], было бы интересно в будущем проверить наличие антител к IdeZ в сыворотке крови людей, контактировавших с заражёнными животными. Разработанная в нашем исследовании тест-система твёрдофазного ИФА может пригодиться в будущем для отслеживания эпизоотий, вызванных вирулентными штаммами *S. equi* или *S. zooepidemicus*.

Следует, видимо, также повысить внимание к *S. zooepidemicus*. Благодаря молекулярно-генетическим исследованиям пересмотрена классификация этого стрептококка: ранее он считался подвидом *S. equi*, но теперь выделен в самостоятельный вид *S. zooepidemicus*, являющийся эволюционным предшественником *S. equi* [33]. Несмотря на пересмотр классификации, во многих современных публикациях встречается старая классификация *S. zooepidemicus* как подвида – *S. equi* ssp. *zooepidemicus*. По данным молекулярно-генетических исследований [33], *S. equi* является биоваром *S. zooepidemicus*, причём ограничение только непарнокопытными спектра хозяев *S. equi* возникло вследствие полной утраты *S. equi* локусов CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)–Cas (CRISPR-associated), наделяющих микроорганизмы «адаптивной иммунной системой», или способностью сохранять устойчивость генома при заселении широкого спектра хозяев. По микробиологической классификации, оба вида (*S. zooepidemicus* и *S. equi*) относятся к группе С по Лэнсфилд (Lancefield). К настоящему времени стало широко известно и общепризнано, что *S. zooepidemicus* является не только комменсалом, но и способен давать патогенные штаммы [33, 34], вызывающие, кроме заболеваний лошадей [35], также вспышки геморрагической пневмонии собак в питомниках [36] и мастита жвачных – на фермах [37]. Источником эпидемической вспышки могут быть бессимптомные носители, включая животных, но известны также случаи заражения и заболевания людей [28–32, 38]. Описан случай массового заражения людей, носивший характер эпидемии. Так, эпидемиологические исследования, проведённые в Бразилии в начале этого века, выявили многочисленные случаи фарингита и гломерулонефрита, вызванные заражением *S. zooepidemicus* при употреблении сыра, приготовленного из сырого молока от болеющих маститом коров [39], что привело к госпитализации около сотни человек и гибели троих из них.

Что касается исследований распространённости микроорганизмов *S. equi* и *S. zooepidemicus* в популяции лошадей, то опубликована американская [35] и индийская [40] работы. Американские исследователи применяли иммунохимические подходы, а индийские исследователи использовали метод ПЦР с праймерами генов *SeM* и *SodA* для идентификации *S. equi* ssp. *equi* и *S. equi* ssp. *zooepidemicus* соответственно (индийскими исследователями дана старая классификация этих стрептококков, как подвидов). Большинство изолятов стрептококков, выделенных в Индии от сотни больных мытом и здоровых лошадей, классифицировано как *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, наряду с которым встречался

также и *S. equi* ssp. *equi*. Таким образом, хотя и не был оценён уровень антител к антигенам стрептококков (в том числе к IdeZ) в сыворотках обследованных лошадей, индийскими учёными была зарегистрирована высокая частота встречаемости у лошадей стрептококков, теоретически способных продуцировать IdeZ.

Результаты нашей работы не противоречат данным американских и индийских учёных: почти у всех обследованных лошадей мы обнаружили антитела к IdeZ. То, что у переболевших молодых лошадей титры оказались выше, чем у лошадей старшего возраста, может свидетельствовать о снижении иммунного ответа с возрастом животных. Так, в сыворотке одной не болевшей мытом лошади (№ 1, мерин, 25 лет) титр антител к IdeZ оказался, по сравнению с другими лошадьми, аномально низким. Это, возможно, указывает на ослабленный иммунитет старого животного, либо на отсутствие недавних контактов с патогенными стрептококками, и, вероятно, стрептококковая инфекция для этой лошади представляет потенциальную опасность. Напротив, у одного молодого жеребца (2 года) наблюдался чрезвычайно высокий титр антител, вышедший за верхний предел диапазона нашей системы ИФА и свидетельствующий о сильной иммунной реакции.

Относительно защиты от стрептококковой инфекции можно, к сожалению, констатировать, что на сегодняшний день пока не удаётся создать субъединичную вакцину, защищающую от *S. pyogenes*, относящегося к группе A, однако ведутся обнадёживающие разработки по созданию вакцин против стрептококков группы C. Известно, что животные, переболевшие инфекциями, вызванными как *S. equi*, так и *S. zooepidemicus*, повторно не заражаются и вырабатывают устойчивый иммунитет, но известно и об отсутствии перекрёстной защитной реакции. Что касается опубликованных подходов к разработке субъединичных вакцин против стрептококков группы C, то на экспериментальной мышиной модели было показано, что вакцинация с использованием IdeE или IdeE2 в качестве антигенов индуцировала защиту от экспериментальной инфекции *S. equi* ssp. *equi* [16], тогда как вакцинация рекомбинантным белком membrane attack complex (MAC) – IdeZ – защищала от экспериментальной инфекции *S. zooepidemicus* [41]. Также описаны разработки субъединичных вакцин с протективными свойствами в отношении инфекции *S. equi* ssp. *equi* и разработанных на основе нескольких расщепляющих иммуноглобулины эндопептидаз в качестве антигенов [28]. Кажется перспективным подход к разработке универсальной субъединичной вакцины, включающей антиген IdeZ, синтезируемый обоими видами – *S. equi* и *S. zooepidemicus*. В заключение отметим важный факт: наличие высоких титров антител к IdeZ у лошадей, перенёсших стрептококковую инфекцию, служит основанием для того, чтобы предположить, что субъединичная вакцина, включающая IdeZ в качестве антигена, может оказаться эффективной и, возможно, будет защищать от заболевания как лошадей, подверженных инфекции и *S. equi*, и *S. zooepidemicus*, так и других животных, заражающихся *S. zooepidemicus*.

Вклад авторов. В.Г. Лунин – концепция и руководство работой; И.С. Бокша, М.С. Попонова, А.М. Лящук, З.М. Галушкина, Е.В. Устенко – проведение экспериментов; Т.А. Данилова, Н.Б. Поляков – обсуждение результатов исследования; И.С. Бокша, С.В. Константинова – написание текста; Т.А. Данилова – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы глубоко благодарны всем владельцам лошадей за предоставленные образцы крови животных и информацию о них.

Конфликт интересов. Авторы заявляют о том, что не имеют никаких конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Образцы крови лошадей были взяты с соблюдением биоэтических норм в рамках плановой оценки состояния здоровья домашних животных и любезно предоставлены нам для исследований ветеринарными врачами.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collin, M. (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG, *EMBO J.*, **20**, 3046-3055, doi: 10.1093/emboj/20.12.3046.
2. Allhorn, M., Olin, A. I., Nimmerjahn, F., and Collin, M. (2008) Human IgG/FcγR interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis, *PLoS One*, **3**, e1413, doi: 10.1371/journal.pone.0001413.

3. Collin, M., Svensson, M. D., Sjöholm, A. G., Jensenius, J. C., Sjöbring, U., and Olsén, A. (2002) EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis, *Infect. Immun.*, **70**, 6646-6651, doi: 10.1128/IAI.70.12.6646-6651.2002.
4. Wenig, K., Chatwell, L., von Pawel-Rammingen, U., Björck, L., Huber, R., and Sondermann, P. (2004) Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG, *Proc. Natl. Acad. Ssi. USA*, **101**, 17371-17376, doi: 10.1073/pnas.0407965101.
5. Von Pawel-Rammingen, U., Johansson, B. P., Tapper, H., and Björck, L. (2002) *Streptococcus pyogenes* and phagocytic killing, *Nat. Med.*, **8**, 1044-1045, doi: 10.1038/nm1002-1044.
6. Von Pawel-Rammingen, U. (2012) Streptococcal IdeS and its impact on immune response and inflammation, *J. Innate Immun.*, **4**, 132-140, doi: 10.1159/000332940.
7. Spoerry, Ch. (2017) Streptococcal immunoglobulin degrading enzymes of the IdeS and IgdE family, *Umeå University*, Thesis for: PhD Advisor: von Pawel-Rammingen, Ulrich, Associate Prof., URL: https://www.researchgate.net/publication/320078854_Streptococcal_Immunoglobulin_degrading_Enzymes_of_the_IdeS_and_IgdE_Family.
8. Ryan, M. H., Petrone, D., Nemeth, J. F., Barnathan, E., Björck, L., and Jordan, R. E. (2008) Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes *in vitro* and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid, *Mol. Immunol.*, **45**, 1837-1846, doi: 10.1016/j.molimm.2007.10.043.
9. Vindebro, R., Spoerry, C., and von Pawel-Rammingen, U. (2013) Rapid IgG heavy chain cleavage by the streptococcal IgG endopeptidase IdeS is mediated by IdeS monomers and is not due to enzyme dimerization, *FEBS Lett.*, **587**, 1818-1822, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.039.
10. Collin, M., and Björck, L. (2017) Toward clinical use of the IgG specific enzymes IdeS and EndoS against antibody-mediated diseases, *Methods Mol. Biol.*, **1535**, 339-351, doi: 10.1007/978-1-4939-6673-8_23.
11. Winstedt, L., Järnum, S., Nordahl, E. A., Olsson, A., Runström, A., Bockermann, R., Karlsson, C., Malmström, J., Palmgren, G. S., Malmqvist, U., Björck, L., and Kjellman, C. (2015) Complete removal of extracellular IgG antibodies in a randomized dose-escalation phase I study with the bacterial enzyme IdeS – a novel therapeutic opportunity, *PLoS One*, **10**, e0132011, doi: 10.1371/journal.pone.0132011.
12. Jordan, S. C., Lorant, T., Choi, J., Kjellman, C., Winstedt, L., Bengtsson, M., Zhang, X., Eich, T., Toyoda, M., Eriksson, B.-M., Ge, S., Peng, A., Järnum, S., Wood, K. J., Lundgren, T., Wennberg, L., Bäckman, L., Larsson, E., Villicana, R., Kahwaji, J., Louie, S., Kang, A., Haas, M., Nast, C., Vo, A., and Tufveson, G. (2017) IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 442-453, doi: 10.1056/NEJMoa1612567.
13. Yang, R., Otten, M. A., Hellmark, T., Collin, M., Bjorck, L., Zhao, M.-H., Daha, M. R., and Segelmark, M. (2010) Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **25**, 2479-2486, doi: 10.1093/ndt/gfq115.
14. Hansa Biopharma AB. (2021) NCT number: NCT02790437. In: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02790437.
15. Holden, M. T. G., Heather, Z., Paillot, R., Steward, K. F., Webb, K., Ainslie, F., Jourdan, T., Bason, N. C., Holroyd, N. E., Mungall, K., Quail, M. A., Sanders, M., Simmonds, M., Willey, D., Brooks, K., Aanensen, D. M., Spratt, B. G., Jolley, K. A., Maiden, M. C., Kehoe, M., Chanter, N., Bentley, S. D., Robinson, C., Maskell, D. J., Parkhill, J., and Waller, A. S. (2009) Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens, *PLoS Pathog.*, **5**, e1000346, doi: 10.1371/journal.ppat.1000346.
16. Hulting, G., Flock, M., Frykberg, L., Lannergård, J., Flock, J.-I., and Guss, B. (2009) Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **298**, 44-50, doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01698.x.
17. Lannergård, J., and Guss, B. (2006) IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **262**, 230-235, doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00404.x.
18. Boksha, I. S., Lavrova, N. V., Grishin, A. V., Demidenko, A. V., Lyashchuk, A. M., Galushkina, Z. M., Ovchinnikov, R. S., Umyarov, A. M., Avetisian, L. R., Chernukha, M. Iu., Shaginian, I. A., Lunin, V. G., and Karyagina, A. S. (2016) *Staphylococcus simulans* recombinant lysostaphin: production, purification, and determination of antistaphylococcal activity, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 502-510, doi: 10.1134/S0006297916050072.
19. An, Y., Zhang, Y., Mueller, H.-M., Shameem, M., and Chen, X. (2014) A new tool for monoclonal antibody analysis, *MAbs*, **6**, 879-893, doi: 10.4161/mabs.28762.
20. Machacek, M., Fields, P. E., and Slawson, C. (2020) A proteolytic method for evaluating O-GlcNAcylation on proteins of similar molecular weight to antibody heavy chain after immunoprecipitation, *Anal. Biochem.*, **611**, 114001, doi: 10.1016/j.ab.2020.114001.
21. Kizlik-Masson, C., Deveuve, Q., Zhou, Y., Vayne, C., Thibault, G., McKenzie, S. E., Pouplard, C., Loyau, S., Gruel, Y., and Rollin, J. (2019) Cleavage of anti-PF4/

heparin IgG by a bacterial protease and potential benefit in heparin-induced thrombocytopenia, *Blood*, **133**, 2427-2435, doi: 10.1182/blood.2019000437.
22. Gruel, Y., Vayne, C., Rollin, J., and Pouplard, C. (2021) Reply to the letter entitled "Suggested treatment of serious complications to Covid-19 vaccination with IdeS, a bacterial antibody-cleaving enzyme", *J. Thromb. Haemost.*, **19**, 2632, doi: 10.1111/jth.15465.
23. Kahn, F., Shannon, O., and Björck, L. (2021) Suggested treatment of serious complications to COVID-19 vaccination with IdeS, a bacterial antibody-cleaving enzyme, *J. Thromb. Haemost.*, **19**, 2363-2364, doi: 10.1111/jth.15433.
24. Lonze, B. E., Tatapudi, V. S., Weldon, E. P., Min, E. S., Ali, N. M., Deterville, C. L., Gelb, B. E., Benstein, J. A., Dagher, N. N., Wu, M., and Montgomery, R. A. (2018) IdeS (Imlifidase): A novel agent that cleaves human igg and permits successful kidney transplantation across high-strength donor-specific antibody, *Ann. Surg.*, **268**, 488-496, doi: 10.1097/SLA.0000000000002924.
25. Runström, A., Järnum, S., Jordan, S., Winstedt, L., and Kjellman, C. (2018) Antibodies in IVIg and its effect on IdeS activity, *American Transplant. Congr.*, A156, URL: https://atcmeetingabstracts.com/abstract/anti-ides-antibodies-in-ivig-and-its-effect-on-ides-activity/.
26. Åkesson, P., Rasmussen, M., Mascini, E., von Pawel-Rammingen, U., Janulczyk, R., Collin, M., Olsen, A., Mattsson, E., Olsson, M. L., Bjorck, L., and Christensson, B. (2004) Low antibody levels against cell wall-attached proteins of *Streptococcus pyogenes* predispose for severe invasive disease, *J. Infect. Dis.*, **189**, 797-804, doi: 10.1086/381982.
27. Elmore, Z. C., Oh, D. K., Simon, K. E., Fanous, M. M., and Asokan, A. (2020) Rescuing AAV gene transfer from neutralizing antibodies with an IgG-degrading enzyme, *JCI Insight*, **5**, e139881, doi: 10.1172/jci.insight.139881.
28. Robinson, C., Frykberg, L., Flock, M., Guss, B., Waller, A. S., and Flock, J.-I. (2018) Strangvac: a recombinant fusion protein vaccine that protects against strangles, caused by *Streptococcus equi*, *Vaccine*, **36**, 1484-1490, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.01.030.
29. Hashikawa, S., Iinuma, Y., Furushita, M., Ohkura, T., Nada, T., Torii, K., Hasegawa, T., and Ohta, M. (2004) Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 186-192, doi: 10.1128/JCM.42.1.186-192.2004.
30. Bradley, S. F., Gordon, J. J., Baumgartner, D. D., Marasco, W. A., and Kauffman, C. A. (1991) Group C streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases, *Clin. Infect. Diseases*, **13**, 270-280, doi: 10.1093/clinids/13.2.270.
31. Downar, J., Willey, B. M., Sutherland, J. W., Mathew, K., and Low, D. E. (2001) Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2358-2359, doi: 10.1128/JCM.39.6.2358-2359.2001.
32. Abbott, Y., Acke, E., Khan, S., Muldoon, E. G., Markey, B. K., Pinilla, M., Leonard, F. C., Steward, K., and Waller, A. (2010) Zoonotic transmission of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from a dog to a handler, *J. Med. Microbiol.*, **59**, 120-123, doi: 10.1099/jmm.0.012930-0.
33. Waller, A. S., and Robinson, C. (2013) *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1437-1443, doi: 10.1042/BST20130165.
34. Björnsdóttir, S., Holden, M. T. G., Svansson, V., Harris, S. R., Webb, K., Robinson, C., Steward, K. F., Wright, N., Paillot, R., Newton, J. R., Gunnarsson, E., and Waller, A. S. (2012) *Streptococcus zooepidemicus*: more than just an opportunist? *J. Equine Vet. Sci.*, **32**, S8, doi: 10.1016/j.jevs.2012.08.024.
35. De Negri, R. (2013) *Equine Serum Antibody Responses to Streptococcus Equi and Streptococcus Zooepidemicus*, Theses and Dissertations – Veterinary Science, 13, University of Kentucky, URL: https://uknowledge.uky.edu/gluck_etds/13.
36. Priestnall, S., and Erles, K. (2011) *Streptococcus zooepidemicus*: An emerging canine pathogen, *Vet. J.*, **188**, 142-148, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.028.
37. Pisoni, G., Zadoks, R. N., Vimercati, C., Locatelli, C., Zanoni, M. G., and Moroni, P. (2009) Epidemiological investigation of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* involved in clinical mastitis in dairy goats, *J. Dairy Sci.*, **92**, 943-951, doi: 10.3168/jds.2008-1548.
38. Pelkonen, S., Lindahl, S. B., Suomala, P., Karhukorpi, J., Vuorinen, S., Koivula, I., Väisänen, T., Pentikäinen, J., Autio, T., and Tuuminen, T. (2013) Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans, *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 1041-1048, doi: 10.3201/eid1907.121365.
39. Baiter, S., Benin, A., Pinto, S. W. L., Teixeira, L. M., Alvim, G. G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliott, J., Facklam, R., and Schuchat, A. (2000) Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil, *Lancet*, **355**, 1776-1780, doi: 10.1016/S0140-6736(00)02265-0.
40. Javed, R., Taku, A. K., Gangil, R., and Sharma, R. K. (2016) Molecular characterization of virulence genes of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in equines, *Vet. World*, **9**, 875-881, doi: 10.14202/vetworld.2016.875-881.
41. Velineni, S., and Timoney, J. F. (2013) Identification of novel immunoreactive proteins of *Streptococcus zooepidemicus* with potential as vaccine components, *Vaccine*, **31**, 4129-4135, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.100.

RECOMBINANT ENDOPEPTIDASES IdeS AND IdeZ AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS

I. S. Boksha[1,2]*, V. G. Lunin[1], T. A. Danilova[1], M. S. Poponova[1], N. B. Polyakov[1], A. M. Lyashchuk[1], S. V. Konstantinova[1], Z. M. Galushkina[1], and E. V. Ustenko[1]

[1] *The National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; e-mail: boksha_irina@mail.ru*

[2] *Mental Health Research Centre, 115522 Moscow, Russia*

IdeS and IdeZ endopeptidases are streptococcal virulence factors that specifically cleave IgG heavy chains and represent an interest from biotechnological, medical, and veterinary points of view. The genes encoding IdeS and IdeZ endopeptidases (the *ideS* gene was cloned from a *Streptococcus pyogenes* collection strain, and *S. zooepidemicus ideZ* gene was synthesized) were cloned and expressed in *Escherichia coli* heterologous expression system, and 6His-tag affinity domain was introduced into the amino acid sequence of each endopeptidase. IdeS and IdeZ enzymes were isolated and purified by metal affinity chromatography. The resulting IdeS and IdeZ are apparently homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis and are active against human and animal IgG. The specificity of human IgG cleavage by endopeptidases IdeS and IdeZ was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis. Application of recombinant IdeZ was demonstrated for immunological analysis of equine "strangles" (diagnostics and specific antibodies' titer determination in the blood). Thus, IdeZ can be used in veterinary medicine and sanitary microbiology for the diagnosis of infections caused by *S. equi* and *S. zooepidemicus* in addition to their applications in medicine and biotechnology.

Keywords: recombinant endopeptidases, IdeS, IdeZ, IgG cleavage, strangles, enzyme linked immunosorbent assay

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 913 – 932

УДК 577.218;577.29

РОЛЬ микроРНК В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ГИПОКСИЮ

Обзор

© 2023 М.В. Силина[1]*, Д.Ш. Джалилова[1], О.В. Макарова[1,2]

[1] *ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына, 117418 Москва, Россия; электронная почта: marusyasilina99@yandex.ru*

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

Поступила в редакцию 20.02.2023
После доработки 13.04.2023
Принята к публикации 13.04.2023

Воздействие гипоксии вызывает изменения транскрипции генов, способствующих адаптации клеток к недостатку кислорода. Основным механизмом, регулирующим клеточный ответ на гипоксию, является активация группы транскрипционных индуцируемых гипоксией факторов семейства HIF, включающих несколько изоформ и контролирующих экспрессию более тысячи генов. Активность HIF регулируется на разных уровнях, в том числе с помощью молекул малых некодирующих РНК, называемых микроРНК (мкРНК). При этом мкРНК осуществляют регуляцию клеточного ответа на гипоксию путем влияния на активацию HIF, его деградацию и на трансляцию зависимых от него белков. В то же время HIF также оказывает влияние на биогенез мкРНК. Данные по взаимосвязи той или иной изоформы HIF с мкРНК противоречивы, поскольку исследования выполняются с использованием разных клеточных линий, разных видов экспериментальных животных и клинического материала, а также при разной концентрации кислорода и разной длительности гипоксического воздействия. Кроме того, на экспрессию HIF может влиять исходная устойчивость организмов к недостатку кислорода, что не учитывается при проведении исследований. В настоящем обзоре проанализированы данные о влиянии гипоксии на биогенез и функционирование мкРНК, а также действие самих мкРНК на мРНК генов, участвующих в адаптации к недостатку кислорода. Понимание механизмов взаимосвязи HIF, гипоксии и мкРНК необходимо для разработки новых подходов к персонализированной терапии заболеваний, сопровождающихся недостатком кислорода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипоксия, микроРНК, HIF.

DOI: 10.31857/S0320972523060039, **EDN:** EEEYGM

ВВЕДЕНИЕ

Гипоксия является одним из основных факторов, регулирующих функциональное состояние организма в физиологических условиях, при стрессорных воздействиях, адаптации и различных заболеваниях. Главную роль в реакции на дефицит кислорода играют транскрипционные индуцируемые гипоксией факторы семейства HIF (Hypoxia-Inducible Factor). Экспрессия кислородзависимой субъединицы HIF-α регулируется главным образом посредством гидроксилирования, отсутствие которого в условиях гипоксии приводит к образованию комплекса с субъединицей HIF-β в ядре [1]. Это ведет к активации экспрессии генов, регулирующих ангиогенез, метаболизм глюкозы и железа – фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), эритропоэтина (*EPO*), переносчика глюкозы *GLUT1* и др. [2–4].

Принятые сокращения: мкРНК – микроРНК; ЛПС – липополисахарид; AGO – белки семейства Argonaute; CTAD – *C*-концевой домен трансактивации; FIH – фактор, ингибирующий HIF; HIF – индуцируемый гипоксией фактор; HREs – отвечающие на гипоксию элементы; HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих; NF-κB – ядерный фактор «каппа би»; NTAD – *N*-концевой домен трансактивации; ODDD – домен кислород-зависимой деградации; PHDs – пролилгидроксилазы; pVHL – белок-онкосупрессор фон Гиппеля–Линдау; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; RISC – RNA-Induced Silencing Complex.

* Адресат для корреспонденции.

Гипоксия и активация HIF взаимосвязаны с увеличением активности ядерного фактора «каппа би» (NF-κB), регулирующего воспалительные процессы [5]. Показано, что существуют индивидуальные различия в реакции на гипоксическое воздействие, во многом обусловленные разным уровнем HIF [6–8]. Организмы с разной устойчивостью к гипоксии отличаются по тяжести течения ряда воспалительных заболеваний, в частности, системного воспалительного ответа и язвенного колита [9–12].

В регуляции функционирования HIF и ответа на гипоксическое воздействие принимают участие микроРНК (мкРНК) – малые некодирующие молекулы РНК, состоящие из 18–25 нуклеотидов (наиболее часто встречаются 22), участвующие в регуляции экспрессии генов путем остановки трансляции или разрушения мРНК. МкРНК обнаружены у растений, животных и даже некоторых вирусов, а их последовательности локализуются либо внутри интронов, либо в экзонах некодирующих РНК [13]. Одновременно они способны регулировать большое количество мРНК-мишеней и, таким образом, влиять на активацию сразу нескольких сигнальных путей, контролирующих синтез белков. Определению роли конкретных мкРНК в регуляции клеточного ответа на гипоксию посвящено множество работ последних лет, однако в них не учитывается индивидуальная исходная устойчивость организма к гипоксии. В настоящем обзоре систематизированы данные о роли мкРНК в реакции организма на недостаток кислорода, а также о влиянии гипоксии на биогенез и функционирование мкРНК. Кроме того, обсуждается роль мкРНК в воспалительных заболеваниях, таких как системный воспалительный ответ и язвенный колит, с учетом индивидуальной устойчивости к гипоксии.

HIF

Структура молекул HIF. В настоящее время у млекопитающих охарактеризованы 3 изоформы HIF-α – HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α и белок HIF-1β. Для регуляции транскрипции зависимых от HIF генов α- и β-субъединицы образуют гетеродимер [14]. Особенностью белков HIF-α и HIF-β является наличие *N*-концевого ДНК-связывающего домена, содержащего мотив «спираль-петля-спираль» перед PAS-доменом (Per-Arnt-Sim) [15]. Помимо этого, HIF-α имеет домен кислород-зависимой деградации (Oxygen Dependent Degradation Domain, ODDD), *N*-концевой домен трансактивации (N-Terminal Transactivation

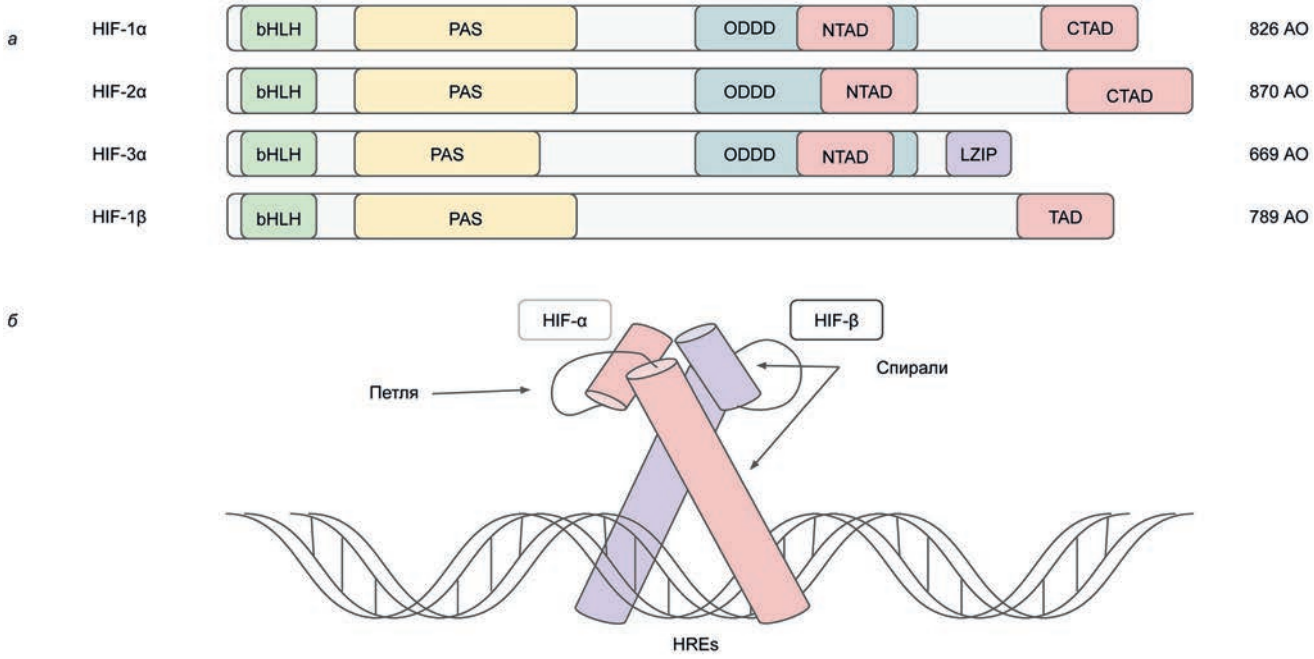

Рис. 1. *а* – Доменная структура изоформ HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α и белка HIF-1β. *б* – Димеризация субъединиц HIF-α и HIF-β и взаимодействие их ДНК-связывающих доменов с HREs. В этих доменах каждая из субъединиц HIF имеет 2 спирали и петлю между ними. Одна из спиралей содержит ДНК-связывающую область, а другая необходима для осуществления гетеродимеризации. АО – аминокислотные остатки; bHLH – мотив «спираль-петля-спираль»; PAS – домен Per-Arnt-Sim; ODDD – домен кислород-зависимой деградации; NTAD – *N*-концевой домен трансактивации; CTAD – *C*-концевой домен трансактивации; TAD – домен трансактивации; LZIP – домен типа «лейциновая молния»; HREs – элементы ДНК, отвечающие на гипоксию

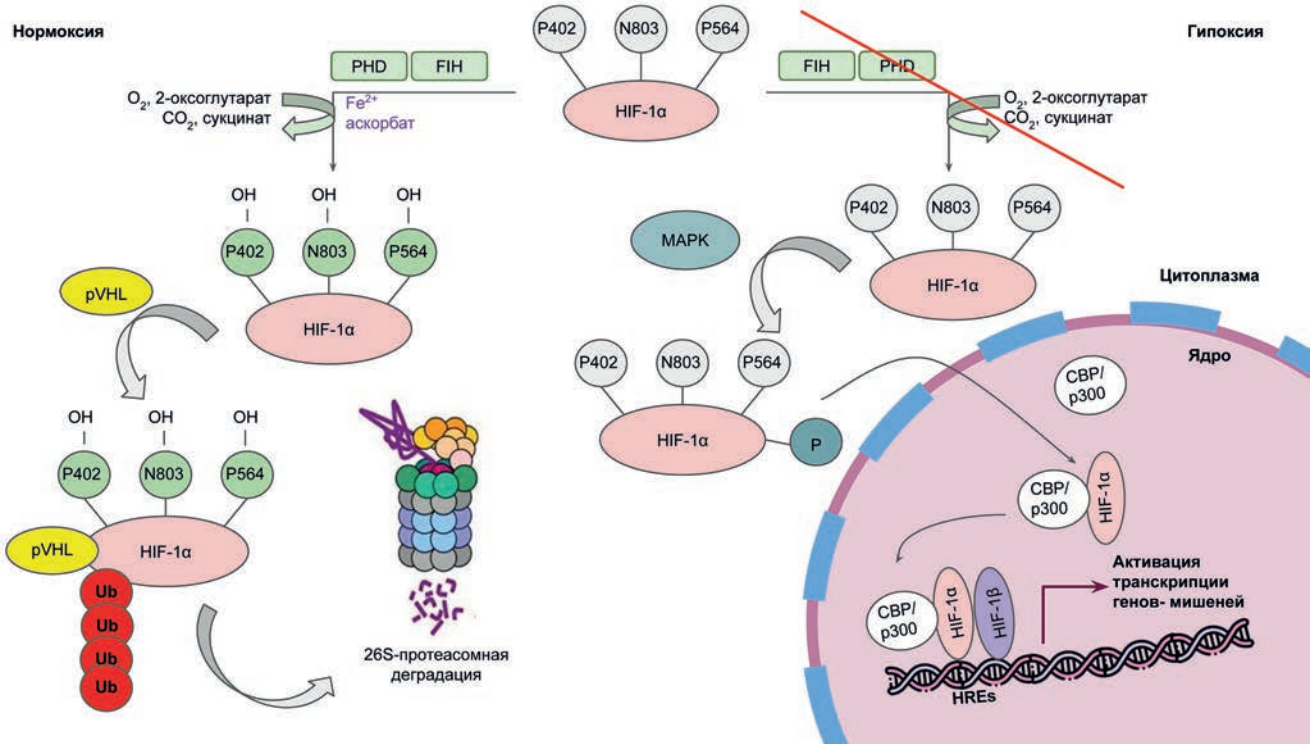

Рис. 2. Кислородзависимая регуляция стабилизации и трансактивации HIF-1α. В условиях нормоксии PHDs осуществляют гидроксилирование HIF-1α по пролину в положениях 402 и 564, а FIH – по аспарагину в положении 803. В условиях гипоксии происходит фосфорилирование и транслокация в ядро негидроксилированной субъединицы HIF-1α. PHD – пролилгидроксилаза; FIH – фактор, ингибирующий HIF; pVHL – белок-онкосупрессор фон Гиппеля-Линдау; Ub – убиквитин; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; CBP/p300 – CREB (cAMP-Response Element-Binding protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300; HREs – элементы ДНК, отвечающие на гипоксию

Domain, NTAD) и *C*-концевой домен трансактивации (C-Terminal Transactivation Domain, CTAD) [14]. Каждый из этих доменов необходим для димеризации субъединиц HIF и связывания с отвечающими на гипоксию элементами ДНК (Hypoxia Response Elements, HREs), активации и взаимодействия с коактиваторами транскрипции [16–18] (рис. 1).

Регуляция активности HIF. При нормоксии субъединица HIF-α подвергается гидроксилированию по остаткам пролина в ODDD с участием пролилгидроксилаз (PHDs) (рис. 2). В качестве субстрата и косубстрата реакции используются кислород и 2-оксоглутарат, а в качестве кофакторов – аскорбат и ионы железа [19]. Далее гидроксилированная субъединица HIF-α подвергается 26S-протеасомной деградации при участии белка-онкосупрессора фон Гиппеля–Линдау (pVHL) [20]. Также гидроксилирование может осуществляться по остаткам аспарагина в CTAD с участием другой гидроксилазы – фактора FIH (Factor Inhibiting HIF), ингибирующего HIF. В этом случае нарушается взаимодействие HIF-α с коактиватором CBP/p300 (CREB (cAMP-Response Element-Binding protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300) [14].

В условиях недостатка кислорода, который является субстратом для PHDs и FIH, гидроксилирования не происходит. В результате субъединица HIF-α стабилизируется за счет фосфорилирования при участии протеинкиназы p38 Mitogen-Activated Protein Kinases (p38-MAPK), транслоцируется в ядро и гетеродимеризуется с HIF-1β. Образующийся комплекс, в свою очередь, активирует гены-мишени путем связывания с HREs [19, 21, 22].

В ряде работ показано, что при воспалительных и опухолевых процессах повышается экспрессия мРНК и стабилизируется белок HIF-α. Воспалительные процессы регулируются ядерным фактором NF-κB [5, 23–26] на транскрипционном и трансляционном уровнях, в то время как катаболические процессы, в т.ч. аутофагия, зависят от активности протеинкиназы mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) [27–29], являющейся мишенью рапамицина у млекопитающих.

На мышах с дефицитом β-киназы IκB (IKKβ) показано, что при гипоксическом воздействии ($8 \pm 0{,}1\%$ O_2) в течение 24 ч происходит активация NF-κB, что приводит к увеличению экспрессии мРНК *HIF-1a* благодаря наличию сайта связывания NF-κB в промоторе

этого гена [5]. Эти два транскрипционных фактора взаимосвязаны, поскольку экспрессия NF-κB активируется при низкой концентрации кислорода, подобно HIF-1α. При нормоксии с помощью PHD1 происходит гидроксилирование субъединицы IKKβ, что приводит к ее убиквитинированию при участии pVHL [30]. При длительной гипоксии происходит инактивация PHD1, что приводит к увеличению активности IKKβ, деградации ингибитора α-субъединицы NF-κB (IκBα) и повышению экспрессии NF-κB [31]. После синтеза белка NF-κB он транслоцируется в ядро, где, взаимодействуя с сайтом связывания в гене *HIF1A*, увеличивает его экспрессию [5]. В последующем происходит транскрипция генов, индуцированных гипоксией, а также некоторых генов, кодирующих провоспалительные белки. Лимитирующим фактором при активации путей NF-κB и HIF является коактиватор CBP/p300, за который конкурируют оба транскрипционных фактора [32].

Другой путь, влияющий на синтез белка HIF-α, опосредован серин/треониновой протеинкиназой mTOR. Она имеет большое количество мишеней и, соответственно, функций, среди которых участие в метаболизме глюкозы, особенно в условиях гипоксии и связанных с ней патологических состояний, таких как канцерогенез. mTOR активирует HIF-1α, что стимулирует экспрессию гликолитических ферментов и способствует переключению метаболизма углеводов с окислительного фосфорилирования на гликолиз [33]. Белок mTOR осуществляет активацию транскрипции мРНК зависимых генов за счет фосфорилирования эукариотического фактора инициации 4E-связывающего белка 1 (4E-BP1) и рибосомальной S6-киназы (S6K) [34]. На эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) и линии опухолевых клеток HeLa было показано, что уровни экспрессии HIF-1α и HIF-2α увеличиваются путем активации сигнального пути mTOR [35], что доказывает его регуляторную роль для HIF-1α и HIF-2α.

Помимо канонического кислородзависимого пути регуляции, существуют дополнительные механизмы, контролирующие реакцию на гипоксическое воздействие, одним из которых является РНК-интерференция при участии мкРНК [36]. Действие мкРНК позволяет клеткам быстро реагировать на изменение условий среды благодаря небольшому размеру, высокой скорости синтеза и быстрому «включению» и «выключению» трансляции мРНК-мишеней [37]. Понимание регуляторных механизмов, участвующих в адаптации организма к дефициту кислорода, имеет важное значение, поскольку гипоксия играет ключевую регуляторную роль в механизмах воспалительных, сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний.

Изоформы HIF-α. Экспрессия изоформ HIF зависит от видов тканей и клеток и периода онтогенеза. Так, HIF-1α участвует в эмбриональном развитии млекопитающих в качестве регулятора метаболизма, поэтому в этот период онтогенеза он локализован во всех клетках и тканях [38]. HIF-2α имеет более селективное распределение и экспрессируется преимущественно в эндотелиальных клетках, клетках глии, пневмоцитах типа II, кардиомиоцитах и фибробластах [39].

Активация изоформ HIF зависит от длительности гипоксического воздействия. На различных клеточных линиях человека показано, что HIF-1α регулирует ответ на острый недостаток кислорода (инкубация клеток менее 2 ч при концентрации O_2, равной 0,5%), а HIF-2α – на длительный (инкубация клеток более 14 ч при концентрации O_2, равной 0,5%). Регуляция переключения HIF-1α и HIF-2α при реализации ответа на недостаток кислорода во многом зависит от активности гидроксилаз. Показано, что PHD2 имеет большее сродство к HIF-1α, а PHD3 – к HIF-2α [40], при этом сам HIF-2α гидроксилируется как PHDs, так и FIH менее эффективно, что приводит к стабилизации данной изоформы в условиях высокого содержания кислорода [41].

При исследовании первичной аминокислотной последовательности между изоформами HIF-1α и HIF-2α была обнаружена гомология, которая составила 48% [42]. Однако HIF-2α распределен в ядре в зонах активности РНК-полимеразы, что обеспечивает лучший доступ к промоторам генов-мишеней, в отличие от HIF-1α, который равномерно распределен в ядре [43]. Более того, изоформа HIF-2α имеет бóльшие размеры и ряд специфических мишеней для регуляции транскрипции и трансляции этой молекулы [42].

HIF-3α является наименее изученной изоформой и имеет несколько разных вариантов, образующихся в процессе альтернативного сплайсинга. Ген *HIF3A* человека имеет 19 предсказанных вариантов, однако установлено, что белок-кодирующими являются лишь 8 – HIF-3α1, HIF-3α2, HIF-3α3, HIF-3α4, HIF-3α5, HIF-3α7, HIF-3α8 и HIF-3α9 [44]. Выявлены значительные различия в уровнях экспрессии и тканеспецифичности вариантов HIF-3α [45]. Варианты транскриптов HIF-3α обнаружены в различных органеллах клеток и в тканях сердца, головного мозга, плаценты, легких, печени, почек, поджелудочной железы, скелетных

Таблица 1. Особенности структуры, локализации, регуляции, функций и экспрессии изоформ HIF-α

HIF-1α	HIF-2α	HIF-3α
Структура		
826 а.о.; имеются ДНК-связывающий домен, домены PAS, ODDD (содержит 2 остатка пролина), NTAD, CTAD (содержит 1 остаток аспарагина) [14, 15]	870 а.о.; имеются ДНК-связывающий домен, домены PAS, ODDD (содержит 2 остатка пролина), NTAD, CTAD (содержит 1 остаток аспарагина) [14, 15]	669 а.о.; имеются ДНК-связывающий домен, домены PAS, ODDD (содержит 1 остаток пролина), NTAD, LZIP [46, 47]; выявлено 8 белок-кодирующих сплайс-вариантов [44]
Локализация		
экспрессируется во всех клетках и тканях [38]; равномерно распределен в ядре клетки [43]	экспрессируется преимущественно в эндотелиальных клетках, клетках глии, пневмоцитах типа II, кардиомиоцитах и фибробластах [39]; в ядре клетки локализуется в зонах активности РНК-полимеразы [43]	экспрессируется в различных органеллах клеток и в тканях сердца, головного мозга, плаценты, легких, печени, почек, поджелудочной железы, скелетных мышц и хрящей [46]
Регуляция		
в условиях нормоксии осуществляется гидроксилирование по 2 остаткам пролина в ODDD и по 1 остатку аспарагина – в CTAD, что приводит к 26S-протеасомной деградации [19, 20]; в условиях гипоксии осуществляется фосфорилирование, транслокация в ядро, гетеродимеризация с субъединицей HIF-1β, распознавание HREs и активация транскрипции зависимых генов [19, 21, 22]	в условиях нормоксии осуществляется гидроксилирование по 2 остаткам пролина в ODDD и по 1 остатку аспарагина – в CTAD, что приводит к 26S-протеасомной деградации [19, 20]; в условиях гипоксии осуществляется фосфорилирование, транслокация в ядро, гетеродимеризация с субъединицей HIF-1β, распознавание HREs и активация транскрипции зависимых генов [19, 21, 22]	в условиях нормоксии осуществляется гидроксилирование по 1 остатку пролина в ODDD, чего недостаточно для 26S-протеасомной деградации, поэтому белок медленно накапливается в клетке [47]; в условиях гипоксии продолжает накапливаться и реализует свой эффект при длительном гипоксическом воздействии [53]
Функции		
активация транскрипции генов *VEGFA* и переносчика глюкозы 1 [48], генов, кодирующих ферменты гликолиза, некоторых проангиогенных генов, генов, регулирующих pH [49]; играет роль в передаче сигналов от рецептора инсулина, передаче сигналов MAPK и метаболизме инозитолфосфата [55]	активация транскрипции генов *VEGFA* и переносчика глюкозы 1 [48], генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы, гена эритропоэтина [50]	негативный регулятор изоформ HIF-1α и HIF-2α (нарушает транслокацию в ядро и последующую активацию транскрипции зависимых генов) [52]; усиливает экспрессию генов, участвующих в метаболизме глюкозы и аминокислот, апоптозе, протеолизе, передаче сигналов онкосупрессорного белка p53 и рецепторов PPAR; усиливает экспрессию генов в сигнальных путях Jak-STAT и рецепторов NLR [55]
Экспрессия относительно времени гипоксического воздействия		
экспрессия увеличивается при кратковременной гипоксии (менее 2 ч) или в первые часы длительного гипоксического воздействия [40, 41]	экспрессия увеличивается при длительном гипоксическом воздействии (более 14 ч) [40, 41]	экспрессия увеличивается при длительном гипоксическом воздействии и влияет на переключение изоформ HIF-1α и HIF-2α [52]

мышц и хрящей. Также показано, что у человека в антенатальном периоде активно экспрессируется вариант HIF-3α4, в то время как в постнатальном периоде экспрессия всех вариантов HIF-3α была выше, а преобладал вариант HIF-3α7 [46]. Варианты HIF-3α имеют некоторые структурные особенности по сравнению с HIF-1α и HIF-2α. В отличие от HIF-1α и HIF-2α, изоформа HIF-3α в ODDD имеет только 1 остаток пролина, который подвергается гидроксилированию, однако этого недостаточно для рекрутирования pVHL. Поэтому в условиях нормоксии не происходит протеасомной деградации HIF-3α [47]. Также варианты HIF-3α имеют домен типа «лейциновая молния» (LZIP), участвующий в реализации белок-белковых взаимодействий, отличающихся от тех, которые осуществляются HIF-1α и HIF-2α [46]. Еще одним отличием от HIF-1α и HIF-2α является то, что гидроксилирование, опосредованное FIH, вероятнее всего, не играет роли в регуляции HIF-3α, так как в нем отсутствует CTAD, содержащий аспарагин в изоформах HIF-1α и HIF-2α [45].

Изоформы HIF характеризуются функциональными различиями. В условиях гипоксии HIF-1α и HIF-2α связываются с одним и тем же HIF-1β. При этом HIF-1α и HIF-2α имеют как уникальные, так и схожие гены-мишени [14, 15]. Общие мишени представлены генами *VEGFA* и переносчика глюкозы 1 [48]. HIF-1α также индуцирует экспрессию генов, кодирующих ферменты гликолиза, некоторых проангиогенных генов и генов, регулирующих pH [49]. HIF-2α стимулирует экспрессию генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы, и гена эритропоэтина [50]. Показано, что HIF-1α регулирует начальные этапы ангиогенеза, а заключительные стадии ремоделирования и стабилизации сосудистой сети контролирует HIF-2α [51]. HIF-3α, в свою очередь, может играть разные и даже противоположные роли в регуляции экспрессии зависимых генов благодаря разнообразию вариантов. В работе Heikkilä et al. [52] были получены данные о взаимодействии HIF-3α с HIF-1α и HIF-2α. Показано, что взаимодействие любого из транскриптов HIF-3α и HIF-1α приводит к нарушению транслокации обеих этих изоформ в ядро и последующему ингибированию транскрипции зависимых генов. Тот же эффект описан для взаимодействия HIF-3α и HIF-2α, однако, по результатам коиммунопреципитации, взаимодействие с изоформой HIF-1α было намного сильнее. Таким образом, HIF-3α выступает в роли негативного регулятора для изоформ HIF-1α и HIF-2α [52]. Соответственно, активация HIF-3α представляет собой петлю отрицательной обратной связи, что позволяет в условиях недостатка кислорода регулировать функциональное состояние клеток и организма в целом [45]. Поэтому варианты HIF-3α, действующие как негативные регуляторы изоформ HIF-1α и HIF-2α, должны быть своевременно активированы для адаптации клеток к условиям среды, что реализуется за счет действия мкРНК [53].

Однако некоторые варианты HIF-3α имеют функции, частично перекрывающиеся с функциями HIF-1α, что может свидетельствовать о том, что HIF-3α – это не только негативный регулятор [54]. Показано, что как HIF-3α, так и HIF-1α могут повышать экспрессию генов, участвующих в метаболизме глюкозы и аминокислот, апоптозе, протеолизе, передаче сигналов онкосупрессорного белка p53 и рецепторов PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). HIF-3α, но не HIF-1α, увеличивает экспрессию генов сигнальных путей Jak-STAT (Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription) и рецепторов NLR (Nucleotide oligomerization domain (NOD)-Like Receptors). В отличие от HIF-3α, HIF-1α способен активировать ген *VEGFA*, передачу сигналов от рецептора инсулина, сигналы MAPK и метаболизм инозитолфосфата [55]. Необходимо проведение дальнейших исследований, посвященных регуляторной роли различных изоформ HIF в адаптации к условиям недостатка кислорода и эффектов, к которым приводит их взаимодействие.

В работе Jaskiewicz et al. [56] показано, что в эндотелиальных клетках человека в ответ на длительную гипоксию (48 ч при 0,9% O_2) повышается содержание HIF-3α2, что сопровождается накоплением каспазы-3/7. Однако молекулярные механизмы индукции гипоксической гибели клеток HIF-3α не известны [56]. Обобщенная информация об особенностях разных изоформ HIF-α представлена в табл. 1.

Следует отметить, что переключение активности изоформ HIF сопровождается изменением уровней мкРНК, в т.ч. miR-210, что будет подробнее обсуждаться ниже [57].

мкРНК – БИОГЕНЕЗ, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, ВЛИЯНИЕ HIF

Биогенез и механизм действия мкРНК. Первоначально мкРНК транскрибируются как обычные мРНК и образуют при-мкРНК, содержащую в своем составе как минимум 1 шпильку [58].

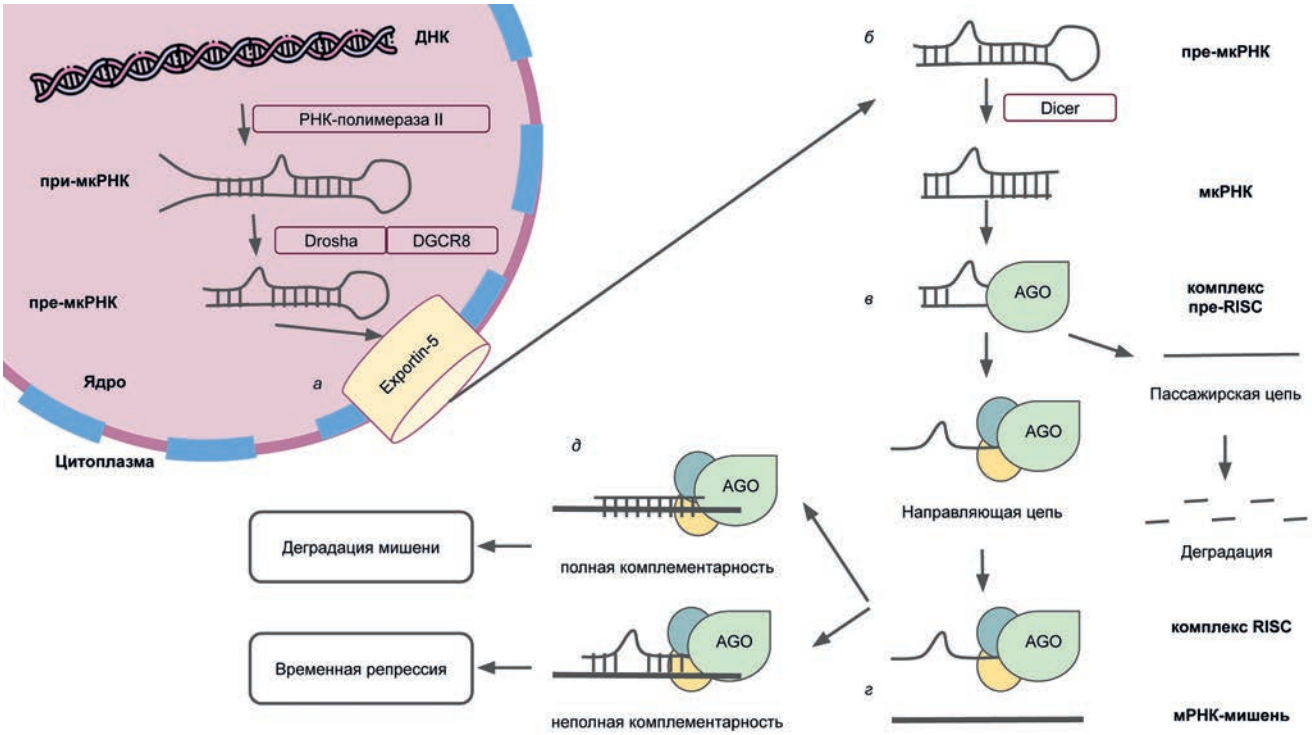

Рис. 3. Биогенез мкРНК. *а* – Формирование при- и пре-мкРНК с участием эндонуклеаз Drosha и DGCR8 и экспорт из ядра; *б* – разрезание белком Dicer и образование зрелой мкРНК; *в* – объединение мкРНК с комплексом AGO и отщепление пассажирской цепи; *г* – распознавание мРНК-мишени комплексом RISC; *д* – эффект, оказываемый мкРНК на мРНК-мишень. DGCR8 – белок гена 8 критической области синдрома Ди Джорджи; AGO – белки семейства Argonaute; RISC – RNA-Induced Silencing Complex

Далее микропроцессорный комплекс, главную роль в работе которого играют эндонуклеаза Drosha и белок, связывающий двухцепочечный фрагмент РНК, называемый Pasha или DGCR8 (белок гена 8 критической области синдрома Ди Джорджи) [59], отщепляет одноцепочечные «хвосты», а полученная пре-мкРНК транслоцируется в цитоплазму при участии белка Exportin-5 [60] (рис. 3, *а*). В цитоплазме РНКаза III Dicer расщепляет предшественник мкРНК возле петли с образованием зрелой малой двухцепочечной РНК (рис. 3, *б*). Дуплекс мкРНК связывается с белками семейства Argonaute (AGO), и с одной из цепей образуется комплекс RISC (RNA-Induced Silencing Complex), а вторая цепь деградирует [61] (рис. 3, *в*). У млекопитающих каждый из четырех белков подсемейства AGO (AGO1–4) может репрессировать трансляцию своих мРНК-мишеней, но только AGO2 способен расщеплять их. Вошедшая в состав комплекса мкРНК играет роль матрицы для распознавания мРНК-мишени (рис. 3, *г*). При полной комплементарности молекул AGO расщепляют мРНК-мишень, приводя к ее деградации, при неполной – «выключение» гена реализуется за счет временной остановки трансляции [62] (рис. 3, *д*).

Для удобства работы с большим количеством мкРНК была создана единая система номенклатуры этих молекул – база данных miRbase [63, 64]. В соответствии с номенклатурой, каждой miR (microRNA) присваивается номер в порядке обнаружения, который присоединяется к префиксу «miR» (например, miR-210). Перед префиксом часто используют еще 3 буквы, которые обозначают видовую принадлежность (например, hsa-miR-210 для *Homo sapiens*). Степень созревания молекулы обозначают «mir», если речь идет о гене или предшественнике мкРНК (при-мкРНК или пре-мкРНК), или «miR» – для обозначения зрелой мкРНК. Последовательности с одной или двумя заменами оснований имеют специальный суффикс, следующий сразу после номера (например, miR-20a). Некоторые предшественники мкРНК могут давать начало двум зрелым молекулам, по одной из каждого плеча. В таком случае к названию мкРНК может добавляться еще один суффикс – -3p или -5p (например, miR-30a-3p).

Эндонуклеазы Drosha и Dicer могут поразному разрезать одни и те же при- и пре-мкРНК, что приводит к образованию мкРНК, которые имеют некоторые различия в нуклеотидной последовательности и называются изо-

мирами [65]. Такие различия могут приводить к изменению мишеней, что расширяет возможности регуляции и создает дополнительные проблемы в изучении этих малых некодирующих мкРНК.

На данный момент главной трудностью в исследованиях функционирования мкРНК является идентификация мишеней, так как каждая из последних может регулироваться несколькими мкРНК [13]. Для наиболее точного определения необходимо использовать комплексный подход – изучение генов и белков-мишеней, проведение полноэкзомного секвенирования и использование методов биоинформатики.

Разработано несколько подходов для идентификации мРНК-мишеней. Одним из методов, применяемых для изучения мкРНК, является иммунопреципитация, в основе которой лежит взаимодействие белков, ассоциированных с комплексом RISC, содержащим направляющую цепь и мРНК-мишень, и специфичных к ним антител [66]. Иммунопреципитированные мкРНК и мРНК затем необходимо анализировать с помощью высокопроизводительного секвенирования для идентификации потенциальных мишеней мкРНК.

Другой метод исследования основан на технологии SILAC (Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture). Клетки культивируют в питательной среде, содержащей незаменимые аминокислоты, меченные тяжелыми изотопами, исследуют с помощью масс-спектрометрического анализа и определяют содержание меченых аминокислот за счет соотношения интенсивностей пептидных пиков. При изучении в культуре клеток HeLa был получен белковый профиль в ответ на нокдаун или сверхэкспрессию мкРНК в рамках всего протеома [67]. Данный метод позволяет проводить оценку возникающих вариаций вскоре после индукции изменений в экспрессии мкРНК.

Одним из недавно описанных методов идентификации мкРНК-мишеней стал скрининг мутагенеза 3'-нетранслируемой области на основе технологии CRISPR-Cas9, который описали Froehlich et al [68]. Данный подход позволяет проводить одновременный анализ нескольких регуляторных последовательностей, оценивая функциональность сайтов связывания мкРНК на мРНК-мишени [68].

Тем не менее, исходя из важной регуляторной роли мкРНК для большого количества генов, вопрос изучения их биогенеза и функций остается одним из актуальных для молекулярной биологии в настоящее время.

Влияние HIF на мкРНК. Показано, что на биогенез мкРНК оказывает влияние HIF-1α, экспрессия которого увеличивается в условиях недостатка кислорода [69]. Активация ответа на гипоксию приводит к снижению синтеза белков DGCR8, Exportin 5, Dicer, AGO1 и AGO2 [70]. Однако более поздние исследования свидетельствуют о том, что HIF-1α активирует пролил-4-гидроксилазу коллагена типа I (cP4HI), которая усиливает пролилгидроксилирование и эндонуклеазную активность AGO2 [71]. Для другого члена подсемейства белков AGO, AGO4, также описана положительная регуляция эукариотическим фактором инициации трансляции 2C4 (EIF2C4), экспрессию которого усиливает HIF-1α. Все эти события приводят к индукции экспрессии таких мкРНК как miR-107, miR-155, miR-210 и др. [53].

Таким образом, данные исследований разных лет о влиянии активации HIF-1α на мкРНК противоречивы. С одной стороны, активация ответа на недостаток кислорода ингибирует белки биогенеза мкРНК, но, по другим данным, наоборот, повышает их активность. Известно, что клетки различных тканей организма имеют разную устойчивость к гипоксии [72]. Возможно, возникшее противоречие можно связать с тем, что в описанных выше работах не была проведена оценка исходной устойчивости к недостатку кислорода, хотя известно, что активность белков, участвующих в адаптации к гипоксии (HIF-1α, VEGF и др.), различается у высоко- и низкоустойчивых организмов. Данная гипотеза может стать основой для будущих исследований взаимосвязи HIF и мкРНК. Кроме того, данное противоречие может быть обусловлено особенностями клеточной линии, на которой проводятся эксперименты, и концентрацией кислорода, используемой для гипоксического воздействия.

Помимо влияния на синтез белков биогенеза мкРНК, изоформы HIF-α способны оказывать действие на экспрессию самих мкРНК. На сегодняшний день ключевой мкРНК гипоксического ответа считается miR-210, так как ее уровень экспрессии изменяется в зависимости от содержания кислорода в окружающей среде. Она имеет элементы HREs, расположенные на 400 п.н. выше своего основного промотора. HREs высококонсервативны у разных видов, что позволяет предположить, что регуляция HIF-1α играет ключевую роль в жизнедеятельности организмов [73]. В эксперименте, проведенном на эндотелиальных клетках пупочной вены человека, подвергаю-

щихся действию 1%-ного кислорода в течение разных временных промежутков, было показано, что уровень miR-210 через 4 ч был в 35 раз выше, чем в контрольной группе, а активация miR-210 была обратно пропорциональна парциальному давлению O_2. Для оценки роли HIF в данной работе блокировали изоформы HIF-1α и HIF-2α, однако ингибирование синтеза только HIF-1α приводило к снижению индукции miR-210 [74]. Следовательно, miR-210 является специфической мишенью для HIF-1α.

В недавно проведенном исследовании показано, что воздействие гипоксии (0,9% O_2) на HUVEC в течение 20 ч приводит к постепенному накоплению и последующему медленному снижению экспрессии мкРНК, что является результатом активации адаптивного ответа на недостаток кислорода. Наблюдалось четкое деление репертуара экспрессируемых мкРНК при острой (2 ч) и длительной (16 ч) гипоксии, что соответствует периодам наибольшей активности HIF-1α и HIF-2α соответственно. Для более детального изучения была выбрана временная точка 8 ч, поскольку это был переходный момент времени между кратковременной и длительной гипоксией и временем, когда обе изоформы были активны. После проведения секвенирования и биоинформатической обработки данных было идентифицировано 5 общих мкРНК-мишеней – miR-210, miR-520d-3p, miR-98-3p, miR-4745-5p и miR-139-5p [57]. Более того, для ключевой мкРНК гипоксического ответа, miR-210, было найдено 12 и 18 HREs, специфичных к HIF-1α и HIF-2α, что опровергает описанное ранее селективное действие HIF-1α на эту мкРНК [74].

HIF-зависимое повышение экспрессии miR-210 выявлено в опухолях молочной железы, легких, толстой кишки, поджелудочной железы [75]. Уровень экспрессии miR-210 коррелирует со стадией опухолевой прогрессии, поэтому в перспективе его можно использовать в качестве прогностического биомаркера [76].

Другой важной мкРНК, экспрессия которой регулируется HIF-1α, является miR-122, промотор которой имеет 2 HREs. В исследовании, проведенном на клетках печени HepG2, было показано, что miR-122 является селективной мишенью для HIF-1α, который взаимодействует с обоими HREs. Для HIF-2α такой эффект показан не был [77]. Более того, miR-122 так же влияет на адаптацию метаболизма клетки к условиям гипоксии, что будет обсуждаться далее.

УЧАСТИЕ мкРНК В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ГИПОКСИЮ

Адаптация к гипоксии, как один из важнейших механизмов, необходимых для выживания организма, оказывает влияние на клеточные процессы и зависит от различных факторов [74]. На сегодняшний день описано более 100 мкРНК, участвующих в регуляции HIF-опосредованного ответа на гипоксию [78, 79]. К сожалению, не для всех идентифицированных молекул проведено достаточно исследований, чтобы подтвердить их участие в адаптации к недостатку кислорода. Далее будут рассмотрены наиболее подробно изученные в настоящее время мкРНК, регулирующие ответ на гипоксию.

МкРНК, участвующие в регуляции клеточного ответа на гипоксию, можно разделить на 3 группы. Во-первых, это молекулы, которые оказывают воздействие на мРНК генов, кодирующих HIF, и, таким образом, подавляют синтез его изоформ [80, 81]. Во-вторых, это группа мкРНК, которая влияет на деградацию α-субъединиц HIF при нормоксии [82]. И в-третьих, – мкРНК, влияющие на экспрессию белков, участвующих в реализации метаболических путей при ответе на гипоксию – гликолиз, окислительное фосфорилирование и др. [74, 83, 84] (рис. 4).

К группе мкРНК, ингибирующих синтез транскрипционных факторов семейства HIF, относятся miR-20a, miR-150, miR-155, miR-519c, miR-153, miR-30c-2-3p, miR-30a-3p, miR-145, miR-429 и miR-107. Общий механизм их действия – комплементарное взаимодействие с соответствующим сайтом связывания, приводящее к временной репрессии трансляции или деградации мРНК одной из изоформ HIF.

HIF-1α, как главный регулятор ответа организма на недостаток кислорода, является мишенью для мкРНК. Показано, что miR-20a [85], miR-155 [86], miR-150 [87] и miR-519c [81] имеют сайты связывания в 3'-нетранслируемой области HIF-1α и играют роль негативных регуляторов синтеза данной субъединицы.

На линии эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека (hRMECs) показано, что в условиях 12-часовой гипоксии (5% CO_2 и 95% N_2), которая является стрессовым фактором для клеток, в эндоплазматическом ретикулуме происходит накопление белков с неправильной конформацией в связи с недостатком энергетических ресурсов и изменением окислительно-восстановительного потенциала клетки [88] (рис. 5). Это приводит к активации трансмембранных сенсоров, которая

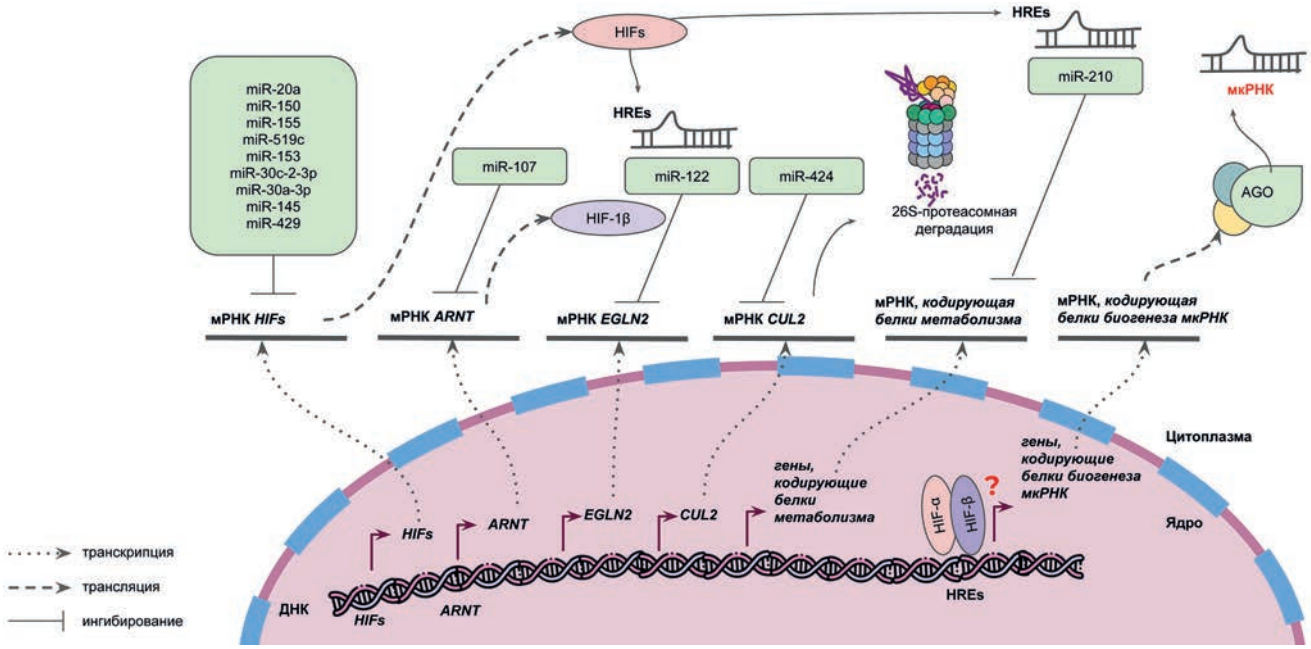

Рис. 4. Мишени некоторых мкРНК в регуляции клеточного ответа на гипоксию: miR-210 участвует в регуляции транскрипции генов-мишеней HIF и зависит от HIF-1α; miR-424 влияет на белки, осуществляющие деградацию HIF в условиях нормоксии; miR-20a, miR-150, miR-155, miR-153 и miR-519c охарактеризованы как регуляторы трансляции HIF-1α; miR-30c-2-3p, miR-30a-3p и miR-145 – HIF-2α; miR-429 – HIF-3α; miR-107 – HIF-1β. *HIFs* – гены *HIF1A*, *EPAS1*, *HIF3A*; HIFs – белки HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α; HREs – элементы ДНК, отвечающие на гипоксию; AGO – белки семейства Argonaute

определяет дальнейшую судьбу клетки при длительном недостатке кислорода. Один из них, IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1), активирует белок XBP1 (X-Box Binding Protein 1), который является важным фактором транскрипции. Liang et al. [89] показали, что XBP1 индуцирует экспрессию miR-153 путем связывания с промотором PTPRN (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type N) за счет того, что промотор miR-153 расположен в этом же гене. Далее эта мкРНК связывается с 3'-нетранслируемой областью мРНК *HIF1A*, подавляя его синтез и ингибируя VEGF-зависимый ангиогенез.

Идентифицировано несколько miR, регулирующих HIF-2α, в основном в линиях опухолевых клеток. Однако зависимость их регуляции от гипоксии изучена недостаточно. Показано, что miR-30c-2-3p и miR-30a-3p, связываясь с 3'-нетранслируемой областью мРНК гена *EPAS1*, кодирующего HIF-2α, подавляют его синтез без изменения уровня или активности HIF-1α [90]. Zhang et al. [91] показали, что 3'-нетранслируемая область мРНК *EPAS1* также содержит сайт связывания miR-145, повышение экспрессии которой в условиях нормоксии снижает уровни как мРНК, так и самого белка HIF-2α.

Изоформа HIF-3α также регулируется с помощью мкРНК. Bartoszewska et al. [92] продемонстрировали, что miR-429 активируется в условиях гипоксии после связывания HIF-1α с HREs, транслоцируется из ядра в цитоплазму, где, связываясь с мРНК *HIF1A*, вызывает ее деградацию, создавая петлю отрицательной обратной связи. Позже эта же группа исследователей изучала влияние miR-429 на HIF-3α и обнаружила, что регуляция экспрессии действительно существует, и она осуществляется через 3'-нетранслируемую область вариантов HIF-3α2 и HIF-3α3. Благодаря этому механизму происходит переключение экспрессии с HIF-1α на HIF-3α при длительной гипоксии (48 ч при концентрации O_2, равной 1%). Экспрессия HIF-1α блокируется miR-429, что приводит к последующему снижению количества самой мкРНК и накоплению HIF-3α, что позволяет организму выжить в условиях длительного недостатка кислорода [54].

HIF-1β, как и различные изоформы α-субъединицы, может регулироваться мкРНК. Yamakuchi et al. [80] исследовали экспрессию мкРНК у больных раком толстой кишки с использованием микрочипов и последующей биоинформатической обработкой и обнаружили, что miR-107 может быть мишенью для p53 и регулятором HIF-1β. Белок p53 в организме супрессирует образование опухолевых клеток за счет ингибирования их пролиферации и стимуляции апоптоза. Однако мутации в p53 являются частой причиной нарушения этих

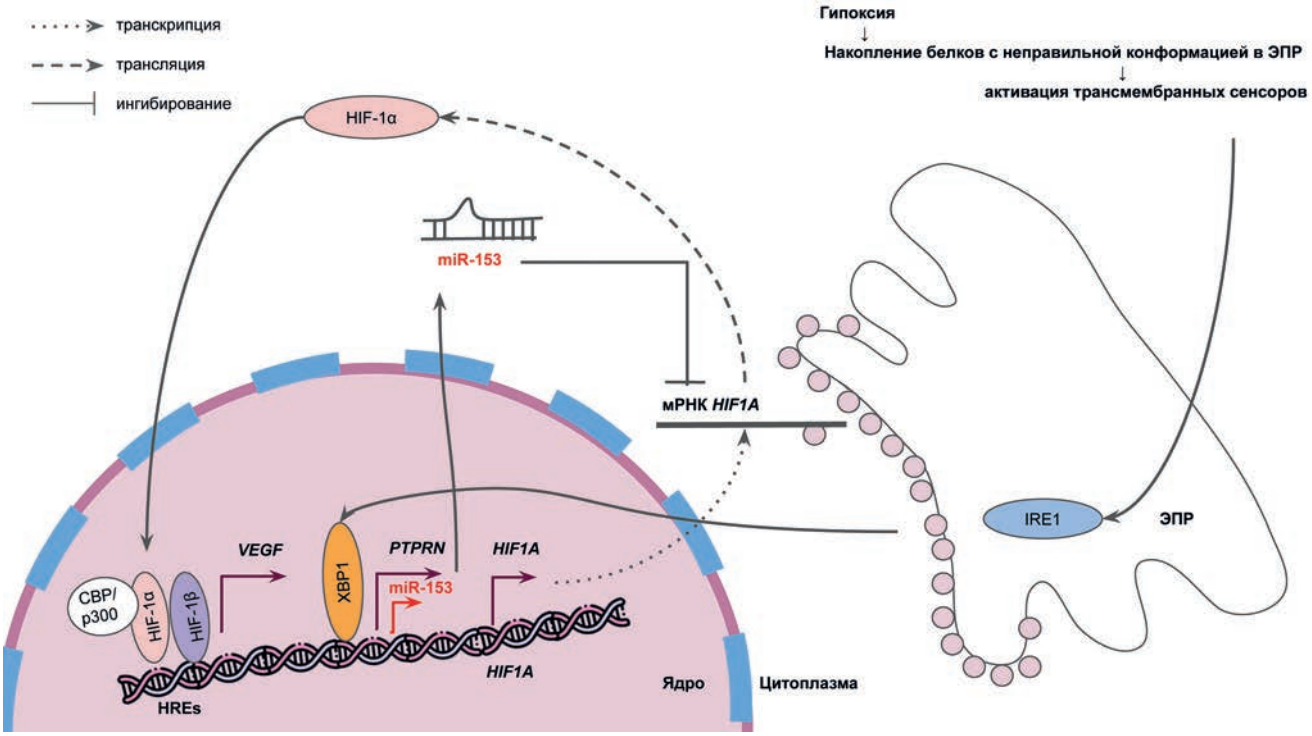

Рис. 5. Механизм действия гипоксии, как стрессового фактора, на экспрессию miR-153 с последующим ингибированием активации транскрипции VEGF. ЭПР – эндоплазматический ретикулум; IRE1 – Inositol-Requiring Enzyme 1; XBP1 – X-Box Binding Protein 1; PTPRN – Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type N; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; HREs – элементы ДНК, отвечающие на гипоксию

механизмов, что индуцирует развитие опухолей [93]. Показано, что 3'-нетранслируемая область гена *ARNT*, кодирующего белок HIF-1β, содержит сайт связывания miR-107, а оказываемое действие ведет к снижению синтеза VEGF и, таким образом, нарушает адаптацию к недостатку кислорода. Эта работа была одним из первых свидетельств того, что регуляция ответа на гипоксию зависит не только от HIF-1α, но и от HIF-1β [80]. Позже это было подтверждено Deng et al. [94] в ходе изучения регуляции ремоделирования сосудов при легочной гипертензии miR-103/107 посредством воздействия на HIF-1β.

Другие мкРНК, в частности miR-424 и miR-122, реализуют свои эффекты, влияя на синтез белков, участвующих в деградации HIF при нормоксии.

Как упоминалось выше, α-субъединица HIF в условиях нормоксии подвергается протеасомной деградации [45]. В комплекс убиквитинлигазы E3, помимо pVHL, входит каркасный белок CUL2 (Cullin-2), блокировка синтеза которого приводит к дестабилизации комплекса и остановке разрушения HIF-α [95]. При изучении профиля мкРНК в эндотелиальных клетках человека в условиях гипоксии наблюдалось увеличение экспрессии miR-424, приводящее к повышению содержания белков HIF-1α и HIF-2α. Для идентификации мишени этой мкРНК использовались алгоритмы, согласно которым были получены данные о том, что miR-424, действуя на 3'-нетранслируемую область *CUL2*, дестабилизирует комплекс E3, что ведет к нарушению деградации HIF-α, и, как следствие, адаптации клеток к гипоксии [82].

Как упоминалось выше, помимо того, что miR-122 сама регулируется HIF-1α, она способна поддерживать выживаемость организма при гипоксии. Мишенью этой мкРНК является 3'-нетранслируемая область мРНК гена *EGLN2*, кодирующего PHD1, которая осуществляет гидроксилирование α-субъедицы HIF в условиях нормоксии. Соответственно, при взаимодействии miR-122 с мРНК *EGLN2* происходит нарушение синтеза фермента, что приводит к стабилизации HIF-1α и последующей реализации зависимых от него эффектов [77].

Третья группа мкРНК включает miR-210, которая осуществляет ингибирование синтеза белков, участвующих в метаболической адаптации к гипоксии, которая заключается в переключении с окислительного фосфорилирования на гликолитический путь.

Для miR-210, регулирующей гипоксический ответ, идентифицировано более 10 мишеней, участвующих в ангиогенезе [74], диф-

ференцировке остеобластов [96], изменении потребления кислорода митохондриями [83]. 3'-Нетранслируемые области транскриптов белков, участвующих в сборке железосерных кластеров ISCU1 и ISCU2 (Iron-Sulfur Cluster assembly proteins), были описаны как мишени для действия miR-210. Основная роль этих белков – обеспечение транспорта электронов и окислительно-восстановительных реакций в метаболизме различных молекул [97]. Нарушение этих функций в результате подавления miR-201 синтеза ISCU1 и ISCU2 приводит к блокировке митохондриального дыхания и переключению на гликолиз («эффект Варбурга») [83], что необходимо для адаптации организма к условиям недостатка кислорода.

Благодаря большому разнообразию мкРНК, а тем более их потенциальных мишеней, проблема их участия в молекулярных механизмах гипоксии и ее контроля важна в изучении адаптации к условиям среды, канцерогенеза, воспалительных процессов и старения.

Таким образом, на основании анализа литературных данных можно сделать заключение, что многие мкРНК взаимодействуют с транскрипционными факторами семейства HIF и регулируют адаптацию клеток и организма в целом к условиям гипоксии (табл. 2).

Таблица 2. Взаимодействие некоторых мкРНК и транскрипционных факторов семейства HIF

HIFs	Ключевые мкРНК, на которые влияет HIF	Ключевые мкРНК, ингибирующие синтез HIF
HIF-1α	miR-210 miR-122 miR-520d-3p miR-98-3p miR-4745-5p miR-139-5p	miR-20a miR-150 miR-155 miR-153 miR-519c miR-429
HIF-2α	miR-210 miR-520d-3p miR-98-3p miR-4745-5p miR-139-5p	miR-30c-2-3p miR-30a-3p miR-145
HIF-3α	не установлены	miR-429
HIF-1β	не установлены	miR-107

РОЛЬ ИСХОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ И мкРНК ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Особенности течения воспалительных заболеваний в зависимости от исходной устойчивости к гипоксии. Показано, что как у лабораторных животных, так и у людей существуют различия в устойчивости к гипоксии, которая зависит от пола, возраста, наличия сопутствующих заболеваний, а также суточных, сезонных и инфрадианных биоритмов [6, 7]. Устойчивость к гипоксии во многом определяется полиморфизмом генов *HIF1A*, *VEGF* и супероксиддисмутазы *SOD2*, регулирующих адаптивный ответ на гипоксию. Наибольшее значение имеет активация индуцируемого гипоксией фактора HIF-1α. По данным литературы, выявлено наличие обратной зависимости между базовым содержанием белка HIF-1α в неокортексе и устойчивостью беспородных самцов крыс к гипоксии: у низкоустойчивых особей в нормоксических условиях содержание белка HIF-1α было в 1,7 раза выше, чем у высокоустойчивых [8]. Животные с низкой устойчивостью к недостатку кислорода, в отличие от высокоустойчивых, характеризуются более тяжелым течением как локальных, так и системных воспалительных процессов [9–12]. В частности, при моделировании острого язвенного колита с использованием декстрансульфата натрия (ДСН) у низкоустойчивых к гипоксии половозрелых самцов мышей C57Bl/6, по сравнению с высокоустойчивыми, наблюдались более выраженные клинические проявления (диарея и кровь в кале), статистически значимое снижение всех популяций лимфоцитов в периферической крови, а также была выше распространенность язв в слизистой оболочке толстой кишки [12]. При моделировании хронического язвенного колита с использованием той же экспериментальной модели у низкоустойчивых к гипоксии мышей также наблюдались более выраженные клинические проявления заболевания на фоне более высокого уровня смертности животных, а также снижения всех популяций Т-лимфоцитов и увеличения числа В-клеток в крови [11]. Эти исследования свидетельствуют о взаимосвязи исходной устойчивости к гипоксии и тяжести течения воспалительных процессов в толстой кишке.

Кроме того, на половозрелых самцах крыс Вистар также показана взаимосвязь тяжести течения системного воспалительного ответа, индуцированного введением липополисахарида (ЛПС), и устойчивости животных к гипоксии. Низкоустойчивые к недостатку кислорода животные в ответ на введение ЛПС характеризуются более высокими уровнями экспрессии *Nf-kb* и *Hif-1a* в печени, бóльшим количеством нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и повышенным содержанием IL-1β и С-реактивного белка в сыворотке крови [9].

В ответ на введение ЛПС для низкоустойчивых к гипоксии животных характерно смещение баланса иммунных реакций в сторону гуморальных, в то время как для высокоустойчивых – в сторону клеточных [10].

Точные механизмы, определяющие различия в тяжести течения воспалительных заболеваний у животных с разной устойчивостью к гипоксии, в настоящее время не установлены. Очевидно, что функционирование белка HIF-1α играет одну из главных ролей в этих процессах. При этом регуляция синтеза HIF-1α у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных может осуществляться по-разному. Вероятно, в этом принимают участие мкРНК, которые влияют как на ответ на гипоксическое воздействие, так и на течение воспалительных процессов. Роль мкРНК как в системных, так и в локальных воспалительных процессах активно изучается в настоящее время. При поиске биомаркеров воспаления изучают преимущественно циркулирующие мкРНК, в то время как исследования тканевых мкРНК у экспериментальных животных позволяют установить механизмы воспалительных реакций. При этом показано, что паттерны экспрессии мкРНК в тканях во многом перекрываются с мкРНК, циркулирующими в крови. Среди обсуждаемых нами ранее мкРНК, которые участвуют в регуляции ответа на гипоксию при воспалительных процессах, повышение экспрессии miR-210 и miR-155 обнаружено как в тканях, так и в крови, а miR-107 и miR-150 – только в крови.

Циркулирующие мкРНК, регулирующие ответ на гипоксию при воспалительных процессах. Согласно исследованиям Virga et al. [98] и Del Mauro et al. [99], повышение уровня экспрессии miR-210 в моноцитах крови человека положительно коррелирует с возможностью развития сепсиса, а увеличение концентрации этой же мкРНК в сыворотке крови – со смертностью. Однако позже проведено другое проспективное когортное исследование miR-210 как возможного биомаркера сепсиса [100]. На основании клинических данных пациентов делили на группы в соответствии с одним из подтипов сепсиса (альфа, бета, гамма и дельта), которые различаются по исходу и ответу на лечение. В ходе этого исследования показано, что уровень циркулирующей miR-210 был увеличен в 3,6 раза независимо от подтипа сепсиса. Однако после поправок на искажающие факторы (использование некоторых лекарственных препаратов или искусственной вентиляции легких) наиболее выраженное увеличение наблюдалось только при дельта-форме. Таким образом, по последним данным, активация одной из связанных с гипоксией мкРНК – miR-210 – сопровождает развитие сепсиса, однако характерна только для одного его подтипа.

Помимо исследований мкРНК в качестве биомаркеров развития сепсиса, показано, что у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона в периферической крови уровни экспрессии некоторых мкРНК повышены [101]. В частности, miR-155 имела более высокий уровень экспрессии при язвенном колите, а miR-107 – при болезни Крона [102]. Кроме того, по результатам экспериментального исследования мкРНК с использованием трех моделей язвенного колита у мышей, показано повышение концентрации miR-150 в сыворотке крови [103]. В ходе данной работы использовали модель острого колита, индуцированного ДСН [104], TLR5-дефицитных мышей ($TLR5^{-/-}$) [105] и IL-10-дефицитных мышей ($IL10^{-/-}$) [106]. Авторы пришли к выводу, что повышение концентрации связанной с гипоксией miR-150 является одним из специфических биомаркеров воспалительных заболеваний кишечника, вызванных различными этиологическими факторами.

Таким образом, концентрации в сыворотке крови некоторых мкРНК, связанных с ответом на гипоксию, могут быть использованы в ходе неинвазивного исследования пациентов в качестве маркеров для прогнозирования возможности возникновения и тяжести течения как локальных, так и системных воспалительных процессов.

Тканевые мкРНК, регулирующие ответ на гипоксию при воспалительных процессах. На экспериментальных моделях ЛПС-индуцированного эндотоксин-септического шока, полимикробного сепсиса, воспроизведенного методом перевязки и дальнейшей пункции слепой кишки, и паразитарной инфекции, вызванной *Trypanosoma brucei* у мышей, показано, что в ответ на воздействие патогенов наблюдалась активация miR-210 в моноцитах и макрофагах, которая сопровождалась увеличением концентрации HIF-1α в сыворотке крови. Активация miR-210 приводит к подавлению митохондриального дыхания за счет остановки трансляции белков ISCU, мРНК которых является мишенью для этой мкРНК. В результате этих метаболических изменений наблюдалась поляризация макрофагов по провоспалительному M1-фенотипу. При последующей делеции miR-210 и воспроизведении всех описанных выше инфекционных моделей наблюдалось более легкое течение воспаления со снижением уровней провоспалительных цитокинов IL-6

и TNF-α и повышением противовоспалительного – IL-10 [98]. Авторы предполагают, что делеция miR-210 приводит к неполной поляризации макрофагов по М1-фенотипу, что объясняет более легкое течение воспаления и повышение выживаемости организмов. Следовательно, повышенная экспрессия miR-210 как в сыворотке крови, так и в тканях способствует более тяжелому течению системного воспалительного ответа.

При изучении различий в экспрессии мкРНК в тканях толстой кишки из зон язвенных поражений и вне их при язвенном колите и болезни Крона была охарактеризована пространственная связь в паттернах экспрессии мкРНК между этими зонами. В биоптатах толстой кишки с воспалением по сравнению с нормальной тканью показано статистически значимое повышение экспрессии miR-155 как при язвенном колите, так и при болезни Крона [107]. Кроме того, показано, что экспрессия этой мкРНК в биоптатах слизистой оболочки толстой кишки у пациентов с активной стадией язвенного колита статистически значимо выше, чем у здоровых людей [108].

При воспалительных заболеваниях кишечника, в том числе язвенном колите, возрастает частота развития рака толстой кишки. При воспалении происходит активация NF-κB, который имеет сайты связывания в некоторых мкРНК. При исследовании спектра экспрессии мкРНК в клетках рака толстой кишки наблюдалось повышение уровней экспрессии miR-210, miR-155 и miR-21, что объясняется наличием сайтов связывания NF-κB в их промоторных областях [109]. В течение десятилетий стандартным химиотерапевтическим препаратом первой линии при колоректальном раке (КРР) является 5-фторурацил (5-ФУ). Несмотря на то что возможности лечения злокачественных опухолей расширились за счет появления терапии 5-ФУ в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами, резистентность опухоли остается серьезной проблемой [110]. Nijhuis et al. [111] изучали возникновение резистентности к 5-ФУ на клеточных линиях КРР и роль мкРНК в этом процессе. Исследование проводили в течение 48 ч в условиях нормоксии (20,9% O_2) и в условиях гипоксии разной тяжести (1,0% и 0,2% O_2). Показано, что при недостатке кислорода активировались 6 мкРНК – miR-21, miR-210, miR-30d, miR-320a, miR-320b и miR-320c, среди которых наиболее высокий уровень был у miR-210. Однако при исследовании репертуара мкРНК в опухолях больных КРР, резистентных к лечению 5-фторурацилом, miR-210 не входила в число значимых молекул, что не подтверждает ее участие в формировании толерантности к противоопухолевой терапии данным препаратом [111]. Таким образом, из мкРНК, регулирующих ответ на гипоксию, наиболее изучена роль miR-210 в развитии как локальных, так и системных воспалительных процессов. Тем не менее точные механизмы участия miR-210 в регуляции воспаления недостаточно изучены, так как исследования проводили на экспериментальных моделях разных воспалительных заболеваний, при этом не учитывалась исходная устойчивость организмов к гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ответ организма на гипоксию осуществляется при участии транскрипционных факторов семейства HIF. Реакция клеток на кратковременное или длительное гипоксическое воздействие регулируется разными изоформами HIF, в переключении которых участвуют мкРНК. Роль мкРНК в регуляции клеточного ответа на гипоксию обусловлена их воздействием на мРНК генов, кодирующих HIF, влиянием на деградацию α-субъединиц HIF и экспрессию белков, реализующих метаболический ответ на гипоксию – гликолиз, окислительное фосфорилирование и др. В то же время HIF также оказывает влияние на биогенез мкРНК. Данные по изменению экспрессии той или иной изоформы HIF и зависимых белков противоречивы, поскольку исследования проводят на разных клеточных линиях и видах экспериментальных животных, при разной концентрации кислорода и разной длительности гипоксического воздействия. Кроме того, на экспрессию HIF может влиять исходная устойчивость изучаемых организмов к гипоксии, что не учитывается при проведении исследований. В то время как взаимосвязь HIF-1α и мкРНК достаточно полно охарактеризована, механизмы взаимодействия HIF-2α и HIF-3α, а также HIF-1β с мкРНК изучены недостаточно. Понимание механизмов взаимосвязи HIF, гипоксии и мкРНК необходимо для разработки новых подходов к персонализированной терапии заболеваний, сопровождающихся недостатком кислорода.

Вклад авторов. М.В.С. – анализ данных литературы, подготовка текста обзора и рисунков, Д.Ш.Д. – обсуждение собранных данных и редактирование текста, О.В.М. – финальное редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена и финансировалась в рамках бюджетной темы 122030200530-6 «Клеточные и молекулярно-биологические механизмы воспаления в развитии социально значимых заболеваний человека».

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. Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447-5454, doi: 10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992.
2. Kaelin, W. G., and Ratcliffe, P. J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway, *Mol. Cell*, **30**, 393-402, doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.
3. Semenza, G. L. (2010) Oxygen homeostasis, *WIREs Syst. Biol. Med.*, **2**, 336-361, doi: 10.1002/wsbm.69.
4. Hirota, K. (2020) Basic biology of hypoxic responses mediated by the transcription factor HIFs and its implication for medicine, *Biomedicines*, **8**, 32, doi: 10.3390/biomedicines8020032.
5. Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., and Karin, M. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha, *Nature*, **453**, 807-811, doi: 10.1038/NATURE06905.
6. Kosyreva, A. M., Dzhalilova, D. S., Makarova, O. V., Tsvetkov, I. S., Zolotova, N. A., Diatroptova, M. A., Ponomarenko, E. A., Mkhitarov, V. A., Khochanskiy, D. N., and Mikhailova, L. P. (2020) Sex differences of inflammatory and immune response in pups of Wistar rats with SIRS, *Sci. Rep.*, **10**, 15884, doi: 10.1038/s41598-020-72537-y.
7. Dzhalilova, D., Kosyreva, A., Vishnyakova, P., Zolotova, N., Tsvetkov, I., Mkhitarov, V., Mikhailova, L., Kakturskiy, L., and Makarova, O. (2021) Age-related differences in hypoxia-associated genes and cytokine profile in male Wistar rats, *Heliyon*, **7**, e08085, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08085.
8. Kirova, Y. I., Germanova, E. L., and Lukyanova, L. D. (2013) Phenotypic features of the dynamics of HIF-1α levels in rat neocortex in different hypoxia regimens, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **154**, 718-722, doi: 10.1007/S10517-013-2038-Z.
9. Dzhalilova, D. S., Kosyreva, A. M., Diatroptov, M. E., Ponomarenko, E. A., Tsvetkov, I. S., Zolotova, N. A., Mkhitarov, V. A., Khochanskiy, D. N., and Makarova, O. V. (2019) Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats, *J. Inflamm. Res.*, **12**, 73-86, doi: 10.2147/JIR.S194581.
10. Dzhalilova, D. S., Kosyreva, A. M., Diatroptov, M. E., Zolotova, N. A., Tsvetkov, I. S., Mkhitarov, V. A., Makarova, O. V., and Khochanskiy, D. N. (2019) Morphological characteristics of the thymus and spleen and the subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia, *Int. J. Inflam.*, **1**, 7584685, doi: 10.1155/2019/7584685.
11. Dzhalilova, D. Sh., Zolotova, N. A., Polyakova, M. A., Diatroptov, M. E., Dobrynina, M. T., and Makarova, O. V. (2018) Morphological features of the inflammatory process and subpopulation pattern of peripheral blood lymphocytes during chronic colitis in mice exhibiting different responses to hypoxia [in Russian], *Clin. Exp. Morphol.*, **28**, 13-20, doi: 10.31088/2226-5988-2018-28-4-13-20.
12. Dzhalilova, D. Sh., Polyakova, M. A., Diatroptov, M. E., Zolotova, N. A., and Makarova, O. V. (2018) Morphological changes in the colon and composition of peripheral blood lymphocytes in acute colitis in mice with different resistance to hypoxia [in Russian], *Mol. Med.*, **16**, 46-50, doi: 10.29296/24999490-2018-06-08.
13. Lytle, J. R., Yario, T. A., and Steitz, J. A. (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9667-9672, doi: 10.1073/pnas.0703820104.
14. Burtscher, J., Mallet, R. T., Burtscher, M., and Millet, G. P. (2021) Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection? *Ageing Res. Rev.*, **68**, 101343, doi: 10.1016/j.arr.2021.101343.
15. Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell*, **148**, 399-408, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.
16. Ledent, V., and Vervoort, M. (2001) The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis, *Genome Res.*, **11**, 754-770, doi: 10.1101/gr.177001.
17. Hu, C.-J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., and Simon, M. C. (2007) The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1α and HIF-2α, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4528-4542, doi: 10.1091/mbc.e06-05-0419.
18. Ema, M. (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to

hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300, *EMBO J.*, **18**, 1905-1914, doi: 10.1093/emboj/18.7.1905.

19. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) Targeting of HIF-α to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation, *Science*, **292**, 468-472, doi: 10.1126/science.1059796.
20. Haase, V. H. (2017) HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism, *Hemodial. Int.*, **21**, S110-S124, doi: 10.1111/hdi.12567.
21. Maxwell, P. H., Wlesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*, **399**, 271-275, doi: 10.1038/20459.
22. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001) HIFα targeted for VHL-Mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O_2 sensing, *Science*, **292**, 464-468, doi: 10.1126/science.1059817.
23. Van Uden, P., Kenneth, N. S., and Rocha, S. (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB, *Biochem. J.*, **412**, 477-484, doi: 10.1042/BJ20080476.
24. Van Uden, P., Kenneth, N. S., Webster, R., Müller, H. A., Mudie, S., and Rocha, S. (2011) Evolutionary conserved regulation of HIF-1β by NF-κB, *PLoS Genet.*, **7**, e1001285, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1001285.
25. Moniz, S., Biddlestone, J., and Rocha, S. (2014) $Grow_2$: the HIF system, energy homeostasis and the cell cycle, *Histol. Histopathol.*, **29**, 589-600, doi: 10.14670/HH-29.10.589.
26. Koyasu, S., Kobayashi, M., Goto, Y., Hiraoka, M., and Harada, H. (2018) Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: two decades of knowledge, *Cancer Sci.*, **109**, 560-571, doi: 10.1111/CAS.13483.
27. Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L., and van Obberghen, E. (2002) Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, **277**, 27975-27981, doi: 10.1074/JBC.M204152200.
28. Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R., and Tee, A. R. (2015) mTORC1 drives HIF-1α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3, *Oncogene*, **34**, 2239-2250, doi: 10.1038/onc.2014.164.
29. Masoud, G. N., and Li, W. (2015) HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy, *Acta Pharm. Sin. B*, **5**, 378-389, doi: 10.1016/J.APSB.2015.05.007.
30. Cummins, E. P., Berra, E., Comerford, K. M., Ginouves, A., Fitzgerald, K. T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J. E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., and Taylor, C. T. (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18154-18159, doi: 10.1073/PNAS.0602235103.
31. Korbecki, J., Simińska, D., Gąssowska-Dobrowolska, M., Listos, J., Gutowska, I., Chlubek, D., and Baranowska-Bosiacka, I. (2021) Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF-κB activation: a review of the molecular mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10701, doi: 10.3390/IJMS221910701.
32. Bandarra, D., Biddlestone, J., Mudie, S., Müller, H. A. J., and Rocha, S. (2015) HIF-1α restricts NF-κB-dependent gene expression to control innate immunity signals, *Dis. Model. Mech.*, **8**, 169-181, doi: 10.1242/DMM.017285.
33. Chun, Y., and Kim, J. (2021) AMPK–mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9765, doi: 10.3390/IJMS22189765.
34. Inoki, K., Corradetti, M. N., and Guan, K. L. (2005) Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease, *Nat. Genet.*, **37**, 19-24, doi: 10.1038/ng1494.
35. Kietzmann, T., Mennerich, D., and Dimova, E. Y. (2016) Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: Impact on stability, localization, and transactivity, *Front. Cell Dev. Biol.*, **4**, 11, doi: 10.3389/fcell.2016.00011.
36. Leaman, D., Po, Y. C., Fak, J., Yalcin, A., Pearce, M., Unnerstall, U., Marks, D. S., Sander, C., Tuschl, T., and Gaul, U. (2005) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development, *Cell*, **121**, 1097-1108, doi: 10.1016/j.cell.2005.04.016.
37. Pocock, R. (2011) Invited review: decoding the microRNA response to hypoxia, *Pflugers Arch.*, **461**, 307-315, doi: 10.1007/s00424-010-0910-5.
38. Ke, Q., and Costa, M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1469-1480, doi: 10.1124/mol.106.027029.
39. Tian, H., Hammer, R. E., Matsumoto, A. M., Russell, D. W., and McKnight, S. L. (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development, *Genes Dev.*, **12**, 3320-3324, doi: 10.1101/gad.12.21.3320.
40. Appelhoffl, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Gleadle, J. M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor, *J. Biol. Chem.*, **279**, 38458-38465, doi: 10.1074/jbc.M406026200.

41. Koivunen, P., Hirsilä, M., Günzler, V., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases, *J. Biol. Chem.*, **279**, 9899-9904, doi: 10.1074/jbc.M312254200.
42. Befani, C., and Liakos, P. (2018) The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 9087-9098, doi: 10.1002/JCP.26805.
43. Taylor, S. E., Bagnall, J., Mason, D., Levy, R., Fernig, D. G., and See, V. (2016) Differential sub-nuclear distribution of hypoxia-inducible factors (HIF)-1 and -2 alpha impacts on their stability and mobility, *Open Biol.*, **6**, 160195, doi: 10.1098/RSOB.160195.
44. Duan, C. (2016) Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **310**, C260-C269, doi: 10.1152/ajpcell.00315.2015.
45. Ravenna, L., Salvatori, L., and Russo, M. A. (2016) HIF3α: the little we know, *FEBS J.*, **283**, 993-1003, doi: 10.1111/febs.13572.
46. Pasanen, A., Heikkilä, M., Rautavuoma, K., Hirsilä, M., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2010) Hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1189-1200, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2010.04.008.
47. Maynard, M. A., Qi, H., Chung, J., Lee, E. H. L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Ohh, M. (2003) Multiple splice variants of the human HIF-3α locus are targets of the von Hippel–Lindau E3 ubiquitin ligase complex, *J. Biol. Chem.*, **278**, 11032-11040, doi: 10.1074/jbc.M208681200.
48. Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2010) HIF-1 and HIF-2 transcription factors –similar but not identical, *Mol. Cells*, **29**, 435-442, doi: 10.1007/S10059-010-0067-2.
49. Kalinowski, L., Janaszak-Jasiecka, A., Siekierzycka, A., Bartoszewska, S., Woźniak, M., Lejnowski, D., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2016) Post-transcriptional and transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia: the role of microRNAs, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **21**, 16, doi: 10.1186/S11658-016-0017-X.
50. Keith, B., Johnson, R. S., and Simon, M. C. (2011) HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 9-22, doi: 10.1038/NRC3183.
51. Koh, M. Y., and Powis, G. (2012) Passing the baton: the HIF switch, *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 364-372, doi: 10.1016/J.TIBS.2012.06.004.
52. Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2011) Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3α variants in the hypoxia response, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 3885-3901, doi: 10.1007/s00018-011-0679-5.
53. Serocki, M., Bartoszewska, S., Janaszak-Jasiecka, A., Ochocka, R. J., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2018) miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target, *Angiogenesis*, **21**, 183-202, doi: 10.1007/S10456-018-9600-2.
54. Janaszak-Jasiecka, A., Bartoszewska, S., Kochan, K., Piotrowski, A., Kalinowski, L., Kamysz, W., Ochocka, R. J., Bartoszewski, R., and Collawn, J. F. (2016) MiR-429 regulates the transition between Hypoxia-inducible factor (HIF)1A and HIF3A expression in human endothelial cells, *Sci. Rep.*, **6**, 22775, doi: 10.1038/srep22775.
55. Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P.-J., and Duan, C. (2014) Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia, *Cell Rep.*, **6**, 1110-1121, doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.011.
56. Jaśkiewicz, M., Moszyńska, A., Serocki, M., Króliczewski, J., Bartoszewska, S., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2022) Hypoxia-inducible factor (hif)-3α2 serves as an endothelial cell fate executor during chronic hypoxia, *EXCLI J.*, **21**, 454-469, doi: 10.17179/excli2021-4622.
57. Moszyńska, A., Jaśkiewicz, M., Serocki, M., Cabaj, A., Crossman, D. K., Bartoszewska, S., Gebert, M., Dąbrowski, M., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2022) The hypoxia-induced changes in miRNA-mRNA in RNA-induced silencing complexes and HIF-2 induced miRNAs in human endothelial cells, *FASEB J.*, **36**, e22412, doi: 10.1096/fj.202101987R.
58. Bhaskaran, M., and Mohan, M. (2014) MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease, *Vet. Pathol.*, **51**, 759-774, doi: 10.1177/0300985813502820.
59. Nguyen, H. M., Nguyen, T. D., Nguyen, T. L., and Nguyen, T. A. (2019) Orientation of human microprocessor on primary microRNAs, *Biochemistry*, **58**, 189-198, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00944.
60. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors, *Science*, **303**, 95-98, doi: 10.1126/science.1090599.
61. Bartel, D. P. (2018) Metazoan microRNAs, *Cell*, **173**, 20-51, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
62. Kalla, R., Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Quintana, J. F., Nimmo, E. R., Buck, A. H., and Satsangi, J. (2015) MicroRNAs: new players in IBD, *Gut*, **64**, 504-513, doi: 10.1136/gutjnl-2014-307891.
63. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., and Tuschl, T. (2003) A uniform system for microRNA annotation, *RNA*, **9**, 277-279, doi: 10.1261/RNA.2183803.
64. Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA registry, *Nucleic Acids Res.*, **32**, D109-D111, doi: 10.1093/NAR/GKH023.

65. Zaporozhchenko, I. A., Rykova, E. Y., and Laktionov, P. P. (2020) The fundamentals of miRNA biology: structure, biogenesis, and regulatory functions, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **46**, 1-13, doi: 10.1134/S106816202001015X.
66. Brosnan, C. A., Palmer, A. J., and Zuryn, S. (2021) Cell-type-specific profiling of loaded miRNAs from *Caenorhabditis elegans* reveals spatial and temporal flexibility in Argonaute loading, *Nat. Commun.*, **12**, 2194, doi: 10.1038/s41467-021-22503-7.
67. Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs, *Nature*, **455**, 58-63, doi: 10.1038/nature07228.
68. Froehlich, J. J., Uyar, B., Herzog, M., Theil, K., Glažar, P., Akalin, A., and Rajewsky, N. (2021) Parallel genetics of regulatory sequences using scalable genome editing *in vivo*, *Cell Rep.*, **35**, 108988, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108988.
69. Peng, X., Gao, H., Xu, R., Wang, H., Mei, J., and Liu, C. (2020) The interplay between HIF-1α and noncoding RNAs in cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 27, doi: 10.1186/S13046-020-1535-Y.
70. Camps, C., Saini, H. K., Mole, D. R., Choudhry, H., Reczko, M., Guerra-Assunção, J. A., Tian, Y. M., Buffa, F. M., Harris, A. L., Hatzigeorgiou, A. G., Enright, A. J., and Ragoussis, J. (2014) Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia, *Mol. Cancer*, **13**, 28, doi: 10.1186/1476-4598-13-28.
71. Xiong, G., Stewart, R. L., Chen, J., Gao, T., Scott, T. L., Samayoa, L. M., O'Connor, K., Lane, A. N., and Xu, R. (2018) Collagen prolyl 4-hydroxylase 1 is essential for HIF-1α stabilization and TNBC chemoresistance, *Nat. Commun.*, **9**, 4456, doi: 10.1038/S41467-018-06893-9.
72. Dzhalilova, D. Sh., and Makarova, O. V. (2021) HIF-Dependent mechanisms of relationship between hypoxia tolerance and tumor development, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1163-1180, doi: 10.1134/S0006297921100011.
73. Martinez, S. R., Ma, Q., Dasgupta, C., Meng, X., and Zhang, L. (2017) MicroRNA-210 suppresses glucocorticoid receptor expression in response to hypoxia in fetal rat cardiomyocytes, *Oncotarget*, **8**, 80249, doi: 10.18632/ONCOTARGET.17801.
74. Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M. C., and Martelli, F. (2008) MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3, *J. Biol. Chem.*, **283**, 15878-15883, doi: 10.1074/jbc.M800731200.
75. Yang, Y., Gu, J., Li, X., Xue, C., Ba, L., Gao, Y., Zhou, J., Bai, C., Sun, Z., and Zhao, R. C. (2021) HIF-1α promotes the migration and invasion of cancer-associated fibroblasts by miR-210, *Aging Dis.*, **12**, 1794, doi: 10.14336/AD.2021.0315.
76. Camps, C., Buffa, F. M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., Harris, A. L., Gleadle, J. M., and Ragoussis, J. (2008) hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1340-1348, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1755.
77. Ju, C., Wang, M., Tak, E., Kim, B., Emontzpohl, C., Yang, Y., Yuan, X., Kutay, H., Liang, Y., Hall, D. R., Dar, W. A., Bynon, J. S., Carmeliet, P., Ghoshal, K., and Eltzschig, H. K. (2021) Hypoxia-inducible factor-1α-dependent induction of miR122 enhances hepatic ischemia tolerance, *J. Clin. Invest.*, **131**, e140300, 140300-140300, doi: 10.1172/JCI140300.
78. Coronel-Hernández, J., Delgado-Waldo, I., Cantú de León, D., López-Camarillo, C., Jacobo-Herrera, N., Ramos-Payán, R., and Pérez-Plasencia, C. (2022) HypoxaMIRs: key regulators of hallmarks of colorectal cancer, *Cells*, **11**, 1895, doi: 10.3390/CELLS11121895.
79. Ivanova, I. G., Park, C. V., and Kenneth, N. S. (2019) Translating the hypoxic response – the role of HIF protein translation in the cellular response to low oxygen, *Cells*, **8**, 114, doi: 10.3390/CELLS8020114.
80. Yamakuchi, M., Lotterman, C. D., Bao, C., Hruban, R. H., Karim, B., Mendell, J. T., Huso, D., and Lowenstein, C. J. (2010) P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 6334-6339, doi: 10.1073/pnas.0911082107.
81. Cha, S. T., Chen, P. S., Johansson, G., Chu, C. Y., Wang, M. Y., Jeng, Y. M., Yu, S. L., Chen, J. S., Chang, K. J., Jee, S. H., Tan, C. T., Lin, M. T., and Kuo, M. L. (2010) MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis, *Cancer Res.*, **70**, 2675-2685, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2448.
82. Ghosh, G., Subramanian, I. V., Adhikari, N., Zhang, X., Joshi, H. P., Basi, D., Chandrashekhar, Y. S., Hall, J. L., Roy, S., Zeng, Y., and Ramakrishnan, S. (2010) Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-α isoforms and promotes angiogenesis, *J. Clin. Invest.*, **120**, 4141-4154, doi: 10.1172/JCI42980.
83. Chan, S. Y., Zhang, Y. Y., Hemann, C., Mahoney, C. E., Zweier, J. L., and Loscalzo, J. (2009) MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2, *Cell Metab.*, **10**, 273-284, doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.015.
84. Hui, X., Al-Ward, H., Shaher, F., Liu, C. Y., and Liu, N. (2020) The role of miR-210 in the biological system: a current overview, *Hum. Hered.*, **84**, 233-239, doi: 10.1159/000509280.
85. Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., and Takahashi, T. (2008)

Identification of hypoxia-inducible factor-1A as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster, *Cancer Res.*, **68**, 5540-5545, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6460.

86. Yang, D., Wang, J., Xiao, M., Zhou, T., and Shi, X. (2016) Role of mir-155 in controlling HIF-1α level and promoting endothelial cell maturation, *Sci. Rep.*, **6**, 1-10, doi: 10.1038/srep35316.
87. Li, Y., Su, J., Li, F., Chen, X., and Zhang, G. (2017) MiR-150 regulates human keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1α and VEGFA: Implications for psoriasis treatment, *PLoS One*, **12**, e0175459, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0175459.
88. Yang, B., Xu, Y., Hu, Y., Luo, Y., Lu, X., Tsui, C. K., Lu, L., and Liang, X. (2016) Madecassic acid protects against hypoxia-induced oxidative stress in retinal microvascular endothelial cells via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress, *Biomed. Pharmacother.*, **84**, 845-852, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2016.10.015.
89. Liang, H., Xiao, J., Zhou, Z., Wu, J., Ge, F., Li, Z., Zhang, H., Sun, J., Li, F., Liu, R., and Chen, C. (2018) Hypoxia induces miR-153 through the IRE1α-XBP1 pathway to fine tune the HIF1α/VEGFA axis in breast cancer angiogenesis, *Oncogene*, **37**, 1961-1975, doi: 10.1038/s41388-017-0089-8.
90. Mathew, L. K., Lee, S. S., Skuli, N., Rao, S., Keith, B., Nathanson, K. L., Lal, P., and Simon, M. C. (2014) Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2α activity, *Cancer Discov.*, **4**, 53-60, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0291.
91. Zhang, H., Pu, J., Qi, T., Qi, M., Yang, C., Li, S., Huang, K., Zheng, L., and Tong, Q. (2012) MicroRNA-145 inhibits the growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells through targeting hypoxia-inducible factor 2 alpha, *Oncogene*, **33**, 387-397, doi: 10.1038/onc.2012.574.
92. Bartoszewska, S., Kochan, K., Piotrowski, A., Kamysz, W., Ochocka, R. J., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2015) The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1α expression in human endothelial cells through a negative feedback loop, *FASEB J.*, **29**, 1467-1479, doi: 10.1096/fj.14-267054.
93. Prives, C., and Hall, P. A. (1999) The p53 pathway, *J. Pathol.*, **187**, 112-126, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<112::AID-PATH250>3.0.CO;2-3.
94. Deng, B., Du, J., Hu, R., Wang, A. P., Wu, W. H., Hu, C. P., Li, Y. J., and Li, X. H. (2016) MicroRNA-103/107 is involved in hypoxia-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by targeting HIF-1β, *Life Sci.*, **147**, 117-124, doi: 10.1016/J.LFS.2016.01.043.
95. Clifford, S. C., Astuti, D., Hooper, L., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., and Maher, E. R. (2001) The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1α in renal cell carcinoma, *Oncogene*, **20**, 5067-5074, doi: 10.1038/sj.onc.1204602.
96. Mizuno, Y., Tokuzawa, Y., Ninomiya, Y., Yagi, K., Yatsuka-Kanesaki, Y., Suda, T., Fukuda, T., Katagiri, T., Kondoh, Y., Amemiya, T., Tashiro, H., and Okazaki, Y. (2009) miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b, *FEBS Lett.*, **583**, 2263-2268, doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.006.
97. Rouault, T. A., and Tong, W. H. (2008) Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease, *Trends Genet.*, **24**, 398-407, doi: 10.1016/j.tig.2008.05.008.
98. Virga, F., Cappellesso, F., Stijlemans, B., Henze, A. T., Trotta, R., Van Audenaerde, J., Mirchandani, A. S., Sanchez-Garcia, M. A., Vandewalle, J., Orso, F., Riera-Domingo, C., Griffa, A., Ivan, C., Smits, E., Laoui, D., Martelli, F., Langouche, L., Van den Berghe, G., Feron, O., Ghesquière, B., Prenen, H., Libert, C., Walmsley, S. R., Corbet, C., Van Ginderachter, J. A., Ivan, M., Taverna, D., and Mazzone, M. (2021) Macrophage miR-210 induction and metabolic reprogramming in response to pathogen interaction boost life-threatening inflammation, *Sci. Adv.*, **7**, eabf0466, doi: 10.1126/sciadv.abf0466.
99. Del Mauro, J. S., Prince, P. D., Santander Plantamura, Y., Allo, M. A., Parola, L., Fernandez Machulsky, N., Morettón, M. A., Bin, E. P., González, G. E., Bertera, F. M., Carranza, A., Berg, G., Taira, C. A., Donato, M., Chiappetta, D. A., Polizio, A. H., and Höcht, C. (2021) Nebivolol is more effective than atenolol for blood pressure variability attenuation and target organ damage prevention in L-NAME hypertensive rats, *Hypertens. Res.*, **44**, 791-802, doi: 10.1038/s41440-021-00630-4.
100. Powell, R. E., Tai, Y. Y., Kennedy, J. N., Seymour, C. W., and Chan, S. Y. (2022) Circulating hypoxia-dependent miR-210 is increased in clinical sepsis subtypes: A cohort study, *J. Transl. Med.*, **20**, 448, doi: 10.1186/s12967-022-03655-6.
101. Alfaifi, J., Germain, A., Heba, A. C., Arnone, D., Gailly, L., Ndiaye, N. C., Viennois, E., Caron, B., Peyrin-Biroulet, L., and Dreumont, N. (2022) Deep dive into microRNAs in inflammatory bowel disease, *Inflamm. Bowel Dis.*, doi: 10.1093/ibd/izac250.
102. Paraskevi, A., Theodoropoulos, G., Papaconstantinou, I., Mantzaris, G., Nikiteas, N., and Gazouli, M. (2012) Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease, *J. Crohns Colitis*, **6**, 900-904, doi: 10.1016/j.crohns.2012.02.006.
103. Viennois, E., Zhao, Y., Han, M. K., Xiao, B., Zhang, M., Prasad, M., Wang, L., and Merlin, D. (2017) Serum miRNA signature diagnoses and discriminates murine colitis subtypes and predicts ulcerative colitis in humans, *Sci. Rep.*, **7**, 2520, doi: 10.1038/s41598-017-02782-1.
104. Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2009)

Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis, *PLoS One*, **4**, e6073, doi: 10.1371/journal.pone.0006073.

105. Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R., and Gewirtz, A. T. (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice, *J. Clin. Invest.*, **117**, 3909-3921, doi: 10.1172/JCI33084.
106. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis, *Cell*, **75**, 263-274, doi: 10.1016/0092-8674(93)80068-p.
107. Schaefer, J. S., Attumi, T., Opekun, A. R., Abraham, B., Hou, J., Shelby, H., Graham, D. Y., Streckfus, C., and Klein, J. R. (2015) MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis, *BMC Immunol.*, **16**, 5, doi: 10.1186/s12865-015-0069-0.
108. Takagi, T., Naito, Y., Mizushima, K., Hirata, I., Yagi, N., Tomatsuri, N., Ando, T., Oyamada, Y., Isozaki, Y., Hongo, H., Uchiyama, K., Handa, O., Kokura, S., Ichikawa, H., and Yoshikawa, T. (2010) Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **25**, S129-S133, doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06216.x.
109. Bakirtzi, K., Hatziapostolou, M., Karagiannides, I., Polytarchou, C., Jaeger, S., Iliopoulos, D., and Pothoulakis, C. (2011) Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors, *Gastroenterology*, **141**, 1749-1761, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.038.
110. Temraz, S., Mukherji, D., Alameddine, R., and Shamseddine, A. (2014) Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **89**, 217-230, doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.015.
111. Nijhuis, A., Thompson, H., Adam, J., Parker, A., Gammon, L., Lewis, A., Bundy, J. G., Soga, T., Jalaly, A., Propper, D., Jeffery, R., Suraweera, N., McDonald, S., Thaha, M. A., Feakins, R., Lowe, R., Bishop, C. L., and Silver, A. (2017) Remodelling of microRNAs in colorectal cancer by hypoxia alters metabolism profiles and 5-fluorouracil resistance, *Hum. Mol. Genet.*, **26**, 1552-1564, doi: 10.1093/hmg/ddx059.

THE ROLE OF microRNA IN THE REGULATION OF CELLULAR RESPONSES TO HYPOXIA

Review

M. V. Silina[1]*, D. Sh. Dzhalilova[1], and O. V. Makarova[1,2]

[1] *Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, 117418 Moscow, Russia; e-mail: marusyasilina99@yandex.ru*

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

The impact of hypoxia causes changes in the transcription of genes that contribute to the adaptation of cells to a lack of oxygen. The main mechanism regulating the cellular response to hypoxia is the activation of a group of transcription factors of the HIF (Hypoxia-Inducible Factor) family, which include several isoforms and control the expression of more than a thousand genes. HIF activity is regulated at various levels, including by small non-coding RNA molecules called microRNAs (miRNAs). miRNAs regulate the cellular response to hypoxia by influencing the activation of HIF, its degradation, and the translation of proteins dependent on it. At the same time, HIF also affects miRNA biogenesis. Data on the relationship of a particular HIF isoform with miRNA are contradictory, since studies are performed using different cell lines, different types of experimental animals and clinical material, as well as at different oxygen concentrations and different durations of hypoxic exposure. In addition, HIF expression may be affected by the initial resistance of organisms to lack of oxygen, which is not taken into account in studies. This review analyzes data on the effect of hypoxia on the biogenesis and functioning of miRNAs, as well as the effect of microRNAs on mRNAs of genes involved in adaptation to oxygen deficiency. Understanding the mechanisms of the relationship between HIF, hypoxia, and miRNA is necessary to develop new approaches to personalized therapy for diseases accompanied by oxygen deficiency.

Keywords: hypoxia, microRNA, HIF

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 933 – 946

УДК 577.25

ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО КОМБИНИРОВАННОГО ВВЕДЕНИЯ КЕТАНСЕРИНА И ФЛУОКСЕТИНА МЫШАМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИНИИ B6.CBA-D13Mit76C, ОТЛИЧАЮЩИМСЯ ИЗМЕНЁННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ 5-HT_{1A}-РЕЦЕПТОРОВ

© 2023 А.С. Цыбко*#, Е.М. Кондаурова#, Е.А. Заливина, В.О. Благиня, В.С. Науменко

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

Поступила в редакцию 15.03.2023
После доработки 11.04.2023
Принята к публикации 12.04.2023

Рекомбинантная линия мышей B6.CBA-D13Mit76C отличается изменённой чувствительностью 5-HT_{1A}-рецепторов и усиленной транскрипцией кодирующего их гена. Недавно нами было обнаружено, что хроническое введение классического антидепрессанта флуоксетина мышам B6.CBA-D13Mit76C оказывает про-депрессивный эффект в тесте «принудительное плавание». Поскольку известно, что блокада 5-HT_{2A}-рецепторов может быть благотворной при терапии устойчивой к антидепрессантам депрессии, мы оценили эффект длительного введения (14 дней внутрибрюшинно) селективного антагониста 5-HT_{2A}-рецепторов кетансерина (0,5 мг/кг), антидепрессанта флуоксетина (20 мг/кг) или комбинации флуоксетин + кетансерин на поведение, функциональную активность 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторов, обмен серотонина (5-НТ) и транскрипцию ключевых генов серотониновой системы в мозге мышей B6.CBA-D13Mit76C. Кетансерин не отменил продепрессивный эффект флуоксетина, хотя кетансерин, флуоксетин и их комбинация снизили функциональную активность 5-HT_{1A}-рецепторов и транскрипцию гена *Htr1a* в гиппокампе и среднем мозге. Кроме того, все использованные препараты снизили уровни мРНК *Slc6a4* и *Maoa* в среднем мозге. Эти изменения не сопровождались существенными изменениями в уровнях 5-НТ и его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты. Однако кетансерин усилил активность ключевого фермента синтеза 5-НТ в мозге – триптофангидроксилазы-2 (ТПГ-2). Таким образом, несмотря на некоторые позитивные эффекты (снижение транскрипции *Htr1a*, *Slc6a4* и *Maoa* и усиление активности ТПГ-2), длительная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов не способна облегчить неблагоприятное действие классического антидепрессанта флуоксетина при аберрантном функционировании 5-HT_{1A}-рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 5-HT_{1A}-рецептор, 5-HT_{2A}-рецептор, ТПГ-2, флуоксетин, кетансерин, устойчивость к антидепрессантам.

DOI: 10.31857/S0320972523060040, **EDN:** EELHUV

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня одним из главных вызовов для фармакотерапии большого депрессивного расстройства является терапевтически резистентная депрессия (ТРД). По данным многочисленных исследований, больше трети, если не половина пациентов, демонстрирует неадекватный ответ на классические антидепрессанты, такие как селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), обычно применяемые в качестве лечения первой линии [1]. Устойчивость к СИОЗС имеет комплексную природу, и серотониновая (5-НТ) система, очевидно, играет здесь одну из важнейших ролей. Помимо таких ключевых компонентов

Принятые сокращения: 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота; СИОЗС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина; ТПГ-2 – триптофангидроксилаза-2; ТРД –терапевтически резистентная депрессия; 5-НТ – серотонин или гидрокситриптамин (5-hydroxytriptamine); 5-HT_{1A} – серотониновый рецептор 1А-подтипа; 5-HT_{2A} – серотониновый рецептор 2А-подтипа.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равнозначный вклад в работу.

5-НТ системы, как триптофангидроксилаза-2 (ТПГ-2), транспортёр 5-НТ (5-НТТ) и моноаминоксидаза А (МАОА), в механизмы нечувствительности/устойчивости к СИОЗС также вовлечён серотониновый рецептор 1А-подтипа (5-$НТ_{1А}$) [2–4].

Серотониновые рецепторы 2А-подтипа (5-$НТ_{2А}$) представляют отдельный интерес, поскольку обладают свойствами, выделяющими их на фоне остальных 5-НТ рецепторов. Например, из-за локализации на различных типах нейронов 5-$НТ_{2А}$-рецепторы способны регулировать секрецию глутамата, дофамина и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [5, 6]. Локализованные во фронтальной коре 5-$НТ_{2А}$-рецепторы могут запускать механизм отрицательной обратной связи, ингибирующий секрецию 5-НТ серотонинергическими нейронами дорсального шва [7]. Было установлено, что 5-$НТ_{2А}$-рецепторы могут быть конститутивно активны и в таком состоянии активируют внутриклеточные сигнальные каскады в отсутствии стимулирующего лиганда [8]. Поскольку десенситизация 5-$НТ_{2А}$-рецепторов может осуществляться не только агонистами, но также и антагонистами, фармакологические свойства данных рецепторов резко отличаются от таковых у остальных подтипов [4, 9, 10]. Известно, что 5-$НТ_{2А}$-рецепторы образуют гетеромерные комплексы *in vivo* с 5-$НТ_{2В}$-, 5-$НТ_{2С}$- [11], дофаминовыми D2- [12] и mGlu2-рецепторами [13]. 5-$НТ_{1А}$- и 5-$НТ_{2А}$-рецепторы способны модулировать функциональную активность друг друга [14], поэтому существование гетеромерных комплексов между этими рецепторами [15, 16] представляет особый интерес. Во фронтальной коре активация 5-$НТ_{2А}$-протомера снижает аффинность 5-$НТ_{1А}$-рецептора к лиганду в гетеродимерах 5-$НТ_{1А}$–5-$НТ_{2А}$, что подчёркивает доминирующее положение 5-$НТ_{2А}$-рецепторов в подобных комплексах *in vivo* [15].

Растущее число свидетельств указывает на вовлечение 5-$НТ_{2А}$-рецепторов в патогенез ТРД. Недавний мета-анализ 42 исследований показал, что полиморфизмы 1438A/G и rs7997012G/A в гене *HTR2A* ассоциированы с ответом на антидепрессанты [17]. Ранее было показано, что плотность 5-$НТ_{2А}$-рецепторов ниже в дорсальной префронтальной коре пациентов с ТРД по сравнению со здоровыми субъектами и пациентами, не получавшими медикаментозного лечения [18]. С другой стороны, нейроны переднего мозга, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов, не отвечающих на СИОЗС, демонстрируют повышенную спайковую активность в ответ на обработку 5-НТ, поскольку отличаются избыточной экспрессией 5-$НТ_{2А}$-рецепторов [19]. Кетансерин (селективный антагонист 5-$НТ_{2А}$-рецепторов) эффективно нормализует 5-НТ-индуцированную электрическую активность нейронов пациентов с ТРД [19].

Неудивительно, что 5-$НТ_{2А}$-рецепторы рассматриваются в качестве важной мишени для фармакотерапии депрессивных расстройств. Частью механизма действия СИОЗС является связывание с 5-$НТ_{2А}$-рецепторами и их блокада [20, 21]. Селективные антагонисты 5-$НТ_{2А}$-рецепторов, такие как M100907, нефазодон и метерголин, демонстрируют антидепрессант-подобный эффект путём подавления обратного захвата 5-НТ и модуляции секреции других нейротрансмиттеров в префронтальной коре [22–24]. В ряде открытых и плацебо-контролируемых испытаний было показано, что антидепрессанты и антипсихотические препараты, которые обладают способностью блокировать 5-$НТ_{2А}$-рецепторы, усиливают клиническую эффективность СИОЗС у пациентов с ТРД [21, 24–28].

Для того чтобы преодолеть ограничения, накладываемые клиническими испытаниями, для изучения нейробиологической основы ТРД и проверки новых терапевтических стратегий следует активно прибегать к доклиническим моделям депрессивных расстройств. Недавно нами была создана рекомбинантная линия мышей B6.CBA-D13Mit76C (B6-M76C), полученная путём переноса дистального фрагмента хромосомы 13 (102,73–118,83 Мпн) из генома мышей CBA на генетический бэкграунд линии C57BL/6J [29, 30]. Полученная линия характеризуется изменённой чувствительностью 5-$НТ_{1А}$-рецепторов в ответ на хроническое введение агониста рецептора 8-OH-DPAT и большей транскрипцией гена *Htr1a* в гиппокампе [29]. Кроме того, мыши B6-M76C демонстрируют замедленный катаболизм 5-НТ в гиппокампе [29] и меньший объём стриатума, мозжечка и эпифиза [31]. Ранее нами было обнаружено, что хроническое введение СИОЗС флуоксетина вызывает у мышей B6-M76C продепрессивный эффект в тесте «принудительное плавание» (forced swim test) [30]. Эти результаты вместе с данными о нарушенной функциональной активности 5-$НТ_{1А}$-рецепторов в мозге мышей B6-M76C предполагают использование данных животных в качестве модели устойчивости к антидепрессантам [30].

Для проверки идеи о том, что блокада 5-$НТ_{2А}$-рецептора может улучшить неблагоприятное действие СИОЗС в модели ТРД,

мы исследовали влияние хронического введения классического СИОЗС флуоксетина, селективного 5-НТ$_{2A}$-антагониста кетансерина, одного или в комбинации с флуоксетином, на I) поведение в тестах «принудительное плавание», «открытое поле» и «тёмно-светлая камера»; II) обмен 5-НТ и активность ТПГ-2; и III) уровни мРНК генов *Htr1a*, *Htr2a*, *Tph2*, *Maoa* и *Slc6a4* в гиппокампе, фронтальной коре и среднем мозге мышей B6-M76C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и препараты. В эксперименте были использованы взрослые самцы мышей B6-M76C (возраст 10–12 недель, вес 23–26 г). Мыши содержались в стандартных лабораторных условиях при естественном режиме свет/темнота (16 ч света и 8 ч темноты) со свободным доступом к воде и еде. В течение 14 дней мышам вводили флуоксетин («Biokom», Россия), кетансерин («Sigma-Aldrich», США) или их комбинацию. Препараты были растворены в физиологическом растворе и вводились внутрибрюшинно (в.б.) в дозировке 20 мг/кг (флуоксетин; 9 мышей в группе), 0,5 мг/кг (кетансерин; 9 мышей в группе) или в комбинации 20 мг/кг флуоксетина + 0,5 мг/кг кетансерина (9 мышей в группе). Дозировка флуоксетина соответствует используемой в клинической практике и применялась нами в предыдущем исследовании [30]. Выбранная дозировка кетансерина, согласно литературным данным, достаточна для эффективной блокады 5-НТ$_{2A}$-рецепторов [32], но вместе с тем при длительном введении позволяет избежать потенциальной гипотензии, которая может возникнуть при более высоких дозировках [33]. Контрольная группа (7 животных) получала инъекции физиологического раствора. За день до тестирования поведения животные были изолированы в индивидуальных клетках для предотвращения группового эффекта. Во избежание острых эффектов от введения препаратов поведенческие тесты, а также оценка функциональной активности 5-НТ$_{1A}$- и 5-НТ$_{2A}$-рецепторов проводились, начиная со следующего дня после последней инъекции. Образцы мозга данных животных были использованы для проведения ВЭЖХ. Используя ту же дозировку, временной интервал и условия содержания (изоляция в индивидуальные клетки после последней инъекции, хэндлинг для имитации экспериментальных процедур), мы осуществили хроническое введение флуоксетина (10 мышей в группе), кетансерина (9 мышей в группе), их комбинации (8 мышей в группе) или физиологического раствора (9 мышей в группе) с целью получить образцы мозга для анализа мРНК.

Функциональная активность 5-НТ$_{1A}$-рецепторов. Функциональную активность определяли по выраженности гипотермического ответа на острое введение селективного агониста 5-НТ$_{1A}$-рецепторов 8-OH-DPAT [34–36]. 8-OH-DPAT («Sigma-Aldrich») был разведён в физиологическом растворе и введён в.б. в дозировке 1 мг/кг. Температуру тела измеряли до и через 20 мин после инъекции с помощью ректального датчика для мышей («Phymep», Франция), используя микрокомпьютер-термометр («Hanna Instruments», Сингапур). Степень выраженности гипотермического ответа выражали как разницу конечной и начальной температуры тела (Δ t, °C).

Функциональная активность 5-НТ$_{2A}$-рецепторов. Функциональную активность рецепторов определяли по завершении всех поведенческих тестов по числу встряхиваний головой (head twitches) в ответ на введение селективного 5-НТ$_{2A}$-агониста 25CN-NBOH [37, 38]. Препарат («Tocris Bioscience», Великобритания) был разведён в физиологическом растворе и введён в.б. в концентрации 1 мг/кг. Число встряхиваний головой подсчитывали в течение 20 мин, начиная через 5 мин после введения препарата.

Поведенческие тесты. Тест «открытое поле» (open field) проводили в открытой круглой арене (40 см в диаметре), окружённой стеной из белого пластика высотой 25 см и подсвеченной через матовый полупрозрачный пол двумя галогеновыми лампами 12 Вт каждая, расположенными в 40 см под дном арены [39]. Мышь помещали поблизости от стены арены, её перемещение регистрировалось в течение 5 мин цифровой камерой («Sony», Япония). После тестирования каждого животного арену тщательно отчищали. Видео анализировалось с помощью системы компьютерной регистрации EthoStudio [40]. Горизонтальная двигательная активность (общая пройденная дистанция), исследованная площадь и время в центре арены определялись автоматически.

Тест «тёмно-светлая камера» был выполнен с помощью пластиковой установки, описанной ранее [36]. Животное помещали в тёмный отсек установки головой по направлению к отверстию. Число переходов между тёмным и светлым отсеками и время нахождения в светлом отсеке оценивали в течение 5 мин с помощью программы EthoStudio. Установку тщательно отчищали после каждого теста.

В тесте «принудительное плавание» мышей помещали в стеклянный цилиндр (15 × 25 см), заполненный водой, температура которой была 25 °C. Подвижность животных оценивалась в течение 4 мин (после 2 мин адаптации) с помощью программы EthoStudio. Программа оценивала степень изменения силуэта животного, который определялся как изменение количества пикселей, связанных с животными, между двумя соседними кадрами [41].

Экстракция структур мозга. Мыши были декапитированы через 46–48 ч после тестирования поведения или через 5 дней после последней инъекции (в случае с забором материала для анализа мРНК). Мозг был извлечён в тот же день (12:00–14:00) на льду, целые средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора были выделены в соответствии с онлайн-атласом мышиного мозга (https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA_v3), заморожены в жидком азоте и хранились при температуре −80 °C до процедур подготовки образцов к ВЭЖХ или выделения РНК.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Суммарная РНК была выделена с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя, обработана свободной от РНК ДНКазой («Promega», США) и разведена до концентрации 0,125 мг/мкл в стерильной воде. 1 мкг суммарной РНК брали для синтеза кДНК, смешивая её со случайными гексануклеотидами [42, 43]. Число копий кДНК генов, кодирующих субъединицу А ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*), 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторов, МАОА, ТПГ-2 и 5-НТТ, было оценено методом количественной ПЦР на приборе LightCycler 480 («Roche Applied Science», Германия) с использованием селективных праймеров (табл. 1), интеркалирующего красителя SYBER Green I (мастермикс R-414, «Синтол», Россия) и геномной ДНК, полученной из печени самцов мышей C57BL/6, в качестве внешнего стандарта. Нами была использована серия разведений геномной ДНК с концентрацией 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 и 6400 копий на мкл. Негативный контроль ставили в тех же условиях, но без добавления образца. Экспрессию генов представляли как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям *Polr2a*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [42–44]. Анализ кривой плавления выполняли в конце каждого запуска для каждой пары праймеров, что позволило нам контролировать специфичность амплификации.

ВЭЖХ. Аликвота 50 мкл образца была смешана с 0,6 М $HClO_4$ («Sigma-Aldrich»), содержащей 200 нг/мл изопротеренола («Sigma-Aldrich») в качестве внутреннего стандарта. Гомогенат центрифугировали при 4 °C в течение 15 мин при 12 000 *g* до осаждения белка. Супернатанты разбавляли водой в 2 раза и фильтровали при помощи центрифужной пробирки с 0,22 мкм ацетатцеллюлозным фильтром («Spin-X», США). Осадок хранился при температуре −20 °C до определения концентрации белка по Брэдфорду. В петлю системы ВЭЖХ вносилось 20 мкл отфильтрованного супернатанта.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики использованных праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Длина продукта, п.н.
Tph2	F 5'-cattcctcgcacaattccagtcg-3' R 5'-cttgacatattcaactagacgctc-3'	61	239
Slc6a4	F 5'-cgctctactacctcatctcctcc-3' R 5'-gtcctgggcgaagtagttgg-3'	63	101
Maoa	F 5'-aatgaggatgttaaatgggtagatgttggt-3' R 5'-cttgacatattcaactagacgctc-3'	61	138
Htr1a	F 5'-ctgtgacctgtttatcgccctg-3' R 5'-gtagtctatagggtcggtgattgc-3'	62	200
Htr2a	F 5'-agaagccaccttgtgtgtga-3' R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'	61	169
Polr2a	F 5'-gttgtcgggcagcagaatgtag-3' R 5'-tcaatgagaccttctcgtcctcc-3'	61	188

Анализ уровней 5-НТ и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) был осуществлён с помощью ВЭЖХ-системы, содержащей в себе следующие компоненты: проточная ячейка из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм, GC sb; «Antec», Нидерланды), электрохимический детектор (700 мВ, DECADE IITM; «Antec»), блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20A, системный контроллер CBM-20A и дегазатор DGU-20A5R («Shimadzu Corporation», США). Хроматографическое разделение веществ производили изократическим элюированием на колонке C18 (размер частиц 5 мкм, L × ID 100 × 4,6 мм, Luna, «Phenomenex», США), защищённой предколонкой-картриджем C8 («Phenomenex») при скорости потока 1 мл/мин. Подвижная фаза представляла собой смесь из 50 мМ фосфатного буфера («Sigma-Aldrich»), метанола класса ВЭЖХ («Fisher Chemical», США) и 300 мкг/л натриевой соли октансульфоновой кислоты («Sigma-Aldrich»), pH 3,9. Температура колонки стабилизировалась при 40 °C. Концентрацию веществ выражали в нг/мг белка (определённого по методу Бредфорда).

Определение активности ТПГ-2. Активность ТПГ-2 была оценена в супернатанте гомогената среднего мозга. Из-за возможности деградации кофактора на свету реакцию проводили при слабом рассеянном освещении. Реакционная смесь общим объёмом 25 мкл содержала 0,05 М Tris-HCl буфера (pH 7,6), 0,001 М дитиотреитола («Sigma-Aldrich»), 15 мкл супернатанта, 0,3 мМ 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптеридина в качестве кофактора («Sigma-Aldrich»), 25 ед. каталазы («Sigma-Aldrich»), 0,5 мМ ингибитора декарбоксилазы m-гидроксибензилгидразина («Sigma-Aldrich») и 0,8 мМ L-триптофана («Sigma-Aldrich»). Смесь инкубировали в течение 15 мин при 37 °C. После этого реакция была остановлена путём добавления 75 мкл 0,6 М $HClO_4$. Первый контроль был без пробы, во втором реакцию после инкубирования останавливали $HClO_4$, после чего смесь повторно ставили в термостат. После инкубации образцы центрифугировали в течение 15 мин при 14 000 *g* и температуре 4 °C до осаждения белка. Супернатант был собран и разведён в два раза водой MilliQ. Концентрацию 5-гидрокситриптофана (5-НТР) оценили с помощью ВЭЖХ, используя 5, 10 и 15 пмоль 5-НТР в качестве соответствующего внешнего стандарта. За единицу активности ТПГ-2 принимали количество фермента, синтезирующего 1 пмоль 5-НТР за 1 мин на мг белка (определённого по методу Бредфорда).

Статистический анализ. Данные представлены как m ± SEM. Для идентификации и устранения экстремальных значений из выборки был использован Q-тест Диксона. После проверки распределения по Гауссу с помощью критерия нормальности Д'Агостино–Пирсона выборки сравнивались либо с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным сравнением по Фишеру, либо с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну (в случае ненормального распределения). Попарные сравнения проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведенческие тесты. Хотя основной эффект введения препаратов на мобильность в тесте «принудительное плавание» был слаб ($F_{3,29} = 2,37$; $p = 0,09$), согласно однофакторному ANOVA, попарное сравнение выявило значительно более низкую мобильность в группе, получавшей флуоксетин, по сравнению с контролем ($t = 2,17$; $p = 0,04$; рис. 1).

Все использованные препараты не оказали значимого эффекта на исследованную площадь

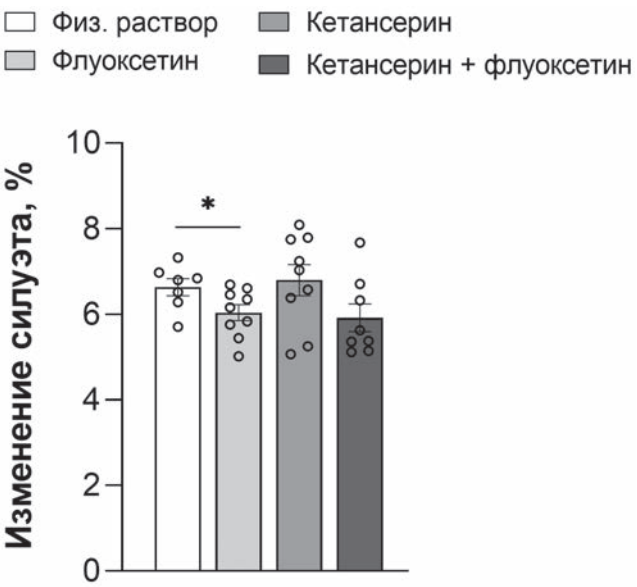

Рис. 1. Влияние хронического введения флуоксетина, кетансерина или их комбинации на мобильность (оцениваемую как скорость изменения силуэта животного) в тесте «принудительное плавание». Данные представлены как m ± SEM; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин». * $p < 0,05$ по сравнению с группой «физ. раствор» (*t*-критерий Стьюдента)

арены (H = 1,79; $p = 0,61$), пройденный путь ($F_{3,29} = 1,09$; $p = 0,36$), время в центре арены ($F_{3,29} = 0,38$; $p = 0,76$), число вертикальных стоек ($F_{3,29} = 0,22$; $p = 0,88$) и актов грумминга (H = 3,9; $p = 0,26$) в тесте «открытое поле» (табл. 2).

В тесте «тёмно-светлая камера» отсутствовал эффект введения препаратов на время, проведённое в тёмном ($F_{3,29} = 1,36$; $p = 0,27$) и светлом ($F_{3,29} = 1,36$; $p = 0,27$) отсеках, число переходов между отсеками ($F_{3,29} = 1,65$; $p = 0,18$) и число выглядываний из тёмного отсека (H = 1,79; $p = 0,61$) (табл. 3). Таким образом, хотя двигательная активность, тревожность и исследовательское поведение не были затронуты введением препаратов, флуоксетин усилил депрессивно-подобное поведение у мышей B6-M76C.

Функциональная активность рецепторов. Все использованные препараты значительно снизили гипотермический ответ на инъекцию агониста 5-HT_{1A}-рецептора 8-OH-DPAT ($F_{3,29} = 11,83$; $p < 0,001$), что говорит о десенситизации 5-HT_{1A}-рецепторов (рис. 2, *а*). Нами отмечен значительный эффект введения препаратов на число встряхиваний головой ($F_{3,28} = 3,95$; $p = 0,01$). Тем не менее апостериорное сравнение показало, что число встряхиваний головой было ниже только в группе «кетансерин + флуоксетин» по сравнению с контролем (тенденция $p = 0,07$) и группой «кетансерин» ($p = 0,02$) (рис. 2, *б*).

Обмен 5-НТ и активность ТПГ-2. Значительный эффект введения препаратов на обмен 5-НТ был обнаружен только в гиппокампе ($F_{3,29} = 5,87$; $p = 0,002$; рис. 3, *в*). В соответствии с апостериорным сравнением соотношение 5-ГИУК/5-НТ было выше в группах «флуоксетин» ($p = 0,002$) и «кетансерин + + флуоксетин» (сильная тенденция $p = 0,059$).

Таблица 2. Эффект хронического введения физиологического раствора, флуоксетина (20 мг/кг), кетансерина (0,5 мг/кг) или комбинации кетансерин + флуоксетин (0,5 и 20 мг/кг соответственно) на общую пройденную дистанцию, исследованную площадь, вертикальные стойки, акты грумминга и пребывание в центре арены в тесте «открытое поле»

Препарат	Общая дистанция (м)	Время в центре (%)	Исследованная площадь арены (%)	Вертикальные стойки (число)	Акты грумминга (число)
Физ. раствор	9,27 ± 1,29	13,91 ± 2,81	91,42 ± 4,69	7,29 ± 2,82	1,57 ± 0,53
Флуоксетин	10,35 ± 0,80	14,53 ± 2,37	95,76 ± 1,81	7,89 ± 1,36	1,00 ± 0,33
Кетансерин	10,82 ± 1,05	14,31 ± 2,16	96,87 ± 1,32	7,11 ± 1,16	1,89 ± 0,31
Кетансерин + + флуоксетин	12,50 ± 1,72	11,22 ± 2,66	94,86 ± 1,64	8,87 ± 1,41	1,37 ± 0,18

Примечание. Данные представлены как m ± SEM; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин» (однофакторный ANOVA и критерий Краскела–Уоллиса).

Таблица 3. Эффект хронического введения физиологического раствора, флуоксетина (20 мг/кг), кетансерина (0,5 мг/кг) или комбинации кетансерин + флуоксетин (0,5 и 20 мг/кг соответственно) на пройденный путь, время нахождения в светлом и тёмном отсеках, количество переходов между отсеками и число выглядываний из тёмного отсека в тесте «тёмно-светлая камера»

Препарат	Время в тёмном отсеке (%)	Время в светлом отсеке (%)	Переходы между отсеками (число)	Выглядывания из тёмного отсека (число)	Путь (м)
Физ. раствор	87,03 ± 3,19	12,97 ± 3,19	3,00 ± 0,65	1,28 ± 0,52	6,52 ± 0,61
Флуоксетин	77,80 ± 2,03	22,20 ± 2,03	4,66 ± 0,66	1,66 ± 0,28	6,50 ± 0,29
Кетансерин	80,59 ± 3,37	19,41 ± 3,37	4,33 ± 0,68	1,56 ± 0,63	6,95 ± 0,50
Кетансерин + + флуоксетин	84,41 ± 4,79	15,59 ± 4,79	2,62 ± 1,03	1,50 ± 0,46	6,12 ± 0,71

Примечание. Данные представлены как m ± SEM; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин» (однофакторный ANOVA и критерий Краскела–Уоллиса).

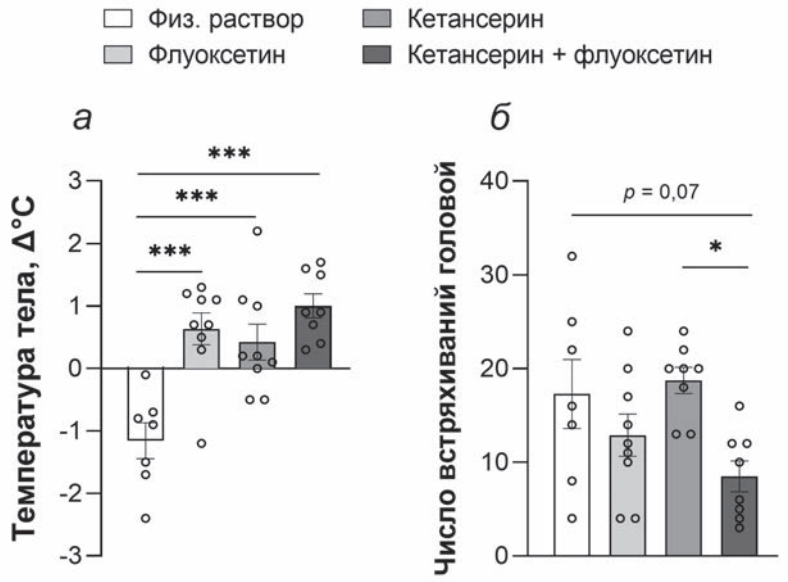

Рис. 2. Гипотермический ответ на острое введение агониста 5-HT$_{1A}$-рецепторов 8-OH-DPAT (1 мг/кг) (*а*) и количество встряхиваний головой, вызванных инъекцией агониста 5-HT$_{2A}$-рецепторов 25CN-NBOH (1 мг/кг) (*б*) у мышей B6-M76C, подвергавшихся хроническому введению флуоксетина, кетансерина или их комбинации. Данные представлены как m ± SEM; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин» (исключено одно экстремальное значение при анализе числа встряхиваний головой); $n = 8$ для группы «кетансерин + + флуоксетин». Тенденция: $p = 0,07$; ***$p < 0,001$ по сравнению с группой «физ. раствор»; *$p < 0,05$ по сравнению с группой «кетансерин» (однофакторный ANOVA)

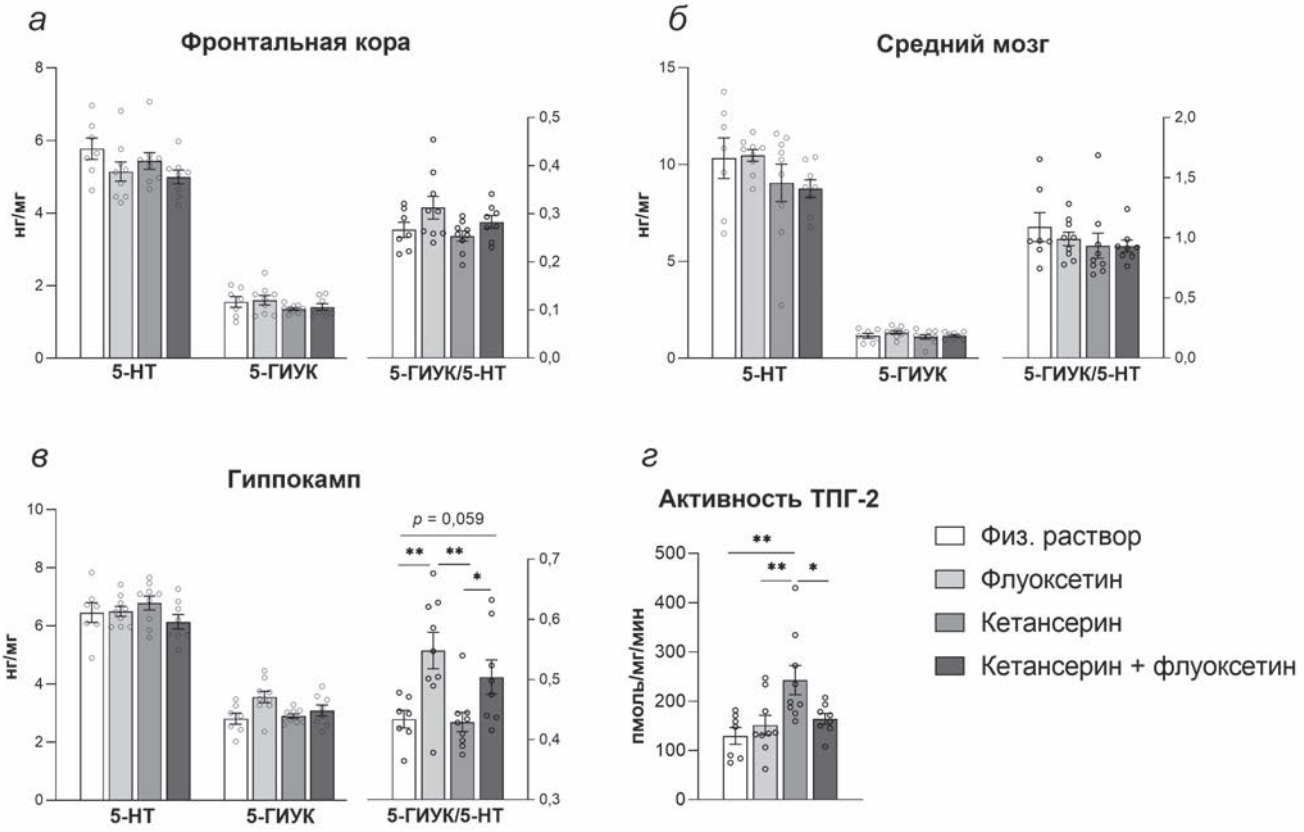

Рис. 3. Уровни 5-НТ, 5-ГИУК и соотношение 5-ГИУК/5-НТ во фронтальной коре (*а*), среднем мозге (*б*) и гиппокампе (*в*), а также активность ТПГ-2 (*г*) в среднем мозге мышей B6-M76C, получавших хронические инъекции флуоксетина, кетансерина или их комбинации. Уровни 5-НТ и 5-ГИУК представлены в нг/мг, активность ТПГ-2 выражена в пмоль/мг/мин. Данные представлены как m ± SEM; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин». Тенденция: $p = 0,059$; * $p < 0,05$ по сравнению с группой «кетансерин»; ** $p < 0,01$ по сравнению с группами «физ. раствор» или «кетансерин» (однофакторный ANOVA)

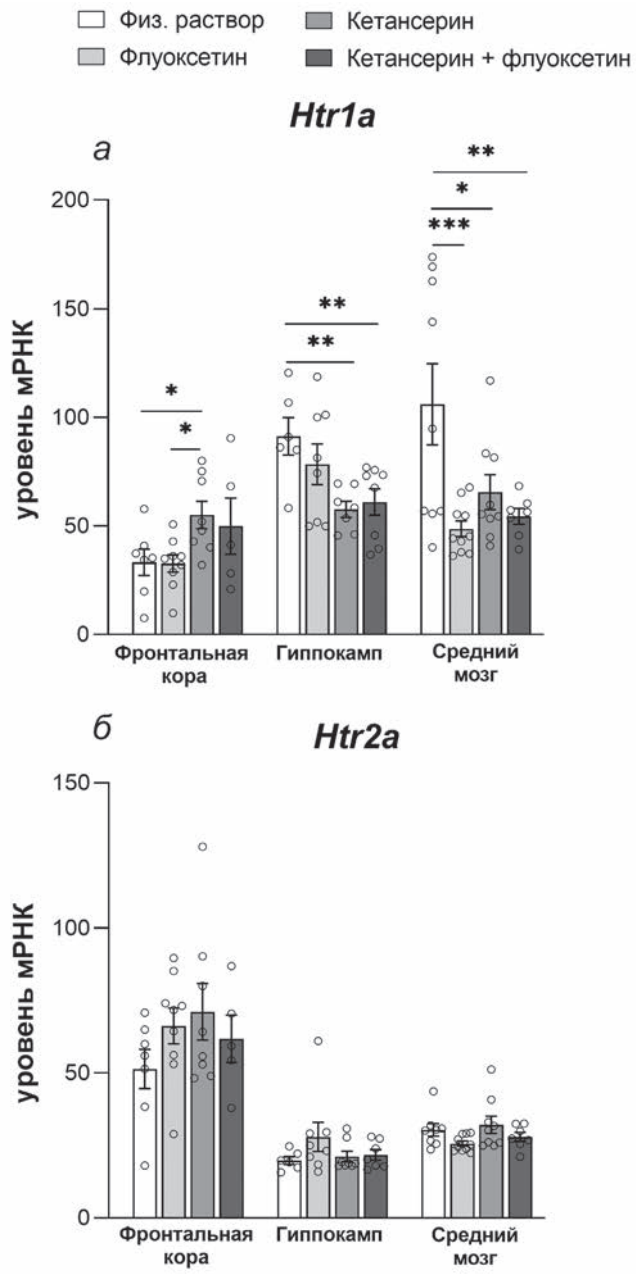

Рис. 4. Уровни мРНК *Htr1a* (*а*) и *Htr2a* (*б*) во фронтальной коре, гиппокампе и среднем мозге мышей B6-M76C, получавших хронические инъекции флуоксетина, кетансерина или их комбинации. Экспрессия представлена как число копий кДНК искомого гена, отнесённое на 100 копий кДНК *Polr2a*. Данные представлены как m ± SEM; во фронтальной коре $n = 7$ для группы «физ. раствор», $n = 9$ для группы «флуоксетин», $n = 8$ для группы «кетансерин», $n = 5$ для группы «кетансерин + флуоксетин»; в гиппокампе $n = 6$ для группы «физ. раствор», $n = 8$ для группы «флуоксетин», $n = 8$ для группы «кетансерин» (исключено одно экстремальное значение в выборке *Htr1a*), $n = 7$ для группы «кетансерин + флуоксетин»; в среднем мозге n = 9 для группы «физ. раствор» (исключено одно экстремальное значение в выборке *Htr2a*), $n = 10$ для группы «флуоксетин», n = 9 для группы «кетансерин», $n = 7$ для группы «кетансерин + флуоксетин». * $p < 0,01$ по сравнению с группами «физ. раствор» или «кетансерин»; ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «физ. раствор» (однофакторный ANOVA)

Хотя в среднем мозге не выявлено значительных изменений в продукции и катаболизме 5-НТ, нами отмечен значительный эффект, оказанный препаратами на активность ключевого фермента синтеза 5-НТ в мозге – ТПГ-2 ($F_{3,29} = 5,407$; $p = 0,004$). Апостериорное сравнение показало, что активность ТПГ-2 была значительно выше в группе «кетансерин», чем в группах «физ. раствор» ($p = 0,001$), «флуоксетин» ($p = 0,003$) или «кетансерин + флуоксетин» ($p = 0,013$; рис. 3, *г*).

Уровни мРНК. Значительное воздействие препаратов на уровень мРНК гена *Htr1a* было обнаружено во фронтальной коре ($F_{3,25} = 3,04$; $p = 0,047$), гиппокампе ($F_{3,25} = 4,16$; $p = 0,016$) и среднем мозге ($F_{3,31} = 5,92$; $p = 0,002$; рис. 4, *а*). В среднем мозге все использованные препараты снизили уровень мРНК *Htr1a* ($p < 0,001$, $p = 0,011$ и $p < 0,003$ для флуоксетина, кетансерина и комбинации кетансерин + флуоксетин соответственно). В гиппокампе снижение уровня мРНК *Htr1a* было обнаружено только в группе «кетансерин» ($p = 0,005$) или «кетансерин + флуоксетин» ($p = 0,009$). С другой стороны, введение кетансерина привело к повышению уровня мРНК *Htr1a* во фронтальной коре ($p = 0,028$ по сравнению с группой «физ. раствор» и $p = 0,017$ по сравнению с группой «флуоксетин»). Нами не обнаружено какого-либо значимого эффекта введения препаратов на уровни мРНК гена *Htr2a* во всех исследованных структурах мозга ($F_{3,25} = 1,15$; $p = 0,34$; $F_{3,25} = 1,05$, $p = 0,38$ и $F_{3,29} = 2,28$; $p = 0,1$ для фронтальной коры, гиппокампа и среднего мозга соответственно; рис. 4, *б*).

В среднем мозге введение всех использованных препаратов повлияло на уровни мРНК генов *Slc6a4* и *Maoa* ($F_{3,30} = 5,29$; $p = 0,004$ и $F_{3,30} = 6,51$; $p = 0,001$ соответственно). Апостериорное сравнение показало, что введение всех препаратов снизило уровни мРНК *Slc6a4* ($p = 0,001$, $p = 0,003$ и $p = 0,008$ для групп «флуоксетин», «кетансерин» и «кетансерин + флуоксетин» соответственно; рис. 5, *б*). Сходным образом уровень мРНК *Maoa* был снижен при хроническом введении флуоксетина ($p < 0,001$), кетансерина ($p = 0,016$) или комбинации кетансерин + флуоксетин ($p = 0,008$; рис. 5, *в*). Не выявлено какого-либо значительного эффекта, оказанного на уровень мРНК гена *Tph2* ($F_{3,31} = 1,49$; $p = 0,23$; рис. 5, *а*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы продемонстрировали, что хроническое введение флуоксетина сни-

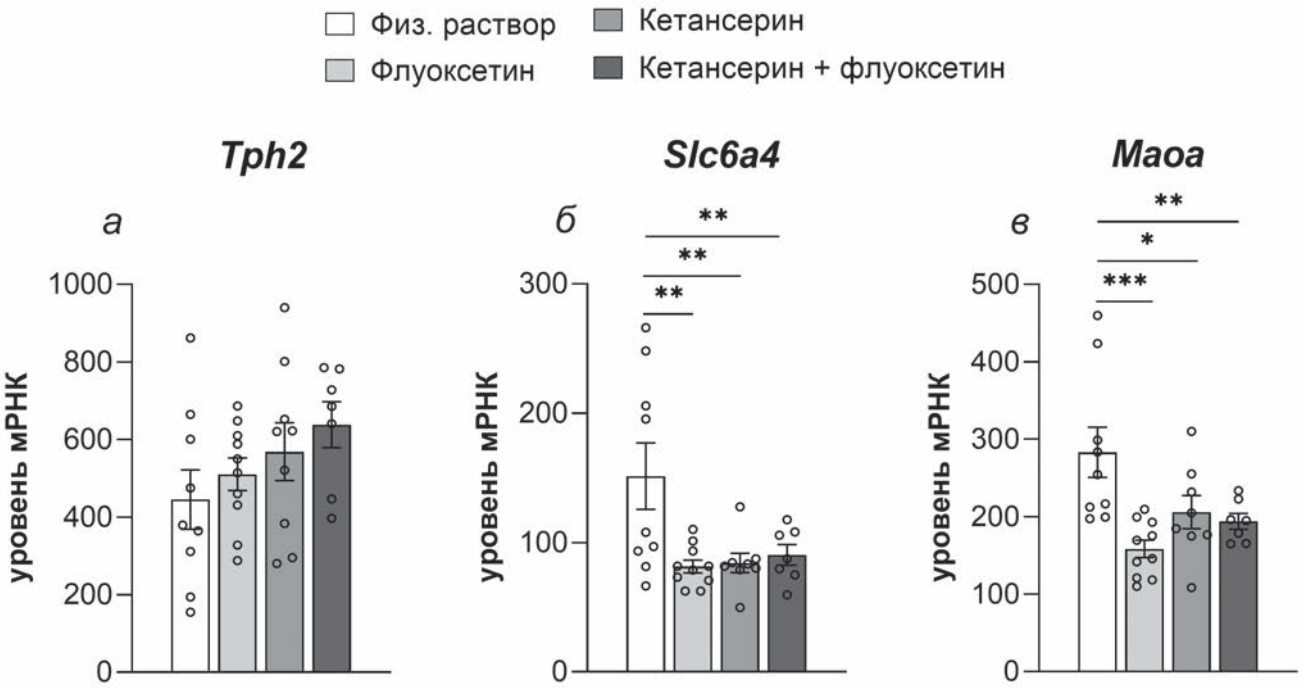

Рис. 5. Уровни мРНК генов *Tph2* (*а*), *Slc6a4* (*б*) и *Maoa* (*в*) в среднем мозге мышей B6-M76C, получавших хронические инъекции флуоксетина, кетансерина и их комбинации. Экспрессия представлена как число копий кДНК искомого гена, отнесённое на 100 копий кДНК *Polr2a*. Данные представлены как m ± SEM; n = 9 для группы «физ. раствор»; n = 10 для группы «флуоксетин»; n = 9 для группы «кетансерин» (исключено по одному экстремальному значению в выборках *Slc6a4* и *Maoa*); n = 7 для группы «кетансерин + флуоксетин». * $p < 0{,}01$, ** $p < 0{,}01$ и *** $p < 0{,}001$ по сравнению с группой «физ. раствор» (однофакторный ANOVA)

жает мобильность в тесте «принудительное плавание», указывая на про-депрессивный эффект у мышей B6-M76C, что, в свою очередь, указывает на устойчивость мышей B6-M76C к действию СИОЗС и согласуется с нашими предыдущими наблюдениями [30]. Напротив, антидепрессантный эффект не был обнаружен у мышей, получавших кетансерин. В литературе имеется достаточно данных, свидетельствующих об антидепрессивных свойствах антагонистов 5-НТ$_{2A}$-рецепторов [27, 45–47]. Конкретно для кетансерина антидепрессантный эффект обнаруживался как при остром [48], так и при хроническом введении [49, 50] в различных моделях депрессивно-подобного поведения. Однако антидепрессантный эффект в ответ на введение кетансерина не был обнаружен у мышей B6-M76C. Логично предположить, что наблюдаемое отсутствие антидепрессантного эффекта кетансерина, как и про-депрессивный эффект флуоксетина, могут быть объяснены аномальной активностью 5-НТ$_{1A}$-рецепторов у мышей B6-M76C [29, 30].

Нами обнаружено, что функциональная активность 5-НТ$_{1A}$-рецепторов одинаково снижалась после хронического введения флуоксетина, кетансерина или комбинации этих препаратов. Тем не менее в основе этого феномена могут лежать разные механизмы. Снижение активности 5-НТ$_{1A}$-рецепторов после хронического введения СИОЗС флуоксетина, вероятно, вызвано повышением концентрации 5-НТ в синаптической щели, который, действуя на рецепторы длительное время, индуцировал их десенситизацию. В основе эффекта кетансерина может лежать антагонизм 5-НТ$_{1A}$- и 5-НТ$_{2A}$-рецепторов. К примеру, ранее мы уже сообщали о значительном снижении гипотермического ответа у мышей после острого введения кетансерина [14]. 5-НТ$_{1A}$/5-НТ$_{2A}$-антагонизм может быть следствием физического взаимодействия между данными рецепторами [15]. Так, в гетерорецепторных комплексах активация 5-НТ$_{2A}$-рецептора значительно снижает связывание 5-НТ$_{1A}$-рецептора с лигандом в гиппокампе и фронтальной коре, в то время как блокада 5-НТ$_{2A}$-рецептора кетансерином восстанавливает их связывание [15]. Более того, нами выявлено существенное снижение уровня мРНК гена *Htr1a* в среднем мозге и гиппокампе, что указывает на подлинную даун-регуляцию 5-НТ$_{1A}$-рецепторов.

Было выявлено значительное снижение функциональной активности 5-НТ$_{2A}$-рецептора в ответ на хроническое введение флуоксетина в комбинации с кетансерином. Напротив, хроническое введение одного кетансерина не привело к изменениям функциональной

активности 5-НТ$_{2A}$-рецепторов, что противоречит литературным данным, сообщающим о снижении плотности 5-НТ$_{2A}$-рецепторов в ответ на хроническое введение антагонистов [9, 51]. Также нами не обнаружено признаков снижения уровня мРНК гена *Htr2a* ни в одной из исследованных структур, что не позволяет предполагать даун-регуляцию 5-НТ$_{2A}$-рецепторов. Следует отметить, что связывание 5-НТ$_{2A}$-рецептора с антагонистом не обязательно способствует интернализации рецептора, а может приводить лишь к его диссоциации с G-белком [9]. Мы также не можем исключить, что использованная дозировка кетансерина (0,5 мг/кг) была недостаточной для десенситизации 5-НТ$_{2A}$-рецепторов. Например, значительная десенситизация рецептора с последующей даун-регуляцией при хроническом введении кетансерина была показана при использовании препарата в концентрации 10 мг/кг [51]. Когда кетансерин вводился вместе с флуоксетином, функциональная активность 5-НТ$_{2A}$-рецепторов, вероятно, снижалась из-за аддитивного эффекта блокады рецепторов антагонистом и одновременной десенситизации из-за повышения количества 5-НТ в синаптической щели. Это предположение соотносится со множеством данных, указывающих на снижение плотности 5-НТ$_{2A}$-рецепторов при хроническом введении СИОЗС [9, 52].

Повышение соотношения 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе мышей, подвергнутых хроническому введению флуоксетина или комбинации флуоксетина и кетансерина, указывает на усиление обмена 5-НТ. В наших прежних работах отмечалось, что гиппокамп – одна из немногих структур мозга, в которых у мышей B6-M76C снижен катаболизм 5-НТ [29, 30]. Локальное усиление катаболизма 5-НТ в гиппокампе, обнаруженное в настоящем исследовании, может быть связано с даун-регуляцией постсинаптических 5-НТ$_{1A}$-рецепторов, о чём можно судить по значительному снижению уровня мРНК. Этот результат хорошо согласуется с ранее высказанным предположением о том, что у мышей B6-M76C постсинаптические 5-НТ$_{1A}$-рецепторы подвергаются более эффективной десенситизации [29]. Кроме того, в ряде работ указывается, что ингибирование не только пре-, но и постсинаптических 5-НТ$_{1A}$-рецепторов приводит к усилению секреции 5-НТ, что является следствием дезингибирования 5-НТ нейронов [7, 53].

В нашем исследовании изменения в метаболизме 5-НТ сопровождались значительным снижением уровня мРНК генов, кодирующих МАОА (фермент, разрушающий 5-НТ до его основного метаболита, 5-ГИУК) и транспортёр 5-НТ (5-НТТ) в среднем мозге мышей всех экспериментальных групп. Хорошо известно, что через две недели введения флуоксетина экспрессия 5-НТТ в среднем мозге существенно снижается [54, 55], поскольку 5-НТТ является основной мишенью для СИОЗС. Снижение уровня мРНК гена *Maoa* в мозге в ответ на введение флуоксетина ранее было показано только в контексте пренатального введения СИОЗС [56]. В литературе отсутствуют упоминания о влиянии антагонистов 5-НТ$_{2A}$-рецептора (включая кетансерин) на экспрессию 5-НТТ и МАОА в мозге. Таким образом, нами впервые показано, что хроническое введение кетансерина, одного или в комбинации с флуоксетином, снижает уровни мРНК генов *Slc6a4* и *Maoa* в среднем мозге мышей.

Кроме того, отмеченное нами повышение активности ТПГ-2 (ключевого фермента биосинтеза 5-НТ в мозге) у мышей, получавших хронические инъекции кетансерина, согласуется с литературными данными, предполагающими, что введение антагонистов 5-НТ$_{2A}$-рецептора (MDL 100907 либо ритансерина) оказывает влияние, противоположное ингибированию 5-НТ нейронов, и восстанавливает их проводящую активность [57, 58]. Известно, что 5-НТ$_{2A}$-рецепторы локализованы на ГАМК-интернейронах в ядрах дорсального шва и обуславливают локальную ингибирующую петлю отрицательной обратной связи [59]. Длительная блокада 5-НТ$_{2A}$-рецепторов у мышей B6-M76C могла привести к дезингибированию 5-НТ нейронов. Возможно, данный эффект был достаточен для значительного усиления продукции и/или секреции нейротрансмиттера в гиппокамп. Ранее мы сообщали, что десенситизация 5-НТ$_{2A}$-рецептора не только усиливает активность ТПГ-2, но также вызывает значительное увеличение концентрации 5-НТ в среднем мозге [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные показывают, что хроническое введение кетансерина (как по отдельности, так и в комбинации с флуоксетином) даёт некоторые преимущества мышам линии B6-M76C: I) повышает активность ТПГ-2 и обмен 5-НТ в гиппокампе, и II) снижает функциональную активность 5-НТ$_{1A}$-рецептора и уровни мРНК *Htr1a*, *Slc6a4* и *Maoa*. Эти результаты согласуются с благотворными эффектами блокады 5-НТ$_{2A}$-рецепторов при

лечении депрессивных расстройств. В то же время наши данные показывают, что у животных линии B6-M76C с нарушенной чувствительностью 5-HT_{1A}-рецепторов длительная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов селективным антагонистом не позволяет достичь антидепрессантного эффекта ни при монотерапии, ни в комбинации с флуоксетином. Полученные данные позволяют предполагать, что нарушение экспрессии и/или чувствительности 5-HT_{1A}-рецепторов является важным фактором, который может не только значительно ухудшать терапевтический ответ при ТРД, но и создавать препятствия для любых попыток его коррекции.

Вклад авторов. Е.М. Кондаурова – концепция, проведение экспериментов, анализ результатов; Е.А. Заливина, В.О. Благиня – проведение экспериментов; А.С. Цыбко – написание текста; В.С. Науменко – редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011).

Благодарности. Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023. Разведение животных линии B6-M76C было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных, восьмое издание, комиссия по обновлению Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных; Национальный Совет Исследователей, 2020, Национальная Академия Наук (США)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (заключение № 34 от 15 июня 2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Papp, M., Cubala, W. J., Swiecicki, L., Newman-Tancredi, A., and Willner, P. (2022) Perspectives for therapy of treatment-resistant depression, *Br. J. Pharmacol.*, **179**, 4181-4200, doi: 10.1111/bph.15596.
2. Kulikov, A. V., Gainetdinov, R. R., Ponimaskin, E., Kalueff, A. V., Naumenko, V. S., and Popova, N. K. (2018) Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **22**, 319-330, doi: 10.1080/14728222.2018.1452912.
3. Vahid-Ansari, F., Zhang, M., Zahrai, A., and Albert, P. R. (2019) Overcoming resistance to selective serotonin reuptake inhibitors: targeting serotonin, serotonin-1A receptors and adult neuroplasticity, *Front. Neurosci.*, **13**, 404, doi: 10.3389/fnins.2019.00404.
4. Popova, N. K., Tsybko, A. S., and Naumenko, V. S. (2022) The implication of 5-HT receptor family members in aggression, depression and suicide: similarity and difference, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8814, doi: 10.3390/ijms23158814.
5. Alex, K. D., and Pehek, E. A. (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission, *Pharmacol. Ther.*, **113**, 296-320, doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.004.
6. Wyskiel, D. R., and Andrade, R. (2016) Serotonin excites hippocampal CA1 GABAergic interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum moleculare border, *Hippocampus*, **26**, 1107-1114, doi: 10.1002/hipo.22611.
7. Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., and Quérée, P. (2007) Important messages in the "post": recent discoveries in 5-HT neurone feedback control, *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**, 629-636, doi: 10.1016/j.tips.2007.10.009.
8. Berg, K. A., Harvey, J. A., Spampinato, U., and Clarke, W. P. (2008) Physiological and therapeutic relevance of constitutive activity of 5-HT 2A and 5-HT 2C receptors for the treatment of depression, *Prog. Brain Res.*, **172**, 287-305, doi: 10.1016/S0079-6123(08)00914-X.
9. Van Oekelen, D., Luyten, W. H. M. L., and Leysen, J. E. (2003) 5-HT2A and 5-HT2C receptors and their atypical regulation properties, *Life Sci.*, **72**, 2429-2449, doi: 10.1016/s0024-3205(03)00141-3.
10. Aloyo, V. J., Berg, K. A., Spampinato, U., Clarke, W. P., and Harvey, J. A. (2009) Current status of inverse agonism at serotonin$_{2A}$ (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors, *Pharmacol. Ther.*, **121**, 160-173, doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.10.010.
11. Moutkine, I., Quentin, E., Guiard, B. P., Maroteaux, L., and Doly, S. (2017) Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers, *J. Biol. Chem.*, **292**, 6352-6368, doi: 10.1074/jbc.M117.779041.

12. Lukasiewicz, S., Polit, A., Kędracka-Krok, S., Wędzony, K., Maćkowiak, M., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010) Hetero-dimerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D(2) receptors, *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 1347-1358, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.08.010.
13. Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuéllar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L. F., Neve, R. L., Milligan, G., Sealfon, S. C., López-Giménez, J. F., Meana, J. J., Benson, D. L., and González-Maeso, J. (2012) Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT2A·mGlu2) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function, *J. Biol. Chem.*, **287**, 44301-44319, doi: 10.1074/jbc.M112.413161.
14. Naumenko, V. S., Bazovkina, D. V., and Kondaurova, E. M. (2015) On the functional cross-talk between brain 5-HT1A and 5-HT2A receptors [in Russian], *Zhurn. Vyssh. Nerv. Deyat. Im I. P. Pavlova*, **65**, 240-247.
15. Borroto-Escuela, D. O., Li, X., Tarakanov, A. O., Savelli, D., Narváez, M., Shumilov, K., Andrade-Talavera, Y., Jimenez-Beristain, A., Pomierny, B., Díaz-Cabiale, Z., Cuppini, R., Ambrogini, P., Lindskog, M., and Fuxe, K. (2017) Existence of brain 5-HT1A-5-HT2A isoreceptor complexes with antagonistic allosteric receptor-receptor interactions regulating 5-HT1A receptor recognition, *ACS Omega*, **2**, 4779-4789, doi: 10.1021/acsomega.7b00629.
16. Szlachta, M., Kuśmider, M., Pabian, P., Solich, J., Kolasa, M., Żurawek, D., Dziedzicka-Wasylewska, M., and Faron-Górecka, A. (2018) Repeated clozapine increases the level of serotonin 5-HT_{1A}R heterodimerization with 5-HT_{2A} or dopamine D(2) receptors in the mouse cortex, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 40, doi: 10.3389/fnmol.2018.00040.
17. Wan, Y.-S., Zhai, X.-J., Tan, H.-A., Ai, Y. S., and Zhao, L. B. (2021) Associations between the 1438A/G, 102T/C, and rs7997012G/A polymorphisms of HTR_{2A} and the safety and efficacy of antidepressants in depression: a meta-analysis, *Pharmacogenomics J.*, **21**, 200-215, doi: 10.1038/s41397-020-00197-2.
18. Baeken, C., De Raedt, R., and Bossuyt, A. (2012) Is treatment-resistance in unipolar melancholic depression characterized by decreased serotonin$_{2A}$ receptors in the dorsal prefrontal – anterior cingulate cortex? *Neuropharmacology*, **62**, 340-346, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.043.
19. Vadodaria, K. C., Ji, Y., Skime, M., Paquola, A., Nelson, T., Hall-Flavin, D., Fredlender, C., Heard, K. J., Deng, Y., Le, A. T., Dave, S., Fung, L., Li, X., Marchetto, M. C., Weinshilboum, R., and Gage, F. H. (2019) Serotonin-induced hyperactivity in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons, *Mol. Psychiatry*, **24**, 795-807, doi: 10.1038/s41380-019-0363-y.
20. Leysen, J. E. (2004) 5-HT2 receptors, *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, **3**, 11-26, doi: 10.2174/1568007043482598.
21. Celada, P., Puig, M., Amargós-Bosch, M., Adell, A., and Artigas, F. (2004) The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression, *J. Psychiatry Neurosci.*, **29**, 252-265.
22. Marek, G. J., Martin-Ruiz, R., Abo, A., and Artigas, F. (2005) The selective 5-HT2A receptor antagonist M100907 enhances antidepressant-like behavioral effects of the SSRI fluoxetine, *Neuropsychopharmacology*, **30**, 2205-2215, doi: 10.1038/sj.npp.1300762.
23. Pehek, E. A., Nocjar, C., Roth, B. L., Byrd, T. A., and Mabrouk, O. S. (2006) Evidence for the preferential involvement of 5-HT2A serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex, *Neuropsychopharmacology*, **31**, 265-277, doi: 10.1038/sj.npp.1300819.
24. Mestre, T. A., Zurowski, M., and Fox, S. H. (2013) 5-Hydroxytryptamine$_{2A}$ receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **22**, 411-421, doi: 10.1517/13543784.2013.769957.
25. McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Woldeyohannes, H. O., Alsuwaidan, M., and Konarski, J. Z. (2007) A preclinical and clinical rationale for quetiapine in mood syndromes, *Expert Opin. Pharmacother.*, **8**, 1211-1219, doi: 10.1517/14656566.8.9.1211.
26. Sanford, M., and Keating, G. M. (2012) Quetiapine: a review of its use in the management of bipolar depression, *CNS Drugs*, **26**, 435-460, doi: 10.2165/11203840-000000000-00000.
27. Wright, B. M., Eiland, E. H. 3rd, and Lorenz, R. (2013) Augmentation with atypical antipsychotics for depression: a review of evidence-based support from the medical literature, *Pharmacotherapy*, **33**, 344-359, doi: 10.1002/phar.1204.
28. Miranda, A. S., de Moreira, F. A., and Teixeira, A. L. (2017) The preclinical discovery and development of quetiapine for the treatment of mania and depression, *Expert Opin. Drug Discov.*, **12**, 525-535, doi: 10.1080/17460441.2017.1304378.
29. Kulikova, E. A., Bazovkina, D. V., Akulov, A. E., Tsybko, A. S., Fursenko, D. V., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Ponimaskin, E., and Kondaurova, E. M. (2016) Alterations in pharmacological and behavioural responses in recombinant mouse line with an increased predisposition to catalepsy: role of the 5-HT_{1A} receptor, *Br. J. Pharmacol.*, **13**, 2147-2161, doi: 10.1111/bph.13484.
30. Kondaurova, E. M., Rodnyy, A. Y., Ilchibaeva, T. V., Tsybko, A. S., Eremin, D. V., Antonov, Y. V., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2020) Genetic background underlying 5-HT_{1A} receptor functioning affects the response to fluoxetine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, doi: 10.3390/ijms21228784.

31. Kulikova, E. A., Bazovkina, D. V., Antonov, Y. V., Akulov, A. E., Kulikov, A. V., and Kondaurova, E. M. (2017) Alteration of the brain morphology and the response to the acute stress in the recombinant mouse lines with different predisposition to catalepsy, *Neurosci. Res.*, **117**, 14-21, doi: 10.1016/j.neures.2016.11.009.
32. Hervig, M. E.-S., Jensen, N. C. H., Rasmussen, N. B., Rydbirk, R., Olesen, M. V., Hay-Schmidt, A., Pakkenberg, B., and Aznar, S. (2017) Involvement of serotonin 2A receptor activation in modulating medial prefrontal cortex and amygdala neuronal activation during novelty-exposure, *Behav. Brain Res.*, **326**, 1-12, doi: 10.1016/j.bbr.2017.02.050.
33. Balasubramaniam, G., Lee, H. S., and Mah, S. C. (1993) Differences in the acute and chronic antihypertensive mechanism of action of ketanserin in spontaneously hypertensive rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 129-134.
34. Hjorth, S. (1985) Hypothermia in the rat induced by the potent serotoninergic agent 8-OH-DPAT, *J. Neural Transm.*, **61**, 131-135, doi: 10.1007/BF01253058.
35. O'Connell, M. T., and Curzon, G. (1996) A comparison of the effects of 8-OH-DPAT pretreatment of different behavioural responses to 8-OH-DPAT, *Eur. J. Pharmacol.*, **312**, 137-143, doi: 10.1016/0014-2999(96)00496-7.
36. Popova, N. K., Naumenko, V. S., Cybko, A. S., and Bazovkina, D. V. (2010) Receptor-genes cross-talk: effect of chronic 5-HT$_{1A}$ agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin treatment on the expression of key genes in brain serotonin system and on behavior, *Neuroscience*, **169**, 229-235, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.044.
37. Buchborn, T., Lyons, T., and Knöpfel, T. (2018) Tolerance and tachyphylaxis to head twitches induced by the 5-HT$_{2A}$ agonist 25CN-NBOH in mice, *Front. Pharmacol.*, **9**, 17, doi: 10.3389/fphar.2018.00017.
38. Tsybko, A. S., Ilchibaeva, T. V., Filimonova, E. A., Eremin, D. V., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2020) The chronic treatment with 5-HT$_{2A}$ receptor agonists affects the behavior and the BDNF system in mice, *Neurochem. Res.*, **12**, 3059-3075, doi: 10.1007/s11064-020-03153-5.
39. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., and Kulikov, V. A. (2008) Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 345-351, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
40. Khotskin, N. V., Plyusnina, A. V., Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., Sorokin, I. E., Kolotygin, I., Mormede, P., Terenina, E. E., Shevelev, O. B., and Kulikov, A. V. (2019) On association of the lethal yellow (A(Y)) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior, *Behav. Brain Res.*, **359**, 446-456, doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.013.
41. Kulikov, A. V., Morozova, M. V., Kulikov, V. A., Kirichuk, V. S., and Popova, N. K. (2010) Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test, *J. Neurosci. Methods*, **191**, 26-31, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.002.
42. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and Popova, N. K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT$_{1A}$ and 5-HT$_{2A}$ serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 97-101, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.06.005.
43. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT$_{1A}$ serotonin receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **40**, 30-36, doi: 10.1134/S0026893306010067.
44. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
45. Carr, G. V., and Lucki, I. (2011) The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies, *Psychopharmacology*, **213**, 265-287, doi: 10.1007/s00213-010-2097-z.
46. Muguruza, C., Miranda-Azpiazu, P., Díez-Alarcia, R., Morentin, B., González-Maeso, J., Callado, L. F., and Meana, J. J. (2014) Evaluation of 5-HT$_{2A}$ and mGlu2/3 receptors in postmortem prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder: effect of antidepressant treatment, *Neuropharmacology*, **86**, 311-318, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.009.
47. Guiard, B. P., and Di Giovanni, G. (2015) Central serotonin$_{2A}$ (5-HT$_{2A}$) receptor dysfunction in depression and epilepsy: the missing link? *Front. Pharmacol.*, **6**, 46, doi: 10.3389/fphar.2015.00046.
48. Rajkumar, R., Pandey, D. K., Mahesh, R., and Radha, R. (2009) 1-(m-Chlorophenyl)piperazine induces depressogenic-like behaviour in rodents by stimulating the neuronal 5-HT$_{2A}$ receptors: proposal of a modified rodent antidepressant assay, *Eur. J. Pharmacol.*, **608**, 32-41, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.02.041.
49. Pilar-Cuéllar, F., Vidal, R., and Pazos, A. (2012) Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, β-catenin and antidepressant-like effects, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 1046-1057, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01516.x.
50. Pandey, D. K., Bhatt, S., Jindal, A., and Gautam, B. (2014) Effect of combination of ketanserin and escitalopram on behavioral anomalies after olfactory bulbectomy: prediction of quick onset of antidepressant action, *Indian J. Pharmacol.*, **46**, 639-643, doi: 10.4103/0253-7613.144935.
51. Yadav, P. N., Kroeze, W. K., Farrell, M. S., and Roth, B. L. (2011) Antagonist functional selectivity: 5-HT$_{2A}$ serotonin receptor antagonists differentially regulate 5-HT$_{2A}$ receptor protein level *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**, 99-105, doi: 10.1124/jpet.111.183780.

52. Yamauchi, M., Miyara, T., Matsushima, T., and Imanishi, T. (2006) Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors, *Brain Res.*, **1067**, 164-169, doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.075.
53. Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2013) 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system, *Rev. Neurosci.*, **24**, 191-204, doi: 10.1515/revneuro-2012-0082.
54. Dygalo, N. N., Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., Yudina, A. M., and Ovchinnikova, E. S. (2006) Effect of repeated treatment with fluoxetine on tryptophan hydroxylase-2 gene expression in the rat brainstem, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **85**, 220-227, doi: 10.1016/j.pbb.2006.08.004.
55. Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., and Dygalo, N. N. (2007) Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect, *Neuroscience*, **150**, 404-412, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.017.
56. Bond, C. M., Johnson, J. C., Chaudhary, V., McCarthy, E. M., McWhorter, M. L., and Woehrle, N. S. (2020) Perinatal fluoxetine exposure results in social deficits and reduced monoamine oxidase gene expression in mice, *Brain Res.*, **1727**, 146282, doi: 10.1016/j.brainres.2019.06.001.
57. Martín-Ruiz, R., Puig, M. V., Celada, P., Shapiro, D. A., Roth, B. L., Mengod, G., and Artigas, F. (2001) Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism, *J. Neurosci.*, **21**, 9856-9866, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-24-09856.2001.
58. Boothman, L. J., Allers, K. A., Rasmussen, K., and Sharp, T. (2003) Evidence that central 5-HT_{2A} and 5-HT2B/C receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat, *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 998-1004, doi: 10.1038/sj.bjp.0705328.
59. Liu, R., Jolas, T., and Aghajanian, G. (2000) Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus, *Brain Res*, **873**, 34-45, doi: 10.1016/s0006-8993(00)02468-9.
60. Naumenko, V. S., Tsybko, A. S., Bazovkina, D. V., and Popova, N. K. (2012) Involvement of 5-HT_{2A} receptors in genetic mechanisms of autoregulation of brain 5-HT system, *Mol. Biol.*, **46**, 416-422, doi: 10.1134/S0026893312020100.

EFFECTS OF CHRONIC COMBINED TREATMENT WITH KETANSERIN AND FLUOXETINE IN B6.CBA-D13Mit76C RECOMBINANT MICE WITH ABNORMAL 5-HT_{1A} RECEPTOR FUNCTIONAL ACTIVITY

A. S. Tsybko*#, E. M. Kondaurova#, E. V. Zalivina, V. O. Blaginya, and V. S. Naumenko

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: antoncybko@mail.ru

The recombinant B6.CBA-D13Mit76C mouse strain is characterized by altered sensitivity of 5-HT_{1A} receptors and greater *Htr1a* gene transcription. Recently, we found that in B6.CBA-D13Mit76C mice, chronic fluoxetine treatment produced pro-depressive effect in a forced swim test. Since 5-HT_{2A} receptor blockade may be beneficial in treatment-resistant depression, we investigated the influence of chronic treatment (14 days, intraperitoneally) with selective 5-HT_{2A} antagonist ketanserin (0.5 mg/kg), fluoxetine (20 mg/kg), or fluoxetine + ketanserin on the behavior, functional activity of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, serotonin turnover, and transcription of principal genes of the serotonin system in the brain of B6.CBA-D13Mit76C mice. Ketanserin did not reverse the pro-depressive effect of fluoxetine. Fluoxetine, ketanserin, and fluoxetine + ketanserin decreased functional activity of 5-HT_{1A} receptors and *Htr1a* gene transcription in the midbrain and hippocampus. Additionally, all the tested drug regimens decreased mRNA levels of *Slc6a4* and *Maoa* in the midbrain. These changes were not accompanied by a significant shift in the levels of serotonin and its metabolite 5-HIAA. Notably, ketanserin upregulated enzymatic activity of tryptophan hydroxylase 2 (TPH2). Thus, despite some benefits (reduced *Htr1a*, *Slc6a4*, and *Maoa* transcription and increased TPH2 activity), prolonged blockade of 5-HT_{2A} receptors failed to ameliorate the adverse effect of fluoxetine during abnormal functioning of 5-HT_{1A} receptors.

Keywords: 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor, TPH2, fluoxetine, ketanserin, antidepressant resistance

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 947 – 961

УДК 577.25

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СИГНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, РЕГУЛИРУЕМЫХ СЕНСОРНЫМИ ФОТОРЕЦЕПТОРАМИ КРИПТОХРОМАМИ У РАСТЕНИЙ

Обзор

© 2023 Г.Я. Фрайкин*, Н.С. Беленикина, А.Б. Рубин

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: Gfraikin@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023
После доработки 28.04.2023
Принята к публикации 02.05.2023

Сенсоры синего света, криптохромы, составляют широко распространённый класс флавопротеиновых фоторецепторов, которые у растений регулируют сигнальные процессы, лежащие в основе их развития, роста и метаболизма. У некоторых водорослей криптохромы могут действовать не только как сенсорные фоторецепторы, но также как фотолиазы, катализирующие репарацию УФ-индуцированных повреждений ДНК. Криптохромы связывают в качестве хромофора FAD в гомологичном фотолиазе домене (photolyase homologous region, PHR) и содержат *C*-концевое удлинение (cryptochrome *C*-terminal extension, CCE), отсутствующее у фотолиаз. Фотосенсорный процесс в криптохроме инициируется фотохимическими превращениями хромофора, включающими образование редокс-форм FAD. В состоянии с восстановленным до нейтрального радикала хромофором ($FADH^{\bullet}$) фоторецепторный белок подвергается фосфорилированию, конформационному изменению и разобщению PHR-домена и CCE с последующим формированием олигомеров криптохромных молекул. Фотоолигомеризация – структурная основа функциональной активности криптохромов, определяющая формирование их комплексов с разнообразными сигнальными белками, включая транскрипционные факторы и регуляторы транскрипции. Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, что приводит к регуляции экспрессии генов и фотоморфогенезу растений. В последнее время опубликовано много работ с новой, более детальной информацией о молекулярных механизмах отмеченных выше процессов. В настоящем обзоре основное внимание сосредоточено на анализе данных этих публикаций, особенно касающихся структурных аспектов перехода криптохромов в фотоактивированное состояние и регуляторных сигнальных процессов, опосредуемых криптохромными фоторецепторами у растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фоторецепторы криптохромы, FAD-хромофор, фотосенсорный процесс, фотоолигомеризация, сигнальные белки и механизмы, регуляция реагирующих на свет генов.

DOI: 10.31857/S0320972523060052, **EDN:** EEUGZP

ВВЕДЕНИЕ

Свет УФ, видимой и ближней ИК-областей (290–800 нм) электромагнитного спектра солнца – ключевой стимул окружающей среды, который воспринимается многочисленными организмами из всех царств жизни. Для детектирования световых стимулов живые системы

Принятые сокращения: (6-4)PP – pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproduct, пиримидин (6-4) пиримидоновый фотопродукт; BICs – blue light inhibitors of CRYs, зависимые от синего света ингибиторы криптохромов растений; CCE – cryptochrome C-terminal extension, *C*-концевое удлинение криптохрома; CIB – CRY-interacting bHLH; CO – CONSTANS, транскрипционный фактор; COP1/SPA – (constitutive photomorphogenic 1)/(suppressor of PHYA-105 1) E3 ubiquitin ligase complex, комплекс белков с активностью E3-убиквитинлигазы; CPD – cyclobutane pyrimidine dimer, циклобутановый пиримидиновый димер; CPF – cryptochrome/photolyase family proteins, белки семейства криптохромов/фотолиаз; CPH1 – Chlamydomonas photolyase homologous 1, plant-like pCRY protein, подобный криптохромам растений белок *Chlamydomonas reinhardtii*; *Cr*aCRY – animal-like aCRY protein, подобный криптохромам животных белок *C. reinhardtii*; CRYs (CRY1/CRY2) – cryptochromes, криптохромы растений; LRGs – light-responsive genes, реагирующие на свет гены; PHR – photolyase homologous region, гомологичная фотолиазе область; PIFs – phytochrome-interacting factors, взаимодействующие с фитохромом факторы (регуляторы транскрипции); PPKs – photoregulatory protein kinases, фоторегуляторные протеинкиназы.

* Адресат для корреспонденции.

развили ряд специализированных сенсорных фоторецепторов [1–11], которые конвертируют физический сигнал в биохимические сигнальные каскады с последующими фотобиологическими ответами. Это позволяет организмам реагировать на флуктуации многих параметров света и адаптироваться в условиях среды обитания. Сенсорные фоторецепторные белки обычно содержат молекулы хромофоров, чувствительных к фотонам разной энергии. Поглощение фотона хромофором фоторецептора в адаптированном к темноте состоянии инициирует серию фотохимических реакций (фотоцикл), сопровождающихся переходом фоторецептора из «темнового» (неактивного) состояния в адаптированное к свету, или «сигнальное» конформационное состояние. Такой переход означает фотоактивацию фоторецептора.

Растения с наиболее развитыми системами восприятия света, ответственными за разнообразные фотоответы, обладают большим числом регуляторных сенсорных фоторецепторов, которые, имея разную спектральную чувствительность, вместе контролируют все области солнечного оптического спектра [12–20]. Можно также отметить, что растительные фоторецепторы функционально взаимосвязаны в запуске программ развития растений и координации циркадных ритмов их физиологических функций с суточным солнечным циклом. Эти сенсорные фоторецепторы на основании конкретной природы и фотоцикла хромофора подразделяются на несколько различных классов. К ним относятся фитохромы – сенсоры красного/дальнего красного света (600–750 нм) [21, 22], криптохромы [14, 23], фототропины и другие белки: Light-Oxygen-Voltage (LOV) – сенсоры ультрафиолета А-области (УФА)/синего света (320–400 нм/400–500 нм) [24], а также белок UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) – сенсор фотонов ультрафиолета В-области (УФВ, 290–320 нм) [25, 26]. За исключением белка UVR8, который не содержит специального хромофора, каждый фоторецептор может быть функционально разделён на фотосенсорный модуль, содержащий хромофор и обеспечивающий поглощение света, и эффекторный (сигнальный) модуль, опосредующий трансдукцию сигнала и фотобиологический ответ. Фитохромы связывают билиновые хромофоры [27], а рецепторы синего света – флавиновые хромофоры; криптохромы в качестве хромофора связывают FAD [1].

У криптохромов растений (CRYs) FAD может существовать в четырёх редокс-формах: полностью окисленной форме (FAD), анион-радикальной ($FAD^{\bullet-}$), нейтральной радикальной ($FADH^{\bullet}$) и анион-восстановленной ($FADH^{-}$) (рис. 1).

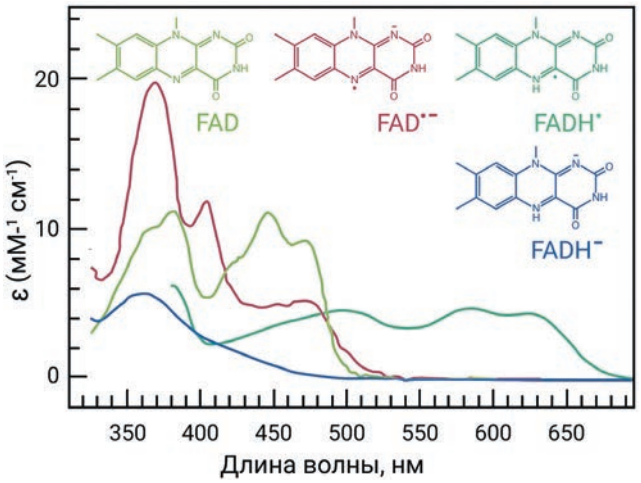

Рис. 1. Абсорбционные спектры редокс-форм FAD-хромофора криптохромов

Все редокс-формы FAD имеют в спектрах поглощения максимум в области УФА при 360–370 нм, причём у $FADH^{-}$ максимум в этой области единственный. У окисленной формы FAD и анион-радикала $FAD^{\bullet-}$ максимумы расположены также в синей области (400–500 нм). У $FADH^{\bullet}$ максимумы сильно сдвинуты в зелёную и красную области спектра между 500 и 650 нм; это принципиальное отличие нейтрального радикала от FAD и $FAD^{\bullet-}$ [28, 29]. Приведённые данные показывают, что каждая редокс-форма FAD характеризуется специфическими максимумами в спектрах поглощения, и поэтому абсорбционные спектры предоставляют важную информацию о редокс-состояниях хромофора в криптохромных белках.

Первый криптохром (cryptochrome, CRY1) был открыт у растения *Arabidopsis thaliana* [30], и было установлено, что этот белок, кодируемый геном *LONG HYPOCOTYL 4* (*HY4*), гомологичен ДНК-фотолиазам – светочувствительным ферментам репарации повреждённой УФ-излучением ДНК. Белок HY4, как и фотолиазы, содержал FAD, но у него отсутствовала ДНК-репарирующая ферментативная активность фотолиаз [31], и он проявлял регуляторные свойства сенсорного фоторецептора. Через несколько лет у *A. thaliana* идентифицировали второй криптохром (CRY2), а у *Drosophila melanogaster* открыли ещё один тип криптохрома – dCRY [32]. В настоящее время криптохромы найдены во всех биологических царствах и определяются на основе схожей двухдоменной структуры, включающей *N*-концевой α/β-домен, содержащий β-лист, и *C*-концевой α-спиральный домен, связы-

вающий хромофор FAD. В совокупности они составляют консервативную гомологичную фотолиазе область (photolyase homologous region, PHR), называемую также PHR-доменом, который состоит из примерно 500 остатков. Дополнительно структура криптохромов включает *C*-концевое удлинение (CRY *C*-terminal extension, CCE), называемое также CCE-доменом (у CRY1 и CRY2 он состоит из 180 и 110 остатков соответственно, а у фотолиаз отсутствует) [33, 34].

Большинство криптохромов действуют как регуляторы экспрессии генов, особенно транскрипции [23, 35]. Из двух CRYs CRY1 функционирует и в ядре, и в цитоплазме, тогда как CRY2, по-видимому, исключительно ядерный белок, который завершает свой посттрансляционный цикл в ядре [36, 37]. У растений криптохромы регулируют множество фотоответов, в том числе таких, как транскрипция геномов, ингибирование вытягивания гипокотиля, избежание тени, циркадные ритмы, инициация цветения, программированная клеточная смерть и светозависимый стресс [23]. Кроме того, CRYs могут вовлекаться в магниторецепцию [38], как это показано в отношении криптохромов других организмов [39]. Хотя CRYs могут независимо регулировать фотоморфогенез, опосредованные ими ответы часто антагонистически или избыточно регулируются с вовлечением других фоторецепторов, а именно фитохромов, UVR8 и LOV-белков. Это объясняется тем, что криптохромы индуцируют ответы на синий свет путём взаимодействия со многими сигнальными белками, некоторые из которых могут взаимодействовать и с отмеченными фоторецепторными белками, вследствие чего может измениться (позитивно или негативно) эффективность сигнальных процессов, запускаемых CRYs [11].

В последнее десятилетие криптохромы также широко изучаются у зелёных водорослей, содержащих подобные растениям и подобные животным типы криптохромов, которые принадлежат к семейству криптохромов/фотолиаз (cryptochrome/photolyase family, CPF). Некоторые криптохромы водорослей отличаются от криптохромов высших растений тем, что проявляют бифункциональные свойства, действуя и как транскрипционные регуляторы, и как ДНК-фотолиазы. Кроме того, эти криптохромы могут реагировать на свет и опосредовать фотоответы водорослей в более широкой области спектра, чем CRYs, а именно в диапазоне 500–650 нм [40].

По современным представлениям, фотосенсорные процессы в криптохромах инициируются фотохимическими превращениями FAD-хромофора, которые индуцируют изменения в хромофор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка, непосредственно окружающего хромофор, распространяются внутри фоторецептора, приводя к разобщению PHR- и CCE-доменов, что сопровождается формированием олигомеров криптохромных молекул [41]. В этом состоянии криптохромы фосфорилируются фоторегуляторными протенкиназами (photoregulatory protein kinases, PPKs), становятся функционально активными и образуют комплексы со многими сигнальными белками, включая транскрипционные факторы и регуляторы экспрессии генов. Зависимые от синего света взаимодействия в таких комплексах вызывают изменение активности сигнальных белков, определяющее их способность регулировать экспрессию реагирующих на свет генов (light-responsive genes, LRGs) [11].

Отмеченные процессы составляют молекулярную основу сигнальной активности криптохромов в фотоморфогенетическом развитии растений. В настоящем обзоре рассмотрены и проанализированы недавние данные, полученные при изучении сигнальных механизмов фоторегуляторных процессов, опосредуемых этими фоторецепторами.

БЕЛКИ CPF: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Гены родственных криптохромам белков найдены в геномах многих организмов из разных филогенетических групп – бактерий, водорослей, грибов и животных [1, 40, 42, 43]. Все криптохромные белки объединяет значительное структурное сходство с фотолиазами, которые содержат кофактор FAD в основном состоянии в форме $FADH^-$. В фотовозбуждённом состоянии $FADH^-$ непосредственно вовлекается в репарацию двух главных УФ-индуцированных повреждений ДНК – циклобутановых пиримидиновых димеров (cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs) и пиримидин (6-4) пиримидоновых фотопродуктов (pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, 6-4PPs). Ферменты, репарирующие CPDs или 6-4PPs, названы соответственно CPD-фотолиазами или (6-4)-фотолиазами [44]. Квантовый выход фоторепарации CPD-фотолиазами значительно превышает квантовый выход фоторепарации (6-4)-фотолиазами, несмотря на сходство структур двух типов ферментов и первичной фотохимии их флавинового кофактора. Это объясняется тем, что

фоторепарация 6-4PP – более сложная реакция, чем фоторепарация CPD (подробнее этот вопрос рассматривается в следующем разделе).

Принято считать, что криптохромы эволюционировали от фотолиазного предшественника. Подтверждением общих эволюционных корней фотолиаз и криптохромов может служить открытие у грибов, диатом и зелёных водорослей белков с двойной функцией – ДНК-репарирующей и регуляторной [10, 40, 45–47]. Большинство криптохромов не способны катализировать фоторепарацию ДНК. Однако отдельные их представители, относящиеся к белкам CPF, сохраняют эту способность. Согласно современной филогенетической и функциональной классификации [10, 43], белки CPF подразделяются на четыре класса. Среди них отметим два основных: растительные криптохромы (CRYs) и подобные им белки (plant-like CRYs, pCRYs) и криптохромы животных и схожие с ними белки (animal-like CRYs, aCRYs). Криптохромы растений и зелёных водорослей, например, pCRY *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlamydomonas photolyase homologous 1, CPH1), действуют в основном как сенсорные фоторецепторы, тогда как криптохромы животных могут выполнять функции либо фоторецепторов (тип I), либо не реагирующих на свет регуляторов циркадных ритмов (тип II). Криптохромы типа I найдены у насекомых (их прототипом считается криптохром дрозофилы dCRY), а криптохромы типа II – у млекопитающих. Другой тип криптохромов идентифицирован у птиц, рыб, земноводных и пресмыкающихся; эти белки содержат FAD и фотохимически активны [48]. Несколько белков aCRYs обнаружено вне царства животных – главным образом у фотосинтезирующих водорослей. Зелёная водоросль *C. reinhardtii* содержит помимо белка pCRY (CPH1) белок aCRY (*Cr*aCRY), который на 40–50% гомологичен по последовательности белкам aCRYs из зелёной водоросли *Ostreococcus tauri* и диатомы *Phaeodactylum tricornutum*. Эти криптохромы водорослей являются бифункциональными белками, проявляющими активность (6-4)-фотолиазы и функцию регуляторов экспрессии генов. Интересно, что регуляторная функция белка *Cr*aCRY выявлена не только при действии синего света, поглощаемого хромофором FAD в окисленной форме, но и при действии красного света, поглощаемого $FADH^{\bullet}$ [40].

Почти все белки CPF подвергаются светоиндуцированной реакции, называемой фотоактивацией, в которой функционально неактивный FAD при фотовозбуждении отрывает электрон от соседнего триптофана. В восстановленном состоянии флавиновый хромофор либо инициирует трансдукцию сигнала ($FADH^{\bullet}$), либо после последующего поглощения фотона катализирует репарацию ДНК ($FADH^{-}$). Быстрый перенос электрона с поверхности белка на FAD обеспечивается консервативной триадой триптофанов (Trp-триада). Этот внутримолекулярный путь переноса электрона удлиняется у *Cr*aCRY и криптохромов животных типа I (например, dCRY) за счёт четвёртого ароматического остатка [49, 50] – тирозина (*Cr*aCRY) или триптофана (dCRY). Удлинённый электрон-транспортный путь важен не только для реакций фотовосстановления FAD у белков aCRY, но и для функционирования (6-4)-фотолиаз.

У CRYs фотовосстановление FAD вызывает высвобождение CCE-домена из ядра PHR-домена, с которым CCE был сильно связан в темноте. В результате CCE-домен переходит в неупорядоченное состояние, и его деструктурированная часть из 80 остатков становится доступной для взаимодействия с некоторыми белками – компонентами сигнальных путей криптохромов. Поэтому ранее полагали, что у CRY1 и CRY2 только CCE играет роль эффекторного домена. Однако полученные в последнее время данные о физическом взаимодействии ряда сигнальных белков с PHR-доменом этих криптохромов позволяют считать, что PHR тоже может выполнять функцию эффекторного домена [23].

Впервые определённая кристаллическая структура PHR-домена CRY1 проявляет удивительное сходство со структурой CPD-фотолиазы *Escherichia coli*, несмотря на их эволюционную отдалённость. Вместе с тем кристаллическая структура растительного криптохрома полной длины из-за технической трудности кристаллизации белка с большим внутренне неупорядоченным CCE-доменом пока не получена. У криптохрома дрозофилы dCRY со сравнительно малым CCE-доменом удалось определить не только кристаллическую структуру полной длины, но и его комплекса с сигнальным белком. Результаты этого исследования продемонстрировали центральную роль FAD-связывающего кармана и физических взаимодействий между PHR- и CCE-доменами в функционировании криптохромов животных [51]. Существует общее согласие в том, что и у CRYs светозависимые изменения во взаимодействии между PHR- и CCE-доменами могут объяснить фотоиндуцированные конформационные переходы. Однако конкретные сайты взаимодействия между PHR и CCE ещё предстоит идентифицировать.

Как отмечено выше, фотоактивация CRYs начинается с поглощения фотона синего света хромофором FAD и его фотовосстановления. Это приводит к конформационным изменениям, вызывающим разобщение PHR- и CCE-доменов и последующий переход фоторецептора из конформации с закрытым CCE-доменом в конформацию с открытым CCE-доменом. Такие изменения сопровождаются формированием олигомеров CRYs, которые необходимы для образования их комплексов с различными сигнальными белками. Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая тем самым регуляцию ими экспрессии LRGs и программ развития растений. При изучении перечисленных процессов в последние годы получены новые результаты, которые рассматриваются в последующих разделах.

ФОТОХИМИЯ FAD-ХРОМОФОРА В CPF-БЕЛКАХ И ФОТОАКТИВАЦИЯ КРИПТОХРОМОВ

Фотохимические свойства флавинов определяются системой сопряжённых двойных связей их изоаллоксазинового кольца. При поглощении фотона УФА/синего света происходит перераспределение заряда в изоаллоксазиновом кольце и изменение редокс-потенциала флавина, что индуцирует его фотохимические превращения, вовлекающие перенос электрона/протона и образование радикальных форм [16, 29]. Структурное сходство между PHR-доменом криптохромов и фотолиазами, особенно в белковом кармане, связывающем FAD, определяет общий принцип их реагирования на свет: у обоих типов белков фотоиндуцированное возбуждение хромофора инициирует реакции переноса электрона. Однако механизмы фотохимических процессов у криптохромов и фотолиаз фундаментально различаются, и это, в частности, выражается в редокс-формах хромофора FAD в ходе его фотоциклов.

Активация светом фотолиаз происходит с участием двух хромофоров – каталитического $FADH^-$ и антенного хромофора, функцию которого у большинства фотолиаз выполняют 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate, MTHF) или 8-гидроксидезазафлавин (8-hydroxydeazaflavin, 8-HDF). Антенные хромофоры интенсивно поглощают фотоны в области УФА и по физическому резонансному механизму передают энергию возбуждения к $FADH^-$, повышая его потенциал восстанавливать CPD или 6-4PP для последующей их репарации фотолиазами. Вследствие переноса электрона от возбуждённого $FADH^-$ к CPD или 6-4PP образуются комплексы с переносом заряда между нейтральным радикалом флавина ($FADH^\bullet$) и анион-радикалом CPD или 6-4PP. Далее в анион-радикале CPD происходит перераспределение электронной плотности, вследствие чего циклобутановое кольцо расщепляется на два исходных пиримидина. Обратный перенос избыточного электрона на $FADH^\bullet$ восстанавливает его в активную форму $FADH^-$. По сравнению с репарацией CPD репарация 6-4PP – более сложный процесс. Это связано с тем, что для формирования двух неповреждённых пиримидинов анион-радикал 6-4PP должен быть предварительно конвертирован в другой интермедиат – оксетан [16, 29, 52]. Согласно данным кристаллографического анализа структуры комплекса PHR-домена *Cr*aCRY с фрагментом ДНК, содержащим 6-4PP [53], механизм репарации ДНК (6-4)-фотолиазой предполагает поглощение второго фотона для перехода от интермедиата оксетана к двум исходным пиримидинам.

Большинство данных по фотохимии криптохромов получено при изучении CRY1 и CRY2 *A. thaliana*, CPH1 и *Cr*aCRY *C. reinhardtii* и dCRY *D. melanogaster* [14, 50, 54–57]. В отличие от фотолиаз, эти криптохромы в основном состоянии содержат FAD в полностью окисленной форме и обычно (за исключением *Cr*aCRY, который дополнительно встраивает хромофор 8-HDF) не связывают антенный хромофор. Как следует из структур криптохромов, это обусловлено замещением ключевых аминокислотных остатков в белковых карманах, связывающих антенный хромофор, что препятствует его узнаванию и встраиванию.

При исследовании CRY1 и CPH1 с применением спектроскопии временного разрешения в ИК-, УФ- и видимой области установлено, что поглощение фотона синего света хромофором FAD индуцирует реакцию его восстановления в анион-радикал ($FAD^{\bullet-}$) посредством переноса электрона от соседнего остатка триптофана – компонента консервативной Trp-триады. Сверхбыстрые реакции переноса электрона от триптофана (Trp_1H) к FAD и между концевым триптофаном (Trp_3H) и Trp_1H происходят за 0,4 пс и 31 пс соответственно. Формируемый при фотовосстановлении FAD анион-радикал $FAD^{\bullet-}$ протонируется у CRY1 и CPH1 в течение нескольких микросекунд и переходит в радикал $FADH^\bullet$. Донором протона в этой реакции может служить расположенный близко к изоаллоксазиновому кольцу флавина остаток

аспарагиновой кислоты. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, согласно которым замена аспарагиновой кислоты на цистеин в PHR-домене CPH1 полностью блокирует перенос протона [58]. Важное следствие реакции протонирования – стабилизация радикала флавина в состоянии $FADH^{\bullet}$ и продление его времени жизни до нескольких миллисекунд *in vitro* и нескольких минут *in vivo* [54, 59]. Свойство $FADH^{\bullet}$ поглощать свет в длинноволновой области спектра (500–650 нм) способствовало установлению его роли как сигнальной формы флавинового хромофора у CRYs. Было показано, что добавление зелёного света подавляет контролируемые криптохромом ответы на синий свет. Антагонистическое действие зелёного света коррелировало с уменьшением концентрации $FADH^{\bullet}$ в результате его фотовосстановления в неактивную форму $FADH^{-}$ [14]. Редокс-фотоцикл FAD завершается реакцией $FADH^{-}$ с кислородом и регенерацией исходной окисленной формы FAD (рис. 2).

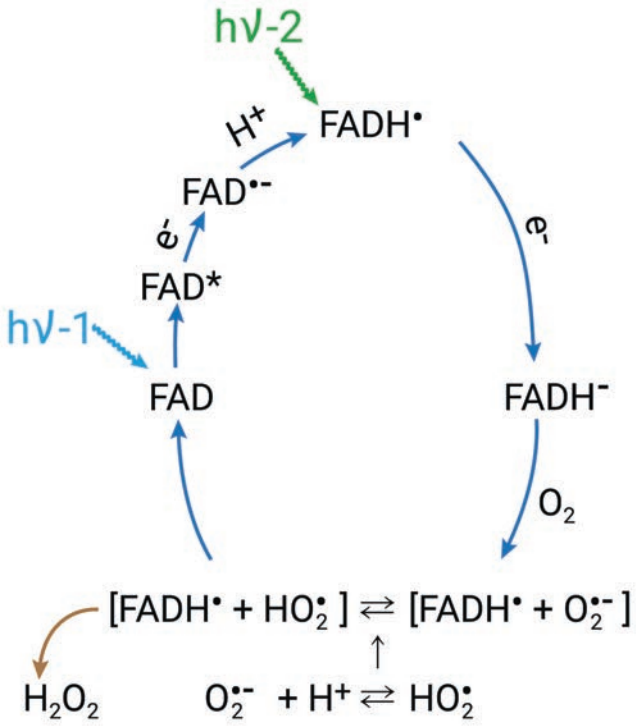

Рис. 2. Фотоцикл хромофора FAD с последовательными его переходами в три редокс-формы. Цикл завершается окислением $FADH^{-}$ кислородом в исходную форму FAD. На первой стадии окисления интермедиатом может быть радикальная пара [$FADH^{\bullet}$ + $O_2^{\bullet-}$]. На второй стадии супероксид $O_2^{\bullet-}$ заменяется на его протонированную форму $HO_2^{\bullet}$, с которой он находится в равновесии, и это приводит к окислению $FADH^{\bullet}$ в FAD с выходом H_2O_2 [60]; FAD* – фотовозбуждённый FAD, *h*ν-1 – фотон синего света, *h*ν-2 – фотон длинноволнового видимого света в области 500–650 нм

Как уже было отмечено, сигнальная активность криптохромов обеспечивается их CCE-доменом, тогда как PHR-домен осуществляет регулируемый светом контроль над функцией CCE. После фотоактивации CCE-домен высвобождается и может затем взаимодействовать с некоторыми сигнальными белками. Однако вопрос о том, как высвобождение CCE связано с фотохимией криптохрома, оставался нерешённым. В исследовании с применением ИК-спектроскопии временного разрешения обнаружено, что после формирования сигнальной формы $FADH^{\bullet}$ в *N*-концевом α/β-субдомене PHR фоторецептора CPH1 в течение 500 мкс происходит заметное изменение структуры β-листа. Этот факт рассматривается как свидетельство ключевой роли β-листа во взаимодействии PHR и CCE, а также в их разобщении и последующей деструктуризации CCE [58]. В недавнем исследовании получены дополнительные данные, демонстрирующие, что реорганизация именно β-листа вызывает диссоциацию CCE от PHR-домена фоторецептора CPH1 [61]. Интересно, что у CRY1 переход CCE в неупорядоченное состояние происходит за время 100 мс после формирования $FADH^{\bullet}$, т.е. намного позже. В предложенной на основе полученных данных модели показано, как структурные изменения синхронизируются с фотохимией флавинового хромофора у CRYs [58].

ФОТООЛИГОМЕРИЗАЦИЯ КРИПТОХРОМОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С СИГНАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ

Структуры фотоолигомеров криптохромов. Как отмечено выше, криптохромы с фотовосстановленным FAD подвергаются конформационным изменениям, которые могут приводить к разобщению PHR- и CCE-доменов [61]. Недавно было показано, что этот процесс может вызывать изменения во взаимодействии между молекулами криптохромов, сопровождаемые их гомоолигомеризацией. Фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRYs, так как повышает их сродство к сигнальным белкам [62]. К этим белкам относятся транскрипционные регуляторы, такие как CRY-interacting bHLHs (CIBs), взаимодействующие с фитохромом факторы – регуляторы транскрипции (phytochrome-interacting factors, PIFs, и CONSTANS, CO); регуляторы криптохромов, такие как PPKs и зависимые от сине-

го света ингибиторы CRYs (blue light inhibitors of CRYs, BICs), а также E3-лигазный комплекс constitutive photomorphogenic 1 (COP1)/ suppressors of PHYA-105 1 (SPAs) [11, 23, 63]. В результате взаимодействия в комплексе гомоолигомера криптохрома с белками изменяется их сигнальная активность, что приводит к изменению экспрессии генов и регуляции программ развития растений [64]. Следует отметить, что ключевые детали этой модели не были точно определены, особенно в отношении структурных изменений в гомодимере криптохрома, на основании которых можно было бы его отличить от структуры мономера. Для решения этого вопроса проведено генетическое изучение связи структура–функция у CRYs [65, 66]. Показано, что мутации остатков Trp-триады у CRY1 или CRY2 блокируют каскад переноса электрона и фотовосстановление FAD *in vitro*, но не влияют на физиологическую активность мутантов *in vivo*. Некоторые мутанты (например, W374A у CRY2) проявляют конститутивную, т.е. независимую от света физиологическую активность. Эти мутанты способствовали определению структуры гомоолигомеров криптохромов. В отличие от дикого типа CRY2, который подвергается фотоолигомеризации, мутант W374A CRY2 проявляет гомоолигомеризацию *in vitro*. Этот результат согласуется с данными о том, что фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRY2, и что его мутант W374A конститутивно активен *in vivo* [64]. В недавней работе с применением низкотемпературной электронной микроскопии с визуализацией выявлены конфигурации гомодимера и гомотетрамера мутанта W374A CRY2, у которого эти олигомеры формируются посредством взаимодействий поверхностей PHR-доменов. Мутации в интерфейсе гомодимера приводили к уменьшению его сродства к сигнальному белку CIB1. На основании этого факта предположили, что CIB1 взаимодействует с CRY2 в интерфейсе гомодимера, и, вероятно, поэтому именно олигомеры, а не мономеры являются активными формами криптохромов [67].

Структурные изменения в олигомерах PHR-домена CRY2 продемонстрированы также в недавнем исследовании, проведённом с кристаллическими структурами PHR-домена в фотоактивном тетрамерном и неактивном мономерном состояниях [68]. Формирование тетрамера опосредуется динамичной петлёй, связывающей PHR- и CCE-домены, которая способствует перемещению определённых остатков в α-6 для их участия в формировании активного интерфейса в олигомерном состоянии.

Взаимодействие CRY–BIC: ингибирование фотоолигомеризации и активации криптохромов. Инактивация фоторецепторов играет важную роль в поддержании необходимого уровня их светозависимой функциональной активности и в предотвращении чрезмерной чувствительности клеток к воздействию света. Фотоактивированные криптохромы могут подвергаться инактивации по трём различным механизмам, включая спонтанную темновую реверсию гомоолигомеров в мономеры, взаимодействие с ингибиторами (BICs) и убиквитин-зависимый протеолиз. Среди этих механизмов только ингибирование криптохромов, вызываемое BICs, является светочувствительным процессом. Поэтому предполагается, что взаимодействие CRY–BIC может играть более динамичную роль в регуляции активности криптохромов у растений, растущих на свету [68].

Анализ недавно полученной кристаллической структуры комплекса PHR-домена CRY2 с BIC2 выявил два возможных механизма, проясняющих вопрос о том, как белки BIC могут инактивировать CRYs [69]. Во-первых, BIC может ингибировать фотовосстановление FAD, поскольку связывание BIC2 с PHR увеличивает расстояние между донором электрона (W397) и акцептором (изоаллоксазиновое кольцо FAD) на 1 Å, и это может затруднить перенос электрона. Кроме того, связывание BIC2 с PHR может привести к вращению карбоксильной боковой цепи предполагаемого донора протона (D393) на 50°, что увеличит расстояние между донором протона и акцептором протона в хромофоре на 5 Å. Такое изменение делает протонирование маловероятным. Соответственно, BIC2 может блокировать фотовосстановление FAD в $FAD^{\bullet -}$ и его протонирование с переходом в сигнальную форму $FADH^{\bullet}$. Во-вторых, BICs могут действовать как ингибиторы гомоолигомеризации криптохромов. В комплексе PHR-домена CRY2 с BIC2 структура фрагмента BIC2 определяет его способность опоясывать паз между двумя субдоменами PHR-домена. PHR и BIC2 имеют по 16 остатков, которые вовлекаются в формирование комплекса между ними. Индивидуальные мутации нескольких остатков в интерфейсе комплекса снижали выраженное сродство между PHR и BIC2 *in vitro*. Интерфейсы гетеродимера CRY2–BIC2 и гомодимера CRY2–CRY2 содержат по два остатка CRY2, а именно W349 и R208. На основании полученных данных предполагается, что связывание BICs с CRYs конкурентно ингибирует фотоолигомеризацию CRYs, блокируя тем самым активацию фоторецепторов.

Взаимодействия CRY–CIB и CRY–PIF: прямая регуляция экспрессии LRGs. Белок CIB1 был первым CRY-взаимодействующим транскрипционным регулятором, идентифицированным у растений. Как было установлено, CIB1 при взаимодействии с фотоактивированным CRY2 индуцирует транскрипцию гена *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), который кодирует центральный регулятор инициации цветения [70]. Было также показано, что другие CIB-белки (CIB2, CIB4 и CIB5) взаимодействуют с фотоактивированным CRY2 и связываются с *FT*-промотором [71]. Наиболее вероятно, что CRY2 не влияет на сродство CIB-белков к ДНК или хроматину [70, 71], однако они напрямую взаимодействуют с транскрипционным фактором CO для инициации цветения [72]. В соответствии с выдвинутым предположением CRY2 может изменить CIB–CO-взаимодействие, обеспечивая тем самым последующую транскрипцию *FT*-гена. Вопрос о том, как именно CRY2/CIB1-комплекс опосредует регуляцию LRGs, остаётся пока невыясненным.

Помимо CIB-белков, CRYs взаимодействуют с другой группой транскрипционных факторов – PIF-белками, которые вовлекаются в фотоморфогенетические ответы, опосредованные фитохромами [17, 19, 22]. Фотоактивированные CRY1 и CRY2 могут физически взаимодействовать с PIF4 и PIF5 посредством PHR-доменов CRYs и *N*-концевых доменов PIF-белков [73, 74]. Как было показано, в условиях затенения уменьшается не только соотношение интенсивностей красного/дальнего красного света, но и интенсивность синего света; при этом и CRYs, и фитохром B (phytochrome B, phyB) опосредуют фотоответы избежания тени [20, 74]. Известно, что phyB, связываясь с PIF3, вызывает его фосфорилирование и убиквитин-зависимую деградацию [75]. Однако в условиях затенения phyB-индуцированная деградация PIF3 ослабляется, и это способствует росту растения на слабом синем свету. Интересно, что в таких условиях CRYs могут подавлять деградацию PIF1 [76]. Согласно выдвинутому предположению, при низкой интенсивности синего света происходит уменьшение эффективности фотоолигомеризации криптохрома и ослабление CRY–PIF-взаимодействия с последующим накоплением PIF-белков. Следует отметить, что взаимодействие CRY–PIF, как и CRY–CIB-взаимодействие, не влияет на сродство PIFs к ДНК или хроматину, хотя изменяет их активность в регуляции транскрипции.

Фосфорилирование криптохромов PPKs. Хорошо известно, что CRY1 и CRY2 подвергаются светозависимому фосфорилированию в растительных клетках [77, 78], причём фосфорилирование CRY2 не только повышает активность фоторецептора, но также способствует его деградации с участием E3-убиквитинлигаз [37, 77, 79, 80]. В изолированных CRY2-белках выявлено много разных фосфорилированных остатков, включая семь основных фосфосеринов, и уровень фосфорилирования почти всех этих остатков возрастает в ответ на действие синего света. Мутант SCRY2D не подвергается фосфорилированию и частично утрачивает физиологические функции.

Фосфорилирование CRY2 происходит преимущественно в ядре и повышает как его активность, так и дестабилизацию посредством

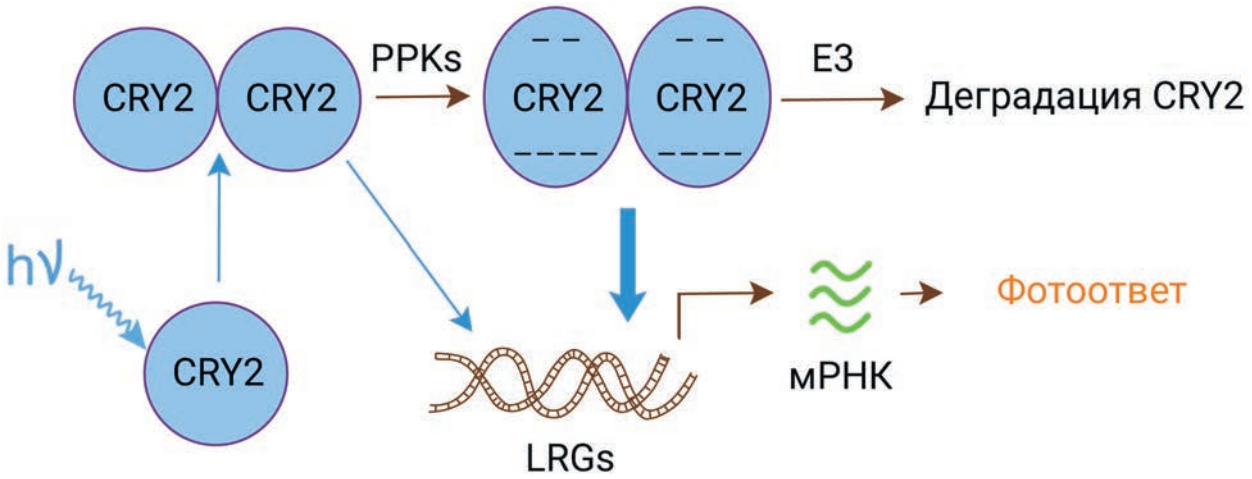

Рис. 3. CRY2 подвергается светозависимым процессам олигомеризации и фосфорилирования, катализируемого PPKs. Это приводит к формированию полностью активного димера CRY2, который эффективно опосредует регуляцию LRGs, что сопровождается транскрипцией мРНК и фотобиологическим ответом. Фосфорилированный CRY2 подвергается также деградации с участием E3-убиквитинлигазы; *hν* – фотон синего света

фотоиндуцированного изменения конформации фоторецептора [81]. Установлено, что четыре сходные PPKs, специфичные для растений, катализируют светозависимое фосфорилирование CRY1 и CRY2 *in vivo*. Все PPKs взаимодействуют в основном с нефосфорилированными CRY-белками и с избытком фосфорилируют их. Фосфорилирующая активность в отношении CRY1 и CRY2 почти отсутствует у тройных мутантов PPKs; кроме того, CRY2 не подвергается деградации этими мутантами, что свидетельствует о необходимости фосфорилирования CRY2 для его последующего убиквитин-зависимого протеолиза. Эти результаты подтверждают модель, демонстрирующую, что фотоактивированные CRYs фосфорилируются четырьмя структурно схожими PPKs, и это вызывает конформационные изменения, повышающие физиологическую активность CRY1 и CRY2, а также деградацию CRY2 [81] (рис. 3).

Кроме криптохромов, у PPKs есть другие субстраты, включая белок PIF3, который вовлекается в сигнальный путь фитохромов. На основании полученных данных предложен механизм, обеспечивающий координацию совместных действий криптохромов и фитохромов в фотоморфогенезе растений в ответ на разные длины волн света в естественных условиях [75, 81].

Взаимодействия криптохромов с комплексом COP1/SPA: непрямая регуляция транскрипции. Общепринято, что COP1, который был первым сигнальным белком, идентифицированным у растений [82, 83], является центральным репрессором фотоморфогенеза, и это подтверждено изучением разных сенсорных фоторецепторов – криптохромов, фитохромов и UVR8 [84–87]. Структура COP1 включает *N*-концевой домен Really Interesting New Gene (RING), домен coiled-coil и *C*-концевой WD40-домен. COP1 действует *in vivo* в комплексе с четырьмя подобными ему белками SPA (SPA1–SPA4), отличие которых от COP1 заключается в том, что в их доменной структуре RING-домен заменён на подобный киназе домен, проявляющий, как недавно было показано, киназную активность [88–90]. Тетрамерный COP1/SPA-комплекс из двух COP1- и двух SPA-белков функционирует как E3-убиквитинлигаза и участвует в деградации транскрипционных факторов, которые вовлекаются в сигнальные пути фоторецепторов, регулирующих процессы фотоморфогенеза у растений [86].

В темноте COP1 находится преимущественно в ядре, где транскрипционные факторы метятся для убиквитинации. Белки SPA не требуются для ядерной локализации COP1, однако в отсутствие SPA-белков COP1 не проявляет активности [91]. Опознание транскрипционных факторов происходит посредством *C*-концевых WD40-доменов COP1 и SPAs [90]. Поскольку WD40-домен SPA1 может замещать WD40-домен у COP1, но не наоборот, функции этого домена у двух белков, вероятно, сходны, но не идентичны [92]. Свет индуцирует релокализацию COP1 в цитозоль, и, как показано, это может содействовать стабилизации мишени COP1 в ядре – транскрипционного фактора LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) [93]. Установлено, что опосредованный фотоактивированным CRY1 выход COP1 из ядра не зависит от SPAs, тогда как этот процесс, индуцированный дальним красным светом с участием фитохрома A, зависит от SPA-белков, а фитохром B, активированный красным светом, менее эффективен в удалении COP1 из ядра [87]. Очевидные различия в инициации фитохромами и CRY1 процесса выхода COP1 из ядра свидетельствуют о разных механизмах участия этих фоторецепторов в светозависимой релокализации COP1 в цитозоль, однако конкретные сигнальные механизмы действия каждого фоторецептора остаются пока невыясненными. Кроме того, неизвестно, происходит ли также светозависимая релокализация в цитозоль и SPA-белков.

Помимо отделения COP1 от транскрипционных факторов, их стабилизация может быть достигнута CRY-опосредованным разрушением COP1–SPA-взаимодействий, сопровождаемым инактивацией убиквитинлигазной активности COP1/SPA-комплекса. Как было показано, регуляция активности COP1/SPA осуществляется светозависимым взаимодействием CRY1 и CRY2 с белками SPA [94–96]. Интересно, что фоторецепторы CRY1 и CRY2 взаимодействуют с белком SPA1 разными структурными доменами. CRY1 посредством CCE-домена взаимодействует с WD40-доменом белка SPA1. Такое взаимодействие приводит к ослаблению связывания SPA1 с COP1 с последующей диссоциацией и физическим разделением белков. В результате подавляется COP1/SPA-лигазная активность и стабилизируется транскрипционный фактор HY5, регулирующий рост гипокотиля [87, 94, 95]. В противоположность этому *N*-концевой PHR-домен CRY2 взаимодействует с *N*-концевым подобным киназе доменом SPA1, что усиливает COP1–SPA-взаимодействия и повышает стабильность комплекса. В этом состоянии COP1/SPA1 E3-убиквитинлигазная активность

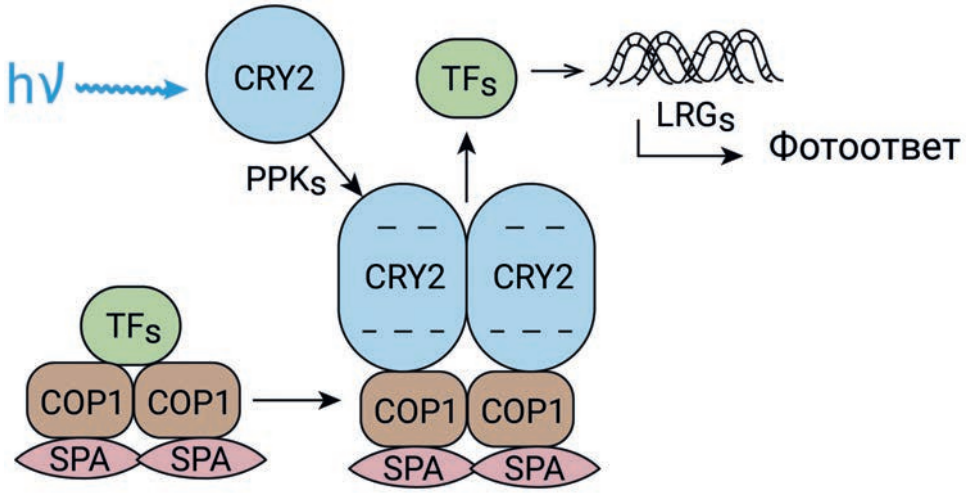

Рис. 4. Модель инактивации убиквитинлигазной активности COP1/SPA-комплекса, вовлекаемого в деградацию транскрипционных факторов (transcription factors, TFs). Фотоактивированный CRY2 в олигомерном фосфорилированном состоянии конкурирует с TFs за связывание с COP1 в комплексе COP1/SPA и вытесняет TFs из комплекса с последующей их стабилизацией и участием в экспрессии LRGs; *hν* – фотон синего света

также уменьшается, и последующая стабилизация транскрипционного фактора CO обеспечивает инициацию им фотопериодического цветения [96]. Вопрос о том, как в точности взаимодействие CRY2 с белком SPA1 ингибирует активность COP1/SPA-комплекса, остаётся нерешённым.

Помимо взаимодействия с белками SPA, CRYs *C*-концевыми доменами могут напрямую взаимодействовать с COP1 [82, 83], причём CRY1–COP1-взаимодействие зависит от SPA-белков, тогда как CRY2–COP1-взаимодействие от них не зависит [97]. Как продемонстрировано в недавних исследованиях, фотоактивированный CRY2 инактивирует COP1/SPA-комплекс путём конкурентного вытеснения субстратов COP1, а именно, транскрипционных факторов, которые взаимодействуют с WD40-доменом COP1 [84, 98, 99]. Этот механизм основан на том, что структуры CRY2 и субстратов COP1 содержат консервативный Val-Pro (VP)-пептид. Как следует из анализа кристаллических структур COP1 с VP-содержащими пептидами и WD40-домена COP1 с VP-содержащим пептидом CRY2, CRY2 и субстраты COP1 взаимодействуют с WD40-доменом COP1 через свои соответствующие VP-пептиды и могут конкурировать за связывание с одним и тем же доменом COP1 [98]. Эти данные подтверждают механизм, в соответствии с которым инактивация COP1/SPA-комплекса фотоактивированным CRY2 происходит в результате конкурентного вытеснения субстратов COP1. Последующее накопление транскрипционных факторов приводит к активации экспрессии реагирующих на свет генов и процессов фотоморфогенеза растений (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи в изучении молекулярных основ сигнальных процессов, опосредуемых криптохромами у растений, связаны с идентификацией в последнее время разнообразных сигнальных белков, которые образуют комплексы с фотоактивированными олигомерами криптохромных молекул. Светозависимые взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая прямую (CIB- и PIF-белки) или опосредованную (COP1/SPA-белки) регуляцию ими транскрипции реагирующих на свет генов и процессов фотоморфогенетического развития растений. Негативные регуляторы криптохромов, белки BIC, могут блокировать фотосенсорные процессы, запускаемые фотохимическими превращениями хромофора FAD, и препятствовать олигомеризации фоторецепторов. Механизмы действия BICs недавно подтверждены кристаллической структурой комплекса BIC2 с PHR-доменом CRY2. Также в недавних исследованиях с привлечением кристаллографического анализа раскрыт механизм инактивации COP1/SPA-комплекса, вовлекаемого в деградацию транскрипционных факторов. Механизм подавления фотоактивированным CRY2 активности COP1/SPA-комплекса основан на конкурентном связывании фоторецептора с COP1 и вытеснении COP1-взаимодействующих транскрипционных факторов с последующей их стабилизацией. Вместе с тем детали структурных основ взаимодействий криптохромов в комплексах с другими сигнальными белками пока не выявлены. Ещё один важный вопрос, требующий прояснения, относится к динамике

комплексов криптохромов с взаимодействующими сигнальными белками, а именно, какие точные механизмы могут обеспечивать регуляцию формирования таких комплексов и их диссоциации, и это, по-видимому, представляет собой наиболее привлекательную задачу для дальнейших исследований.

Вклад авторов. Г.Я. Фрайкин – концепция, анализ публикаций, написание текста; Н.С. Беленикина – оформление рукописи и рисунков; А.Б. Рубин – обсуждение материала рукописи с соавторами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Losi, A., and Gartner, W. (2012) The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 49-72, doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105538.
2. Fraikin, G. Ya., Strakhovskaya, M. G., and Rubin, A. B. (2013) Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1238-1253, doi: 10.1134/S0006297913110047.
3. Li, F.-W., and Mathews, S. (2016) Evolutionary aspects of plant photoreceptors, *J. Plant Res.*, **129**, 115-122, doi: 10.1007/s10265-016-0785-4.
4. Podolec, R., Demarsy, E., and Ulm, R. (2021) Perception and signaling of ultraviolet-B radiation in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **72**, 793-822, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095946.
5. Inoue, K., Nishihama, R., and Kohchi, T. (2017) Evolutionary origin of phytochrome responses and signaling in land plants, *Plant Cell Environ.*, **40**, 2502-2508, doi: 10.1111/pce.12908.
6. Fraikin, G. Ya., Strakhovskaya, M. G., Belenikina, N. S., and Rubin, A. B. (2015) Bacterial photosensory proteins: regulatory functions and optogenetic applications, *Microbiology*, **84**, 461-472, doi: 10.1134/S0026261715040086.
7. Demarsy, E., Goldschmidt-Clemont, M., and Ulm, R. (2018) Coping with "dark sides of the sun" through photoreceptor signaling, *Trends Plant Sci.*, **23**, 260-271, doi: 10.1016/j.tplants.2017.11.007.
8. Фрайкин Г. Я. (2018) Белковые сенсоры света: фотовозбуждённые состояния, сигнальные свойства и применение в оптогенетике, АР-Консалт, Москва.
9. Ponnu, J., and Hoecker, U. (2022) Signaling mechanisms by Arabidopsis cryptochromes, *Front. Plant Sci.*, **13**, 844714, doi: 10.3389/fpls.2022.844714.
10. Vechtomova, Y. L., Telegina, T. A., and Kritsky, M. S. (2020) Evolution of proteins of the DNA photolyase/cryptochrome family, *Biochemistry (Moscow)*, **85** (Suppl. 1), S131-S153, doi: 10.1134/S0006297920140072.
11. Wang, Q., and Lin, C. (2020) Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **71**, 103-129, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100300.
12. Fraikin, G. (2017) *Photobioregulatory Receptors*, Lambert Academic Publishing, Saarbrucken.
13. Sun, K., and Zhu, Z. (2018) Illuminating the nucleus: UVR8 interacts with more, *Trends Plant Sci.*, **23**, 279-281, doi: 10.1016/j.tplants.2018.03.002.
14. Ahmad, M. (2016) Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **33**, 108-115, doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.013.
15. Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., and Sullivan, S. (2015) Plant flavoprotein photoreceptors, *Plant Cell Physiol.*, **56**, 401-413, doi: 10.1093/pcp/pcu196.
16. Фрайкин Г. Я., Рубин А. Б. (2022) В кн. *Горизонты биофизики*. Т. 1 (под ред. Рубина А. Б.), Институт компьютерных исследований, М.-Ижевск, с. 426-454.
17. Cheng, M. C., Kathare, P. K., Paik, I., and Huq, E. (2021) Phytochrome signaling networks, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **72**, 217-244, doi: 10.1146/annurev-arplant-080620-024221.
18. Bae, G., and Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 281-311, doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859.
19. Franklin, K. A., and Quail, P. H. (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development, *J. Exp. Bot.*, **61**, 11-24, doi: 10.1093/jxb/erp304.
20. Fraser, D. P., Hayes, S., and Franklin, K. A. (2016) Photoreceptor crosstalk in shade avoidance, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **33**, 1-7, doi: 10.1016/jpbi.2016.03.008.
21. Chen, M., and Chory, J. (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development, *Trends Cell Biol.*, **21**, 664-671, doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.002.
22. Pham, V. N., Kathare, P. K., and Huq, E. (2018) Phytochromes and phytochrome interacting factors, *Plant Physiol.*, **176**, 1025-1038, doi: 10.1104/pp.17.01384.

23. Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Liu, Q., Gu, L., Oka, Y., and Lin, C. (2018) Beyond the photocycle – how cryptochromes regulate photoresponses in plants? *Curr. Opin. Plant Biol.*, **45**, 120-126, doi: 10.1016/j.pbi.2018.05.014.
24. Demarsy, E., and Fankhauser, C. (2009) Higher plants use LOV to perceive blue light, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 69-74, doi: 10.1016/j.pbi.2008.09.002.
25. Christie, J. M., Arvai, A. S., Baxter, K. J., Heilmann, M., Pratt, A. J., O'Hara, A., Kelly, S. M., Hothorn, M., Smith, B. O., Hitomi, K., Jenkins, G. I., and Getzoff, E. D. (2012) Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges, *Science*, **335**, 1492-1496, doi: 10.1126/science.1218091.
26. Fraikin, G. Ya. (2018) Signaling mechanisms regulating diverse plant cell responses to UVB radiation, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 787-794, doi: 10.1134/S0006297918070027.
27. Rockwell, N. C., Shang, L., Martin, S. S., and Lagarias, J. C. (2009) Distinct classes of red/far-red photochemistry within the phytochrome superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6123-6127, doi: 10.1073/pnas.0902370106.
28. Schwinn, K., Ferre, N., and Huix-Rotllant, M. (2020) UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 12447-12455, doi: 10.1039/d0cp01714k.
29. Fraikin, G. Ya. (2022) Photosensory and signaling properties of cryptochromes, *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.*, **77**, 54-63, doi: 10.3103/S0096392522020031.
30. Ahmad, M., and Cashmore, A. R. (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor, *Nature*, **366**, 162-166, doi: 10.1038/366162a0.
31. Sancar, A. (2004) Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors, *Adv. Protein Chem.*, **69**, 73-100, doi: 10.1016/S0065-3233(04)69003-6.
32. Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., and Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals, *Science*, **284**, 760-765, doi: 10.1126/science.284.5415.760.
33. Muller, M., and Carell, T. (2009) Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 277-285, doi: 10.1016/j.sbi.2009.05.003.
34. Zoltowski, B. D. (2015) Resolving cryptic aspects of cryptochrome signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 8811-8812, doi: 10.1073/pnas.1511092112.
35. Takahashi, J. S. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 164-179, doi: 10.1038/nrg.2016.150.
36. Wu, G., and Spalding, E. P. (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18813-18818, doi: 10.1073/pnas.0705082104.
37. Yu, X., Klejnot, J., Zhao, X., Shalitin, D., Maymon, M., Yang, H., Lee, J., Liu, X., Lopez, J., and Lin, C. (2007) *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its post-translational life cycle in the nucleus, *Plant Cell*, **19**, 3146-3156, doi: 10.1105/tpc.107.053017.
38. Pooam, M., Arthaut, L.-D., Burdick, D., Link, J., Martino, C. F., and Ahmad, M. (2019) Magnetic sensitivity mediated by the *Arabidopsis* blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark, *Planta*, **249**, 319-332, doi: 10.1007/s00425-018-3002-y.
39. Zoltowski, B. D., Chelliah, Y., Wickramaratne, A., Jarecha, L., Karki, N., Xu, W., Mouritsen, H., Hore, P. J., Hibbs, R. E., Green, C. B., and Takahashi, J. S. (2019) Chemical and structural analysis of a photoactive vertebrate cryptochrome from pigeon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 19449-19457, doi: 10.1073/pnas.1907875116.
40. Petersen, J., Rredhi, A., Szyttenholm, J., Oldemeyer, S., Kottke, T., and Mittag, M. (2021) The world of algae reveals a broad variety of cryptochrome properties and functions, *Front. Plant Sci.*, **12**, 748760, doi: 10.3389/fpls.2021.766509.
41. Palayam, M., Ganapathy, J., Guercio, A. M., Tal, L., Deck, S. L., and Shabek, K. N. (2021) Structural insights into photoactivation of plant cryptochrome-2, *Commun. Biol.*, **4**, 28, doi: 10.1038/s42003-020-01531-x.
42. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.-O., van der Horst, G. T., Batschauer, A., and Ahmad, M. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 335-364, doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103759.
43. Ozturk, N. (2017) Phylogenetic and functional classification of the photolyase/cryptochrome family, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 1-22, doi: 10.1111/php.12676.
44. Zhang, M., Wang, L., and Zhong, D. (2017) Photolyase: dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair, *Arch. Biochem. Biophys.*, **632**, 158-174, doi: 10.1016/j.abb.2017.08.007.
45. Bayram, O., Braus, G. H., Fischer, R., and Rodriguez-Romero, J. (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulands* photosensory systems, *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 900-908, doi: 10.1016/j.fgb.2010.05.008.
46. Konig, S., Juhas, M., Jager, S., Kottke, T., and Buchel, C. (2017) The cryptochrome-photolyase protein family in diatoms, *J. Plant Physiol.*, **217**, 15-19, doi: 10.1016/j.plph.2017.06.015.
47. Kottke, T., Oldemeyer, S., Wenzel, S., Zou, Y., and Mittag, M. (2017) Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions, *J. Plant Physiol.*, **217**, 4-14, doi: 10.1016/j.plph.2017.05.021.
48. Michael, A. K., Fribourgh, J. L., Van Gelder, R. N., and Partch, C. L. (2017) Animal cryptochromes: divergent roles in light perception, circadian timekeeping

and beyond, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 128-140, doi: 10.1111/php.12677.

49. Oldemeyer, S., Franz, S., Wenzel, S., Essen, L.-O., Mittag, M., and Kottke, T. (2016) Essential role of an unusual long-lived tyrosil radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome aCRY, *J. Biol. Chem.*, **291**, 14062-14071, doi: 10.1074/jbc.M116.726976.
50. Paulus, B., Bajzath, C., Melin, F., Heidinger, L., Kromm, V., Herkersdorf, C., Benz, U., Mann, L., Stehle, P., Hellwig, P., Weber, S., and Schleicher, E. (2015) Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states, *FEBS J.*, **282**, 3175-3189, doi: 10.1111/febs.13299.
51. Zoltowski, B. D., Vaidya, A. T., Top, D., Widom, J., Young, M. W., and Crane, B. R. (2011) Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome, *Nature*, **480**, 396-399, doi: 10.1038/nature10618.
52. Sancar, A. (2008) Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32153-32157, doi: 10.1074/jbc.R800052200.
53. Franz, S., Ignatz, E., Wenzel, S., Zielosko, H., Putu, E., Maestre-Reyna, M., Tsai, M.-D., Yamomoto, J., Mittag, M., and Essen, L.-O. (2018) Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 8010-8022, doi: 10.1093/nar/gky621.
54. Hense, A., Herman, E., Oldemeyer, S., and Kottke, T. (2015) Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome, *J. Biol. Chem.*, **290**, 1743-1751, doi: 10.1074/jbc.M114.606327.
55. Lacombat, F., Espagne, A., Dozova, N., Plaza, P., Muller, P., Brettel, K., Franz-Badur, S., and Essen, L.-O. (2019) Ultrafast oxidation of a tyrosine by proton-coupled electron transfer promotes light activation of an animal-like cryptochrome, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 13394-13409, doi: 10.1021/jacs.9b03680.
56. Oldemeyer, S., Haddat, A. Z., and Fleming, G. R. (2020) Interconnection of the antenna pigment 8-HDF and flavin facilitates red-light reception in bifunctional animal-like cryptochrome, *Biochemistry*, **59**, 594-604, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00875.
57. Goett-Zink, L., and Kottke, T. (2021) Plant cryptochromes illuminated: a spectroscopic perspective on the mechanism, *Front. Chem.*, **9**, 780199, doi: 10.3389/fchem.2021.780199.
58. Thoing, C., Oldemeyer, S., and Kottke, T. (2015) Microsecond deprotonation of aspartic acid and response of the α/β subdomain precede C-terminal signaling in the blue light sensor plant cryptochrome, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 5990-5999, doi: 10.1021/jacs.5b01404.
59. Herbel, V., Orth, C., Wenzel, R., Ahmad, M., Bittl, R., and Batschauer, A. (2013) Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states *in vivo*, *Plant J.*, **74**, 583-592, doi: 10.1111/tpj.12144.
60. Muller, P., and Ahmad, M. (2011) Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21033-21040, doi: 10.1074/jbc.M111.228940.
61. Goett-Zink, L., Toschke, A. L., Petersen, J., Mittag, M., and Kottke, T. (2021) C-terminal extension of plant cryptochrome dissociates from the β-sheet of the flavin-binding domain, *J. Phys. Chem. Lett.*, **12**, 5558-5563, doi: 10.1021/acs.jpclett.1c00844.
62. Liu, Q., Su, T., He, W., Ren, H., Liu, S., Chen, Y., Gao, L., Hu, X., Lu, H., Cao, S., Huang, Y., Wang, X., Wang, Q., and Lin, C. (2020) Photooligomerization determines photosensitivity and photoreactivity of plant cryptochromes, *Mol. Plant.*, **13**, 398-413, doi: 10.1016/j.molp.2020.01.002.
63. Yang, Z., Liu, B., Su, J., Liao, J., Lin, C., and Oka, Y. (2017) Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 112-127, doi: 10.1111/php.12663.
64. Wang, Q., and Lin, C. (2020) A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 401-403, doi: 10.1038/s41594-020-0432-6.
65. Gao, J., Wang, X., Zhang, M., Bian, M., Deng, W., Zuo, Z., Yang, Z., Zhong, D., and Lin, C. (2015) Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of *Arabidopsis* CRY1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9135-9140, doi: 10.1073/pnas.1504404112.
66. Liu, H., Su, T., He, W., Wang, G., and Lin, C. (2020) The universally conserved residues are not universally required for stable protein expression or functions of cryptochromes, *Mol. Biol. Evol.*, **37**, 327-340, doi: 10.1093/molbev/msz217.
67. Shao, K., Zhang, X., Li, X., Hao, Y., Huang, X., Ma, M., Zhang, M., Yu, F., Liu, H., and Zhang, P. (2020) The oligomeric structures of plant cryptochromes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 480-488, doi: 10.1038/s41594-020-0420-x.
68. Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Gu, L., Koshizumi, T., Yang, Z., Yang, L., Liu, Q., Liu, W., Han, Y. J., Kim, J. I., Liu, B., Wohlschlegel, J. A., Matsui, M., Oka, Y., and Lin, C. (2016) Photoactivation and inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2, *Science*, **354**, 343-347, doi: 10.1126/science.aaf9030.
69. Ma, L., Wang, X., Guan, Z., Wang, L., Wang, Y., Zheng, L., Gong, Z., Shen, C., Wang, J., Zhang, D., Liu, Z., and Yin, P. (2020) Structural insight into BIC-mediated inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 472-479, doi: 10.1038/s41594-020-0410-z.
70. Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D., and Lin, C. (2008) Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral

initiation in *Arabidopsis*, *Science*, **322**, 1535-1539, doi: 10.1126/science.1163927.

71. Liu, Y., Li, X., Li, K., Lin, H., and Lin, C. (2013) Multiple bHLH proteins form heterodimers to mediate CRY2-dependent regulation of flowering-time in *Arabidopsis*, *PLoS Genet.*, **9**, e1003861, doi: 10.1371/journal.pgen.1003861.
72. Liu, Y., Li, X., Ma, D., Chen, Z., Wang, J.-W., and Liu, H. (2018) CIB and CO interact to mediate CRY2-dependent regulation of flowering, *EMBO Rep.*, **19**, e45762, doi: 10.15252/embr.2018.45762.
73. Ma, D., Li, X., Guo, Y., Chu, J., Fang, S., Yan, C., Noel, J. P., and Liu, H. (2016) Cryptochrome 1 interacts with PIFs to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 224-229, doi: 10.1073/pnas.1511437113.
74. Pedmale, U. V., Huang, S. C., Zander, M., Cole, B. J., Herzel, J., Nery, J. R., and Ecker, J. R. (2016) Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light, *Cell*, **164**, 233-245, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.018.
75. Ni, W., Xu, S.-L., Gonzalez-Grandio, E., Chalkley, R. J., Huhmer, A. F. R., Burlingame, A. L., Wang, Z.-Y., and Qual, P. H. (2017) PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3, *Nat. Commun.*, **8**, 15236, doi: 10.1038/ncomms15236.
76. Castillon, A., Shen, H., and Huq, E. (2009) Blue light induces degradation of the negative regulator phytochrome interacting factor 1 to promote photomorphogenic development of Arabidopsis seedlings, *Genetics*, **182**, 161-171, doi: 10.1534/genetics.108.099887.
77. Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T. C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G. C., and Lin, C. (2002) Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation, *Nature*, **417**, 763-767, doi: 10.1038/nature00815.
78. Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T., and Lin, C. (2003) Blue-light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1, *Plant Cell*, **15**, 2421-2429, doi: 10.1105/tpc.013011.
79. Weidler, G., zur Oven-Krockhaus, S., Heunemann, M., Orth, C., Schleifenbaum, F., Harter, K., Hoecker, U., and Batschauer, A. (2012) Degradation of *Arabidopsis* CRY2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A, *Plant Cell*, **24**, 2610-2623, doi: 10.1105/tpc.112.098210.
80. Liu, Q., Wang, Q., Liu, B., Wang, W., Wang, X., Park, J., Yang, Z., Du, X., Bian, M., and Lin, C. (2016) The blue-light-dependent polyubiquitination and degradation of Arabidopsis cryptochrome 2 requires multiple E3 ubiquitin ligases, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 2175-2186, doi: 10.1093/pcp/pcw134.
81. Liu, Q., Wang, Q., Deng, W., Wang, X., Piao, M., Cai, D., Li, Y., Barshop, W. D., Yu, X., Zhou, T., Liu, B., Oka, Y., Wohlschlegel, J., Zuo, Z., and Lin, C. (2017) Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2, *Nat. Commun.*, **8**, 15234, doi: 10.1038/ncomms15234.
82. Wang, H., Ma, L. G., Li, G. M., Zhao, H. Y., and Deng, X. W. (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development, *Science*, **294**, 154-158, doi: 10.1126/science.1063630.
83. Yang, H.-Q., Tang, R.-H., and Cashmore, A. R. (2001) The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1, *Plant Cell*, **13**, 2573-2587, doi: 10.1105/tpc.010367.
84. Ponnu, J. (2020) Molecular mechanisms suppressing COP1/SPA E3 ubiquitin ligase activity in blue light, *Physiol. Plant*, **169**, 418-429, doi: 10.1111/ppl.13103.
85. Heijde, M., and Ulm, R. (2012) UV-B photoreceptor-mediated signaling in plants, *Trends Plant Sci.*, **17**, 230-237, doi: 10.1016/j.tplants.2012.01.007.
86. Hoecker, U. (2017) The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **37**, 63-69, doi: 10.1016/j.pbi.2017.03.015.
87. Podolec, R., and Ulm, R. (2018) Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **45**, 18-25, doi: 10.1016/j.pbi.2018.04.018.
88. Paik, I., Chen, F., Ngoc Pham, V., Zhu, L., Kim, J. I., and Huq, E. (2019) A phyB-PIF1-SPA1 kinase regulatory complex promotes photomorphogenesis in Arabidopsis, *Nat. Commun.*, **10**, 4216, doi: 10.1038/s41467-019-12110-y.
89. Wang, W., Paik, I., Kim, J., Hou, X., Sung, S., and Huq, E. (2021) Direct phosphorylation of HY5 by SPA kinases to regulate photomorphogenesis in Arabidopsis, *New Phytol.*, **230**, 2311-2326, doi: 10.1111/nph.17332.
90. Ponnu, J., and Hoecker, U. (2021) Illuminating the COP1/SPA ubiquitin ligase: fresh insight into its structure and functions during plant photomorphogenesis, *Front. Plant Sci.*, **12**, 662793, doi: 10.3389/fpls.2021.662793.
91. Balzerowicz, M., Kemer, K., Schenkel, C., and Hoecker, U. (2017) SPA proteins affect the sub-cellular localization of COP1 in the COP1/SPA ubiquitin ligase complex during photomorphogenesis, *Plant Physiol.*, **174**, 1314-1321, doi: 10.1104/pp.17.00488.
92. Kerner, K., Nagano, S., Lubbe, A., and Hoecker, U. (2021) Functional comparison of the WD-repeat domains of SPA1 and COP1 in suppression of photomorphogenesis, *Plant Cell Environ.*, **44**, 3273-3282, doi: 10.1111/pce.14128.
93. Pacin, M., Legris, M., and Casal, J. J. (2014) Rapid decline in nuclear constitutive photomorphogenesis 1 abundance anticipates the stabilization of its target ELONGATED hypocotyl 5 in the light, *Plant Physiol.*, **164**, 1134-1138, doi: 10.1104/pp.113.234245.
94. Lian, H. L., He, S. B., Zhang, Y. C., Zhu, D. M., Zhang, J. Y., Jia, K. P., San, S. X., Li, L., and Yang, H. Q.

(2011) Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism, *Genes Dev.*, **25**, 1023-1028, doi: 10.1101/gad.2025111.
95. Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., and Lin, C. (2011) *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light, *Genes Dev.*, **25**, 1029-1034, doi: 10.1101/gad.2025011.
96. Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., and Lin, C. (2011) Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis, *Curr. Biol.*, **21**, 841-847, doi: 10.1016/j.cub.2011.03.048.
97. Holtkotte, X., Ponnu, J., Ahmad, M., and Hoecker, U. (2017) The blue light-induced interaction of cryptochrome 1 with COP1 requires SPA proteins during Arabidopsis light signaling, *PLoS Genet.*, **13**, e1007044, doi: 10.1371/journal.pgen.1007044.
98. Lau, K., Podolec, R., Chappuis, R., Ulm, R., and Hothorn, M. (2019) Plant photoreceptors and their signaling components compete for COP1 binding via VP peptide motifs, *EMBO J.*, **38**, e102140, doi: 10.15252/embj.2019102140.
99. Ponnu, J., Riedel, T., Penner, E., Schrader, A., and Hoecker, U. (2019) Cryptochrome 2 competes with COP1-substrates to repress COP1 ligase activity during *Arabidopsis* photomorphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 27133-27141, doi: 10.1073/pnas.1909181116.

MOLECULAR BASES OF SIGNALING PROCESSES REGULATED BY CRYPTOCHROME SENSORY PHOTORECEPTORS IN PLANTS

Review

G. Ya. Fraikin*, N. S. Belenikina, and A. B. Rubin

Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: Gfraikin@yandex.ru

The blue-light sensors cryptochromes compose the widespread class of flavoprotein photoreceptors, regulating in plants signaling processes underlying their development, growth, and metabolism. In several algae cryptochromes may act not only as sensory photoreceptors but also as photolyases, catalyzing the repair of UV-induced DNA lesions. Cryptochromes bind FAD as the chromophore in the photolyase homologous region (PHR) domain and contain the cryptochrome C-terminal extension (CCE), which lacks in photolyases. Photosensory process in cryptochrome is initiated by photochemical chromophore conversions, including the formation of FAD redox forms. In a state with the chromophore reduced to neutral radical ($FADH^{\cdot}$), photoreceptory protein undergoes phosphorylation, conformational changes, and disengagement of the PHR domain and CCE with the subsequent formation of oligomers of cryptochrome molecules. Photooligomerization is a structural basis of functional activity of cryptochromes, which determines the formation of their complexes with variety of signaling proteins, including transcriptional factors and transcription regulators. Interactions in such complexes change the protein signaling activity, leading to gene expression regulation and plant photomorphogenesis. In recent years, multiple papers, reporting novel, more detailed information about molecular mechanisms of above-mentioned processes were published. The present review largely focuses on the analysis of data contained in these publications, particularly regarding structural aspects of cryptochrome transitions into photoactivated states and regulatory signaling processes mediated by cryptochrome photoreceptors in plants.

Keywords: cryptochrome photoreceptors, FAD chromophore, photosensory process, photo oligomerization, signaling proteins and mechanisms, light-responsive gene regulation

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 962 – 972

УДК 547.857.7; 576.32/.36; 577.152.2

ПРИРОДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГУАНИНА ОКАЗЫВАЮТ PARP-ИНГИБИТОРНОЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

© 2023 С.И. Шрам[1]*, Т.А. Щербакова[2], Т.В. Абрамова[3], Э.Ц. Барадиева[1], А.С. Ефремова[4], М.С. Смирновская[5], В.Н. Сильников[3], В.К. Швядас[2,6], Д.К. Нилов[2]*

[1] *Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия; электронная почта: shram-si.img@yandex.ru*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119992 Москва, Россия; электронная почта: nilovdm@gmail.com*

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

[4] *Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, 115522 Москва, Россия*

[5] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия*

[6] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 13.12.2022
После доработки 27.03.2023
Принята к публикации 27.03.2023

Ингибиторы поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARP) человека рассматриваются в качестве перспективных агентов для лечения сердечно-сосудистых, неврологических и других заболеваний, сопровождающихся воспалением и окислительным стрессом. Ранее была продемонстрирована способность природных соединений 7-метилгуанина (7mGua) и 8-гидрокси-7-метилгуанина (8h7mGua) подавлять активность рекомбинантного белка PARP. В представленной работе мы исследовали возможность PARP-ингибиторного и цитопротекторного действия 7mGua и 8h7mGua в отношении культур недифференцированных и дифференцированных кардиомиобластов крысы H9c2. Установлено, что 7mGua и 8h7mGua быстро проникают в клетки и эффективно подавляют стимулированную H_2O_2 активацию PARP (IC_{50} = 270 и 55 мкМ соответственно). Выраженное цитопротекторное действие 7mGua и 8h7mGua показано на клеточной модели окислительного стресса, причём 8h7mGua превзошёл по эффективности классический ингибитор PARP 3-аминобензамид. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки ингибиторов PARP на основе производных гуанина и их тестирования в отношении моделей ишемия-реперфузионного повреждения тканей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 7-метилгуанин, 8-гидрокси-7-метилгуанин, поли(ADP-рибозо)полимераза, ингибитор, кардиомиоциты, окислительный стресс, цитопротекторное действие.

DOI: 10.31857/S0320972523060064, **EDN:** EFCJHN

ВВЕДЕНИЕ

Природные соединения 7-метилгуанин (7mGua) и 8-гидрокси-7-метилгуанин (8h7mGua, рис. 1) являются метаболитами нуклеиновых кислот и в малом количестве обнаружены в крови и моче человека [1–6]. 7mGua образуется при деградации ДНК и матричной РНК, а 8h7mGua является продуктом окисления 7mGua [7–10]. Ранее мы показали, что данные метаболиты ингибируют фермент поли(ADP-рибозо)полимеразу (PARP), взаимодействуя

Принятые сокращения: 3-АВ – 3-аминобензамид; 7mGua – 7-метилгуанин; 8h7mGua – 8-гидрокси-7-метилгуанин; PAR – поли(ADP-рибоза); PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза.

* Адресат для корреспонденции.

с остатками глицина и тирозина на участке связывания субстрата NAD^+. Ингибиторная способность была продемонстрирована в различных экспериментах с очищенным рекомбинантным ферментом, а также с помощью молекулярного моделирования [11–14].

PARP активируется при воздействии на клетку стрессовых факторов, вызывающих повреждение ДНК, и осуществляет синтез отрицательно заряженной поли(ADP-рибозы) (PAR), выполняющей сигнальные функции [15–19]. PARP играет важную роль в поддержании стабильности генома и регуляции экспрессии генов, однако её повышенная активность может иметь негативные последствия [20–22]. Так, при ишемии/реперфузии тканей наблюдается массированное повреждение ДНК, сопровождающееся сверхактивацией PARP. Это приводит к резкому падению уровня NAD^+ и ATP, индукции экспрессии провоспалительных генов и запуску механизмов клеточной гибели [23–26].

Синтетические ингибиторы PARP олапариб, рукапариб и нирапариб применяются для подавления репарации ДНК в терапии онкологических заболеваний [27–29], однако область возможного применения ингибиторов PARP гораздо шире. Известно, что PARP вовлечена в механизмы клеточной гибели при заболеваниях сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, дыхательной и других систем организма [30–34]. Патогенез этих заболеваний, как правило, связан с развитием острого или хронического окислительного стресса и воспаления. На различных моделях *in vivo* продемонстрировано терапевтическое действие ингибиторов PARP при ишемия-реперфузионном повреждении тканей, при осложнениях сахарного диабета, травмах головного мозга, артритах, воспалительных заболеваниях кишечника и септическом шоке [35–37].

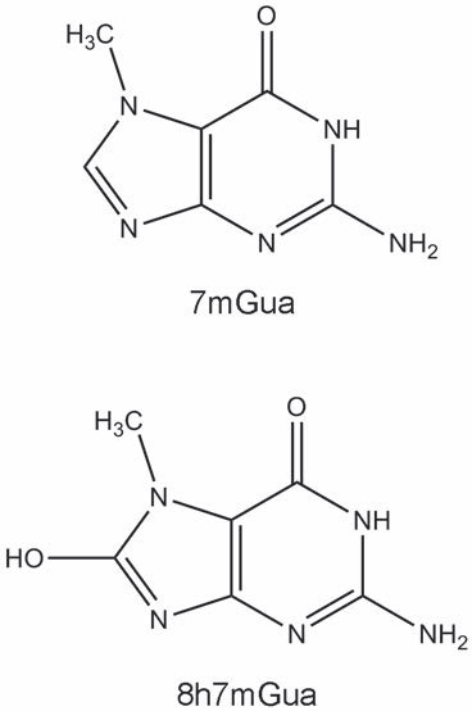

Рис. 1. Химические структуры природных пуринов 7mGua и 8h7mGua

Широкое использование синтетических ингибиторов PARP затруднено ввиду вызываемых ими серьёзных побочных эффектов [38–40], поэтому в данном контексте значительный интерес могут представлять природные соединения, такие как 7mGua и 8h7mGua. В частности, проведённое нами токсикологическое исследование 7mGua продемонстрировало его безопасность при пероральном введении мышам в дозе 50 мг/кг, а также отсутствие канцерогенного действия в ряде доклинических тестов [41]. В представленной работе впервые изучены PARP-ингибиторные и цитопротекторные свойства природных пуринов 7mGua и 8h7mGua на клеточной модели повреждения кардиомиоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ингибиторы PARP 3-аминобензамид (3-AB) и 7mGua, приобретённые в компании «Sigma-Aldrich» (США), а также 8h7mGua, который синтезировали по описанной ранее методике [13]. Также использовали среды и реагенты для культивирования клеток («ПанЭко», Россия), эмбриональную сыворотку телёнка («HyClone», США), трансретиноевую кислоту («ICN», США), флуоресцентные красители Хёхст 33258 («Sigma-Aldrich»), Кальцеин АМ и Гомодимер этидия III («Biotium», США). Кардиомиобласты эмбриона крысы H9c2 были получены из коллекции клеточных культур ATCC («LGC Standards», Великобритания).

Клетки H9c2 культивировали в среде DMEM, содержащей эмбриональную сыворотку телёнка (10%, *v/v*), L-глутамин (2 мМ) и смесь антибиотиков пенициллин/стрептомицин, при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. При проведении исследований на недифференцированных кардиомиобластах культуры растили в течение 24–48 ч в среде с 10% сыворотки. В экспериментах с дифференцированными клетками культуры растили 48 ч в среде с 10% сыворотки, а затем 72 ч в среде, содержащей 1% (*v/v*) сыворотки и транс-ретиноевую кислоту (45 нг/мл),

для стимуляции дифференцировки в миоциты. Все эксперименты с клеточными культурами проводили в 4- или 24-луночных пластиковых планшетах («SPL», Республика Корея), поверхность которых предварительно покрывали желатином.

Анализ степени ингибирования PARP исследуемыми веществами в живых клетках проводили по описанной ранее методике [42]. Клетки H9c2 (недифференцированные или дифференцированные) преинкубировали с исследуемым веществом в течение определённого времени в среде DMEM с 1% сыворотки, затем вносили H_2O_2 до конечной концентрации 1 мМ, и через 5 или 10 мин клетки фиксировали охлаждённым до 0 °C метанолом. Содержание PAR в клетках определяли иммунофлуоресцентным анализом с использованием первичных моноклональных антител к PAR (клон 10-H) («Santa Cruz Biotech.», США) и вторичных антител, конъюгированных с Alexa 488 («Abcam», Великобритания). Ядра клеток контрастировали Хёхстом 33258. Для детектирования сердечного тропонина T использовали антитела, конъюгированные с Alexa 555 («Хайтест», Россия).

Для анализа цитопротекторного действия веществ в условиях острого окислительного стресса клетки H9c2 (недифференцированные или дифференцированные) преинкубировали с тестируемым веществом в среде DMEM с 1% сыворотки в течение 1 ч, затем вносили H_2O_2 до конечной концентрации 1 мМ и помещали в CO_2-инкубатор. Через 30 мин клетки отмывали от H_2O_2 и продолжали инкубировать в среде с тестируемым веществом ещё 24 ч, после чего производили прижизненное окрашивание клеток Гомодимером этидия III, Кальцеином AM и Хёхстом 33258.

Во всех экспериментах получали и анализировали образцы из 3–5 независимо выращенных культур. При определении остаточной активности PARP анализировали 400–800 ядер в 4–5 случайно выбранных полях лунки планшета (объектив 4×), а при определении плотности культуры и конфлюентности – от 40 до 80% общей площади лунки (объектив 2,5×). При проведении попарного сравнения использовали *t*-критерий Стьюдента, а в случае множественного сравнения – однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный анализ Бонферрони. Полученные количественные данные представлены в виде «среднее значение ± стандартное отклонение».

Анализ интенсивности флуоресценции в препаратах живых и фиксированных клеток проводили с использованием имиджера Lion-Heart FX («Biotek», США) и конфокального микроскопа LSM 900 («Carl Zeiss», Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot («Systat Software Inc.», США) и Statistica («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на культурах как недифференцированных, так и дифференцированных клеток – кардиомиобластов и кардиомиоцитов крысы H9c2 (рис. 2). В процессе дифференцировки клеток H9c2 наблюдали образование многоядерных синцитий-подобных структур (рис. 2, *г*) и увеличение уровня тканеспецифического маркерного белка тропонина T (рис. 2, *е*). Проведённые предварительные исследования не выявили какого-либо влияния длительной инкубации (120 ч) с 7mGua или 8h7mGua в концентрации 300 мкМ на морфологию и показатели жизнеспособности клеток (рис. S1, рис, S2, таблица S1 Приложения), что свидетельствует о низкой цитотоксичности данных соединений.

Исследование на недифференцированных клетках H9c2 показало, что 7mGua и 8h7mGua подавляют активность PARP, но 8h7mGua обладает более выраженным действием, сопоставимым с классическим ингибитором PARP 3-AB (рис. 3). В концентрации 450 мкМ 8h7mGua практически полностью подавляет ферментативную активность, в то время как 7mGua – примерно на 70% (рис. 3, *в*). Анализ дозовых зависимостей также демонстрирует более высокую эффективность 8h7mGua в сравнении с 7mGua: расчётные значения IC_{50} для этих соединений оказались равными 55 и 270 мкМ соответственно (рис. 3, *г*). Полученные данные хорошо согласуются с результатами экспериментов с рекомбинантной PARP человека [13], в которых 7mGua и 8h7mGua проявляли ингибиторное действие в диапазоне концентраций 10^{-5}–10^{-4} М, и значения IC_{50} для 8h7mGua были в среднем в 4 раза ниже значений для 7mGua.

В аналогичном исследовании на дифференцированных клетках H9c2 показано, что эффективность PARP-ингибиторного действия 8h7mGua близка к наблюдаемой с недифференцированными клетками: расчётное значение IC_{50} оказалось равным 43 мкМ (рис. 4). Можно предположить, что рассматриваемые варианты фенотипа клеток H9c2 существенно не отличаются как по внутриклеточной концентрации NAD^+, так и по проницаемости плазматической мембраны для 8h7mGua.

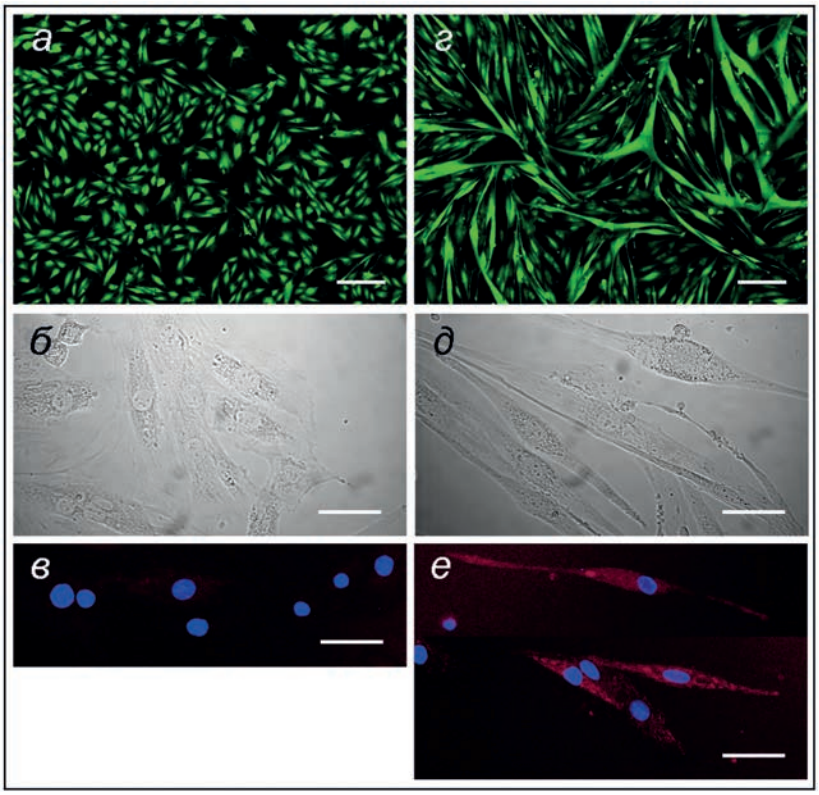

Рис. 2. Изменение морфологии и экспрессии сердечного маркера при дифференцировке клеток H9c2. *а–в* – Культуры недифференцированных клеток. *г–е* – Культуры дифференцированных клеток. *а*, *г* – Клетки после прижизненного окрашивания Кальцеином АМ (зелёный цвет). *б*, *д* – Морфология клеток при съёмке в режиме светлого поля. *в*, *е* – Иммунофлуоресцентный анализ сердечного тропонина Т (красный цвет). Длина масштабной планки соответствует 250 мкм (*а*, *г*) или 50 мкм (*б*, *в*, *д*, *е*)

При сравнении 1- и 4-часовой преинкубации клеток H9c2 с производными гуанина не было выявлено существенных различий в ингибировании PARP (рис. 3, *в*). Однако при более детальном исследовании было обнаружено наличие чёткой и хорошо воспроизводимой зависимости степени ингибирования PARP от времени преинкубации с 7mGua в интервале 0,5–4 ч (рис. 5, *а* и *б*). В диапазоне времени 0,5–3 ч наблюдали некоторое снижение степени ингибирования PARP, а при увеличении времени преинкубации до 4 ч – небольшое усиление ингибирования. Наблюдаемый вид зависимости может быть обусловлен такими факторами, как наличие механизмов обратного транспорта 7mGua (ослабление действия) и превращение 7mGua в более активный метаболит 8h7mGua (усиление действия). Полученные данные также указывают на то, что 7mGua достаточно быстро проникает в клетку и выходит из неё. Эксперимент с отмывкой клеток от 7mGua показал, что для полного его удаления из клетки достаточно не более 10 мин (рис. 5, *в*). Полное восстановление активности PARP в клетках после их отмывки от 7mGua указывает на обратимый характер ингибирования данным соединением. Аналогичные данные были получены и для классического ингибитора PARP 3-AB (рис. 5, *г*).

Для моделирования острого окислительного стресса культуры клеток H9c2 подвергали 30-минутной инкубации в среде с H_2O_2 (1 мМ) и через 24 ч оценивали показатели, характеризующие степень повреждения клеток (рис. S3 Приложения). При этом предварительно было установлено, что PARP-ингибиторный эффект 7mGua, 8h7mGua и 3-AB на клетки сохраняется вплоть до 24 ч после их однократного внесения в среду (таблица S2 Приложения). В исследовании на культуре недифференцированных клеток H9c2 после воздействия H_2O_2 наблюдали катастрофическое снижение числа живых клеток (таблица). Внесение в среду культивирования 7mGua и 8h7mGua в концентрации 300 мкМ приводило к значительному увеличению числа выживших клеток. Оказалось, что наиболее сильным цитопротекторным действием обладает 8h7mGua (увеличение числа живых клеток более чем в 3 раза). Интересно, что 3-AB, взятый в концентрации 1000 мкМ, обеспечивающей полное подавление активности PARP, уступает по эффективности цитопротекторного действия 8h7mGua и соизмерим с 7mGua (таблица). Можно предположить, что

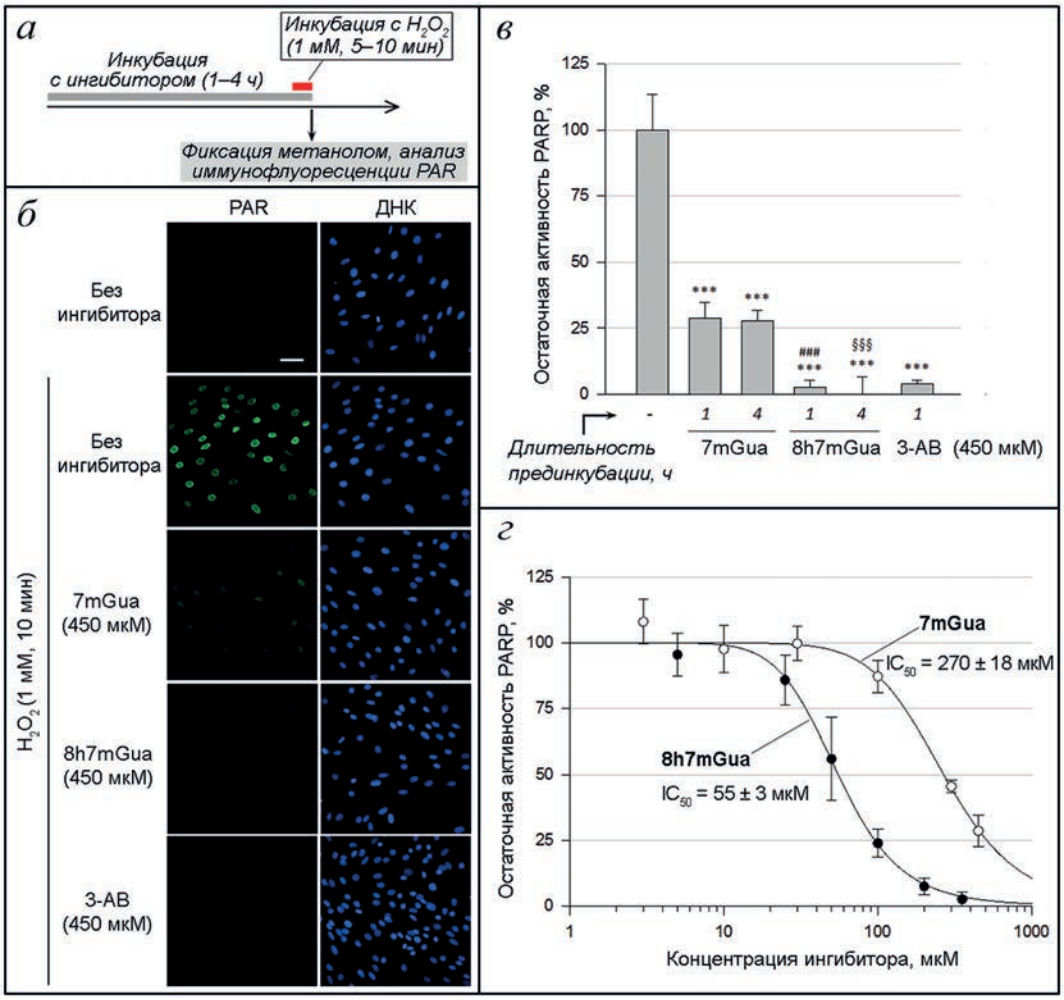

Рис. 3. Ингибирование PARP в присутствии 7mGua и 8h7mGua в недифференцированных клетках H9c2. *а* – Схема эксперимента. *б* – Выборочные микрофлуоресцентные снимки, полученные в ходе анализа. В качестве положительного контроля использован 3-AB. Длина масштабной планки соответствует 50 мкм. *в* – PARP-Ингибиторное действие тестируемых веществ в концентрации 450 мкМ при 1- и 4-часовой преинкубации. *г* – Сравнение дозовых зависимостей для 7mGua и 8h7mGua (длительность преинкубации клеток с веществами – 1 ч; инкубация с 1 мМ H_2O_2 – 5 мин). *** $p < 0{,}001$ относительно контроля (инкубация без тестируемых веществ). ### $p < 0{,}001$ относительно 1-часовой преинкубации клеток с 7mGua. §§§ $p < 0{,}001$ относительно 4-часовой преинкубации клеток с 7mGua

в данной модели действие производных гуанина обусловлено, наряду с ингибированием PARP, некоторыми дополнительными механизмами.

Дифференцированные клетки оказались более устойчивыми к повреждающему воздействию H_2O_2 по сравнению с недифференцированными, однако и в данном случае 7mGua и 8h7mGua увеличивали выживаемость клеток. При этом производные гуанина и 3-AB демонстрировали соизмеримое цитопротекторное действие (таблица). В культуре дифференцированных клеток невозможно произвести морфометрический анализ ввиду слияния клеток и многоядерности (см. рис. 2, *г*), поэтому в качестве количественного показателя для оценки выживаемости использовали конфлюентность – степень покрытия поверхности роста живыми клетками.

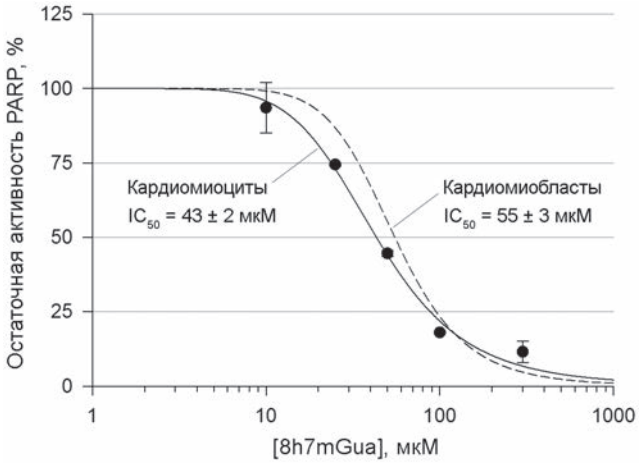

Рис. 4. Сравнение эффективности PARP-ингибиторного действия 8h7mGua в культурах дифференцированных и недифференцированных клеток H9c2

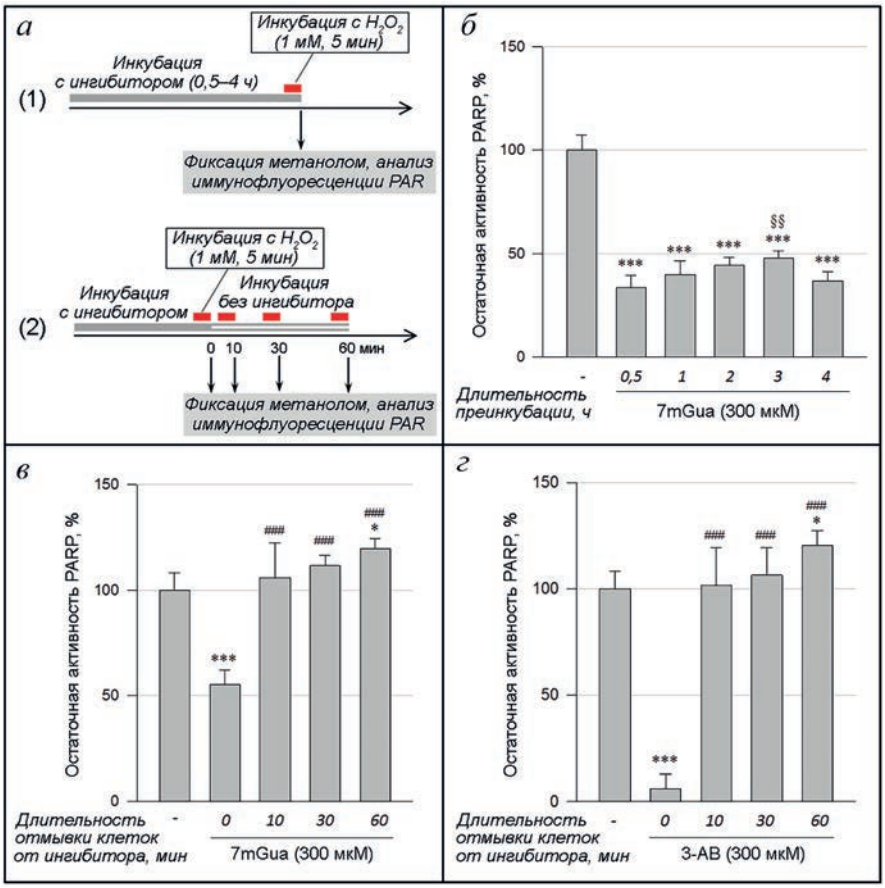

Рис. 5. Динамика PARP-ингибиторного действия 7mGua в недифференцированных клетках H9c2 при его внесении и удалении из среды культивирования. *а* – Схема экспериментов. *б* – Влияние длительности преинкубации клеток с 7mGua на степень ингибирования PARP. *в*, *г* – Восстановление активности PARP в клетках после отмывки от 7mGua и 3-AB; клетки предварительно выдерживали в среде с ингибиторами в течение 1 ч. * $p < 0,05$ относительно контроля. *** $p < 0,001$ относительно контроля. §§ $p < 0,01$ относительно длительности преинкубации 0,5 ч. $^{###}$ $p < 0,001$ относительно клеток без отмывки от ингибиторов (длительность отмывки 0 мин)

Влияние 7mGua и 8h7mGua на выживаемость клеток H9c2 в модели сильного окислительного стресса, вызванного воздействием H_2O_2

Тестируемое вещество	H_2O_2	Содержание живых клеток в культуре			
		Недифференцированные клетки		Дифференцированные клетки	
		N/см^2	p*	Конфлюентность, %	p*
– (Контроль 1)	–	13 204 ± 1862	< 0,001	81,3 ± 2,0	< 0,001
– (Контроль 2)	+	240 ± 55	–	47,4 ± 2,2	–
7mGua (300 мкМ)	+	617 ± 193	0,003	52,5 ± 1,8	0,003
8h7mGua (300 мкМ)	+	807 ± 159	< 0,001	57,7 ± 2,3	< 0,001
3-AB (1000 мкМ)	+	660 ± 182	0,002	56,1 ± 1,8	< 0,001

* Значения p относительно контроля 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было установлено, что 7mGua и его метаболит 8h7mGua конкурентно ингибируют рекомбинантную PARP человека (изоформа 1), причём более сильным ингибитором является 8h7mGua [13]. Хотя было известно о наличии PARP-ингибиторной активности у некоторых пуринов (преимущественно у метилированных производных ксантина) [43, 44],

мы показали, что 7mGua существенно превосходит по активности ближайший аналог 7-метилксантин [11].

Поскольку PARP имеет чёткую ядерную локализацию, её эффективные ингибиторы должны проникать через плазматическую мембрану и диффундировать в ядро, не подвергаясь при этом превращению в неактивные метаболиты. В представленной работе мы попытались выяснить, способны ли 7mGua и 8h7mGua подавлять активность PARP в живых клетках и проявлять цитопротекторные эффекты, свойственные ингибиторам PARP. В качестве объекта исследований была выбрана линия кардиомиобластов крысы H9c2. Особенностью данных клеток является возможность дифференцировки в кардиомиоцитоподобный фенотип. Дифференцированные клетки H9c2 по многим морфологическим, биохимическим и функциональным характеристикам сходны с кардиомиоцитами миокарда, хотя и не тождественны им (в частности, отсутствует способность к сокращению) [45–47].

Для оценки ингибиторного действия производных гуанина использовали предложенный ранее протокол, основанный на иммунофлуоресцентном анализе PAR после кратковременной обработки клеток высокими дозами H_2O_2 [42]. Пероксид водорода быстро проникает в клетку и при взаимодействии с Fe^{2+} превращается в гидроксильный радикал, способный вызывать повреждения ДНК (в частности, одноцепочечные разрывы, с которыми связывается PARP). Это приводит к быстрой активации PARP и синтезу PAR из клеточного NAD^+.

В результате было подтверждено ингибиторное действие 7mGua и 8h7mGua на клеточном уровне, а также обнаружена сложная зависимость степени ингибирования PARP от времени преинкубации, которая может быть обусловлена сочетанием процессов обратного транспорта и превращением 7mGua в более сильный ингибитор 8h7mGua. Известно, что частичное превращение 7mGua в 8h7mGua происходит под действием фермента ксантиноксидазы [10]. Вопросы транспорта 7mGua через плазматическую мембрану пока не изучались. В качестве возможных механизмов, наряду с пассивной диффузией, следует рассматривать белок-опосредованный транспорт с участием транспортёров нуклеозидов и азотистых оснований [48–50].

Патогенез заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, дыхательной и других систем сопряжён с активацией PARP, причём как сильной и транзиентной (например, при ишемия-реперфузионном повреждении тканей), так и умеренной и перманентной (например, при осложнениях сахарного диабета). Ингибиторы PARP способны оказывать цитопротекторное действие на животных и клеточных моделях таких заболеваний [33, 37, 51–53]. Для оценки цитопротекторной активности производных гуанина мы рассмотрели модель повреждения кардиомиоцитов в условиях острого окислительного стресса, имеющую отношение к ишемия-реперфузионному повреждению миокарда. Полученные данные свидетельствуют о способности 7mGua и 8h7mGua предотвращать гибель клеток при повреждающем воздействии. Интересно, что по наблюдаемому цитопротекторному эффекту 8h7mGua превосходит классический ингибитор PARP 3-AB, что может свидетельствовать о влиянии производных гуанина на дополнительные белковые мишени [54].

Таким образом, впервые на клеточном уровне исследованы PARP-ингибиторные и цитопротекторные свойства производных гуанина 7mGua и 8h7mGua. Эксперименты проведены на культурах недифференцированных и дифференцированных клеток линии H9c2. Показано, что оба соединения подавляют стимулированную H_2O_2 активацию PARP в клетке в диапазоне 10^{-5}–10^{-4} М. При этом 8h7mGua оказался в несколько раз более эффективным ингибитором по сравнению с 7mGua. При моделировании острого окислительного стресса, индуцированного 30-минутной обработкой клеток H_2O_2, 8h7mGua в концентрации 300 мкМ продемонстрировал цитопротекторное действие, превосходящее по эффективности классический ингибитор PARP 3-AB. Полученные данные свидетельствуют о возможности разработки новых лекарственных препаратов на основе 8h7mGua и других производных гуанина для лечения заболеваний, ассоциированных с воспалением, окислительным стрессом и повышенной активностью 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, Э.Ц. Барадиева, А.С. Ефремова, М.С. Смирновская – проведение экспериментов; В.Н. Сильников и В.К. Швядас – обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-08-01161 А) за исключением указанных далее работ. Синтез 8-гидрокси-7-метилгуа-

нина выполнен при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10072).

Благодарности. В работе использовано оборудование ЦКП «Центр клеточных и генных технологий» (НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ).

Конфликт интересов. Д.К. Нилов, С.И. Шрам, Т.А. Щербакова и В.К. Швядас являются авторами патентов на использование производных гуанина 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.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. I. Separation and identification, *J. Biol. Chem*., **224**, 407-422, doi: 10.1016/S0021-9258(18)65040-9.
2. Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation, *J. Biol. Chem*., **224**, 423-434, doi: 10.1016/S0021-9258(18)65041-0.
3. Weissmann, B., and Gutman, A. B. (1957) The identification of 6-succinoaminopurine and of 8-hydroxy-7-methylguanine as normal human urinary constituents, *J. Biol. Chem*., **229**, 239-250, doi: 10.1016/S0021-9258(18)70612-1.
4. Topp, H., Sander, G., Heller-Schöch, G., and Schöch, G. (1987) Determination of 7-methylguanine, N^2,N^2-dimethylguanosine, and pseudouridine in ultrafiltrated serum of healthy adults by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem*., **161**, 49-56, doi: 10.1016/0003-2697(87)90650-6.
5. Svoboda, P., and Kasai, H. (2004) Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents, *Anal. Biochem*., **334**, 239-250, doi: 10.1016/j.ab.2004.08.021.
6. Raćkowska, E., Bobrowska-Korczak, B., and Giebułtowicz, J. (2019) Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for determination of methylated nucleosides and nucleobases in urine, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*., **1128**, 121775, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121775.
7. Sander, G., Hülsemann, J., Topp, H., Heller-Schöch, G., and Schöch, G. (1986) Protein and RNA turnover in preterm infants and adults: a comparison based on urinary excretion of 3-methylhistidine and of modified one-way RNA catabolites, *Ann. Nutr. Metab*., **30**, 137-142, doi: 10.1159/000177186.
8. Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., Takahashi, K., Miyamoto, T., Kato, N., and Kasai, H. (2009) Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine, *Cancer Sci*., **100**, 715-721, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01088.x.
9. Litwack, M. D., and Weissmann, B. (1966) Source of urinary 8-hydroxy-7-methylguanine in man, *Biochemistry*, **5**, 3007-3012, doi: 10.1021/bi00873a033.
10. Skupp, S., and Ayvazian, J. H. (1969) Oxidation of 7-methylguanine by human xanthine oxidase, *J. Lab. Clin. Med*., **73**, 909-916.
11. Нилов Д. К., Тараров В. И., Куликов А. В., Захаренко А. Л., Гущина И. В., Михайлов С. Н., Лаврик О. И., Швядас В. К. (2016) Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120-128, doi: 10.32607/20758251-2016-8-2-108-115.
12. 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, doi: 10.3390/ijms21062159.
13. Кургина Т. А., Шрам С. И., Кутузов М. М., Абрамова Т. В., Щербакова 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(ADP-рибозо)полимеразу 1 человека, *Биохимия*, **87**, 794-803, doi: 10.31857/S0320972522060070.
14. 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, doi: 10.3390/cancers13061201.
15. 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.
16. 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, doi: 10.1101/gad.291518.116.
17. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and

regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827, doi: 10.1093/nar/gkz120.
18. Kamaletdinova, T., Fanaei-Kahrani, Z., and Wang, Z. Q. (2019) The enigmatic function of PARP1: from PARylation activity to PAR readers, *Cells*, **8**, 1625, doi: 10.3390/cells8121625.
19. 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, doi: 10.31857/S0320972520010091.
20. 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, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.11.007.
21. 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, doi: 10.3390/cells8091047.
22. Curtin, N. J., and Szabo, C. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 711-736, doi: 10.1038/s41573-020-0076-6.
23. Szabó, G., Liaudet, L., Hagl, S., and Szabó, C. (2004) Poly(ADP-ribose) polymerase activation in the reperfused myocardium, *Cardiovasc. Res.*, **61**, 471-480, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.029.
24. Woolley, S. M., Farivar, A. S., Naidu, B. V., Salzman, A., Szabo, C., Thomas, R., Fraga, C., and Mulligan, M. S. (2004) Role of poly (ADP) ribose synthetase in lung ischemia-reperfusion injury, *J. Heart Lung Transplant.*, **23**, 1290-1296, doi: 10.1016/j.healun.2003.08.036.
25. 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, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.021.
26. Fujikawa, D. G. (2015) The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **13**, 212-221, doi: 10.1016/j.csbj.2015.03.004.
27. Frampton, J. E. (2015) Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer, *BioDrugs*, **29**, 143-150, doi: 10.1007/s40259-015-0125-6.
28. Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., Sapino, A., and Valabrega, G. (2018) PARP inhibitors in ovarian cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **13**, 392-410, doi: 10.2174/1574892813666180305165256.
29. Zimmer, A. S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J. M. (2018) Update on PARP inhibitors in breast cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **19**, 21, doi: 10.1007/s11864-018-0540-2.
30. 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, doi: 10.1016/j.mam.2013.01.007.
31. Curtin, N. J., and Szabo, C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1217-1256, doi: 10.1016/j.mam.2013.01.006.
32. Henning, R. J., Bourgeois, M., and Harbison, R. D. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: Mechanisms of action and role in cardiovascular disorders, *Cardiovasc. Toxicol.*, **18**, 493-506, doi: 10.1007/s12012-018-9462-2.
33. 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, doi: 10.1111/bph.13748.
34. Liu, S., Luo, W., and Wang, Y. (2022) Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke, *J. Neurochem.*, **160**, 74-87, doi: 10.1111/jnc.15464.
35. 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, doi: 10.1111/j.1527-3466.2007.00018.x.
36. Tao, R., Kim, S. H., Honbo, N., Karliner, J. S., and Alano, C. C. (2010) Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **56**, 659-668, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181faeaf0.
37. Tiwari, P., Khan, H., Singh, T. G., and Grewal, A. K. (2022) Poly (ADP-ribose) polymerase: an overview of mechanistic approaches and therapeutic opportunities in the management of stroke, *Neurochem. Res.*, **47**, 1830-1852, doi: 10.1007/s11064-022-03595-z.
38. Ohmoto, A., and Yachida, S. (2017) Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions, *Onco Targets Ther.*, **10**, 5195-5208, doi: 10.2147/OTT.S139336.
39. Walsh, C. (2018) Targeted therapy for ovarian cancer: the rapidly evolving landscape of PARP inhibitor use, *Minerva Ginecol.*, **70**, 150-170, doi: 10.23736/S0026-4784.17.04152-1.
40. Jain, P. G., and Patel, B. D. (2019) Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents – a recent update, *Eur. J. Med. Chem.*, **165**, 198-215, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.024.
41. 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, doi: 10.3389/fphar.2022.842316.

42. Efremova, A. S., Zakharenko, A. L., Shram, S. I., Kulikova, I. V., Drenichev, M. S., Sukhanova, M. V., Khodyreva, S. N., Myasoedov, N. F., Lavrik, O. I., and Mikhailov, S. N. (2013) Disaccharide pyrimidine nucleosides and their derivatives: a novel group of cell-penetrating inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **32**, 510-528, doi: 10.1080/15257770.2013.827793.
43. Virág, L., and Szabó, C. (2001) Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death, *FASEB J.*, **15**, 99-107, doi: 10.1096/fj.00-0299com.
44. Geraets, L., Moonen, H. J., Wouters, E. F., Bast, A., and Hageman, G. J. (2006) Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations, *Biochem. Pharmacol.*, **72**, 902-910, doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.023.
45. Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., and Schultz, G. (1991) Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart, *Circ. Res.*, **69**, 1476-1486, doi: 10.1161/01.res.69.6.1476.
46. Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., and Oliveira, P. J. (2015) Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype, *PLoS One*, **10**, e0129303, doi: 10.1371/journal.pone.0129303.
47. Kankeu, C., Clarke, K., Van Haver, D., Gevaert, K., Impens, F., Dittrich, A., Roderick, H. L., Passante, E., and Huber, H. J. (2018) Quantitative proteomics and systems analysis of cultured H9C2 cardiomyoblasts during differentiation over time supports a "function follows form" model of differentiation, *Mol. Omics*, **14**, 181-196, doi: 10.1039/c8mo00036k.
48. Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, M. P., Larráyoz, I., Martínez-Picado, J., and Casado, F. J. (2005) Cell entry and export of nucleoside analogues, *Virus Res.*, **107**, 151-164, doi: 10.1016/j.virusres.2004.11.005.
49. Cano-Soldado, P., and Pastor-Anglada, M. (2012) Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition, *Med. Res. Rev.*, **32**, 428-457, doi: 10.1002/med.20221.
50. Inoue, K. (2017) Molecular basis of nucleobase transport systems in mammals, *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1130-1138, doi: 10.1248/bpb.b17-00374.
51. Zingarelli, B., Cuzzocrea, S., Zsengellér, Z., Salzman, A. L., and Szabó, C. (1997) Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, *Cardiovasc. Res.*, **36**, 205-215, doi: 10.1016/s0008-6363(97)00137-5.
52. Ilnytska, O., Lyzogubov, V. V., Stevens, M. J., Drel, V. R., Mashtalir, N., Pacher, P., Yorek, M. A., and Obrosova, I. G. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy, *Diabetes*, **55**, 1686-1694, doi: 10.2337/db06-0067.
53. Tas Hekimoglu, A., Toprak, G., Akkoc, H., Evliyaoglu, O., Tas, T., Kelle, I., and Colpan, L. (2014) Protective effect of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase in distant liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **18**, 34-38.
54. Пушкарев С. В., Винник В. А., Шаповалова И. В., Швядас В. К., Нилов Д. К. (2022) Моделирование структуры комплекса тРНК-гуанинтрансгликозилазы человека с 7-метилгуанином и выявление факторов, определяющих взаимодействие фермента с ингибиторами, *Биохимия*, **87**, 550-557, doi: 10.31857/S0320972522040078.

NATURAL GUANINE DERIVATIVES EXERT PARP-INHIBITORY AND CYTOPROTECTIVE EFFECTS IN A MODEL OF CARDIOMYOCYTE DAMAGE UNDER OXIDATIVE STRESS

S. I. Shram[1]*, T. A. Shcherbakova[2], T. V. Abramova[3], E. C. Baradieva[1], A. S. Efremova[4], M. S. Smirnovskaya[5], V. N. Silnikov[3], V. K. Švedas[2,6], and D. K. Nilov[2]*

[1] *Institute of Molecular Genetics, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: shram-si.img@yandex.ru*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, 119992 Moscow, Russia; e-mail: nilovdm@gmail.com*

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

[4] *Research Centre for Medical Genetics, 115522 Moscow, Russia*

[5] *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*
[6] *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

Inhibitors of human poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) are considered as promising agents for the treatment of cardiovascular, neurological, and other diseases accompanied by inflammation and oxidative stress. Previously, the ability of the natural compounds 7-methylguanine (7mGua) and 8-hydroxy-7-methylguanine (8h7mGua) to suppress the activity of the recombinant PARP protein was demonstrated. In the present work, we have investigated the possibility of PARP-inhibitory and cytoprotective action of 7mGua and 8h7mGua against rat cardiomyoblast cultures (undifferentiated and differentiated H9c2). It was found that 7mGua and 8h7mGua rapidly penetrate into cells and effectively suppress H_2O_2-stimulated PARP activation (IC_{50} = 270 and 55 μM, respectively). The pronounced cytoprotective effects of 7mGua and 8h7mGua were shown in a cellular model of oxidative stress, and 8h7mGua exceeded the classic PARP inhibitor 3-aminobenzamide for effectiveness. The obtained data indicate the prospects for the development of PARP inhibitors based on guanine derivatives and their testing on models of ischemia-reperfusion tissue damage.

Keywords: 7-methylguanine, 8-hydroxy-7-methylguanine, poly(ADP-ribose) polymerase, inhibitor, cardiomyocytes, oxidative stress, cytoprotection

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 973 – 983

УДК 577.22; 577.214.5

МНОЖЕСТВЕННЫЕ НЕКАНОНИЧЕСКИЕ СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ КАК ОДИН ИЗ ГЛАВНЫХ ФАКТОРОВ ОРГАНИЗАЦИИ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ РНК

© 2023 В.Г. Метелев[1], Е.Ф. Баулин[2], А.А. Богданов[1,3,4]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия*

[2] *Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ имени М.В. Келдыша РАН, 142290 Пущино, Россия*

[3] *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: bogdanov@belozersky.msu.ru*

[4] *Государственный научный центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 21.03.2023
После доработки 18.04.2023
Принята к публикации 20.04.2023

Межплоскостные (стэкинг) взаимодействия гетероциклических оснований нуклеотидных остатков (н.о.) РНК являются одним из важнейших факторов организации её вторичной и третичной структуры. Большая часть таких (канонических) взаимодействий осуществляется между непосредственными соседями в полинуклеотидных цепях РНК. Однако по мере накопления данных об атомных третичных структурах самых разнообразных РНК и их комплексов с белками стало ясно, что с помощью стэкинга оснований (неканонического) могут взаимодействовать н.о. РНК, не являющиеся соседями в их полинуклеотидных цепях и иногда разделённые в первичной структуре РНК десятками или сотнями н.о. В настоящей работе представлена исчерпывающая база данных о таких элементах и их окружении в макромолекулах природных и синтетических РНК. Они названы NA-BSE (nonadjacent base-stacking elements). Анализ этих данных показал, что формирующие NA-BSE н.о. составляют в среднем около четверти всех н.о. той или иной РНК и должны рассматриваться как полноценные мотивы в их третичной структуре. В работе проведена классификация NA-BSE по типам локализации в макромолекулах РНК. Показано, что структурообразующая роль NA-BSE состоит в компактном сворачивании однотяжевых петель РНК, в превращении двутяжевых и более сложноорганизованных петель в несовершенные спирали, а также в связывании удалённых в первичной и вторичной структуре районов РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стэкинг-взаимодействия, третичная структура РНК, рибосомные РНК, рибонуклеаза Р, РНК-мотивы.

DOI: 10.31857/S0320972523060076, **EDN:** EFLFMJ

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что макромолекулярная структура РНК определяет её функциональные свойства. И хотя общие принципы организации вторичной и третичной структуры одноцепочечных РНК были сформулированы Fresco et. al. [1] и Спириным [2] более 60 лет назад, сегодня мы всё ещё не можем, располагая только нуклеотидной последовательностью некой достаточно протяжённой РНК, достоверно предсказать её пространственную структуру.

За последние 20–25 лет в изучении макромолекулярной структуры РНК произошла настоящая революция: в руках исследователей оказались тысячи третичных структур разно-

Принятые сокращения: н.о. – нуклеотидные остатки; РНКаза Р – рибонуклеаза Р; BIE – base-intercalated element; BWE – base-waged element; DC – double-crossing; NA-BSE – nonadjacent base-stacking element.

* Адресат для корреспонденции.

образных природных РНК и их синтетических аналогов, полученных с атомным разрешением с помощью рентгеноструктурного анализа, криоэлектронной микроскопии или ЯМР-спектроскопии. Следует подчеркнуть, что многие из этих структур описывают детали пространственной организации макромолекул РНК в комплексе со специфическими белками, то есть в состоянии, близком к тому, в котором они находятся в клетке. Это особенно важно, поскольку пространственная структура свободной РНК, за редкими исключениями, существенно отличается от таковой в природных РНК-белковых комплексах. В настоящее время общедоступные банки данных (PDB, NDB) содержат более 5000 таких структур. Анализ этих данных постоянно приносит информацию об общих структурных элементах, т.н. мотивах, которые повторяются с разной степенью регулярности в третичной структуре широкого спектра РНК [3]. Так, например, уже при анализе первых атомных структур в рибосомах (рибосомных РНК, рРНК) были идентифицированы такие элементы, как А-миноры [4] и К-повороты [5], и продемонстрирована их общность для РНК других классов. Следует подчеркнуть, что открытие новых мотивов постоянно продолжается. Например, относительно недавно был обнаружен и охарактеризован широко распространённый мотив, в котором свободная пара электронов O4'-атома остатка рибозы одного нуклеотида взаимодействует с плоскостью гетероциклического основания другого нуклеотида [6]. Мы, в свою очередь, описали мотивы, которые мы назвали BIE и BWE (base-intercalated element и base-waged element соответственно) [7]. В этих структурных элементах гетероциклическое основание удалённого нуклеотидного остатка (н.о.) либо интеркалирует между двумя соседними основаниями определённого динуклеотидного сегмента РНК (BIE), либо вытесняет среднее основание из тринуклеотидного сегмента, занимая его место (BWE). BIE и BWE участвуют не только в сворачивании полинуклеотидных цепей РНК в уникальные пространственные структуры, но также важны для организации функциональных центров РНК и РНК-белковых комплексов. В ходе анализа BIE и BWE мы заметили, что эти структурные элементы являются представителями гораздо более обширного семейства мотивов. Общим для этого семейства является стэкинг-взаимодействие между основаниями н.о., которые расположены в первичной структуре РНК на разных расстояниях друг от друга, но не являются непосредственными соседями. Мы объединили их под сокращённым обозначением NA-BSE (nonadjacent base-stacking elements). Соответственно, межплоскостные взаимодействия нуклеиновых оснований в NA-BSE мы называем здесь неканоническими, чтобы отличить их от канонических стэкинг-взаимодействий соседних н.о. в РНК и полинуклеотидах.

В этой статье мы представляем базу данных, включающую все разновидности мотивов этого семейства, и рассматриваем их структурную роль. Они обнаруживаются во всех природных и многих синтетических РНК, для которых на сегодняшний день установлена третичная структура с высоким разрешением. Следует отметить, что существование NA-BSE некоторых типов ранее эпизодически фиксировалось в третичных структурах ряда РНК и рибонуклеопротеинов (РНП), см., например, работы Dallas et al., Cate et al. и Teplova et al. [8–10]. Однако их никогда не рассматривали как повторяющиеся элементы (мотивы) в пространственной структуре РНК, их не классифицировали по типам локализации в макромолекулах РНК, а также не анализировали их структурообразующие и функциональные свойства. Такой систематический анализ проводится впервые в данной работе. Он показывает, что NA-BSE не только широко распространены во всех классах РНК, но и играют значительную роль в организации их третичной структуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы определили NA-BSE как максимальный набор из k нуклеотидов N_1, ..., N_k, такой, что для каждого $i < k$ N_i и N_{i+1} образуют неканоническое стэкинг-взамодействие оснований, т.е. они не являются соседями по последовательности, и их основания уложены в стопку.

Для построения набора данных NA-BSE мы использовали неизбыточный набор РНК-содержащих структур из PDB с ограничением среднего разрешения 3,0 Å (версия 3.166 [11]). Для аннотирования NA-BSE использовалась программа DSSR (версия 2.0 [12]). Результирующий набор данных включал только NA-BSE из цепей РНК длиной $\geqslant 25$ нуклеотидов, при этом анализировались стэкинг-взаимодействия оснований, для которых угол основание-основание был $<30^\circ$, и расстояние между ближайшими атомами двух оснований составляло <4,0 Å. Другой набор данных был создан с использованием неизбыточного набора структур с ограничением разрешения 3,5 Å.

Столбцы подготовленных таблиц были такими же, как в работе Baulin et al. [7], и включали параметры стэкинга, параметры спариваний, в которых участвуют основания, и другие (см. вкладку readme в табл. S1 Приложения). Мы также аннотировали третичные мотивы РНК, имеющие общие нуклеотиды с NA-BSE, включая коаксиальный стэкинг, A-миноры, K-повороты, рибозные молнии, BIE, BWE, динуклеотидные платформы, внутренние петли с тандемными GA-спариваниями и внутренние петли типа UAA/GAN (см. табл. S2 Приложения). Внутренние петли были аннотированы с использованием пакета URSLIB [13], а все остальные мотивы были аннотированы с использованием DSSR.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базы данных и статистика. В качестве основной в этой работе использовалась база данных, разработанная на основании анализа третичных структур РНК, полученных с разрешением не ниже 3,0 Å (база данных «3,0»). Она включает в себя 11 733 NA-BSE различных размеров, образованных за счёт стэкинг-взаимодействий между гетероциклическими основаниями 14 862 н.о., не являющихся непосредственными соседями в полинуклеотидных цепях РНК (табл. S1 Приложения). При этом 9525 NA-BSE состоят из двух н.о., 1500 мотивов – из трёх, 512 мотивов – из четырёх, 179 мотивов – из пяти и 17 мотивов – из шести н.о. В основной базе данных NA-BSE, образованные н.о., принадлежащими разным молекулам РНК, составляют всего 3,3%.

Из 11 733 NA-BSE 60,5% представлены только пуриновыми н.о., 32,4% – пуриновыми и пиримидиновыми и 5,9% – только пиримидиновыми н.о.; 1,2% NA-BSE содержат модифицированные основания.

Мотивы, описываемые в этой работе, обнаруживаются во всех элементах вторичной структуры РНК. Это хорошо иллюстрирует рис. 1, на котором в классической модели вторичной структуры сегмента (49-360) рРНК малой субъединицы рибосом *E. coli* отмечены н.о., образующие NA-BSE в этом сегменте рРНК в составе малой субъединицы рибосомы. Они составляют примерно четверть (25,6%) от общего числа н.о. в этом сегменте РНК. Похожая картина наблюдается и для NA-BSE 23S рРНК этих рибосом, доля которых равна примерно 26% от их общего числа н.о. в её макромолекуле.

Более 98% NA-BSE, входящих в основную базу данных, дополнительно стабилизированы взаимодействием основания с фосфатными группами, 22,7% мотивов стабилизированы взаимодействием основания одного н.о. с O4'-атомом рибозы другого н.о. В большинстве NA-BSE (56,1%) их основания находятся в стэкинге с основаниями фланкирующих н.о., расположенных с обеих сторон мотива; у 35,1% мотивов взаимодействующий с ними фланкирующий нуклеотид расположен только с одной стороны, а 8,8% мотивов вообще не имеют фланкирующих н.о. Кроме того, гетероциклические основания в большинстве NA-BSE образуют с основаниями соседних районов РНК как уотсон-криковские, так и (гораздо чаще) неуотсон-криковские пары (см. табл. S1 Приложения и рассматриваемые ниже примеры).

6903 NA-BSE (58,8%) не участвуют в формировании каких-либо других известных мотивов, обнаруженных в третичных структурах РНК; в то же время 4830 NA-BSE (41,2%), входящих в базу данных «3,0», имели общие нуклеотиды по крайней мере с одним из таких мотивов.

Типы NA-BSE. Структурные мотивы, описываемые в этой работе, можно подразделить на три типа.

NA-BSE первого типа (NA-BSE I) образованы н.о. одного и того же одноцепочечного участка или (крайне редко) остатками одной из цепей двухцепочечного участка РНК. В первичной структуре РНК они разделены всего несколькими (часто одним) н.о., а образование мотива сопровождается выходом из петли или из двойной спирали одного или нескольких остатков (рис. 2, *а*). Эти остатки часто играют важную роль в узнавании РНК белками (см., например, работы Yogesh et al. и Laura et al. [14, 15]).

Ко второму типу (NA-BSE II) мотивов этого семейства относятся структурные элементы, в которых стэкинг-взаимодействия осуществляются между гетероциклическими основаниями н.о., находящихся в разных цепях одной двойной спирали (как, например, на рис. 2, *б*) или более сложноорганизованной петли, а также в участках противоположных полинуклеотидных цепей, связанных друг с другом, в частности, благодаря образованию неканонических (неуотсон-криковских) пар оснований. (Следует заметить, что в традиционных схемах вторичных структурах РНК они часто представлены в виде петель.)

К третьему типу NA-BSE (NA-BSE LR, long-range) относятся мотивы, образованные за счёт стэкинг-взаимодействий нуклеотидов, расположенных в разных петлях РНК, в разных цепях одной и той же РНК (при этом расстояние

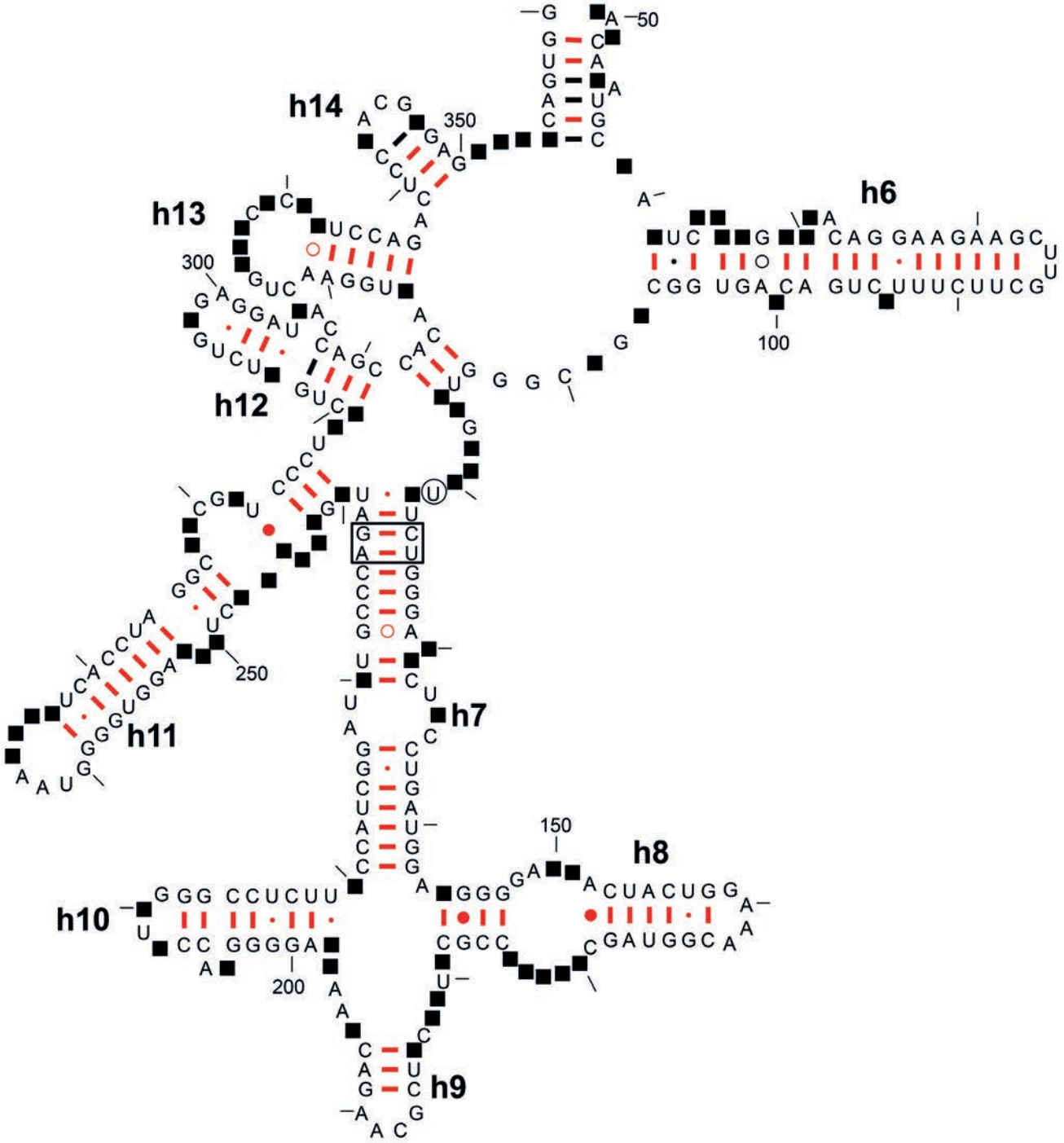

Рис. 1. Схема канонической вторичной структуры сегмента (49-360) 16S рРНК *E. coli* (http://rna.bgsu.edu/rna3dhub/motifs/2ds/escherichia_coli_16s). Чёрными квадратами отмечены н.о., образующие NA-BSE в этом сегменте рРНК в составе малой субъединицы рибосомы

между взаимодействующими нуклеотидами в первичной структуре РНК может достигать нескольких сотен н.о. (рис. 3)) или в разных молекулах РНК. Так, в частности, в связывании 5,8S рРНК с остальной частью рРНК большой субъединицы рибосом эукариот участвуют семь NA-BSE третьего типа (см., например, файл 6ZMI в табл. S1 Приложения).

Следует подчеркнуть, что BIE и BWE, подробно описанные ранее [7], могут относиться к любому из трёх типов NA-BSE. В основной базе данных, представленной в настоящей работе, они, как правило, входят в состав NA-BSE, состоящих из четырёх н.о.

Наиболее распространённым типом NA-BSE оказался тип II, на долю которого приходится

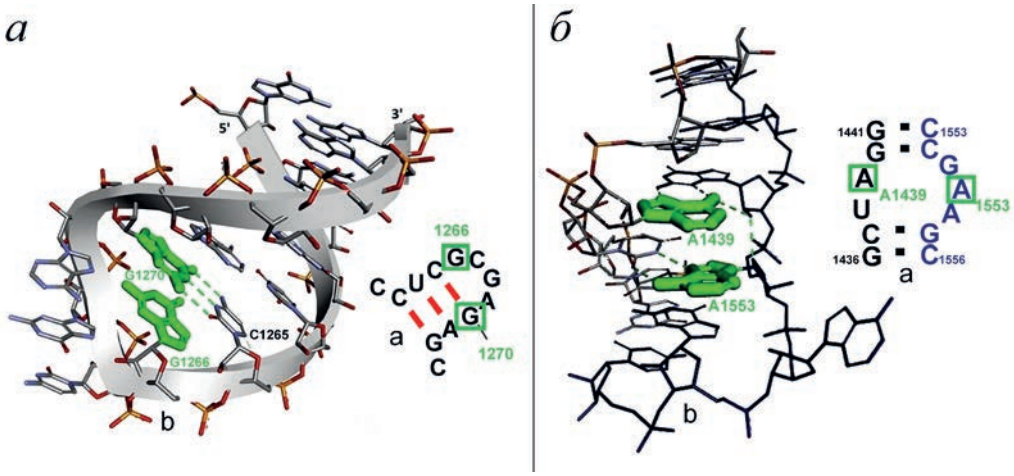

Рис. 2. Локализация н.о., образующих NA-BSE первого и второго типа. *а* – Локализация н.о., образующих NA-BSE первого типа, во фрагменте 16S рРНК в составе рибосом *E. coli*. *б* – Локализация н.о., образующих NA-BSE второго типа, во фрагменте 23S рРНК в составе рибосом *Thermus thermophilus*. Панели (a) – локализация н.о. во вторичной структуре, панели (b) – пространственная организация этих мотивов в третичной структуре рРНК (PDB ID 7K00 и 4Y4O соответственно)

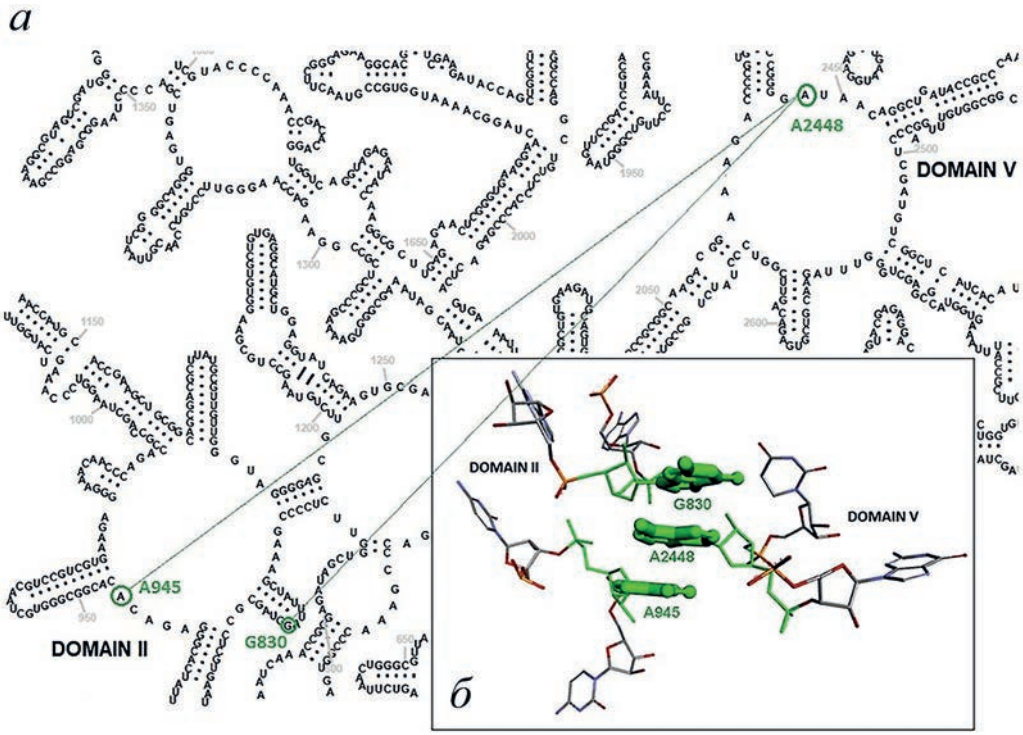

Рис. 3. Локализация н.о., образующих NA-BSE третьего типа, в структуре 23S рРНК рибосом *E. coli*. *а* – Локализация н.о. во вторичной структуре. *б* – Пространственная организация этого мотива во внутририбосомной третичной структуре рРНК (PDB ID 7K00)

45,5% мотивов, при этом доли мотивов типа I и типа LR в основной базе данных составили 31,8% и 22,7% соответственно.

Структурообразующие функции NA-BSE. Разнообразие структурообразующих функций NA-BSE мы продемонстрируем здесь на примере рибонуклеазы P (РНКазы P). Структура рибозимов этого класса из различных источников, а также их комплексов с тРНК, процессинг 5'-концевого района которых они осуществляют, была детально изучена (для обзора см. работу Mondragón et al. [16]). Макромолекула РНКазы P состоит из двух доменов: S-домена, специфически узнающего её субстрат, предшественник тРНК, и C-домена, обладающего каталитической активностью. В настоящей работе была проанализирована атомная структура S-домена РНКазы P из *T. thermophilus*, кото-

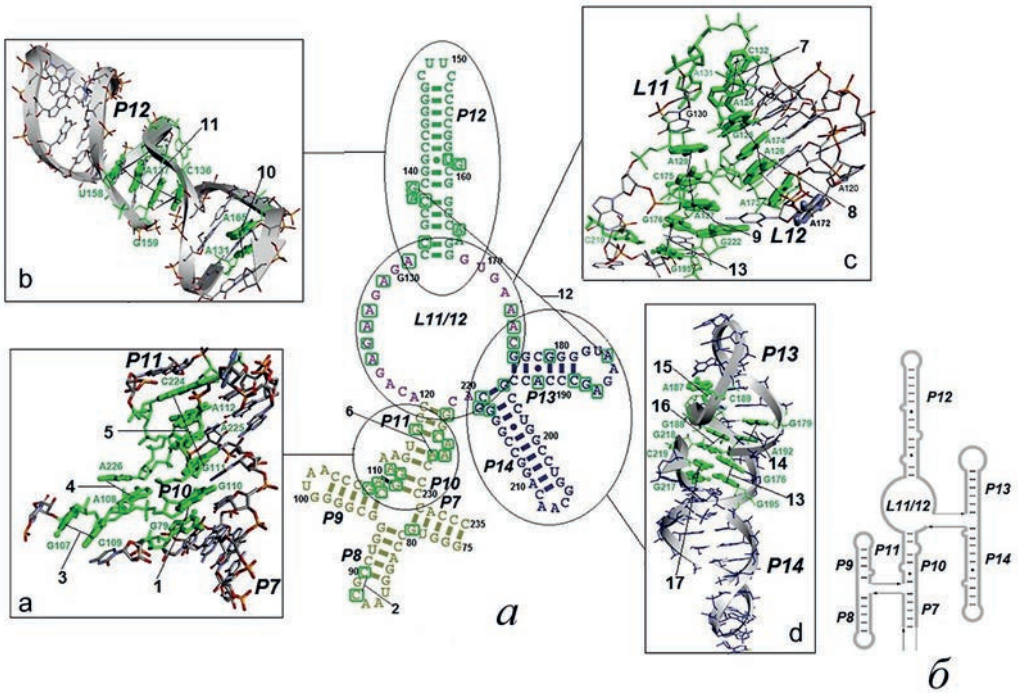

Рис. 4. Участие NA-BSE в организации третичной структуры РНКазы P *T. thermophilus*. *а* – В центре – схема канонической вторичной структуры S-домена рибозима [17]; нуклеотиды, образующие NA-BSE, помещены в квадраты; во вставках справа и слева (a, b, c, d) – третичная структура фрагментов рибозима. *б* – Схема взаимного расположения спиральных участков РНК S-домена РНКазы P в его третичной структуре [19]

NA-BSE, участвующие в формировании третичной структуры S-домена РНКазы P *T. thermophilus* [17, 18]

№	NA-BSE	Тип	Роль в формировании третичной структуры РНК
1	G79.G110	II	коаксиальный стэкинг спиралей P7 и P10
2	C88.C90	I	компактная укладка петли с экспонированием A89
3	A107.C109	I	внутриспиральный стэкинг с экспонированием A108
4	A108.A226	LR	межспиральный контакт спиралей P9 и P10
5	G111.A225.A112.C224	LR-LR-LR	формирование межпетлевого NA-BSE-ZIP мотива
6	G117.A227	II	коаксиальный стэкинг спиралей P10 и P11
7	A124.C132	I	компактная укладка петли L11
8	G125.A174.A126.A.173	II-II-II	формирование внутрипетлевого (L11/L12) NA-BSE-ZIP мотива
9	A129.C175.A127.G.222	II-II-II	формирование внутрипетлевого (L11/L12) NA-BSE-ZIP мотива
10	A131.A165	LR	формирование компактной структуры основания спирали P12
11	C136.G159.A137.U158	LR-LR-LR	формирование NA-BSE-ZIP мотива в составе спирали P12
12	G138.A184	LR	формирование контакта между спиралями P12 и P13
13	G176.G195	II	коаксиальный стэкинг спиралей P13 и P14
14	G179.A192	II	сшивание двух цепей в «дефектном» участке спирали P13
15	A187.C189	I	компактная укладка петли в шпильке с экспонированием G188
16	G188.G218	LR	формирование межпетлевого контакта
17	G217.C219	I	внутриспиральный стэкинг с экспонированием G218

рую Krasilnikov et al. [17, 18] удалось получить в изолированном виде с максимально высоким (2,9 Å) разрешением для РНК этого класса (PDB ID 1U9S). Кроме того, S-домен в составе полноценной РНКазы P, в отличие от C-домена, не связан ни с какими белками, модулирующими структуру этого рибозима, и можно считать, что его третичная структура в изолированном состоянии максимально приближена к внутриклеточной.

На рис. 4, *а* приведена вторичная структура S-домена РНКазы P в канонической форме. Этот домен состоит из 161 н.о., ровно 100 из которых находятся в спиральных участках, образуя уотсон-криковские пары. Из оставшихся 61 н.о. 42 (т.е. примерно четверть от общего числа н.о. в этой РНК) входят в состав NA-BSE. Их нуклеотидный состав, типы структуры и возможная роль в формировании третичной структуры РНК приведены в таблице. Рассмотрим эти данные подробнее.

Как видно из рис. 4, *б*, восемь двуспиральных элементов канонической вторичной структуры S-домена РНКазы P в её третичной структуре в действительности представлены четырьмя достаточно протяжёнными спиралями. При этом в трёх случаях (спирали P8-P9, P7-P10 и P13-P14) это осуществляется с помощью коаксиального стэкинга, одного из самых детально изученных способов организации макромолекулярной структуры РНК (для обзора см. работу Butcher et al. [3]). В этом процессе принимают участие три NA-BSE (№№ 1, 6 и 13 в таблице). Следует заметить, что участие этих мотивов в коаксиальном стэкинге спиралей вполне ожидаемо, т.к. он, как правило, осуществляется с помощью уотсон-криковских пар оснований, находящихся на концах спиральных элементов (см., например, стэкинг-контакт нуклеотидов G176 и G195, входящих в состав концевых уотсон-криковских пар в спиралях P13 и P14 соответственно; рис. 4, *а*, вставка «d»).

Далее, роль мотива № 14 (G179.A192 в таблице) в стабилизации спирали P13 также вполне очевидна: известно, что стэкинг пуриновых оснований н.о., расположенных в разных цепях несовершенного участка спирали, повышает устойчивость неуотсон-криковских пар оснований [20], в данном случае, пары A192-C178. Его следует назвать межцепочечным поперечным стэкингом (cross-strand stacking). Образующийся здесь NA-BSE и подобные ему мотивы в подавляющем большинстве случаев входит в состав E-мотивов, первый из которых был обнаружен в т.н. E-«петле» 5S рРНК [8].

Другой интересный пример участия NA-BSE в организации протяжённого спирального участка РНК – это образование блока из двух пиримидиновых и двух пуриновых нуклеотидов в спирали P12 (рис. 4, *а*, вставка «b», элемент 11; № 11 в таблице). Центральная ось этого блока фактически параллельна основной оси спирали P12. Важно, что в центре блока находятся «петлевые» (в терминах вторичной структуры) остатки A137 и G159, а на его концах – остатки C136 и U158, дополнительно образующие в спирали P12 уотсон-криковскую CG- и неканоническую UG-пары соответственно. При этом «петлевые» пуриновые остатки занимают место в центре блока с максимальным перекрыванием плоскостей всех четырёх оснований. Расположенный по соседству G138 в формировании блока не участвует, но, образуя NA-BSE с A184 (№ 12 в таблице), стабилизирует контакт между спиралями P12 и P13. Сходным образом организованы блок, формирующий протяжённую структуру спиралей P10-P11 (№ 5 в таблице; рис. 4, *а*, вставка «a»), а также два блока, ответственных за достаточно компактную конформацию крупного петлевого участка S-домена L11/L12 (№№ 8 и 9 в таблице; рис. 4, *а*, вставка «c»). В целом, структура каждого такого блока напоминает застёжку «молния», и эти мотивы мы в дальнейшем обозначаем здесь как NA-BSE-ZIP (от англ. zipper).

Контакт между спиралями P9 и P10 стабилизируется также NA-BSE A108.A126 (№ 4 в таблице). При этом образование данного мотива становится возможным благодаря внутриспиральному стэкингу оснований н.о. A107 и C109, который происходит с экспонированием A108 (№ 3 в таблице; рис. 4, *а*, вставка «a»). Как уже отмечалось выше, такие стэкинг-взаимодействия важны не только для образования третичной структуры РНК (как в данном случае), но и их контактов с белками.

Спираль P12 не образует коаксиального стэкинг-контакта ни с одной из спиралей S-домена. Однако её сочленение с петлёй L11 организовано при помощи NA-BSE A131.A165, который расположен в основании этой спирали (№ 10 в таблице; рис. 4, *а*, вставка «b»). При этом он оказывается сближенным (но прямо не контактирует) с NA-BSE A124.C132, который делает более компактным один из участков большой «петли» L11 (№ 7 в таблице; рис. 4, *а*, вставка «c»).

NA-BSE (№№ 15–17 в таблице) образуют целый ансамбль, выполняющий разнообразные функции в организации третичной структуры S-домена РНКазы P. Действительно, об-

разование NA-BSE первого типа (A187.C189, № 15 в таблице) в петле классической шпильки P13 сопровождается экспонированием G188, который вступает в стэкинг-взаимодействие с G218 в основании шпильки P14 и создаёт контакт между этими двумя спиральными участками, отчётливо видный на рис. 4, *а* (вставка «d»). В то же время у G218 появилась возможность образовать этот контакт благодаря стэкингу оснований в н.о. G217 и C219 (NA-BSE первого типа, № 17 в таблице).

Таким образом, анализируя третичную структуру сравнительно небольшой РНК, можно проследить разнообразие участия всех типов NA-BSE в формировании её макромолекулы. Они способствуют компактному сворачиванию однотяжевых петель РНК (а иногда и определяют его), участвуют в превращении двутяжевых петель в несовершенные спирали, играют важную роль в связывании удалённых в первичной и вторичной структуре районов РНК.

Мотивы типа NA-BSE-ZIP, столь широко представленные в S-домене РНКазы P, встречаются также в тРНК, в рРНК в составе рибосом и в некоторых других РНК (см. табл. S1 Приложения). Более того, при анализе структур этих РНК видно, что они входят в довольно обширное подсемейство NA-BSE с характерным внедрением соседних в первичной структуре РНК н.о. в противоположные по направлению фосфодиэфирных связей участки её полинуклеотидной цепи. При этом основания каждого из этих остатков находятся в стэкинге с н.о., которые также являются соседями в первичной структуре РНК. То есть здесь мы

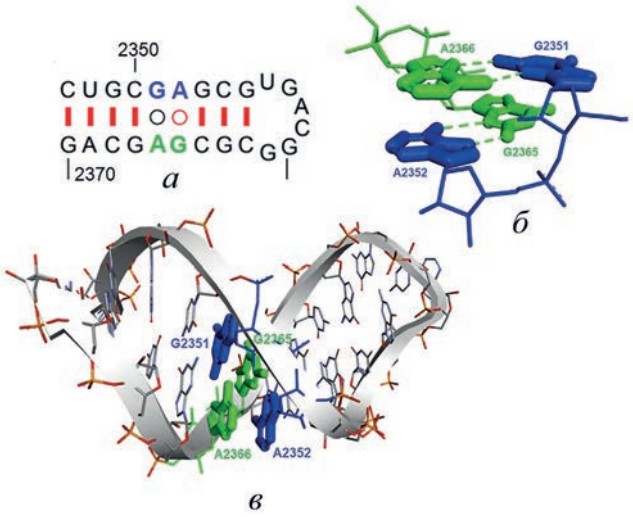

Рис. 5. Пример наиболее распространённого варианта NA-BSE-DC. *а* – Мотив-образующие GA-последовательности во вторичной структуре 23S рРНК *E. coli* (отмечены кружками). *б* – Пространственная структура мотива [PDB ID 7K00]. *в* – Положение мотива в третичной структуре фрагмента 23S рРНК в составе рибосомы

имеем дело с двойным поперечным межцепочечным стэкингом оснований. Мы обозначаем далее эти мотивы как NA-BSE-DC (double-crossing). Впервые NA-BSE-DC был замечен в кристаллической структуре другого рибозима, а именно в P4-P6 домене интрона группы I [9].

На рис. 5 приведён типичный пример NA-BSE-DC. В спирали H86 23S рРНК большой субъединицы рибосом *E. coli* он образован двумя динуклеотидными GA-сегментами этой рРНК, расположенными друг над другом в её канонической вторичной структуре (рис. 5, *а*).

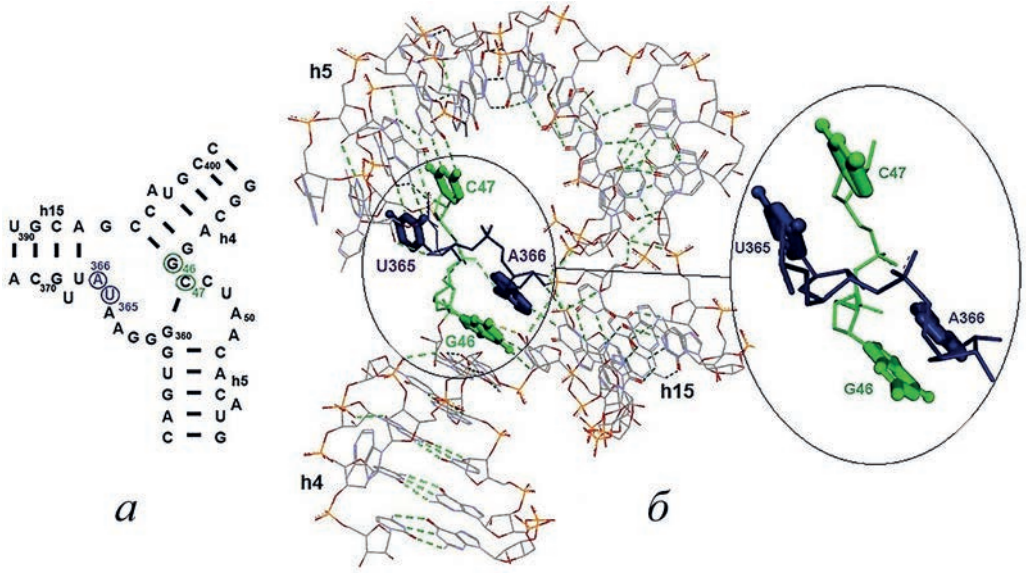

Рис. 6. Пример NA-BSE-DC с максимальным расстоянием между соседними основаниями в первичной структуре РНК. Показано расположение мотив-образующих н.о. во вторичной структуре (*а*) и в третичной структуре (*б*) 16S рРНК в составе рибосомы *E. coli* (PDB ID 7K00)

Поперечный стэкинг одноимённых пуриновых оснований позволяет им образовать полноценные хугстиновские GA-пары (trans-Hoogsteen/SugarEdge пары оснований по номенклатуре Леонтиса–Вестхофа [21]). При этом общая форма спирали не искажается, и она лишь несколько изгибается в районе расположения NA-BSE-DC (рис. 5, *б* и *в*).

Другой пример NA-BSE-DC, иллюстрирующий участие мотивов этого подсемейства в формировании третичной структуры РНК (рис. 6), заметно отличается от предыдущего. Здесь непосредственные соседи в первичной структуре РНК располагаются в достаточно удалённых друг от друга спиральных участках, и их фосфодиэфирные связи служат для необычного соединения этих спиралей. При этом основания н.о., образующих NA-BSE-DC, спарены не друг с другом (как в предыдущем случае), а с функциональными группами н.о. спиралей, в которые они включены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, NA-BSE способствуют компактному сворачиванию однотяжевых петель РНК (а иногда и определяют его), участвуют в превращении двутяжевых петель в несовершенные спирали, играют важную роль в связывании удалённых в первичной или вторичной структуре районов РНК (например, отдельных доменов рРНК или её сегментов, если рРНК транскрибируется в виде фрагментов).

В заключение отметим ещё одну потенциально важную черту рассмотренных здесь РНК-мотивов. Недавно Noller et al. [22], проанализировав 2000 нуклеотидных последовательностей рРНК малой субъединицы рибосом прокариот и цитоплазматических рибосом эукариот, установили, что примерно десятая часть н.о. этих РНК (140 н.о. в 16S рРНК *E. coli*) являются абсолютно консервативными. Анализируя все известные на сегодня экспериментальные данные, авторы смогли приписать с некоторой долей вероятности прямую или косвенную роль в функционировании рибосомы 82 консервативным н.о. 16S рРНК. Почему мутации гетероциклических оснований в оставшихся 58 нуклеотидах этой РНК неблагоприятны, остаётся не ясным.

Сопоставляя результаты работы Noller et al. с данными, полученными в настоящей работе, можно высказать следующие соображения. Из 140 абсолютно консервативных остатков, выявленных этими авторами, 41 участвует в образовании NA-BSE. При этом 23 таким н.о. можно приписать определённую функциональную роль. Поиск ответа на вопрос, почему основания в оставшихся 18 н.о. не могут быть заменены на другие, с нашей точки зрения, принципиально важен. Предварительный анализ показывает, что NA-BSE, построенные из этих н.о., находятся внутри «головки» и «тела» малой субъединицы рибосомы, т.е. располагаются вне её функциональных центров. С другой стороны, в литературе накоплено большое число фактов, которые говорят о том, что и в рибосомах, и в других РНК-содержащих макромолекулярных комплексах происходит передача функциональных (конформационных) сигналов на большие расстояния [23–25]. Вполне логично предположить, что NA-BSE в рРНК, а также во многих других РНК участвуют в построении системы передачи таких сигналов.

Вклад авторов. Е.Б. выполнил вычислительную работу и конформационный анализ. В.М. проанализировал данные и подготовил все рисунки. А.Б. разработал проект. Все авторы внесли значительный вклад в написание рукописи.

Финансирование. В.М. и А.Б. благодарят за поддержку Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова и Минобрнауки (Соглашение 1075-15-2021-1949 от 28.09.21).

Благодарности. Авторы благодарят рецензентов за внимательное прочтение рукописи и конструктивные предложения.

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. Fresco, J. R., Alberts, B. M., and Doty, P. (1960) Some molecular details of the secondary structure of ribonucleic acids, *Nature*, **188**, 98-101, doi: 10.1038/188098a0.
2. Spirin, A. S. (1960) On macromolecular structure of native high-polymer ribonucleic acid in solution, *J. Mol. Biol.*, **2**, 436-446, doi: 10.1016/S0022-2836(60)80054-X.

3. Butcher, S. E., and Pyle, A. M. (2011) The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks, *Acc. Chem. Res.*, **44**, 1302-1311, doi: 10.1021/ar200098t.
4. Nissen, P., Ippolito, J. A., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2001) RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4899-4903, doi: 10.1073/pnas.081082398.
5. Klein, D. J., Schmeing, T. M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2001) The kink-turn, *EMBO J.*, **20**, 4214-4221, doi: 10.1093/emboj/20.15.4214.
6. Chawla, M., Chermak, E., Zhang, O., Bujnicki, J. M., Oliva, R., and Cavallo, L. (2017) Occurrence and stability of lone pair–stacking interactions between ribose and nucleobases in functional RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11019-11032, doi: 10.1093/nar/gkx757.
7. Baulin, E., Metelev, V., and Bogdanov, A. (2020) Base-intercalated and base-wedged stacking elements in 3D-structure of RNA and RNA–protein complexes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8675-8685, doi: 10.1093/nar/gkaa610.
8. Dallas, A., and Moore, P. B. (1997) The loop E–loop D region of *Escherichia coli* 5S rRNA: the solution structure reveals an unusual loop that may be important for binding ribosomal proteins, *Structure*, **5**, 1639-1653, doi: 10.1016/s0969-2126(97)00311-0.
9. Cate, J. H., Gooding, A. R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B. L., Kundrot, C. E., Cech, T. R., and Doudna, J. A. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing, *Science*, **273**, 1678-1685, doi: 10.1126/science.273.5282.1678.
10. Teplova, M., Malinina, L., Darnell, J. C., Song, J., Lu, M., Abagyan, R., Musunuru, K., Teplov, A., Burley, S. K., Darnell, R. B., and Patel, D. J. (2011) Protein–RNA and protein–protein recognition by DualKH1/2 domains of the neuronal splicing factor Nova-1, *Structure*, **19**, 930-944, doi: 10.1016/j.str.2011.05.002.
11. Leontis, N. B., and Zirbel, C. L. (2012) Nonredundant 3D structure datasets for RNA knowledge extraction and benchmarking, *RNA 3D Structure Analysis and Prediction* (Leontis, N., and Westhof, E., eds), *Nucleic Acids and Molecular Biology*, **27**, 282-298, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-25740-7_13.
12. Lu, X.-J., Bussemaker, H. J., and Olson, W. K. (2015) DSSR: an integrated software tool for dissecting the spatial structure of RNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e142, doi: 10.1093/nar/gkv716.
13. Shalybkova, A. A., Mikhailova, D. S., Kulakovskiy, I. V., Fakhranurova, L. I., and Baulin, E. F. (2021) Annotation of the local context of RNA secondary structure improves the classification and prediction of A-minors, *RNA*, **27**, 907-919, doi: 10.1261/rna.078535.120.
14. Yogesh, K., Gupta, Y. K., Nair, D. T., Wharton, R. P., Aggarwal, A. K. (2008) Structures of human Pumilio with noncognate RNAs reveal molecular mechanisms for binding promiscuity, *Structure*, **16**, 549-557, doi: 10.1016/j.str.2008.01.006.
15. Guogas, L. M., Filman, D. J., Hogle, J. M., and Gehrke, L. (2004) Cofolding organizes alfalfa mosaic virus RNA and coat protein for replication, *Science*, **306**, 2108-2111, doi: 10.1126/science.1103399.
16. Mondragón, A. (2013) Structural studies of RNase P, *Annu. Rev. Biophys.*, **42**, 537-557, doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130406.
17. Krasilnikov, A. S., Xiao, Y., Pan, T., and Mondragón, A. (2004) Basis for structural diversity in homologous RNAs, *Science*, **306**, 104-107, doi: 10.1126/science.1101489.
18. Krasilnikov, A. S., Yang, X., Pan, T., and Mondragón, A. (2003) Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P, *Nature*, **421**, 760-764, doi: 10.1038/nature01386.
19. Reiter, N. J., Osterman, A., Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Pan, T., and Mondragón, A. (2010) Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA, *Nature*, **468**, 784-789, doi: 10.1038/nature09516.
20. Mignon, P., Loverix, S., Steyaert, J., and Geerlings, P. (2005) Influence of the π–π interaction on the hydrogen bonding capacity of stacked DNA/RNA bases, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1779-1789, doi: 10.1093/nar/gki317.
21. Leontis, N. B., and Westhof, E. (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs, *RNA*, **7**, 499-512, doi: 10.1017/s1355838201002515.
22. Noller, H. F., Donohue, J. P., and Gutell, R. R. (2022) The universally conserved nucleotides of the small subunit ribosomal RNAs, *RNA*, **28**, 623-644, doi: 10.1261/rna.079019.121.
23. Sergiev, P. V., Kiparisov, S. V., Burakovsky, D. E., Lesnyak, D. V., Leonov, A. A., Bogdanov, A. A., and Dontsova, O. A. (2005) The conserved A-site finger of the 23S rRNA: just one of the intersubunit bridges or a part of the allosteric communication pathway? *J. Mol. Biol.*, **353**, 116-123, doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.006.
24. Walkera, A. S., Russ, W. P., Ranganathanc, R., and Schepartza, A. (2020) RNA sectors and allosteric function within the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 19879-19887, doi: 10.1073/pnas.1909634117.
25. Peselis, A., and Serganov, A. (2021) Cooperativity and allostery in RNA systems, *Methods Mol. Biol.*, **2253**, 255-271, doi: 10.1007/978-1-0716-1154-8_15.

MULTIPLE NON-CANONICAL BASE-STACKING INTERACTIONS AS ONE OF THE MAJOR DETERMINANTS OF RNA TERTIARY STRUCTURE ORGANIZATION

V. G. Metelev[1], E. F. Baulin[2], and A. A. Bogdanov[1,3,4]*

[1] *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

[2] *Institute of Mathematical Problems of Biology of the Russian Academy of Sciences – the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

[3] *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: bogdanov@belozersky.msu.ru*

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

Interplane (stacking) interactions of heterocyclic bases of nucleotide residues (n.t.) of RNA are one of the most important factors in the organization of its secondary and tertiary structure. Most of these (canonical) interactions are carried out between neighbors in the polynucleotide chains of RNA. However, with the accumulation of data on the atomic tertiary structures of a wide variety of RNAs and their complexes with proteins, it became clear that RNA nucleotide residues that are not neighbors in their polynucleotide chains and are sometimes separated in the RNA primary structure by tens or hundreds of n.t. can interact with the help of base stacking (non-canonical). This paper presents an exhaustive database of such elements and their environment in the macromolecules of natural and synthetic RNAs. They were called nonadjacent base-stacking elements (NA-BSE). The analysis of these data showed that the NA-BSE forming nucleotides, on average, account for about a quarter of all nucleotides of a particular RNA, therefore, they should be considered as real motifs in their tertiary structure. The classification of NA-BSE by types of localization in RNA macromolecules is carried out. It is shown that the structure-forming role of NA-BSE consists in the compact folding of single-stranded RNA loops, in the transformation of double-stranded bulges into imperfect helices, as well as in the binding of RNA regions removed in their primary and secondary structure.

Keywords: stacking interactions, tertiary structure of RNA, ribosomal RNA, ribonuclease P, RNA motifs

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 984 – 994

УДК 577.112.7

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОФОРМ ТРОПОМИОЗИНА Tpm4.1 И Tpm2.1

© 2023 А.С. Логвинов[1,2], В.В. Нефёдова[1], Д.С. Ямпольская[1], С.Ю. Клейменов[1,3], Д.И. Левицкий[1], А.М. Матюшенко[1]*

[1] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: ammatyushenko@mail.ru*

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

[3] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, Россия*

Поступила в редакцию 28.03.2023
После доработки 05.05.2023
Принята к публикации 10.05.2023

Тропомиозин (Tpm) – это один из важнейших партнёров актинового филамента, во многом определяющий его свойства. В организмах животных существуют разные изоформы Tpm, которые, как считается, участвуют в регуляции различных клеточных функций. Однако молекулярные механизмы регуляции функций актиновых филаментов различными цитоплазматическими изоформами Tpm до сих пор мало изучены. В нашей работе мы применяли различные методы для исследования свойств изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1 и сравнивали их как между собой, так и со свойствами изоформ Tpm, которые уже подвергались ранее более детальному изучению. Изоформы Tpm2.1 и Tpm4.1 почти не отличались друг от друга по их сродству к фибриллярному актину (F-актину), по термостабильности их молекул и по их устойчивости к ограниченному протеолизу трипсином, но заметно различались по вязкости их растворов и по термостабильности их комплексов с F-актином. Главным отличием Tpm2.1 и Tpm4.1 от других ранее исследованных изоформ Tpm (таких, например, как Tpm1.6 и Tpm1.7) была их крайне низкая термостабильность, измеренная методами КД и ДСК. Возможные причины этой нестабильности детально рассмотрены при сравнении аминокислотных последовательностей Tpm4.1 и Tpm2.1 с последовательностями изоформ Tpm1.6 и Tpm1.7, которые не отличались от Tpm4.1 и Tpm2.1 соответственно по экзонной структуре их генов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: изоформы тропомиозина; стабильность структуры coiled-coil, актин-ассоциированные белки, актиновые филаменты, дифференциальная сканирующая калориметрия.

DOI: 10.31857/S0320972523060088, **EDN:** EFOAFG

ВВЕДЕНИЕ

Тропомиозин (Tpm) представляет собой фибриллярный актин-связывающий белок, присутствующий во многих структурах актинового цитоскелета. Tpm широко распространён в организмах животных и представлен во всех их тканях [1]. Tpm формирует так называемую структуру coiled-coil, образованную двумя параллельными друг другу α-спиралями [2]. За счёт концевых взаимодействий между молекулами Tpm образует вытянутую нить, которая плотно прилегает к поверхности актинового филамента. Считается, что Tpm способен регулировать функции актинового цитоскелета в животной клетке и выступает своеобразным «привратником» [3, 4], определяющим, с какими партнёрами будет взаимодействовать актиновый филамент [5, 6]. Было показано, что Tpm повышает стабильность актиновых филаментов [7, 8] и предотвращает их деполимеризацию [9, 10]. Tpm также участвует в регуляции глобальных клеточных процессов, таких как морфогенез и тканевая дифференцировка [11, 12], везикулярный транспорт [13, 14], клеточная адгезия [15, 16], а также регуляция сокращения скелетных и сердечных мышц [17, 18].

У млекопитающих обнаружено более 40 изоформ Tpm [1]. Большое количество изоформ может лежать в основе регуляции различных

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; F-актин – фибриллярный актин; Tpm – тропомиозин.

* Адресат для корреспонденции.

функций Tpm и обеспечивать взаимодействие с другими актин-связывающими белками [19–21]. Молекулы Tpm являются продуктами четырёх генов (*TPM1*, *TPM2*, *TPM3* и *TPM4*), а большая вариабельность в синтезе изоформ возникает в основном в результате альтернативного сплайсинга [1]. Особенности экзонной структуры этих изоформ и их названия представлены в общепринятой номенклатуре Tpm [22].

В нашей работе мы изучили свойства двух изоформ Tpm: Tpm2.1 и Tpm4.1. Изоформа Tpm2.1 достаточно хорошо изучена, тогда как работ, посвящённых Tpm4.1 очень мало. Tpm2.1 представляет собой уникальную изоформу, которая экспрессируется как в гладкомышечных, так и в немышечных тканях [23, 24]. В гладкомышечных клетках Tpm2.1 является частью сократительного аппарата клетки и участвует в сокращении этого типа мышц [24]. Следует отметить, что в гладких мышцах Tpm2.1 в основном образует гетеродимеры с другой изоформой Tpm, продуктом гена *TPM1* (Tpm1.3 или Tpm1.4, старое название – α smooth Tm или просто α Tm [22]) [2, 24]. Функции Tpm2.1 в немышечных клетках пока ещё полностью не изучены. Известно, что он принимает участие в формировании стресс-фибрилл в клетках и участвует в передаче механических сигналов от внеклеточного матрикса [23, 25]. Снижение экспрессии Tpm2.1 приводит к разборке стресс-фибрилл и часто коррелирует с развитием опухолевой трансформации и усилением клеточной инвазии [26, 27]. Tpm2.1 часто называют раковым супрессором. Так, восстановление экспрессии этой изоформы в раковых клетках приводит к возобновлению нормального функционирования клеток и предотвращению злокачественной трансформации [25, 28].

В литературе также имеются данные о структурно-функциональных свойствах молекулы Tpm2.1. Ранее стабильность этой изоформы Tpm изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [29]. Плавление всей молекулы происходило в интервале температур 20–50 °C, и при деконволюции кривых избыточного теплопоглощения в молекуле были обнаружены три калориметрических домена (т.е. частей молекулы, которые денатурируют кооперативно и независимо друг от друга). Среди них был идентифицирован калориметрический домен, соответствующий плавлению *N*-концевой части молекулы Tpm2.1 [29]. В литературе также имеются данные, хотя и довольно противоречивые, о сродстве Tpm2.1 к фибриллярному актину (F-актину). В одних исследованиях было определено высокое сродство Tpm2.1 к F-актину ($K_d \leqslant 1$ мкМ) [30, 31], тогда как в других исследованиях оно было существенно ниже ($K_d = 5{,}5$ мкМ) [32].

Гораздо меньше известно о свойствах изоформы Tpm4.1. На данный момент имеются только доказательства её существования и была опубликована лишь одна работа, демонстрирующая последствия снижения экспрессии этой изоформы в клетках эпителия молочной железы. В этой работе было показано, что нарушение экспрессии Tpm4.1 приводит к разрушению межклеточных контактов и способствует усилению клеточной инвазии [33].

В нашей работе с использованием различных подходов мы оценили свойства изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1 и сравнили их как друг с другом, так и со свойствами других известных изоформ Tpm.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Все молекулярно-генетические конструкции изоформ Tpm, используемые в этой работе, представляли собой кодирующие последовательности (CDS) с дополнительными триплетами, кодирующими Ala и Ser перед основной последовательностью для имитации естественного *N*-концевого ацетилирования [34]. CDS различных изоформ Tpm были синтезированы («Евроген», Россия) и клонированы в вектор pET-23a+ между сайтами рестрикции NdeI и EcoRI. Корректность всех конструкций проверена секвенированием («Евроген»).

Белковые препараты получали в клетках *Escherichia coli* штамма C41 (DE3). Ночную культуру инокулировали в 1 литр свежей среды LB («Ambresco», США) в присутствии 100 мг/литр ампициллина. Клетки росли до тех пор, пока поглощение суспензии (при длине волны 600 нм) не достигало 0,6, после чего индуцировали экспрессию добавлением 1 мМ IPTG. Клетки продолжали инкубировать в течение ночи при 30 °C и постоянном перемешивании. Затем клетки осаждали центрифугированием (4000 *g*, 50 мин) и ресуспендировали в буфере для очистки (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0).

Изоформы Tpm очищали, как было описано ранее [35]. Сначала Tpm подвергали грубой экстракции. Суспензию разрушенных клеток инкубировали при 86 °C в течение 5 мин с последующим центрифугированием при 15 000 *g* в течение 40 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали изоэлектрическому

осаждению с последующим центрифугированием при 15 000 *g* в течение 40 мин. Осадок растворяли в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и проводили диализ в течение ночи против этого буфера. На заключительном этапе препараты Tpm очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiTrapQ HP («GE Healthcare», США) с использованием линейного градиента NaCl (0–2 М). Концентрацию препаратов Tpm определяли спектрофотометрически с использованием коэффициентов экстинкции $E_{1\%}$ при 280 нм, равных 2,1 $см^{-1}$ – для Tpm4.1 и 2,73 $см^{-1}$ – для Tpm2.1.

Глобулярный мономер ATP-G-актин экстрагировали из ацетонового порошка мышц кролика по стандартной методике [36]. F-Актин полимеризовали из ATP-G-актина добавлением 5 мМ $MgCl_2$ и 100 мМ NaCl. За полимеризацией следили путём регистрации светорассеяния при 350 нм с использованием флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse («Varian Australia Pty Ltd», Австралия). Полная полимеризация F-актина занимала не более 30 мин.

Метод спектроскопии кругового дихроизма (КД). Эксперименты по КД проводили на КД-спектрофотометре Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания). Спектры КД для Tpm2.1 и Tpm4.1 регистрировали при 5 °C в кюветах с длиной оптического пути 0,02 см при концентрации белка 1 мг/мл. Спектры имели стандартный вид с двумя отрицательными максимумами при 222 и 208 нм, характерными для α-спиральных белков. Термостабильность препаратов Tpm измеряли путём регистрации молярной эллиптичности при 222 нм в диапазоне температур 5–70 °C со скоростью нагрева 1 °C/мин; другие условия: концентрация Tpm составляла 1 мг/мл в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ. Два последовательных нагревания использовали для проверки обратимости термического разворачивания образцов Tpm.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Эксперименты методом ДСК проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре MicroCal VP-Capillary DSC («Malvern Instruments», США) при скорости нагревания 1 °C/мин, как описано ранее [37]. Концентрация Tpm составляла 2 мг/мл в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl. Профили ДСК анализировали с использованием программного обеспечения Origin 7.0 («MicroCal Inc», США), как описано ранее [37].

Ограниченный протеолиз трипсином. Для проведения ограниченного протеолиза образцы Tpm с концентрацией 0,5 мг/мл подвергали воздействию трипсина, обработанного L-1-тозиламидо-2-фенилэтилхлорметилкетоном («Worthington», США). Образцы инкубировали в течение 90 мин при 30 °C в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl. В экспериментах использовали массовое соотношение трипсина к Tpm, равное 1 : 300. Аликвоты образцов отбирали в разное время, а реакцию останавливали добавлением буфера для образцов, содержащего 5 мМ фенилметилсульфонил фторида. Протеолиз белка анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном SDS-PAGE. Полученный гель сканировали, и анализировали интегральную плотность с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53q.

Соосаждение Tpm с F-актином. Сродство Tpm к F-актину оценивали с помощью анализа их совместного осаждения, как описано ранее [35]. Вкратце, 10 мкМ F-актин, стабилизированный фаллоидином, смешивали с Tpm в различных концентрациях (0–7,5 мкМ) в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 200 мМ NaCl. Затем актин осаждали вместе со связанным с ним Tpm путём ультрацентрифугирования при 100 000 *g* в течение 40 мин («Beckman Coulter», США). Эквивалентные образцы осадка и супернатанта подвергали анализу с помощью электрофореза в 12,5%-ном SDS-PAGE. Полученные гели сканировали и анализировали интегральную плотность с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53q. Долю F-актина, связанного с молекулами Tpm, определяли как отношение количества Tpm в осадке к количеству F-актина.

Определение термостабильности комплексов Tpm с F-актином. Диссоциацию комплексов Tpm с F-актином индуцировали с помощью нагревания и следили за ней по изменению светорассеяния, как описано ранее [35]. Эксперименты проводили при постоянной скорости нагрева 1 °C/мин на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse, оснащённом регулятором температуры и термоприставкой. Образцы содержали F-актин (20 мкМ), стабилизированный фаллоидином, и 10 мкМ Tpm. При обработке экспериментальных данных, полученных для комплексов Tpm с F-актином, вычитали температурную зависимость светорассеяния свободного F-актина; после этого кривые были аппроксимированы стандартной сигмоидальной функцией Больцмана (Boltzmann function) в программе Origin 7.0. Основным параметром, извлекаемым из этого анализа, является T_{diss}, т.е. та температура, при которой происходит 50%-ное снижение светорассеяния.

Измерение вязкости растворов Tpm. Эксперименты проводили на вискозиметре AMVn («Anton Paar GmbH», Австрия) с использованием капилляра объёмом 0,5 мл при 20 °C. Для корректных расчётов вязкости удельную плотность растворов Tpm измеряли на приборе DMA 4500 («Anton Paar GmbH»). Все измерения проводили при концентрации Tpm 2 мг/мл в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ. Измерения повторяли трижды, а полученные значения усредняли.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Структурные свойства изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1. Значительная часть работы была посвящена изучению структурных свойств изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1. Мы использовали такие методы, как КД, ДСК и ограниченный протеолиз трипсином, для описания стабильности этих изоформ Tpm. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 1–3.

В первую очередь мы применили метод КД для изучения термостабильности изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1 (рис. 1, *а* и *б*). Разрушение α-спирали при нагревании для этих видов Tpm исследовали путём измерения эллиптичности при 222 нм, которая отражает содержание α-спирали в молекуле Tpm. До 30–34 °C изоформы Tpm2.1 и Tpm4.1 теряют около 20% своей α-спиральности при некооперативном плавлении, а основная потеря спиральности происходит при более высокой температуре, в интервале от 34–35 до 50–52 °C (рис. 1, *а*). В дифференциальной форме основной тепловой переход наблюдался при ~42 °C для Tpm2.1 и при 44 °C – для Tpm4.1 (рис. 1, *б*). В целом, результаты КД показали, что термостабильность Tpm4.1 была несколько выше, чем у Tpm2.1.

Стабильность молекул Tpm4.1 и Tpm2.1 оценивали также методом ограниченного протеолиза трипсином, позволяющим определить устойчивость этих молекул к протеолизу, которая оказалась одинаковой для обеих изоформ Tpm (рис. 2). Вероятно, это связано с тем, что протеолиз происходит преимущественно по центральной части молекулы Tpm – наименее стабильной части молекулы из-за наличия в ней ряда неканонических аминокислотных остатков, дестабилизирующих двойную спираль. Ранее было показано, что аминокислотная последовательность этой части молекулы обладает чрезвычайно высокой консервативностью для множества самых разных

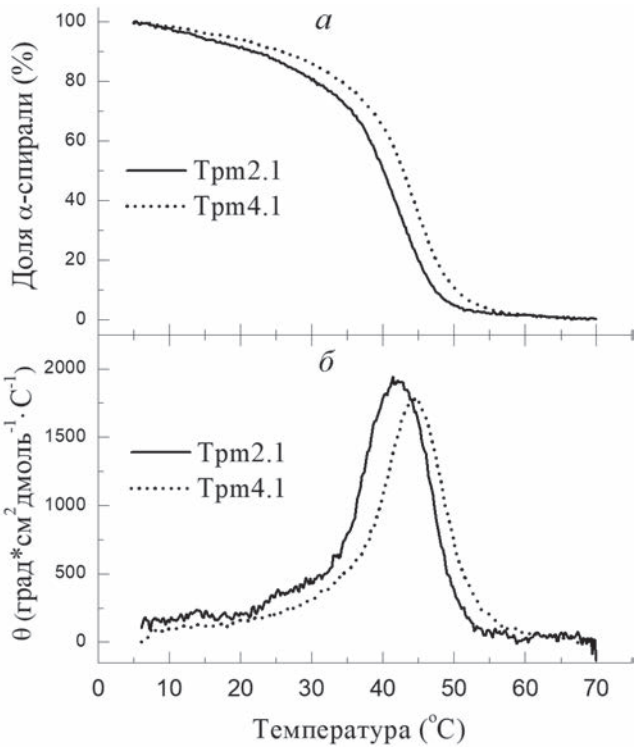

Рис. 1. Стабильность молекул Tpm2.1 и Tpm4.1, измеренная с помощью КД (*а* и *б*). Температурные зависимости содержания α-спиралей измеряли с помощью регистрации эллиптичности при 222 нм при постоянной скорости нагрева (1 °C/мин)

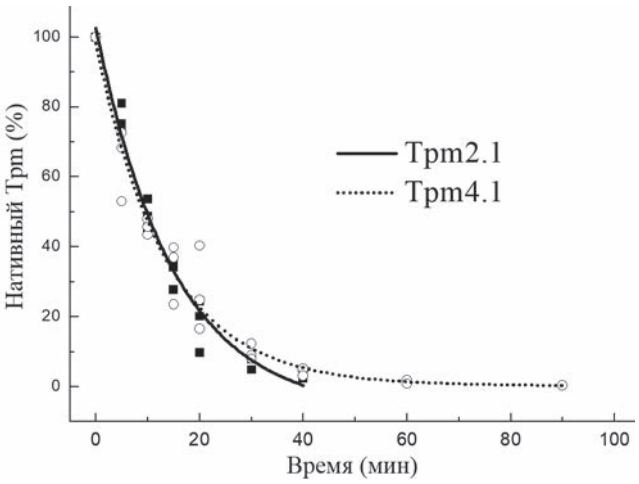

Рис. 2. Стабильность молекул Tpm2.1 и Tpm4.1, измеренная с помощью ограниченного протеолиза трипсином. Протеолиз проводили при 30 °C при соотношении трипсин : Tpm, равном 1 : 300

изоформ Tpm [35, 38]. Именно этим можно объяснить тот факт, что изоформы Tpm4.1 и Tpm2.1, которые мало различаются по последовательности центральной части их молекул, не различаются и по их устойчивости к протеолизу трипсином.

Данные ДСК (рис. 3) достаточно хорошо согласуются с результатами, полученными

методом КД. Деконволюционный анализ показал, что кривую ДСК для Tpm2.1 можно разложить на три калориметрических домена (рис. 3, *а*; таблица), что хорошо согласуется с ранее опубликованными результатами [29]. Более того, ранее было показано, что калориметрический домен 2 на кривой ДСК соответствует плавлению *N*-концевой части молекулы Tpm2.1 [29]. Напротив, изоформа Tpm4.1 продемонстрировала только два калориметрических домена на кривой ДСК (рис. 2, *б*; таблица). Вероятно, некоторые части молекулы Tpm4.1 денатурируют вместе как единый калориметрический домен 2 или их тепловые переходы совпадают по положению и потому не могут быть разделены деконволюционным анализом. Что касается наименее термостабильного калориметрического домена 1, то он, вероятно, отражает некооперативное плавление некоторых довольно малых частей молекул Tpm2.1 и Tpm4.1. В целом, температуры теплового перехода для главных калориметрических доменов близки для изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1, что свидетельствует о сходной стабильности всех частей молекул для этих изоформ Tpm.

Функциональные свойства изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1. Параметры взаимодействия Tpm2.1 и Tpm4.1 с F-актином оценивали методами соосаждения Tpm с F-актином и регистрации термостабильности комплексов Tpm–F-актин по изменению светорассеяния. Результаты этих исследований представлены на рис. 4. Сродство изоформ Tpm к F-актину было практически идентичным (рис. 4, *а*): значение $K_{50\%}$ составляло 2,70 ± 0,18 мкМ для Tpm2.1 и 3,02 ± ± 0,22 мкМ – для Tpm4.1.

В отличие от сродства изоформ Tpm к F-актину (рис. 4, *а*), термостабильность комплексов Tpm–F-актин была значительно выше для Tpm4.1 (T_{diss} = 45,4 ± 0,3 °C), чем для Tpm2.1 (T_{diss} = 40,4 ± 0,3 °C) (рис. 4, *б*). Примечательно,

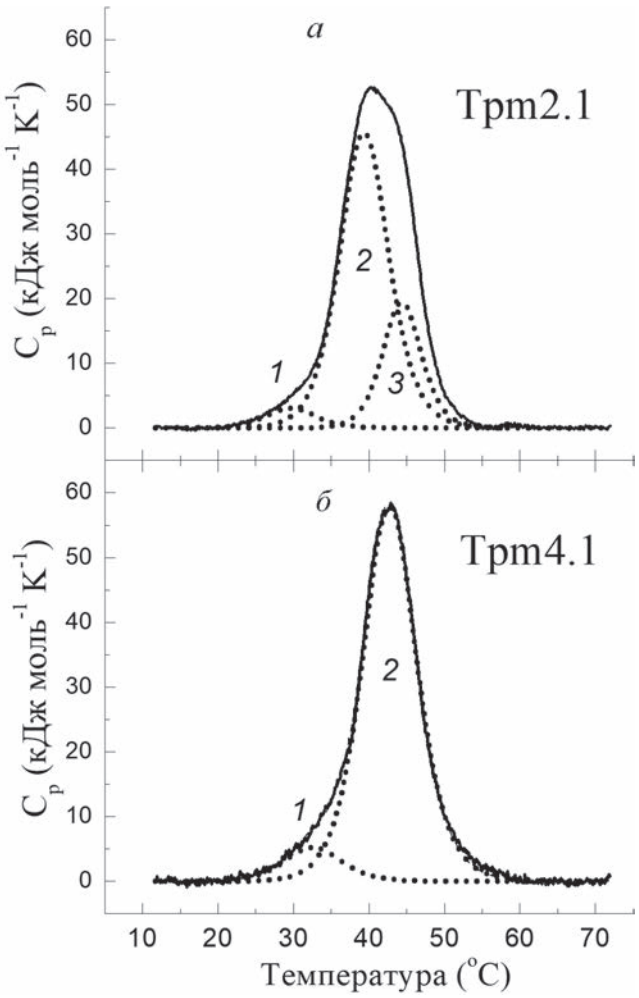

Рис. 3. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения (C_p) для изоформ Tpm2.1 (*а*) и Tpm4.1 (*б*), полученные методом ДСК. Сплошные линии представляют собой экспериментальные кривые после вычитания инструментальных и химических базовых линий, а пунктирными линиями показаны отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), полученные путём деконволюции этих кривых. Каждый калориметрический домен обозначен цифрами по мере увеличения термостабильности

Калориметрические параметры для изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1, полученные после анализа кривых ДСК

Изоформы Tpm	Калориметрические параметры***						
	Домен 1		Домен 2		Домен 3		$\sum\Delta H_{cal}$**, кДж/моль
	T_m*, °C	ΔH_{cal}, кДж/моль	T_m, °C	ΔH_{cal}, кДж/моль	T_m, °C	ΔH_{cal}, кДж/моль	
Tpm2.1	29,4	30	39,3	390	44,3	200	620
Tpm4.1	32,6	50	42,7	550	–	–	600

Примечание. * T_m – температура калориметрического домена; ** ΔH_{cal} – значение калориметрической энтальпии; *** Погрешность приведённых значений температуры не превышала ± 0,2 °C; для значений калориметрической энтальпии погрешность не превышала 10%.

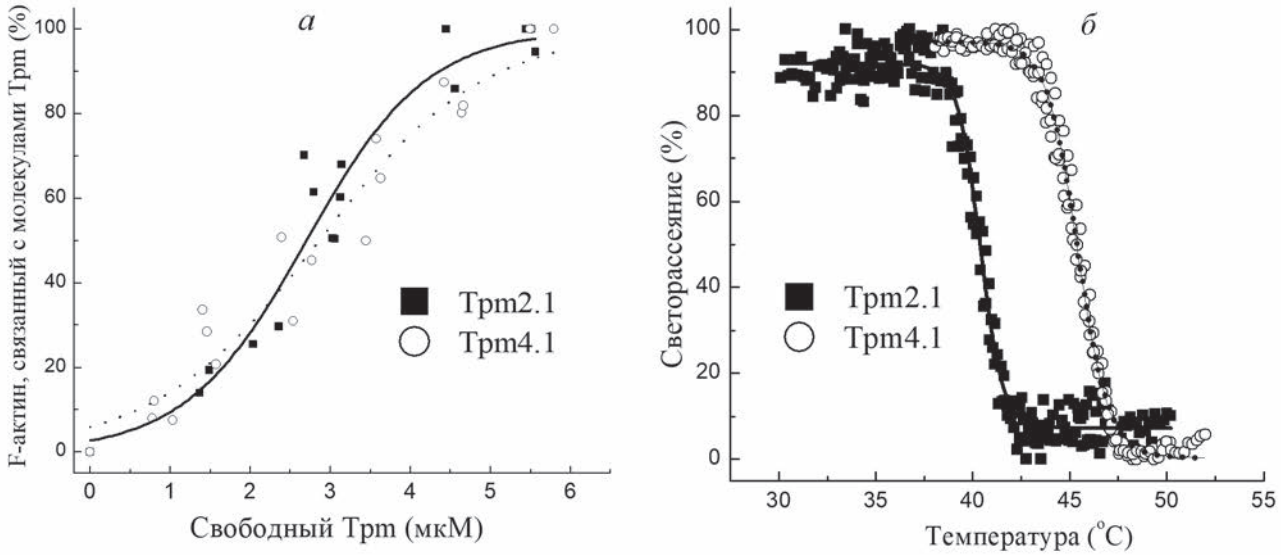

Рис. 4. Функциональные свойства молекул Tpm. *а* – Сродство Tpm2.1 и Tpm4.1 к F-актину, полученное с помощью соосаждения Tpm с F-актином. Результаты представлены на графике как доля F-актина, декорированного Tpm, в зависимости от концентрации свободного Tpm, обнаруженного в супернатанте. Значения $K_{50\%}$, соответствующие концентрациям Tpm при полунасыщении, составляют 2,70 ± 0,18 мкМ для Tpm2.1 и 3,02 ± 0,22 мкМ – для Tpm4.1. *б* – Нормализованные температурные зависимости диссоциации Tpm2.1 и Tpm4.1 с поверхности F-актина. Снижение интенсивности светорассеяния отражает диссоциацию комплекса Tpm–F-актин. Значения T_{diss} (т.е. той температуры, при которой интенсивность светорассеяния снижается на 50%) составляют 40,4 ± 0,3 °C для Tpm2.1 и 45,4 ± 0,3 °C – для Tpm4.1

что для Tpm2.1 значение T_{diss} (40,4 ± 0,3 °C) (рис. 4, *б*) было сравнимо с температурой плавления основного калориметрического домена 2 (39,3 °C) (рис. 3, *а*). Это указывает на то, что стабильность комплексов Tpm2.1 с F-актином зависит в первую очередь от стабильности самой молекулы Tpm. Однако стабильность комплексов F-актина с Tpm4.1 была значительно выше, чем термостабильность молекулы Tpm4.1. Это означает, что в случае Tpm4.1 существуют и другие факторы, которые могут влиять на стабильность его комплекса с F-актином. Мы предположили, что дополнительный вклад могут вносить концевые взаимодействия между молекулами Tpm, и оценили их силу методом вискозиметрии. Действительно, вязкость раствора Tpm составила 0,484 ± 0,001 мПа·с для Tpm4.1, что существенно выше, чем значение, полученное для Tpm2.1 – 0,321 ± 0,002 мПа·с.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение свойств Tpm2.1 и Tpm4.1 с другими изоформами Tpm. Tpm4.1 – одна из наименее стабильных изоформ Tpm. Она обладает довольно уникальными структурными свойствами. Почти все части молекулы Tpm4.1 денатурируют вместе как единый калориметрический домен 2 (рис. 3, *б*) и довольно значительная часть Tpm4.1 (около 25%) не структурирована в диапазоне физиологических температур (рис. 1, *а*). Такие структурные особенности, вероятно, придают молекуле Tpm4.1 высокую лабильность, что может влиять на её функциональные свойства.

Результаты, полученные методом ДСК и свидетельствующие о низкой термостабильности изоформы Tpm2.1 (рис. 3, *а*), хорошо согласуются с данными, полученными ранее [29]. По своей стабильности изоформы Tpm2.1 и Tpm4.1 очень похожи друг на друга (рис. 1–3). Отметим, что Tpm2.1, Tpm4.1 и ранее изученная изоформа Tpm2.2 [37] составляют когорту нестабильных изоформ Tpm. С большой долей вероятности уникально низкая термостабильность этих изоформ Tpm может быть важна для их функционирования.

Сродство Tpm4.1 и Tpm2.1 к F-актину можно оценить как среднее по сравнению с другими изоформами Tpm. Аффинность этих изоформ уступает некоторым продуктам гена *TPM1*, таким как Tpm1.5 (1,1 мкМ) и Tpm1.7 (0,4 мкМ) [39]; но, с другой стороны, их сродство значительно выше, чем у Tpm1.12 (15,5 мкМ) [39] или Tpm3.7 (3,7 мкМ) [40]. Примечательно, что сродство Tpm4.1 и Tpm2.1 к F-актину ниже, чем у других продуктов генов *TPM4* и *TPM2* (1,07 мкМ – для Tpm4.2 и 0,33 мкМ – для Tpm2.2) [39, 41]. Сродство Tpm2.1 к F-актину, полученное в наших экс-

периментах, отличается от предыдущих исследований [30–32, 39–41]. Эти различия в значениях аффинности можно объяснить значительными различиями в экспериментальных условиях, таких как используемая ионная сила, различия в изоформах актина и др.

Стабильность комплекса Tpm4.1 с F-актином (T_{diss} = 45,4 °C) также находится на уровне средних значений для различных изоформ Tpm; однако она значительно ниже, чем у другого продукта гена *TPM4* – Tpm4.2 (T_{diss} = = 49,8 °C) [39]. Что касается изоформы Tpm2.1, то она образует один из самых нестабильных комплексов с F-актином среди других изоформ Tpm [39–41].

В целом, можно отметить, что основным отличием изучаемых нами препаратов Tpm от других изоформ является их низкая термостабильность. Довольно сложно разобраться, к каким функциональным последствиям это может привести. Однако можно понять, почему изоформы Tpm4.1 и Tpm2.1 крайне нестабильны, если обратиться к их аминокислотным последовательностям и использовать то свойство, что структура coiled-coil строго определяется её первичной последовательностью.

Возможные причины низкой стабильности изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1. Предыдущие работы показали важность первичной последовательности Tpm для формирования его стабильной структуры. Особую роль в стабильности молекулы Tpm играют вариабельные экзоны генов Tpm [38]. Так, было продемонстрировано, что стабильность многих изоформ Tpm зависит от того, какие экзоны входят в состав его последовательности [38]. Исследования по множественному выравниванию изоформ Tpm показали, что основное различие в последовательностях между разными изоформами Tpm достигается за счёт использования альтернативно сплайсированных экзонов [42]. В то же время одни и те же экзоны высоко консервативны между разными генами [1, 42]. Это означает, что изоформы Tpm, кодируемые разными генами с одними и теми же экзонами, должны быть похожи друг на друга по своим свойствам.

Изоформы Tpm2.1 и Tpm4.1 имеют вариабельные экзоны 1a2b6a9d и 1a2b6b9d соответственно. Легко видеть, что эти изоформы отличаются друг от друга только экзонами 6 (6a или 6b), если не учитывать экспрессию с разных генов. Экзон 6 приходится на центральную часть молекулы Tpm, одну из самых нестабильных частей во всей молекуле, как было показано ранее [43], и, вероятно, поэтому эти изоформы так близки по своей стабильности.

Ген *TPM1* также экспрессирует две изоформы Tpm с идентичным набором экзонов, изоформы Tpm1.6 и Tpm1.7. Структуры экзонов Tpm1.6 и Tpm1.7 идентичны структурам Tpm4.1 и Tpm2.1 соответственно. Однако термостабильность молекул Tpm1.6 и Tpm1.7 значительно выше, чем у изученных изоформ. Особенно это касается калориметрического домена 3, соответствующего плавлению *N*-концевой части молекул Tpm1.6 и Tpm1.7 [39]. Термическая стабильность этого домена была выше на 7,1 °C в случае Tpm1.7 по сравнению с Tpm2.1 и на 6,7 °C – в случае Tpm1.6 по сравнению с главным (объединённым) доменом 2 в случае Tpm4.1.

Для того чтобы понять, в чём может быть причина такого различия, мы сравнили последовательности этих изоформ (рис. 5). Tpm1.6 отличается от Tpm4.1 42 аминокислотными остатками, что составляет 14,7% от общей последовательности. Однако 19 аминокислотных замен аналогичны (рис. 5). В свою очередь, Tpm1.7 отличается от Tpm2.1 49 остатками, т.е. несколько больше по сравнению с предыдущей парой. Отличие от общей последовательности составляет 17,2%, а 27 остатков из 49 аналогичны (рис. 5). В целом, можно сказать, что последовательности очень похожи друг на друга, однако в случае молекулы Tpm даже единичная замена может сильно повлиять на её стабильность. Поэтому мы решили внимательно посмотреть на последовательности. Особое внимание при анализе уделялось положениям *a* и *d* в гептадах, так как они отвечают за стабильность гидрофобного кора структуры coiled-coil. Во-вторую очередь, внимание было сосредоточено на позициях *e* и *g*, которые могут дополнительно стабилизировать структуру суперспирали. Поскольку наибольшая разница в стабильности наблюдается в *N*-концевой части молекул, последовательность этой части анализировали в первую очередь.

Имеется 5 замен в выбранных положениях между изоформами Tpm1.7 и Tpm2.1 в *N*-концевой части их молекул. Это замены L43Q, L57V, L64V и L71Q в позиции *a* и A63S – в позиции *g* (первая буква кода соответствует изоформе Tpm1.7, а вторая – Tpm4.1). Ни одна из этих замен не может быть отмечена как критическая для структуры двойной суперспирали. Однако, с точки зрения теоретической стабильности спиральных структур [2, 44], все замены в позиции *a* имеют несколько худшие параметры стабилизации гидрофобного кора в случае изоформы Tpm2.1. По-видимому, снижение стабильности *N*-концевой части молекулы Tpm2.1 по сравнению с Tpm1.7 можно

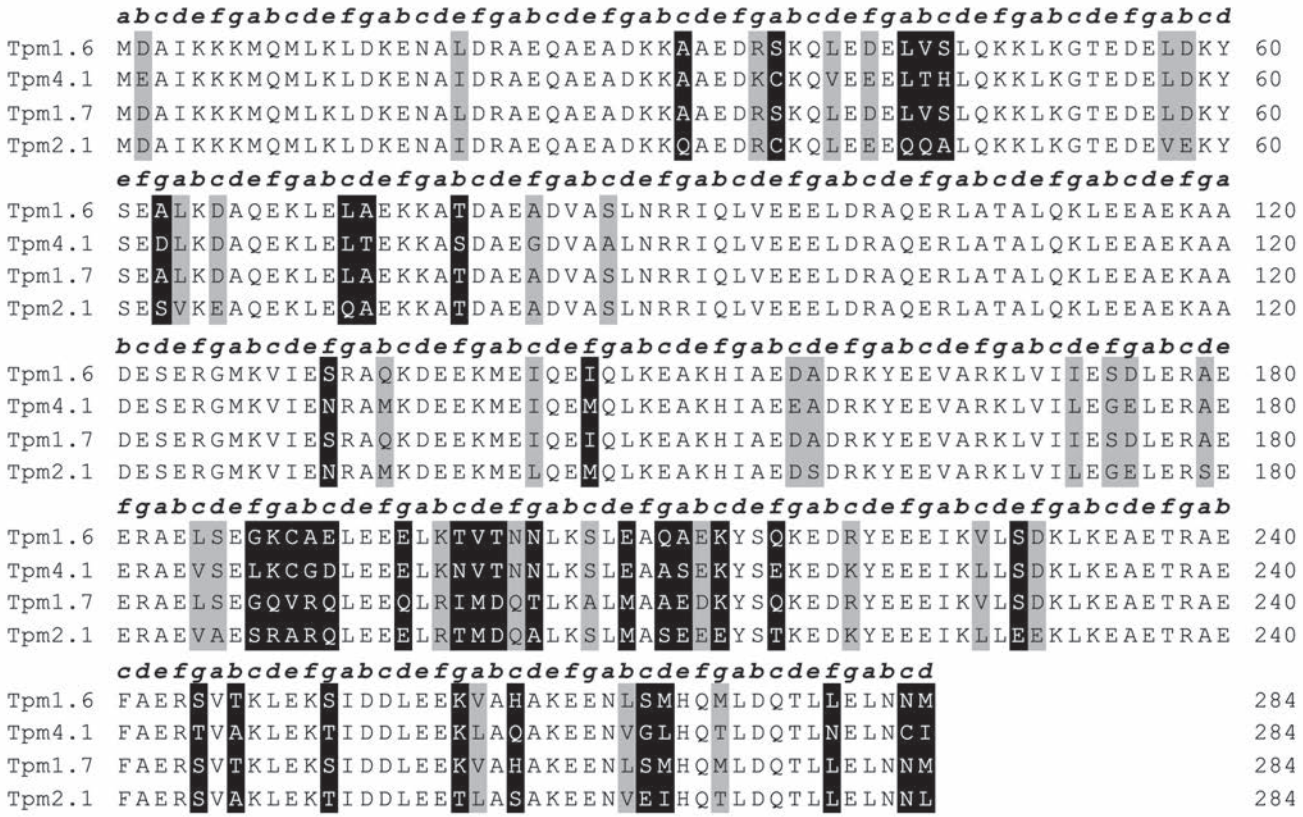

Рис. 5. Результаты множественного выравнивания, полученные для изоформ тропомиозина Tpm1.6, Tpm1.7, Tpm2.1 и Tpm4.1. Светло-серый цвет указывает на сходные аминокислоты в первичной последовательности молекул Tpm, темно-серый цвет – на аминокислоты, существенно различающиеся по своим свойствам, а без окраски приведены идентичные аминокислоты. Положения аминокислот в структуре гептад выделены курсивом *a*–*g*

объяснить кумулятивным эффектом небольшого снижения стабильности, вызванного заменами в положении *a*. В *C*-концевой части молекулы имеется большое количество замен между этими двумя изоформами (рис. 5). Однако все они в основном приходятся на позиции *b*, *c* и *f*, меньше – на позиции *e* и *g*, и только две воздействуют на гидрофобный кор молекулы. Эти замены, V190A и K213E, размещены в положениях *a* и *d* соответственно. Первая из них (V190A) может вызвать незначительную дестабилизацию в структуре суперспирали, а другая (K213E) не должна приводить к существенным изменениям, поскольку заряд в гидрофобном коре молекулы независимо от его знака приводит к дестабилизации структуры coiled-coil.

Аналогичная ситуация наблюдается и при сравнительном анализе последовательностей изоформ Tpm1.6 и Tpm4.1 (рис. 5). Как и в предыдущем случае, основное отличие в стабильности приходится на *N*-концевую часть молекулы Tpm, в которой не так много замен. Особое внимание следует уделить трём из них. Две из этих замен (L39V и A74T) размещены в позиции *d* и одна (A63D) – в позиции *g*. Все они могут вызывать эффект дестабилизации структуры coiled-coil. Аминокислотных замен в *C*-концевой части молекулы Tpm также больше, как и в предыдущим случае. Однако только 2 замены, A211S и V260L, находящиеся в положении *a*, могли бы повлиять на стабильность суперспирали. Однако предсказать их действие сложно. Замена в положении 211 должна приводить к небольшой дестабилизации *C*-концевой части молекулы Tpm4.1 по сравнению с Tpm1.6, но этот эффект, вероятно, устраняется заменой V260L. В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что калориметрический домен 2 на кривых ДСК имеет одинаковую температуру плавления как для Tpm4.1, так и для Tpm1.6 [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены различные свойства изоформ Tpm2.1 и Tpm4.1. Показано, что основным отличием этих изоформ от других изоформ Tpm является их низкая стабильность (термостабильность). Причина сниженной стабильности этих изоформ кроется в группе аминокислотных остатков в гидрофоб-

ном коре молекулы, которая может дестабилизировать структуру двойной спирали (coiled-coil). Кроме того, изоформы Tpm2.1 и Tpm4.1 очень похожи друг на друга по своим свойствам. Единственным выявленным различием является термостабильность их комплексов с F-актином, обусловленная, по-видимому, различиями в силе концевых взаимодействий молекул этих изоформ. Принимая во внимание, что функциональные свойства Tpm часто связаны с устойчивостью структуры coiled-coil его молекулы, можно предположить, что сниженная стабильность этих изоформ может иметь функциональное значение.

Вклад авторов. А.М. Матюшенко – концепция и руководство работой; А.С. Логвинов, Д.С. Ямпольская и В.В. Нефёдова – получение препаратов Tpm и постановка экспериментов; С.Ю. Клейменов – выполнение экспериментов методом ДСК; А.М. Матюшенко и Д.И. Левицкий – написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-10106).

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. Gunning, P., O'Neill, G., and Hardeman, E. (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space, *Physiol. Rev.*, **88**, 1-35, doi: 10.1152/physrev.00001.2007.
2. Nevzorov, I. A., and Levitsky, D. I. (2011) Tropomyosin: double helix from the protein world, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1507-1527, doi: 10.1134/S0006297911130098.
3. Tardiff, J. C. (2010) Tropomyosin and dilated cardiomyopathy: revenge of the actinomyosin "gatekeeper", *J. Am. Coll. Cardiol.*, **55**, 330-332, doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.018.
4. Manstein, D. J., and Mulvihill, D. P. (2016) Tropomyosin-mediated regulation of cytoplasmic myosins, *Traffic*, **17**, 872-877, doi: 10.1111/tra.12399.
5. Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P., and Mulvihill, D. P. (2015) Tropomyosin – master regulator of actin filament function in the cytoskeleton, *J. Cell Sci.*, **128**, 2965-2974, doi: 10.1242/jcs.172502.
6. Khaitlina, S. Y. (2015) Tropomyosin as a regulator of actin dynamics, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **318**, 255-291, doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.06.002.
7. Goldmann, W. H. (2000) Binding of tropomyosin-troponin to actin increases filament bending stiffness, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 1225-1228, doi: 10.1006/bbrc.2000.3608.
8. Nabiev, S. R., Ovsyannikov, D. A., Kopylova, G. V., Shchepkin, D. V., Matyushenko, A. M., Koubassova, N. A., Levitsky, D. I., Tsaturyan, A. K., and Bershitsky, S. Y. (2015) Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament, *Biophys. J.*, **109**, 373-379, doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.006.
9. Weigt, C., Schoepper, B., and Wegner, A. (1990) Tropomyosin-troponin complex stabilizes the pointed ends of actin filaments against polymerization and depolymerization, *FEBS Lett.*, **260**, 266-268, doi: 10.1016/0014-5793(90)80119-4.
10. Broschat, K. O. (1990) Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end, *J. Biol. Chem.*, **265**, 21323-21329, doi: 10.1016/S0021-9258(17)45363-4.
11. Schevzov, G., Vrhovski, B., Bryce, N. S., Elmir, S., Qiu, M. R., O'Neill, G. M., Yang, N., Verrills, N. M., Kavallaris, M., and Gunning, P. W. (2005) Tissue-specific tropomyosin isoform composition, *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 557-570, doi: 10.1369/jhc.4A6505.2005.
12. Weinberger, R. P., Henke, R. C., Tolhurst, O., Jeffrey, P. L., and Gunning, P. (1993) Induction of neuron-specific tropomyosin mRNAs by nerve growth factor is dependent on morphological differentiation, *J. Cell Biol.*, **120**, 205-215, doi: 10.1083/jcb.120.1.205.
13. Pelham, R. J. Jr., Lin, J. J., and Wang, Y. L. (1996) A high molecular mass non-muscle tropomyosin isoform stimulates retrograde organelle transport, *J. Cell Sci.*, **109** (Pt 5), 981-989, doi: 10.1242/jcs.109.5.981.
14. Thoms, J. A., Loch, H. M., Bamburg, J. R., Gunning, P. W., and Weinberger, R. P. (2008) A tropomyosin 1 induced defect in cytokinesis can be rescued by elevated expression of cofilin, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **65**, 979-990, doi: 10.1002/cm.20320.
15. Caldwell, B. J., Lucas, C., Kee, A. J., Gaus, K., Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Yap, A. S., and Gomez, G. A. (2014) Tropomyosin isoforms support actomyosin biogenesis to generate contractile tension at the epithelial zonula adherens, *Cytoskeleton*, **71**, 663-676, doi: 10.1002/cm.21202.
16. McMichael, B. K., and Lee, B. S. (2008) Tropomyosin 4 regulates adhesion structures and resorptive

capacity in osteoclasts, *Exp. Cell Res.*, **314**, 564-573, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.10.018.
17. Craig, R., and Lehman, W. (2001) Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **311**, 1027-1036, doi: 10.1006/jmbi.2001.4897.
18. Sweeney, H. L., and Hammers, D. W. (2018) Muscle contraction, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, a023200, doi: 10.1101/cshperspect.a023200.
19. Fath, T. (2013) Tropomodulins and tropomyosins – organizers of cellular microcompartments, *Biomol. Concepts*, **4**, 89-101, doi: 10.1515/bmc-2012-0037.
20. Gray, K. T., Kostyukova, A. S., and Fath, T. (2017) Actin regulation by tropomodulin and tropomyosin in neuronal morphogenesis and function, *Mol. Cell. Neurosci.*, **84**, 48-57, doi: 10.1016/j.mcn.2017.04.002.
21. Hardeman, E. C., Bryce, N. S., and Gunning, P. W. (2020) Impact of the actin cytoskeleton on cell development and function mediated via tropomyosin isoforms, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **102**, 122-131, doi: 10.1016/j.semcdb.2019.10.004.
22. Geeves, M. A., Hitchcock-DeGregori, S. E., and Gunning, P. W. (2015) A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 147-153, doi: 10.1007/s10974-014-9389-6.
23. Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P. W., and Lappalainen, P. (2011) A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers, *Curr. Biol.*, **21**, 539-550, doi: 10.1016/j.cub.2011.03.007.
24. Sanders, C., Burtnick, L. D., and Smillie, L. B. (1986) Native chicken gizzard tropomyosin is predominantly a beta gamma-heterodimer, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12774-12778, doi: 10.1016/S0021-9258(18)67160-1.
25. Wolfenson, H., Meacci, G., Liu, S., Stachowiak, M. R., Iskratsch, T., Ghassemi, S., Roca-Cusachs, P., O'Shaughnessy, B., Hone, J., and Sheetz, M. P. (2016) Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices, *Nat. Cell. Biol.*, **18**, 33-42, doi: 10.1038/ncb3277.
26. Boyd, J., Risinger, J. I., Wiseman, R. W., Merrick, B. A., Selkirk, J. K., and Barrett, J. C. (1995) Regulation of microfilament organization and anchorage-independent growth by tropomyosin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11534-11538, doi: 10.1073/pnas.92.25.11534.
27. Stehn, J. R., Schevzov, G., O'Neill, G. M., and Gunning, P. W. (2006) Specialisation of the tropomyosin composition of actin filaments provides new potential targets for chemotherapy, *Curr. Cancer Drug Targets*, **6**, 245-256, doi: 10.2174/156800906776842948.
28. Mahadev, K., Raval, G. S., Bharadwaj, S., Willingham, M. C., and Lange, E. M. (2002) Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1, *Exp. Cell Res.*, **279**, 40-51, doi: 10.1006/excr.2002.5583.
29. Nevzorov, I., Redwood, C., and Levitsky, D. I. (2008) Stability of two beta-tropomyosin isoforms: effects of mutation Arg91Gly, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **29**, 173-176, doi: 10.1007/s10974-009-9171-3.
30. Gateva, G., Kremneva, E., Reindl, T., Kotila, T., and Kogan, K. (2017) Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations *in vitro*, *Curr. Biol.*, **27**, 705-713, doi: 10.1016/j.cub.2017.01.018.
31. Coulton, A., Lehrer, S. S., and Geeves, M. A. (2006) Functional homodimers and heterodimers of recombinant smooth muscle tropomyosin, *Biochemistry*, **45**, 12853-12858, doi: 10.1021/bi0613224.
32. Janco, M., Bonello, T. T., Byun, A., Coster, A. C. F., Lebhar, H., Dedova, I., Gunning, P. W., and Böcking, T. (2016) The impact of tropomyosins on actin filament assembly is isoform specific, *Bioarchitecture*, **6**, 61-75, doi: 10.1080/19490992.2016.1201619.
33. Jeong, S., Lim, S., Schevzov, G., Gunning, P. W., and Helfman, D. M. (2017) Loss of Tpm4.1 leads to disruption of cell-cell adhesions and invasive behavior in breast epithelial cells via increased Rac1 signaling, *Oncotarget*, **8**, 33544-33559, doi: 10.18632/oncotarget.16825.
34. Monteiro, P. B., Lataro, R. C., Ferro, J. A., and Reinach, F.-C. (1994) Functional α-tropomyosin produced in *Escherichia coli*. A dipeptide extension can substitute the amino-terminal acetyl group, *J. Biol. Chem.*, **269**, 10461-10466, doi: 10.1016/S0021-9258(17)34082-6.
35. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershitsky, S. Y., Tsaturyan, A. K., Sluchanko, N. N., and Levitsky, D. I. (2014) Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α-tropomyosin molecule, *FEBS J.*, **281**, 2004-2016, doi: 10.1111/febs.12756.
36. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871, doi: 10.1016/S0021-9258(18)62016-2.
37. Matyushenko, A. M., Kleymenov, S. Y., Susorov, D. S., and Levitsky, D. I. (2018) Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal-muscle isoforms of tropomyosin, *Biophys. Chem.*, **243**, 1-7, doi: 10.1016/j.bpc.2018.09.002.
38. Nefedova, V. V., Marchenko, M. A., Kleymenov, S. Y., Datskevich, P. N., Levitsky, D. I., and Matyushenko, A. M. (2019) Thermal unfolding of various human non-muscle isoforms of tropomyosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **514**, 613-617, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.008.
39. Marchenko, M., Nefedova, V., Artemova, N., Kleymenov, S., Levitsky, D., and Matyushenko, A. (2021) Structural and functional peculiarities of cytoplasmic tropomyosin isoforms, the products of

TPM1 and TPM4 genes, *Int. J. Mol. Sci*., **22**, 5141, doi: 10.3390/ijms22105141.
40. Marchenko, M. A., Nefedova, V. V., Yampolskaya, D. S., Borzova, V. A., Kleymenov, S. Y., Nabiev, S. R., Nikitina, L. V., Matyushenko, A. M., and Levitsky, D. I. (2021) Comparative structural and functional studies of low molecular weight tropomyosin isoforms, the TPM3 gene products, *Arch. Biochem. Biophys*., **710**, 108999, doi: 10.1016/j.abb.2021.108999.
41. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershitsky, S. Y., and Levitsky, D. I. (2020) Unique functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin, *Biochimie*, **174**, 1-8, doi: 10.1016/j.biochi.2020.03.013.
42. Lees-Miller, J. P., and Helfman, D. M. (1991) The molecular basis for tropomyosin isoform diversity, *Bioessays*, **13**, 429-437, doi: 10.1002/bies.950130902.
43. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Sluchanko, N. N., and Levitsky, D. I. (2015) Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α-tropomyosin on the domain structure of its molecule, *Biophys. Chem*., **196**, 77-85, doi: 10.1016/j.bpc.2014.10.001.
44. Arndt, K. M., Pelletier, J. N., Müller, K. M., Plückthun, A., and Alber, T. (2002) Comparison of *in vivo* selection and rational design of heterodimeric coiled coils, *Structure*, **10**, 1235-1248, doi: 10.1016/s0969-2126(02)00838-9.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF TROPOMYOSIN ISOFORMS Tpm4.1 AND Tpm2.1

A. S. Logvinov[1,2], V. V. Nefedova[1], D. S. Yampolskaya[1], S. Y. Kleymenov[1,3], D. I. Levitsky[1], and A. M. Matyushenko[1]*

[1] *Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: ammatyushenko@mail.ru*

[2] *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

[3] *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Tropomyosin (Tpm) is one of the most important partners of the actin filament, largely determining its properties. In animal organisms, there are different isoforms of Tpm, which are believed to be involved in the regulation of various cellular functions. However, the molecular mechanisms of regulation of the functions of actin filaments by various cytoplasmic isoforms of Tpm are still poorly understood. In our work, we used various methods to study the properties of Tpm2.1 and Tpm4.1 isoforms and compared them both with each other and with the properties of Tpm isoforms that had already been subjected to more detailed study earlier. The isoforms Tpm2.1 and Tpm4.1 almost did not differ from each other in their affinity for F-actin, in the thermal stability of their molecules and in their resistance to limited proteolysis by trypsin, but they differed markedly in viscosity of their solutions and in the thermal stability of their complexes with F-actin. The main difference of Tpm2.1 and Tpm4.1 from other previously studied Tpm isoforms (such, for example, as Tpm1.6 and Tpm1.7) is their extremely low thermal stability measured by CD and DSC methods. The possible causes of this instability are considered in detail when comparing the amino acid sequences of Tpm4.1 and Tpm2.1 with the sequences of isoforms Tpm1.6 and Tpm1.7, which did not differ from Tpm4.1 and Tpm2.1, respectively, by the exon structure of their genes.

Keywords: tropomyosin isoforms; coiled-coil stability, actin-associated proteins, actin filaments, differential scanning calorimetry

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 995 – 1010

УДК 576.32/.36

ФИТОГОРМОНЫ ОКАЗЫВАЮТ ВЛИЯНИЕ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ СТАТУС ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ПУТЁМ АКТИВАЦИИ UPR

© 2023 Е.П. Турищева[1]*, М.С. Вильданова[1], П.А. Вишнякова[2,3], Д.К. Матвеева[4], А.А. Саидова[1], Г.Е. Онищенко[1], Е.А. Смирнова[1]

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: kitten-caterina@yandex.ru*

[2] *Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, 117997 Москва, Россия*

[3] *Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия*

[4] *ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 17.03.2023
После доработки 28.04.2023
Принята к публикации 02.05.2023

Нормализация секреторной активности и уровня дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, в том числе фибробластов, является одной из важных биомедицинских проблем. Одним из решений этой проблемы является воздействие на сигнальный каскад «ответ на неправильно свёрнутые белки» (UPR), который активируется при дифференцировке фибробластов. В настоящем исследовании было изучено влияние фитогормонов на секреторную активность и дифференцировку культивируемых дермальных фибробластов человека. С помощью анализа уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR, в этих клетках мы установили, что фитогормон абсцизовая кислота (АБК) повышала экспрессию генов *GRP78* и *ATF4*, а фитогормон гиббереллиновая кислота (ГК) повышала экспрессию *CHOP*. Оценка секреторно-синтетической активности фибробластов показала, что АБК увеличивала уровень секреции и синтеза проколлагена I и уровень синтеза фибронектина, а также общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. Кроме того, АБК стимулировала синтез маркера миофибробластов гладкомышечного актина α (α-SMA) и повышала количество миофибробластов в клеточной популяции. Напротив, ГК увеличивала уровень секреции фибронектина, но снижала уровень синтеза проколлагена I, а также общей продукции коллагеновых белков внеклеточного матрикса. Кроме того, при действии ГК снижался уровень синтеза α-SMA и количество миофибробластов в клеточной популяции. Наши результаты дают основания полагать, что фитогормоны являются модуляторами секреторно-синтетической активности фибробластов и оказывают влияние на их дифференцировочный статус.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: абсцизовая кислота, гиббереллиновая кислота, фибробласты, миофибробласты, заживление ран, фиброз, дифференцировка, гладкомышечный актин.

DOI: 10.31857/S032097252306009X, **EDN:** EFPTLN

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание на оптимальном уровне секреторно-синтетических процессов у разных типов дифференцированных клеток важно для нормального функционирования органов и тканей. Нарушение регуляции секреторно-синтетической активности, вызванное изменением дифференцировочного статуса клеток или изменением количества дифференцированных

Принятые сокращения: АБК – абсцизовая кислота; ГК – гиббереллиновая кислота; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ATF4 – активирующий фактор транскрипции 4 (activating transcription factor 4); CHOP – CCAAT/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein); GRP78 – белок 78 кДа, регулируемый глюкозой (glucose-regulated protein 78); IRE1 – требующий инозитол белок 1 (inositol-requiring protein 1); PERK – киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase); sXBP1 – сплайсированный X-box-связывающий белок 1 (spliced X-box-binding protein 1); UPR – ответ на неправильно свёрнутые белки (unfolded protein response); α-SMA – гладкомышечный актин α (α-smooth muscle actin).

* Адресат для корреспонденции.

клеток, ведёт к развитию широкого спектра патологических состояний, в том числе фиброзу, снижению регенеративного потенциала, диабету II-го типа, остеопорозу и многим другим. Так, например, избыточная дифференцировка фибробластов в миофибробласты вызывает фиброз, сопровождающийся повышенной продукцией внеклеточного матрикса, а недостаточная активность миофибробластов и/или их недостаточное количество приводит к подавлению регенеративных процессов [1–6]. Дедифференцировка β-клеток островков Лангерганса, секретирующих инсулин, является одной из причин, вызывающих диабет II-го типа [7–9], а снижение активности остеобластов в менопаузе ведёт к остеопорозу [10]. Следует отметить, что для дифференцировки многих клеток с высокой секреторной активностью, в том числе фибробластов, предшественников β-клеток и преостеобластов, необходима активация сигнального каскада, носящего название «ответ на неправильно свёрнутые белки» или UPR [2, 11–18]. При этом до настоящего времени неизвестно, является ли активация UPR индуктором дифференцировки клеток или же UPR запускается из-за повышенного синтеза секреторных белков в процессе дифференцировки [18]. Нормализация секреторной активности и уровня дифференцировки клеток, в частности за счёт воздействия на молекулярные компоненты UPR, является одной из задач терапии многих патологий [1, 7, 9, 12, 13, 18].

Биологически активные молекулы, обнаруженные в различных видах растений, давно являются объектом пристального внимания в биологии и медицине и широко используются для создания на их основе новых медицинских препаратов [19–22]. Среди них определённый интерес представляют фитогормоны – сигнальные молекулы, регулирующие рост и дифференцировку растений. Известно, что эти соединения могут оказывать влияние на секреторно-синтетическую активность и дифференцировочный статус некоторых культивируемых клеток животных, в том числе и человека. Так, например, фитогормон гиббереллиновая кислота (ГК) повышает содержание α-амилазы в мезенхимных стромальных клетках [23] и активирует UPR и дифференцировку в культивируемых нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения [24]. Другой фитогормон, абсцизовая кислота (АБК), стимулирует секрецию инсулина β-клетками островков Лангерганса и секрецию гастроинтестинального гормона энтероэндокринными клетками [25, 26]. Кроме того, было показано, что АБК в микромолярных концентрациях нормализует аномально повышенную секреторную активность, вызывая снижение отложения коллагена у фибробластов, полученных от больных системным склерозом [27]. Согласно данным этих же авторов, АБК не влияет на секреторную активность фибробластов, полученных от здоровых доноров. Однако низкие концентрации и короткая продолжительность воздействия (24 ч) не позволяют сделать однозначные выводы о характере влияния АБК на данный тип клеток, так как анализ изменения секреторной активности фибробластов обычно проводится через 48 и более часов инкубации с исследуемыми агентами [2, 13, 28]. Кроме этого, авторы исследования не определяли изменение содержания в популяции миофибробластов, для которых характерна повышенная секреторно-синтетическая активность [1, 16]. Поэтому мы полагаем, что влияние АБК на секреторную активность и дифференцировочный статус фибробластов требует более глубокого изучения.

Таким образом, есть основания полагать, что фитогормоны влияют на секреторно-синтетическую систему и дифференцировочный статус некоторых типов культивируемых клеток, в том числе соединительнотканного происхождения (фибробластов, мезенхимных стромальных клеток), но существующие данные носят фрагментарный характер и нуждаются в верификации. В связи с этим целью нашего исследования было изучить влияние АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность и признаки дифференцировки культивируемых дермальных фибробластов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование дермальных фибробластов человека. Дермальные фибробласты человека (линия HdFb (d75)), полученные из Уникальной научной установки «Коллекция клеточных культур» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки телёнка (FBS; «HyClone», США), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко») и коммерческую смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (5 мл смеси на 450 мл среды) («ПанЭко») в стандартных условиях (37 °C, 5% CO_2). Согласно паспорту клеточной линии HdFb (d75), использованной в настоящем исследовании, время удвоения популяции составляло 24 ч. Клетки пассировали смесью растворов трипсина («ПанЭко»)

и Версена («ПанЭко») в соотношении 3/7. При проведении экспериментов клетки 5–8 пассажей высаживали в чашки Петри (d = = 60 мм) и 24-луночные планшеты в концентрации 50 000 клеток/мл или в чашки Петри (d = 35 мм) с покровными стёклами в концентрации 40 000 клеток/мл и культивировали в течение 24 ч. Затем в культуральную среду добавляли стоковые спиртовые растворы АБК (189 мМ) и ГК (500 мМ) («Merck», США) до конечной концентрации 2 мМ. Время культивирования с фитогормонами составляло 24 ч, 48 ч или 7 суток. Клетки достигали конфлюэнтного монослоя через 5–6 суток после посадки. Для контрольных точек вместо фитогормонов в культуральную среду добавляли соответствующий объём 96%-ного этилового спирта.

Иммуноферментный анализ. Анализ уровня секреции проколлагена I и фибронектина проводили с помощью коммерческих наборов Human Pro-Collagen I alpha 1 SimpleStep ELISA® Kit («Abcam», Великобритания) и Human Fibronectin SimpleStep ELISA® Kit («Abcam») соответственно, согласно протоколам, приложенным к наборам. Оптическую плотность измеряли с помощью анализатора иммуноферментных реакций Униплан («Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в однократном лизирующем буфере, содержащем 150 мМ NaCl («ПанЭко»), 0,1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и коктейль ингибиторов протеаз (все составляющие – «Merck»). Затем в лизат добавляли буфер Лэммли («Bio-Rad», США), содержащий β-меркаптоэтанол («Merck»), инкубировали лизат при 65 °C в течение 5 мин и дополнительно денатурировали в течение 2 мин при –20 °C. Белки разделяли с помощью вертикального электрофореза, используя 8%-ные или 10%-ные полиакриламидные гели. Полусухой перенос белков на ПВДФ-мембрану («Bio-Rad») осуществляли с помощью Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini LF PVDF TransferKit («Bio-Rad Laboratories», США). Затем ПВДФ-мембрану инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке, разведённом Tris-буфером (TBS; «Bio-Rad»), содержащем 0,1% Tween («Bio-Rad»), в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами к GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), проколлагену I, фибронектину и α-SMA (гладкомышечный актин α) («Abcam») в течение ночи при +4 °C и затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad»), 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белков использовали Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit («Thermo Fisher Scientific», США) и систему визуализации ChemiDoc™ («Bio-Rad»). Оптическую плотность белковых полос определяли с помощью ImageLab Software («Bio-Rad»). Полученные значения для целевых белков нормировали на GAPDH.

Колориметрический полуколичественный анализ общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. Дермальные фибробласты высаживали в 24-луночные планшеты («Corning», США) и после добавления фитогормонов культивировали в течение 7 суток. Следует отметить, что схемы экспериментов с длительным (8 суток и более) культивированием клеток, продуцирующих внеклеточный матрикс, являются общепринятыми [29–33]. Далее клетки промывали тёплым PBS (pH 7,2–7,4) («ПанЭко»), фиксировали насыщенным раствором пикриновой кислоты («Merck») в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой и окрашивали 0,1%-ным Sirius Red F3BA («Merck») или 0,1%-ным Fast Green FCF («Merck») в течение 30 мин при комнатной температуре на ротационном шейкере для выявления коллагеновых и неколлагеновых белков соответственно. Для приготовления 0,1%-ных растворов красителей сухие Sirius Red и Fast Green растворяли в насыщенной пикриновой кислоте. В качестве контроля использовали раствор насыщенной пикриновой кислоты, не содержащий красителей. После окрашивания клетки промывали дистиллированной водой и фотографировали на инвертированном микроскопе Eclipse Ti-U («Nikon», Япония; объектив – Nikon Plan Fluor 10×/0.30). Затем красители, связавшиеся с белками внеклеточного матрикса, растворяли в смеси 0,1% NaOH и ледяного абсолютного метанола (1/1). Оптическую плотность полученного элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера Microplate Reader PR2100 («Bio-Rad») при 550 нм (Sirius Red) и 620 нм (Fast Green). Для нормирования полученных значений оптической плотности на количество клеток проводили окрашивание 0,5%-ным Crystal Violet («Merck»), разведённом на абсолютном метаноле, в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем краситель отмывали дистиллированной водой, и клетки фотографировали на микроскопе Eclipse Ti-U. Далее связавшийся краситель растворяли в 96%-ном этаноле, и оптическую плотность полученного элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера Microplate Reader PR2100 при 550 нм.

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров (5'→3')	
	прямой	обратный
GRP78	TCTGCTTGATGTGTGTCCTCTT	GTCGTTCACCTTCGTAGACCT
ATF4	TGGCTGGCTGTGGATGG	TCCCGGAGAAGGCATCCT
CHOP	AGTCTAAGGCACTGAGCGTATC	TCTGTTTCCGTTTCCTGGTT
sXBP1	GCTGAGTCCGCAGCAGGT	CAGGGTCCAACTTGAACAGAAT
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
GAPDH	TGCACCACAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

Иммуноцитохимический анализ. Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида («MP Biochemical», Франция), разведённым в PBS, и пермеабилизировали с помощью 0,5%-ного раствора Triton X-100 («Serva», Германия). Для выявления α-SMA использовали первичные мышиные моноклональные антитела к α-SMA («Merck») и вторичные моноклональные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 («Thermo Fisher Scientific»). Ядра визуализировали с помощью DAPI (4',6-диамидино-2-фениндол) («Merck»); препараты заключали в Mowiol («Hoechst», Германия). Съёмку препаратов проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия; объектив – 63× PlanApo NA 1.40 Oil), снабжённого чёрно-белой цифровой камерой Zeiss Axiocam 202 mono («Carl Zeiss») и программным обеспечением Zeiss ZEN 3.3 (blue edition) («Microscope Software», Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы Fiji (National Institutes of Health, США).

Количественная ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили по описанной ранее схеме [24], используя праймеры («Синтол», Россия) к генам *GRP78*, *ATF4*, *CHOP*; к сплайсированной форме мРНК *XBP1* (*sXBP1*), *HPRT*, а также к *GAPDH* и *YWHAZ*. Последовательности используемых праймеров указаны в таблице. *HPRT*, *GAPDH* и *YWHAZ* использовали в качестве референсных генов. ПЦР для каждого образца проводили в трёх технических повторах. Результаты ПЦР анализировали по методике Vandesompele et al. [34].

Статистический анализ проводили в программе RStudio 1.4.1717 (R 4.1.1). Для проверки достоверности различий между контрольными и экспериментальными значениями использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR. С помощью ПЦР мы провели оценку уровня экспрессии маркеров UPR – *GRP78* (белок 78 кДа, регулируемый глюкозой), *ATF4* (активирующий фактор транскрипции 4), *sXBP1* (сплайсированный X-box-связывающий белок 1) и *CHOP* (CCAAT/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку) – после воздействия 2 мМ АБК и ГК в течение 24 ч (рис. 1). Срок инкубации с фитогормонами и их концентрации были выбраны на основе полученных нами ранее данных об активации UPR через 24 ч воздействия 2 мМ ГК в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения и данных об изменении морфо-функционального состояния секреторно-синтетической системы дермальных фибробластов через 24 ч воздействия 2 мМ АБК и ГК [24, 35]. Оказалось, что при действии АБК в дермальных фибробластах повышалась экспрессия генов *GRP78* и *ATF4* в 2,7 и 1,7 раза соответственно (рис. 1, *а* и *в*). При этом АБК не оказывала значимого влияния на количество *sXBP1* и уровень экспрессии *CHOP* (рис. 1, *д* и *ж*). Напротив, ГК оказывала влияние на уровень экспрессии только *CHOP*, повышая его в 2,9 раза (рис. 1, *б*, *г*, *е* и *з*). Таким образом, АБК и ГК активировали экспрессию генов, кодирующих маркеры UPR в дермаль-

ных фибробластах, при этом паттерны их активации у АБК и ГК различались.

Оценка уровня секреции проколлагена I и фибронектина. В соединительной ткани наиболее распространёнными компонентами внеклеточного матрикса, синтезируемыми фибробластами, являются проколлаген I и фибронектин [36, 37]. В связи с этим с помощью ИФА мы провели оценку уровня секреции проколлагена I и фибронектина дермальными фибробластами после воздействия фитогормонов. Мы предположили, что изменение секреторной активности клеток может происходить позже, чем активация UPR, поэтому проанализировали уровень секреции проколлагена I и фибронектина через 24 и 48 ч культивирования фибробластов с АБК и ГК (рис. 2). Как видно из рис. 2 (*а*–*г*), АБК и ГК не вызывали изменений в уровне секреции проколлагена I и фибронектина через 24 ч воздействия. Однако культивирование с АБК в течение 48 ч приводило к повышению уровня секреции проколлагена I на 6,1% (рис. 2, *д*) и не влияло на уровень секреции фибронектина (рис. 2, *ж*). Культивирование с ГК в течение 48 ч приводило к повышению уровня секреции фибронектина на 7,2% (рис. 2, *з*) и не влияло на уровень секреции проколлагена I (рис. 2, *е*). Таким образом, АБК и ГК оказывали влияние на секреторную активность дермальных фибробластов, причём АБК стимулировала секрецию проколлагена I, а ГК стимулировала секрецию фибронектина.

В связи с тем, что воздействие АБК и ГК на секреторную активность фибробластов проявлялось через 48 ч, этот срок был выбран для дальнейшей оценки влияния фитогормонов на дермальные фибробласты.

Оценка уровня синтеза проколлагена I и фибронектина. Повышение уровня секреции проколлагена I и фибронектина может свидетельствовать о повышении уровня синтеза этих белков. Поэтому с помощью вестерн-блоттинга мы провели оценку уровня синтеза проколлагена I и фибронектина после 48 ч инкубации фибробластов с АБК и ГК (рис. 3). Оказалось, что АБК увеличивала уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в 29,4 раза (рис. 3, *а*) и в 1,6 раза (рис. 3, *в*) соответственно. При этом ГК снижала уровень синтеза проколлагена I в 1,6 раза (рис. 3, *б*), а также снижала уровень синтеза фибронектина (рис. 3, *г*), но статистически недостоверно. Таким образом, в дермальных фибробластах АБК вызывала повышение уровня синтеза белков внеклеточного матрикса – проколлагена I и фибронектина, а ГК достоверно индуцировала снижение уровня синтеза только проколлагена I.

Оценка общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. Во внеклеточном матриксе, формируемом фибробластами, проколлаген I и фибронектин являются преобладающими коллагеновыми и неколлагеновыми белками соответственно [37]. Для оценки влияния АБК и ГК на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами был проведён полуколичественный анализ (рис. 4). Срок инкубации с фитогормонами в данном эксперименте составлял 7 суток, что позволило детектировать перицеллюлярное накопление анализируемых белков, а также их внутриклеточные формы. Коллагеновые и неколлагеновые белки матрикса выявлялись с помощью гистологических красителей Sirius Red и Fast Green соответственно. Красители, связавшиеся с коллагеновыми и неколлагеновыми белками внеклеточного матрикса, элюировали, и затем анализировали оптическую плотность образцов. Для нормирования полученных значений на количество клеток использовали окрашивание гистологическим красителем Crystal Violet, оптическая плотность элюата которого пропорциональна количеству клеток [38].

После культивирования фибробластов с АБК общее содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса возрастало на 17,4%, а содержание неколлагеновых белков возрастало на 29,5% (рис. 4, *а* и *б*). После культивирования фибробластов с ГК содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса, наоборот, снижалось на 21,0% (рис. 4, *в*). Содержание неколлагеновых белков также снижалось, но изменение было статистически недостоверным (рис. 4, *г*). Полученные данные свидетельствуют о том, что общая продукция коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами при действии АБК повышалась, а при действии ГК – снижалась, но статистически достоверные данные были получены только для коллагеновых белков.

Оценка уровня синтеза α-SMA и доли миофибробластов в популяции фибробластов. Изменение секреторно-синтетической активности дермальных фибробластов, наблюдаемое при действии АБК и ГК в настоящем исследовании, может быть связано с изменением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, так как для миофибробластов характерен повышенный, по сравнению с фибробластами, уровень синтеза проколлагена I и фибронектина [1]. Основным маркером миофибробластов является

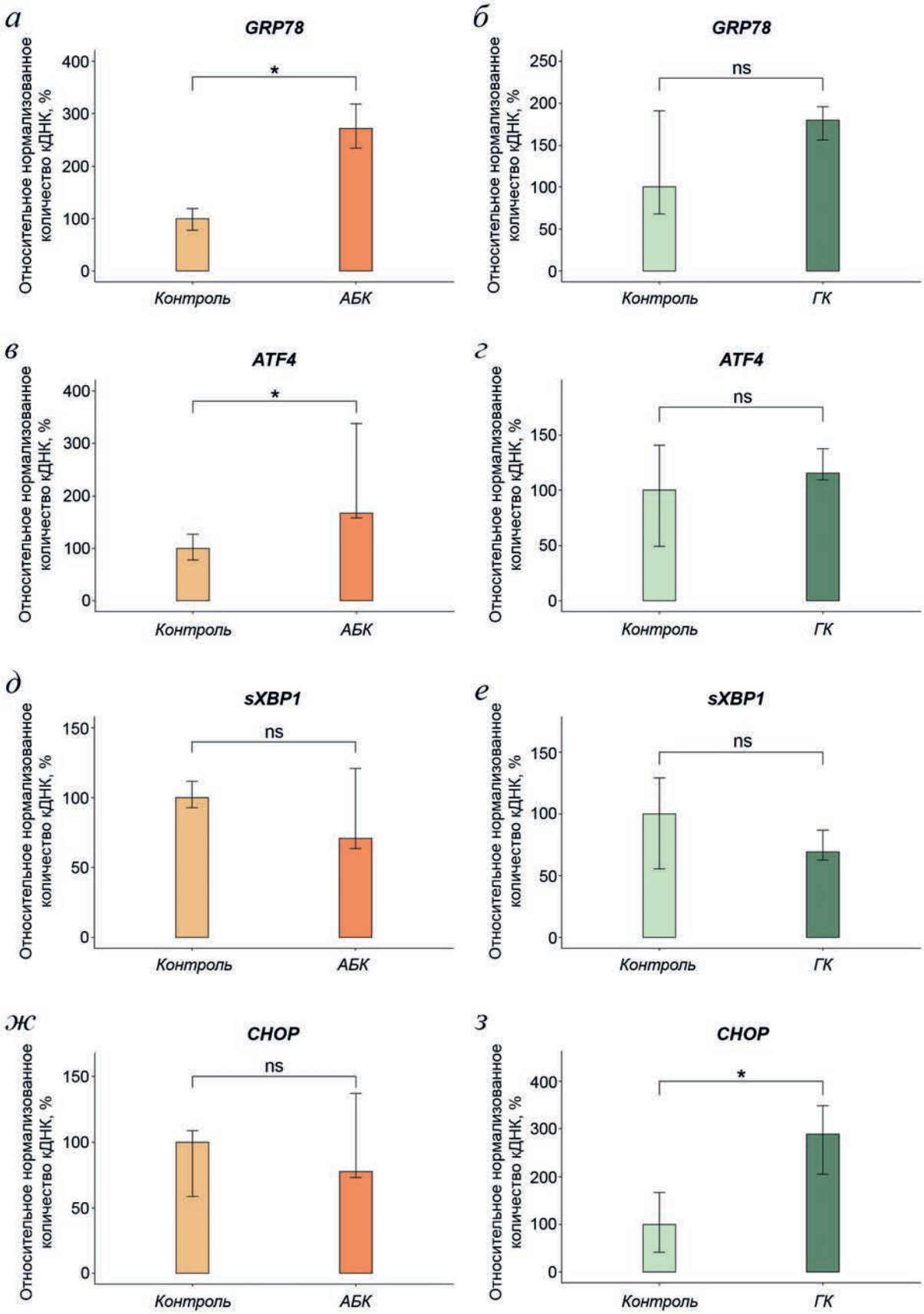

Рис. 1. Уровень экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR *GRP78* (*а* и *б*), *ATF4* (*в* и *г*), *sXBP1* (*д* и *е*) и *CHOP* (*ж* и *з*) после 24-часового воздействия АБК и ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0{,}05$ по критерию Манна–Уитни; 7 независимых экспериментов

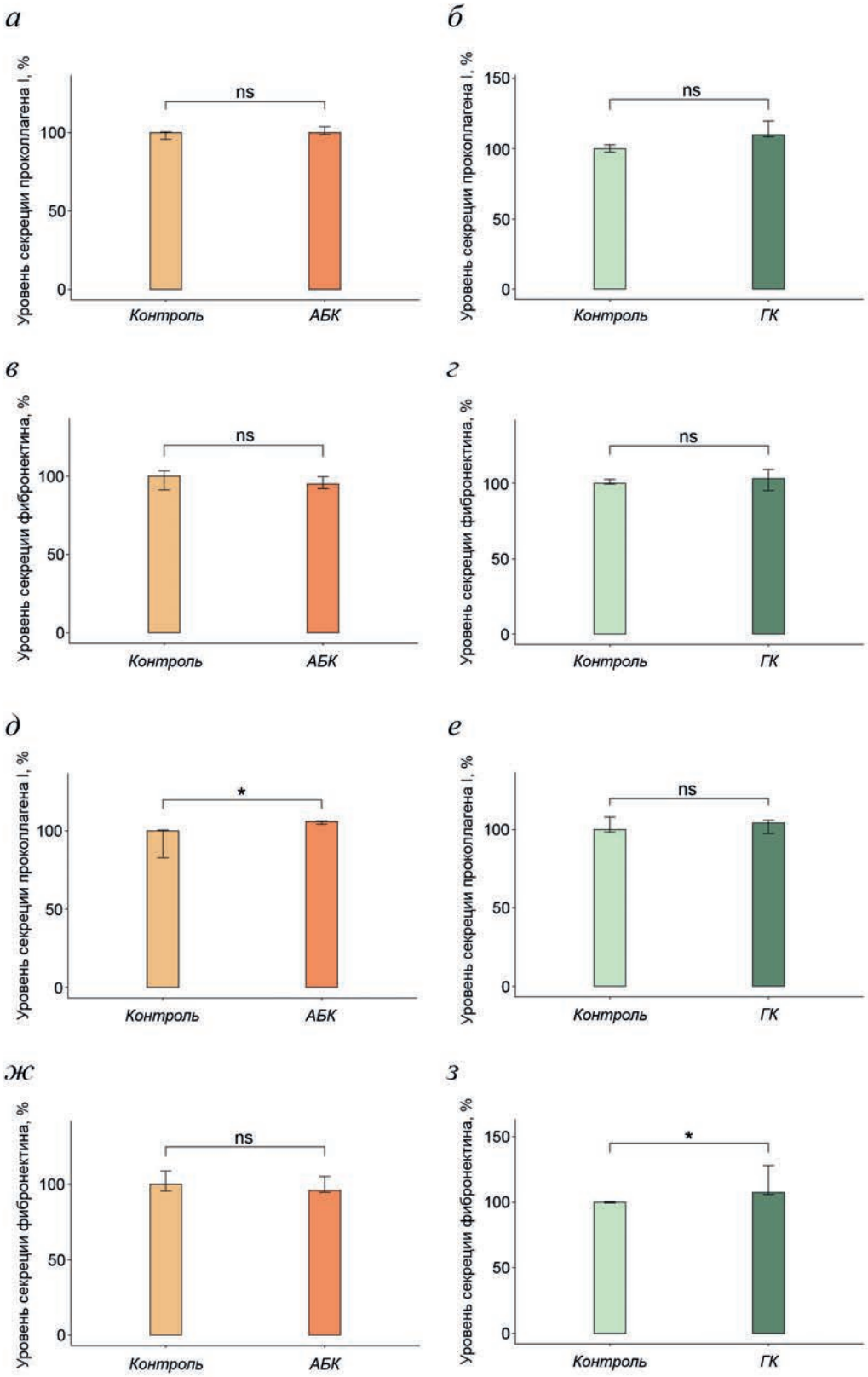

Рис. 2. Влияние АБК и ГК на уровень секреции проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – Уровень секреции проколлагена I после 24 ч воздействия АБК; *б* – уровень секреции проколлагена I после 24 ч воздействия ГК; *в* – уровень секреции фибронектина после 24 ч воздействия АБК; *г* – уровень секреции фибронектина после 24 ч воздействия ГК; *д* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия АБК; *е* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия ГК; *ж* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия АБК; *з* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – не значимо; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов

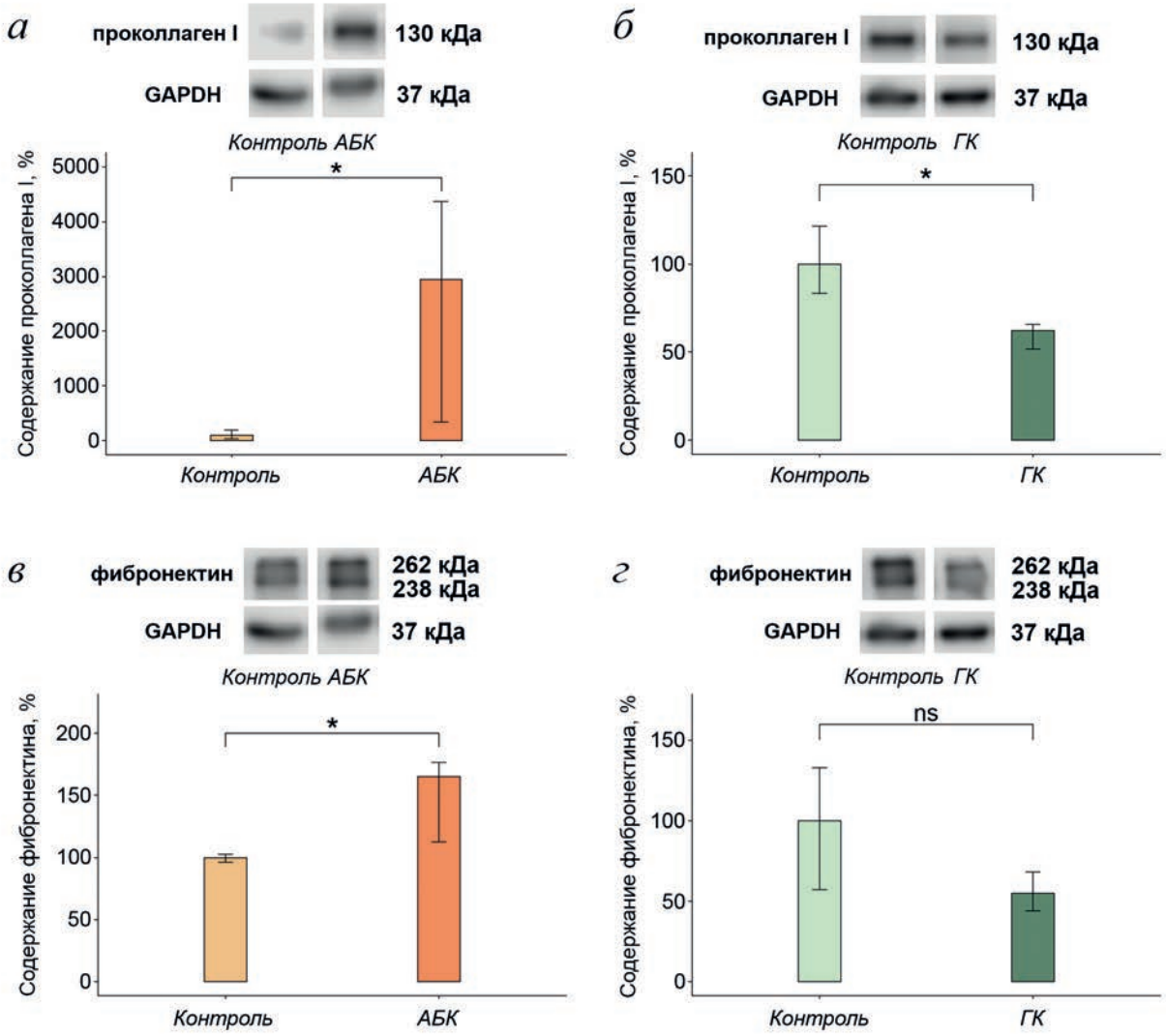

Рис. 3. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – Содержание проколлагена I после воздействия АБК; *б* – содержание проколлагена I после воздействия ГК; *в* – содержание фибронектина после воздействия АБК; *г* – содержание фибронектина после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns –не значимо; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов

гладкомышечный актин α [2, 16, 17], поэтому была проведена оценка уровня синтеза α-SMA с помощью вестерн-блоттинга и произведён подсчёт доли миофибробластов в популяции дермальных фибробластов с помощью иммуноцитохимического выявления α-SMA после 48-часового воздействия АБК и ГК (рис. 5). Как видно из рис. 5, при действии АБК уровень синтеза α-SMA повышался на 38,5% (рис. 5, *а*), а при действии ГК – снижался на 5,4% (рис. 5, *б*). Подсчёт доли миофибробластов (клеток, содержащих α-SMA-положительные фибриллы) показал, что при действии АБК доля миофибробластов возрастала в 1,5 раза (рис. 5, *в*), а при действии ГК – снижалась на 41,5% (рис. 5, *г*). Таким образом, АБК стимулировала увеличение уровня синтеза α-SMA и количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, а при действии ГК уровень синтеза α-SMA и количество миофибробластов уменьшалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведённые нами исследования показали, что фитогормоны АБК и ГК вызывают активацию UPR в дермальных фибробластах человека, а также оказывают влияние на их секреторно-синтетическую активность. UPR – это адаптивный ответ клетки на нарушение гомеостаза эндоплазматического ретикулума (ЭПР), вызванное накоплением в ЭПР не свёрнутых и/или неправильно свёрнутых белков [18, 39].

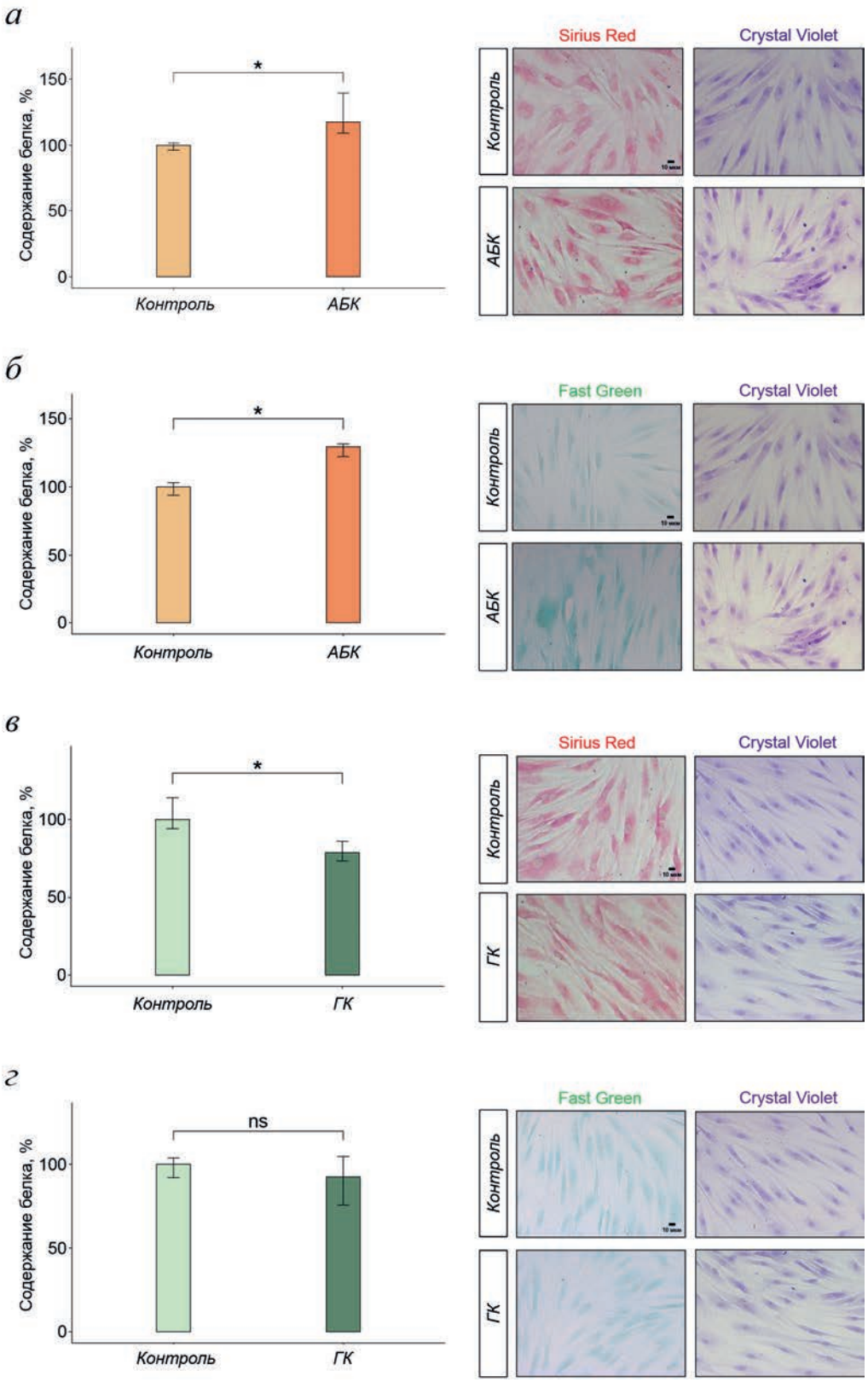

Рис. 4. Влияние 7-суточной инкубации с АБК и ГК на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. Представлены репрезентативные изображения окрашивания клеток Sirius Red (выявление коллагеновых белков матрикса), Fast Green (выявление неколлагеновых белков матрикса) и Crystal Violet (оценка количества клеток). *а* – Содержание коллагеновых белков после воздействия АБК; *б* – содержание неколлагеновых белков после воздействия АБК; *в* – содержание коллагеновых белков после воздействия ГК; *г* – содержание неколлагеновых белков после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – не значимо; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов. Масштабный отрезок – 10 мкм

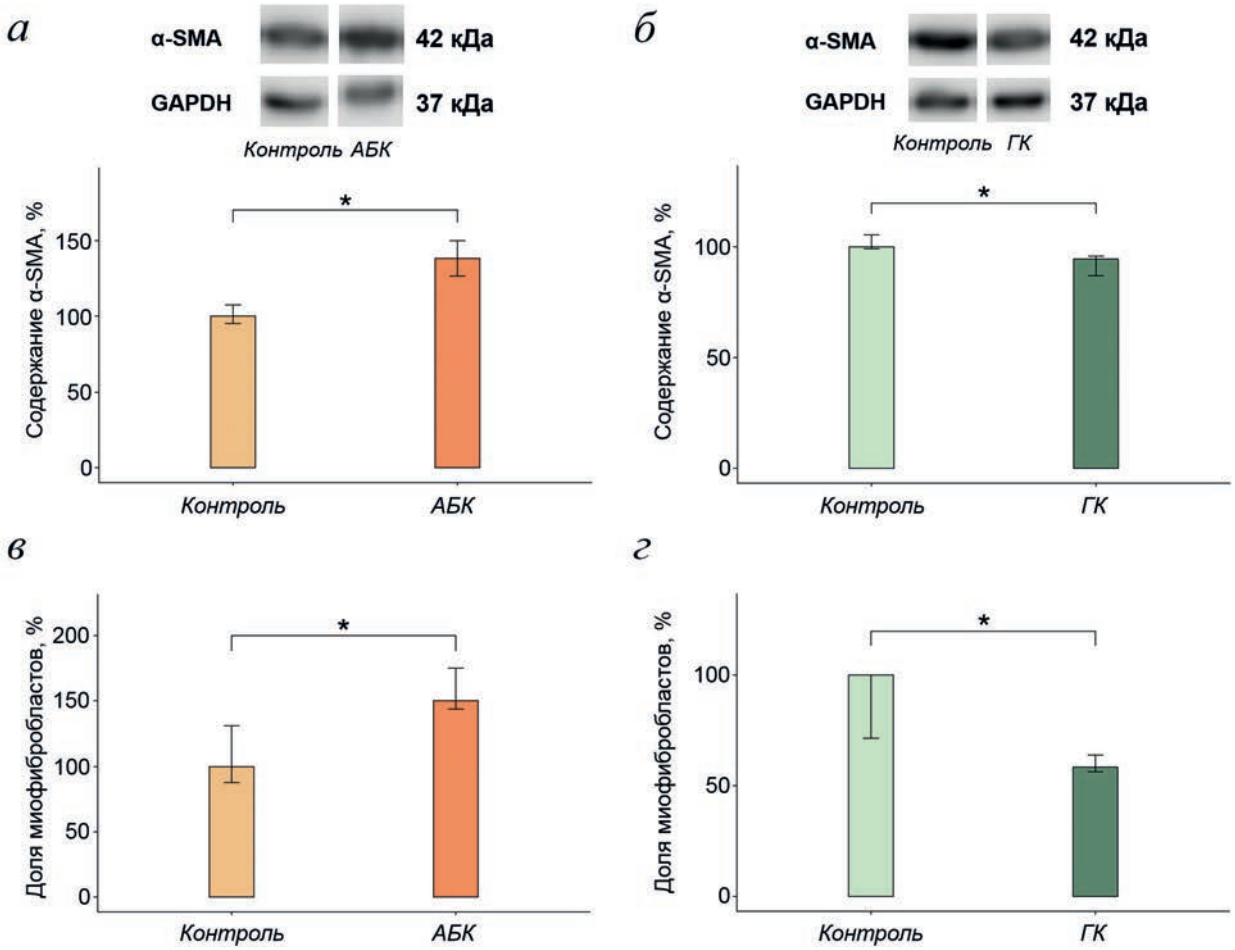

Рис. 5. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза α-SMA и долю миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. *а* – Содержание α-SMA после воздействия АБК; *б* – содержание α-SMA после воздействия ГК; *в* – доля миофибробластов после воздействия АБК; *г* – доля миофибробластов после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов

Такое нарушение гомеостаза носит название «стресс ЭПР». Ранее нами было показано, что ГК вызывает активацию сигнальных путей UPR в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения, повышая экспрессию генов, кодирующих основные маркеры стресса ЭПР и UPR – *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* [24]. GRP78 – это шаперон люмена ЭПР, в отсутствие стресса ЭПР связанный с тремя трансмембранными сенсорами стресса ЭПР – IRE1 (требующий инозитол белок 1), PERK (киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA) и ATF6 (активирующий фактор транскрипции 6) [39]. В условиях стресса ЭПР GRP78 отделяется от этих сенсоров, что вызывает их активацию. Каждый сенсор стресса ЭПР (IRE1, PERK и ATF6) при активации запускает свой сигнальный каскад, приводящий к активации экспрессии таких транскрипционных факторов, как sXBP1 («s» означает «сплайсированный»), ATF4 и CHOP [18, 39, 40]. Все транскрипционные факторы, активирующиеся в ходе стресса ЭПР и UPR, за исключением CHOP, повышают экспрессию генов белков ответа на стресс ЭПР, направленных на восстановление гомеостаза ЭПР и его свёртывающей способности. CHOP стимулирует стресс-опосредованную индукцию апоптоза.

В настоящем исследовании мы провели оценку уровня экспрессии *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* при воздействии АБК и ГК на клетки соединительнотканного происхождения – дермальные фибробласты человека. Оказалось, что АБК повышает уровень экспрессии *GRP78* и *ATF4*, что свидетельствует об активации стресса ЭПР и запуске UPR. Насколько нам известно, это первые данные о способности АБК активировать стресс ЭПР и UPR в клетках человека. При этом АБК не повышала уровень экспрессии *sXBP1*. Это может быть связано с тем, что АБК не активирует или бло-

кирует сигналинг по IRE1–XBP1-пути стресса ЭПР, а также с возможной активацией этого пути на более ранних сроках воздействия, а затем снижением его активности. Отсутствие повышения экспрессии *CHOP* свидетельствует о том, что АБК не индуцирует стресс-опосредованный апоптоз, контролируемый CHOP, по крайней мере через 24 ч воздействия.

В свою очередь, ГК тоже вызывала активацию UPR, о чём свидетельствует повышение уровня экспрессии *CHOP*. Однако значительного изменения уровня экспрессии генов, кодирующих другие маркеры стресса ЭПР, при её воздействии не наблюдалось, что может быть связано с активацией сигнальных путей UPR на более ранних сроках воздействия ГК и последующим снижением их активности. CHOP считается проапоптотическим фактором, однако ранее мы показали, что ГК не вызывает значительного снижения метаболической активности, а, следовательно, и гибели дермальных фибробластов при 24-часовом воздействии [35]. По-видимому, фибробласты «справляются» со стрессом ЭПР, индуцированным ГК, без активации гибели клеток. Данные ПЦР также позволяют заключить, что обнаруженное нами ранее расширение цистерн ЭПР в дермальных фибробластах при действии ГК [35], по-видимому, вызвано активацией стресса ЭПР. Следует отметить, что в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения ГК вызывала повышение экспрессии генов, кодирующих все исследованные маркеры стресса ЭПР и UPR – *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* [24], следовательно, влияние АБК и ГК на клетки разного тканевого происхождения различается.

Наши данные свидетельствуют о том, что влияние АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов носит противоположный характер. АБК оказывает стимулирующее действие на синтез и секрецию проколлагена I и синтез фибронектина, а также повышает общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. ГК, напротив, снижает уровень синтеза проколлагена I и продукцию коллагеновых белков внеклеточного матрикса. Однако ГК стимулирует секрецию фибронектина, хотя уровень синтеза фибронектина при её воздействии не повышается, а имеет тенденцию к снижению. Это может быть связано с тем, что дермальные фибробласты отвечают на действие ГК выбросом синтезированного фибронектина, однако синтез новых молекул фибронектина ГК подавляет. Возможно, выход фибронектина в культуральную среду обусловлен тем, что ГК оказывает влияние на секреторный путь фибронектина, который, как известно, отличается от секреторного пути проколлагена I [41]. Проколлаген I транспортируется из ЭПР в аппарат Гольджи в составе COPII-везикул, которые формируются при участии белка TANGO1 (transport and Golgi organization protein 1). Далее в аппарате Гольджи проколлаген I сортируется в тубулярные структуры, которые направляются к плазматической мембране. Секреторный путь фибронектина до сих пор полностью не изучен [41]. Известно, что он не зависит от белков COPII и TANGO1. Предполагается, что в транспорте фибронектина из ЭПР участвуют периостин и трансмембранный P24 транспортный белок 2 (TMED2), а далее фибронектин транспортируется к плазматической мембране при участии мультивезикулярных телец и секретируется во внеклеточную среду в составе внеклеточных везикул [41]. Возможно, ГК ускоряет транспорт фибронектина из ЭПР или воздействует на формирование внеклеточных везикул и их слияние с плазматической мембраной.

Полученные нами данные указывают на то, что АБК и ГК прямо или косвенно влияют на синтез проколлагена I и фибронектина и, возможно, других коллагеновых и неколлагеновых белков в дермальных фибробластах. Косвенное влияние этих фитогормонов может быть обусловлено регуляцией экспрессии генов дифференцировки фибробластов в миофибробласты, так как для миофибробластов характерна повышенная секреторно-синтетическая активность, в частности повышенный уровень синтеза проколлагена I и фибронектина [1].

В литературе есть данные об уменьшении уровня синтеза и отложения коллагена I фибробластами при действии АБК [27, 42]. Однако в этих работах исследовали влияние АБК в более низких концентрациях и на фибробласты из зон фиброза. Поэтому мы полагаем, что наши данные не противоречат данным литературы, а дополняют их.

Изменение секреторно-синтетической активности дермальных фибробластов при действии АБК и ГК, установленное в нашем исследовании, может быть связано с изменением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. Действительно, проведённый нами анализ уровня синтеза основного маркера миофибробластов – α-SMA, а также подсчёт количества миофибробластов в популяции фибробластов показал, что АБК вызывает повышение уровня синтеза α-SMA

и количества миофибробластов. Эти данные коррелируют с данными о повышении секреторно-синтетической активности в популяции дермальных фибробластов при действии АБК. ГК, в свою очередь, снижала уровень синтеза α-SMA и количество миофибробластов, что коррелирует со снижением секреторно-синтетической активности в популяции дермальных фибробластов при действии этого фитогормона. В связи с этим можно заключить, что наблюдаемое при действии АБК повышение секреторно-синтетической активности фибробластов по крайней мере частично вызвано дифференцировкой фибробластов в миофибробласты. Наблюдаемое при действии ГК снижение секреторно-синтетической активности фибробластов может быть обусловлено уменьшением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. Для того чтобы выяснить, чем вызвано такое снижение количества миофибробластов при действии ГК – подавлением дифференцировки фибробластов в миофибробласты или гибелью миофибробластов, необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Известно, что сигнальные пути UPR участвуют не только в восстановлении гомеостаза ЭПР, но и играют ключевую роль в дифференцировке клеток разного тканевого происхождения, в том числе и фибробластов [2, 13, 16–18]. Наши данные о стимуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты при действии АБК свидетельствуют о том, что UPR сопровождает дифференцировку, индуцированную АБК. Кроме того, это даёт основание полагать, что АБК может запускать эту дифференцировку, активируя UPR.

По данным литературы, при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты с помощью трансформирующего фактора роста β (TGF-β) и 1%-ного экстракта сигаретного дыма наблюдается повышение уровня синтеза GRP78 и sXBP1, но не CHOP [13, 43]. CHOP не участвует в дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Исследования уровня синтеза ATF4 в этих работах не проводилось, однако показано, что нокдаун гена, кодирующего PERK, мишенью которой является ATF4, подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты [17]. Таким образом, полученные нами данные о повышении уровня экспрессии *GRP78* и *ATF4*, но не *CHOP* при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты соответствуют данным литературы. Отличия в данных по уровню экспрессии *sXBP1* в литературе и нашем исследовании могут быть связаны с тем, что сигнальные пути активации UPR при действии АБК отличаются от таковых при действии других индукторов дифференцировки.

В свою очередь, повышение экспрессии только *CHOP* при воздействии ГК вместе с данными о снижении секреторно-синтетической активности и количества миофибробластов в популяции фибробластов свидетельствуют о том, что индуцируемый ГК UPR в дермальных фибробластах связан не с активацией дифференцировки и секреторно-синтетической активности клеток, а с подавлением этих процессов.

Ранее нами было показано, что ГК индуцирует стресс ЭПР (UPR) и дифференцировку в нормальных и опухолевых клетках человека эпидермоидного происхождения [24]. По-видимому, влияние ГК на дифференцировочный статус клеток разного происхождения различается. В свою очередь, данные об активации стресса ЭПР параллельно с дифференцировкой при воздействии АБК в литературе отсутствуют. Было обнаружено стимулирующее влияние АБК на дифференцировку предшественников мегакариоцитов при индукции их дифференцировки стандартной дифференцировочной смесью [44], однако индукция стресса ЭПР в этом процессе не изучалась, хотя показано участие стресса ЭПР в тромбоцитопоэзе [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что АБК стимулирует дифференцировку дермальных фибробластов в миофибробласты, повышая их секреторно-синтетическую активность и увеличивая долю миофибробластов в клеточной популяции. В свою очередь, ГК, напротив, подавляет секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов и снижает долю миофибробластов в клеточной популяции. Кроме того, оба фитогормона вызывают активацию UPR в дермальных фибробластах, имеющего, однако, разное происхождение и разный сигналинг, а также оказывающего противоположное влияние на дифференцировочный статус фибробластов.

Стимулирующее влияние АБК на дифференцировку фибробластов может быть использовано при разработке препаратов для ускорения заживления ран и лечения хронических ран при диабете, сосудистых заболеваниях, тяжёлых травмах и ожогах. При этом следует обратить внимание как на возможность введения АБК в рану в составе лекарственных препаратов для стимуляции дифференцировки фибро-

бластов пациента в миофибробласты, так и на активацию дифференцировки аллогенных фибробластов *in vitro* с последующим введением полученных миофибробластов в рану [4].

До сих пор не существует клинически одобренных методов предотвращения формирования рубцов (терапии рубцов), специально разработанных для ограничения или предотвращения фиброза кожи [46]. Предлагаемые стратегии лечения включают в себя резекцию рубца или уменьшение его размера, использование методов тканевой инженерии, использование антител и лекарственной терапии, направленной, в частности, на блокирование дифференцировки фибробластов. В связи с этим на способность ГК снижать количество миофибробластов следует обратить внимание при поиске способов предотвращения и лечения фиброза и, в частности образования рубцов. Поэтому мы считаем важным детальное изучение механизмов действия разных фитогормонов на пути активации UPR, тем более что разные фитогормоны, вызывая стресс ЭПР, оказывают противоположный эффект на дифференцировочный статус разных типов клеток [24]. Особенно интересным представляется исследование потенциальной способности ГК снижать количество миофибробластов в популяции дермальных фибробластов на моделях фиброза *in vitro* и *in vivo*.

Вклад авторов. Е.А. Смирнова – концепция и руководство работой; Е.П. Турищева, М.С. Вильданова, Д.К. Матвеева – проведение экспериментов; Е.П. Турищева, П.А. Вишнякова, А.А. Саидова – обсуждение результатов исследования; Е.П. Турищева – написание текста; Е.А. Смирнова, Г.Е. Онищенко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ашниеву Герману Альфредовичу за помощь в статистической обработке данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Desai, V. D., Hsia, H. C., and Schwarzbauer, J. E. (2014) Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **9**, e86865, doi: 10.1371/journal.pone.0086865.
2. Heindryckx, F., Binet, F., Ponticos, M., Rombouts, K., Lau, J., et al. (2016) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE 1α-mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 729-744, doi: 10.15252/emmm.201505925.
3. Hinz, B. (2016) The role of myofibroblasts in wound healing, *Curr. Res. Transl. Med.*, **64**, 171-177, doi: 10.1016/j.retram.2016.09.003.
4. Ko, U. H., Choi, J., Choung, J., Moon, S., and Shin, J. H. (2019) Physicochemically tuned myofibroblasts for wound healing strategy, *Sci. Rep.*, **9**, 16070, doi: 10.1038/s41598-019-52523-9.
5. Las Heras, K., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., and Hernandez, R. M. (2020) Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions, *J. Control. Release*, **328**, 532-550, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.09.039.
6. Zou, M. L., Teng, Y. Y., Wu, J. J., Liu, S. Y., Tang, X. Y., Jia, Y., Chen, Z. H., Zhang, K. W., Sun, Z. L., Li, X., Ye, J. X., Xu, R. S., and Yuan, F. L. (2021) Fibroblasts: heterogeneous cells with potential in regenerative therapy for scarless wound healing, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 713605, doi: 10.3389/fcell.2021.713605.
7. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L., and Accili, D. (2012) Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure, *Cell*, **150**, 1223-1234, doi: 10.1016/j.cell.2012.07.029.
8. Efrat, S. (2019) Beta-cell dedifferentiation in type 2 diabetes: concise review, *STEM Cells*, **37**, 1267-1272, doi: 10.1002/stem.3059.
9. Lenghel, A., Gheorghita, A. M., Vacaru, A. M., and Vacaru, A.-M. (2021) What is the sweetest UPR flavor for the β-cell? That is the question, *Front. Endocrinol.*, **11**, 614123, doi: 10.3389/fendo.2020.614123.
10. Eastell, R., O'Neill, T. W., Hofbauer, L. C., Langdahl, B., Reid, I. R., Gold, D. T., and Cummings, S. R. (2016) Postmenopausal osteoporosis, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2**, 16069, doi: 10.1038/nrdp.2016.69.
11. Zhang, W., Feng, D., Li, Y., Iida, K., McGrath, B., and Cavener, D. R. (2006) PERK EIF2AK3 control of pancreatic β cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis, *Cell Metab.*, **4**, 491-497, doi: 10.1016/j.cmet.2006.11.002.
12. Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D. R., and Imaizumi, K. (2011) Endoplasmic reticulum stress response medi-

ated by the PERK-eIF2-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4809-4818, doi: 10.1074/jbc.M110.152900.
13. Baek, H. A., Kim, D. S., Park, H. S., Jang, K. Y., Kang, M. J., Lee, D. G., Moon, W. S., Chae, H. J., and Chung, M. J. (2012) Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts, *Am. J. Resp. Cell Mol.*, **46**, 731-739, doi: 10.1165/rcmb.2011-0121OC.
14. Jang, W.-G., Kim, E.-J., Kim, D.-K., Ryoo, H.-M., Lee, K.-B., Kim, S. H., Choi, H. S., and Koh, J. T. (2012) BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription, *J. Biol. Chem.*, **287**, 905-915, doi: 10.1074/jbc.M111.253187.
15. Chan, J. Y., Luzuriaga, J., Bensellam, M., Biden, T. J., and Laybutt, D. R. (2013) Failure of the adaptive unfolded protein response in islets of obese mice is linked with abnormalities in β-cell gene expression and progression to diabetes, *Diabetes*, **62**, 1557-1568, doi: 10.2337/db12-0701.
16. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Taniguchi, M., Shingaki, K., Kubo, T., Kiya, K., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Kanematsu, R., Maeda, T., Takamura, H., Yamada, K., Miyoshi, K., Hosokawa, K., Tohyama, M., and Katayama, T. (2015) Physiological ER stress mediates the differentiation of fibroblasts, *PLoS One*, **10**, e0123578, doi: 10.1371/journal.pone.0123578.
17. Chen, Y. C., Chen, B. C., Huang, H. M., Lin, S. H., and Lin, C. H. (2019) Activation of PERK in ET-1-and thrombin-induced pulmonary fibroblast differentiation: inhibitory effects of curcumin, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 15977-15988, doi: 10.1002/jcp.28256.
18. Turishcheva, E., Vildanova, M., Onishchenko, G., and Smirnova, E. (2022) The role of endoplasmic reticulum stress in differentiation of cells of mesenchymal origin, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 916-931, doi: 10.1134/S000629792209005X.
19. Budovsky, A., Yarmolinsky, L., and Ben-Shabat, S. (2015) Effect of medicinal plants on wound healing, *Wound Repair Regen.*, **23**, 171-183, doi: 10.1111/wrr.12274.
20. Alamgir, A. N. M. (2018) *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 2. Phytochemistry and Bioactive Compounds,* Springer Cham, doi: 10.1007/978-3-319-92387-1.
21. Addis, R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., Maioli, M., and Pintore, G. (2020) Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: evidence for a novel synergic outcome, *Int. J. Med. Sci.*, **17**, 1030-1042, doi: 10.7150/ijms.43986.
22. Sharma, A., Khanna, S., Kaur, G., and Singh, I. (2021) Medicinal plants and their components for wound healing applications, *Futur. J. Pharm. Sci.*, **7**, 53, doi: 10.1186/s43094-021-00202-w.
23. Kasamatsu, A., Iyoda, M., Usukura, K., Sakamoto, Y., Ogawara, K., Shiiba, M., Tanzawa, H., and Uzawa, K. (2012) Gibberellic acid induces α-amylase expression in adipose-derived stem cells, *Int. J. Mol. Med.*, **30**, 243-247, doi: 10.3892/ijmm.2012.1007.
24. Vildanova, M., Vishnyakova, P., Saidova, A., Konduktorova, V., Onishchenko, G., and Smirnova, E. (2021) Gibberellic acid initiates ER stress and activation of differentiation in cultured human immortalized keratinocytes HaCaT and epidermoid carcinoma cells A431, *Pharmaceutics*, **13**, 1813, doi: 10.3390/pharmaceutics13111813.
25. Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Moreschi, I., Nano, R., Antonioli, B., Fruscione, F., Magnone, M., Scarfì, S., De Flora, A., and Zocchi, E. (2008) Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32188-32197, doi: 10.1074/jbc.M802603200.
26. Bruzzone, S., Magnone, M., Mannino, E., Sociali, G., Sturla, L., Fresia, C., Booz, V., Emionite, L., De Flora, A., and Zocchi, E. (2015) Abscisic acid stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from L-cells and its oral administration increases plasma glucagon-like peptide-1 levels in rats, *PLoS One*, **10**, e0140588, doi: 10.1371/journal.pone.0140588.
27. Bruzzone, S., Battaglia, F., Mannino, E., Parodi, A., Fruscione, F., Basile, G., Salis, A., Sturla, L., Negrini, S., Kalli, F., Stringara, S., Filaci, G., Zocchi, E., and Fenoglio, D. (2012) Abscisic acid ameliorates the systemic sclerosis fibroblast phenotype *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **422**, 70-74, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.107.
28. Zhang, W., Chen, D.-Q., Qi, F., Wang, J., Xiao, W.-Y., and Zhu, W. Z. (2010) Inhibition of calcium–calmodulin-dependent kinase ii suppresses cardiac fibroblast proliferation and extracellular matrix secretion, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **55**, 96-105, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181c9548b.
29. Матвеева Д. К., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б. (2019) Выбор оптимального протокола получения децеллюляризованного внеклеточного маткрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека, *Вестн. Моск. Унив.*, **74**, 294-300.
30. Basalova, N., Sagaradze, G., Arbatskiy, M., Evtushenko, E., Kulebyakin, K., Grigorieva, O., Akopyan, Z., Kalinina, N., and Efimenko, A. (2020) Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles, *Cells*, **9**, 1272, doi: 10.3390/cells9051272.
31. Zhivodernikov, I. V., Ratushnyy, A. Yu., Matveeva, D. K., and Buravkova, L. B. (2020) Extracellular matrix proteins and transcription of matrix-associated genes in mesenchymal stromal cells during modeling of the effects of microgravity, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **170**, 230-232, doi: 10.1007/s10517-020-05040-z.
32. Grigorieva, O. A., Vigovskiy, M. A., Dyachkova, U. D., Basalova, N. A., Aleksandrushkina, N. A.,

Kulebyakina, M. A., Zaitsev, I. L., Popov, V. S., and Efimenko, A. Y. (2021) Mechanisms of endothelial-to-mesenchymal transition induction by extracellular matrix components in pulmonary fibrosis, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171**, 523-531, doi: 10.1007/s10517-021-05264-7.

33. Yang, M. C., O'Connor, A. J., Kalionis, B., and Heath, D. E. (2022) Improvement of mesenchymal stromal cell proliferation and differentiation *via* decellularized extracellular matrix on substrates with a range of surface chemistries, *Front. Med. Technol.*, **4**, 834123, doi: 10.3389/fmedt.2022.834123.
34. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0034, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
35. Турищева Е. П., Вильданова М. С., Поташникова Д. М., Смирнова Е. А. (2020) Различная реакция биосинтетической системы дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы человека на действие растительных гормонов, *Цитология*, **62**, 566-580, doi: 10.31857/S0041377120080088.
36. Kendall, R. T., and Feghali-Bostwick, C. A. (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators, *Front. Pharmacol.*, **5**, 123, doi: 10.3389/fphar.2014.00123.
37. Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 786-801, doi: 10.1038/nrm3904.
38. Vega-Avila, E., and Pugsley, M. K. (2011) An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **54**, 10-14.
39. Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., and Igbaria, A. (2020) A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems, *FEBS J.*, **287**, 27-42, doi: 10.1111/febs.15107.
40. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89-102, doi: 10.1038/nrm3270.
41. Albacete-Albacete, L., Sanchez-Alvarez, M., and Del Pozo, M. A. (2021) Extracellular vesicles: an emerging mechanism governing the secretion and biological roles of tenascin-C, *Front. Immunol.*, **12**, 671485, doi: 10.3389/fimmu.2021.671485.
42. Chen, X., Ding, C., Liu, W., Liu, X., Zhao, Y., Zheng, Y., Dong, L., Khatoon, S., Hao, M., Peng, X., Zhang, Y., and Chen, H. (2021) Abscisic acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in thioacetamide-induced hepatic fibrosis by regulating the NF-kB signaling pathway in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, **891**, 173652, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173652.
43. Song, M., Peng, H., Guo, W., Luo, M., Duan, W., Chen, P., and Zhou, Y. (2019) Cigarette smoke extract promotes human lung myofibroblast differentiation by the induction of endoplasmic reticulum stress, *Respiration*, **98**, 347-356, doi: 10.1159/000502099.
44. Huang, W., Gu, H., Zhan, Z., Wang, R., Song, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, S., Li, J., Zang, Y., Li, Y., and Qian, B. (2021) The plant hormone abscisic acid stimulates megakaryocyte differentiation from human iPSCs *in vitro*, *Platelets*, **33**, 462-470, doi: 10.1080/09537104.2021.1944616.
45. Kovuru, N., Raghuwanshi, S., Sharma, D. S., Dahariya, S., Pallepati, A., and Gutti, R. K. (2020) Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis and caspase activation is mediated through mitochondria during megakaryocyte differentiation, *Mitochondrion*, **50**, 115-120, doi: 10.1016/j.mito.2019.10.009.
46. Tai, Y., Woods, E. L., Dally, J., Kong, D., Steadman, R., Moseley, R., and Midgley, A. C. (2021) Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis, *Biomolecules*, **11**, 1095, doi: 10.3390/biom11081095.

PHYTOHORMONES AFFECT THE DIFFERENTIATION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS VIA UPR ACTIVATION

E. P. Turishcheva[1]*, M. S. Vildanova[1], P. A. Vishnyakova[2,3], D. K. Matveeva[4], A. A. Saidova[1], G. E. Onishchenko[1], and E. A. Smirnova[1]

[1] *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e mail: kitten-caterina@yandex.ru*

[2] *National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V. I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997 Moscow, Russia*

[3] *Peoples' Friendship University of Russia, 117198 Moscow, Russia*

[4] *Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia*

Normalization of secretory activity and the level of differentiation of mesenchymal cells, including fibroblasts, is the important biomedical problem. One of the plausible solutions to this problem is to affect the unfolded protein response (UPR) signaling cascade, which is activated during fibroblast differentiation. In the present study, the effect of phytohormones on the secretory activity and differentiation of cultured human dermal fibroblasts was investigated. By analyzing the expression level of genes encoding UPR markers in these cells, we found that phytohormone abscisic acid (ABA) upregulated the expression of *GRP78* and *ATF4* genes, while phytohormone gibberellic acid (GA) upregulated the expression of *CHOP*. Evaluation of the biosynthetic activity of fibroblasts showed that ABA elevated the level of secretion and synthesis of procollagen I and the level of fibronectin synthesis, as well as total production of collagen and non-collagen proteins of extracellular matrix. ABA also stimulated the synthesis of smooth muscle actin α (α-SMA) and increased the number of myofibroblasts in cell population. On the contrary, GA increased the level of fibronectin secretion, but decreased the level of procollagen I synthesis, and reduced the total production of collagen proteins of extracellular matrix. Concomitantly, in these conditions we observed the decreased level of α-SMA synthesis and the number of myofibroblasts in the cell population. Our results suggest that phytohormones are the modulators of the biosynthetic activity of fibroblasts and affect their differentiation status.

Keywords: abscisic acid, gibberellic acid, fibroblasts, myofibroblasts, wound healing, fibrosis, differentiation, smooth muscle actin

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 1011 – 1034

УДК 578

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Обзор

© 2023 Я. Шакиба[1,2], П.О. Воробьев[2], М. Махмуд[2], А. Хамад[2], Д.В. Кочетков[2], Г.М. Юсубалиева[2,3,4], В.П. Баклаушев[2,3,4], П.М. Чумаков[2], А.В. Липатова[2]*

[1] *Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия*

[2] *ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lipatovaanv@gmail.com*

[3] *Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, 115682 Москва, Россия*

[4] *Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, 117513 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 16.01.2023
После доработки 06.04.2023
Принята к публикации 24.04.2023

Онколитическая виротерапия представляет собой альтернативный подход к лечению онкологических заболеваний, основанный на использовании вирусов, избирательно инфицирующих и уничтожающих опухолевые клетки. Вирус осповакцины (VV, vaccinia virus) является членом семейства оболочечных вирусов *Poxviridae*, содержащих крупный геном, представленный двуцепочечной линейной молекулой ДНК. Подтверждённая многолетним клиническим применением безопасность штаммов VV и широкие возможности для генно-инженерной модификации вируса делают его отличной платформой для создания рекомбинантных онколитических вирусов с улучшенной избирательностью действия и повышенной терапевтической эффективностью в отношении злокачественных заболеваний. Вирус может быть «вооружён» вставкой в геном последовательностей проапоптотических молекул, усиливающих прямое цитопатическое действие вируса на опухоль, факторами, усиливающими онкоселективность, или иммуномодулирующими белками, экспрессия которых в инфицированных опухолевых клетках активирует иммунную систему организма-хозяина и повышает перекрестное распознавание опухолевых неоантигенов Т-клетками или NK-клетками. В настоящем обзоре мы суммировали биоинженерные подходы, направленные на создание рекомбинантных штаммов VV с усиленным иммунотерапевтическим действием.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус осповакцины, онколитические вирусы, рекомбинантные вирусы, иммуносупрессия, иммуномодуляция, цитокины.

DOI: 10.31857/S0320972523060106, **EDN:** EFRIKQ

ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (VV, vaccinia virus) является членом семейства *Poxviridae*. Он содержит линейную двуцепочечную ДНК длиной около 190 тыс. пар оснований, кодирующую почти 200 генов. Так же, как и у других членов семейства *Poxviridae*, центральный сегмент генома VV содержит консервативные участки, кодирующие белки, необходимые для репликации вируса, и концевые неконсервативные участки, кодирующие белки, обеспечивающие

Принятые сокращения: CTL – цитотоксический Т-лимфоцит; CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; EEV – внеклеточный оболочечный вирус; GM-CSF – гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор; DC – dendritic cells, дендритные клетки; ITIM – ингибирующий мотив на основе остатка тирозина иммунорецептора; IFN – интерферон; IL – интерлейкин; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; MLKL – подобная киназному домену смешанного происхождения псевдокиназа; MUC1 – муцин 1; MVA – модифицированный вирус осповакцины Анкара; NF-κB – ядерный фактор каппа B; NK – естественный киллер; PD-1 – белок запрограммированной гибели-1; PD-L1 – лиганд 1 запрограммированной гибели; Th1/2 – Т-хелпер 1/2; TIGIT – Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM; TK – тимидинкиназа; TME – микроокружение опухоли; TNF – фактор некроза опухоли; Treg – регуляторные Т-клетки; VGF – вирусный ростовой фактор; VV – вирус осповакцины; VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

распознавание и проникновение вируса в клетку-хозяина [1]. Определены две инфекционные формы VV: это внеклеточный оболочечный вирус (EEV, extracellular enveloped virus) и внутриклеточный зрелый вирус (IMV, intracellular mature virus), которые различаются по способности связываться с поверхностью клетки [2]. В 1922 г. Levaditi et al. показали, что VV может замедлять рост опухоли у мышей, что было первой демонстрацией онколитического эффекта этого вируса в лабораторных условиях [3]. Впоследствии было показано, что VV избирательно инфицирует и разрушает опухолевые клетки в клеточных культурах и на животных моделях [4]. С 1980-х гг. рекомбинантные штаммы VV и другие поксвирусы используются в качестве векторов в протоколах иммунизации при лечении инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований. Векторы VV были широко исследованы в клинических испытаниях, что позволяет рассматривать их как, пожалуй, самую безопасную платформу для создания новых рекомбинантных онколитических штаммов для адъювантной и неоадъювантной иммунотерапии [5].

Несколько свойств VV делают его перспективным агентом для онколитической вирусной терапии. Во-первых, VV был разработан в рамках программы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по искоренению оспы в качестве живой вакцины, которой было вакцинировано 200 миллионов человек, что подтвердило безопасность этого вируса как онколитического агента и вектора для доставки генов [6]. Даже при возникновении экстренных ситуаций при инфекции VV широко доступны антитела к этому вирусу и противовирусные препараты [7]. Во-вторых, VV обладает большим пластичным геномом, что позволяет включать в него протяжённые последовательности ДНК без существенного снижения эффективности репликации вируса [8]. В-третьих, репликация вируса в цитоплазме снижает риск интеграции вирусной ДНК в геном организма-хозяина. Геном ДНК-содержащего вируса VV определяет его большую генетическую стабильность в сравнении с РНК-содержащими вирусами [9]. Наконец, VV обладает тропизмом к опухолевым клеткам и одновременно может успешно избегать иммунного ответа организма-хозяина [10]. Все эти природные свойства делают его не только самой безопасной, но и очень перспективной платформой для иммунотерапии онкологических заболеваний. Повышенная экспрессия в опухолевых клетках таких факторов, как антиапоптотические белки, ферменты репарации ДНК и рибонуклеотидредуктаза, делает их устойчивыми к химиотерапии, в то время как штаммы VV могут целенаправленно воздействовать на такие резистентные клетки [11].

Для разработки рекомбинантных вариантов VV с повышенной онколитической активностью были использованы различные генно-инженерные подходы. Например, рекомбинантный VV с делецией гена тимидинкиназы (TK, thymidine kinase), участвующей в синтезе геномных ДНК, повышает избирательность VV в отношении опухолей, делая возможной репликацию этого вируса только в быстро пролиферирующих опухолевых клетках, богатых нуклеотидами [4]. Также модификации генов, обеспечивающие уклонение VV от иммунного ответа, могут усиливать онколитическое действие и ответ иммунной системы для достижения длительных ремиссий [12], а экспрессия опухолевых антигенов или иммуномодулирующих молекул может повышать онколитические свойства VV [13]. В настоящем обзоре приведены данные о генно-инженерных подходах к созданию рекомбинантных штаммов VV для использования в иммуновиротерапии.

VV И ИММУННАЯ СИСТЕМА

VV использует ряд механизмов, чтобы избежать действия противовирусного иммунного ответа организма-хозяина и эффективно инфицировать опухолевые клетки без риска быть инактивированным [14] (рисунок). На основе данных о взаимодействии VV с некоторыми отдельными иммунными механизмами были получены различные рекомбинантные VV для запуска системного противоопухолевого иммунного ответа.

NK-Клетки (Natural killer, естественные киллеры). NK-Клетки – это клетки системы врождённого иммунитета, играющие роль первой линии защиты организма-хозяина от вирусов. NK-Клетки также имеют важное значение в иммунном надзоре за опухолевыми клетками и способны их эффективно уничтожать [15]. Перед тем как цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs, cytotoxic T lymphocytes) запустят инактивацию вируса, инфекция VV усиливает миграцию NK-клеток в опухоль, запускает синтез интерферонов (IFNs, interferons), цитокинов, а также модулирует активность основного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I, class I major histocompatibility complex) [16]. Кодируемый VV гемагглютинин (белок A56) был идентифицирован как активирующий лиганд

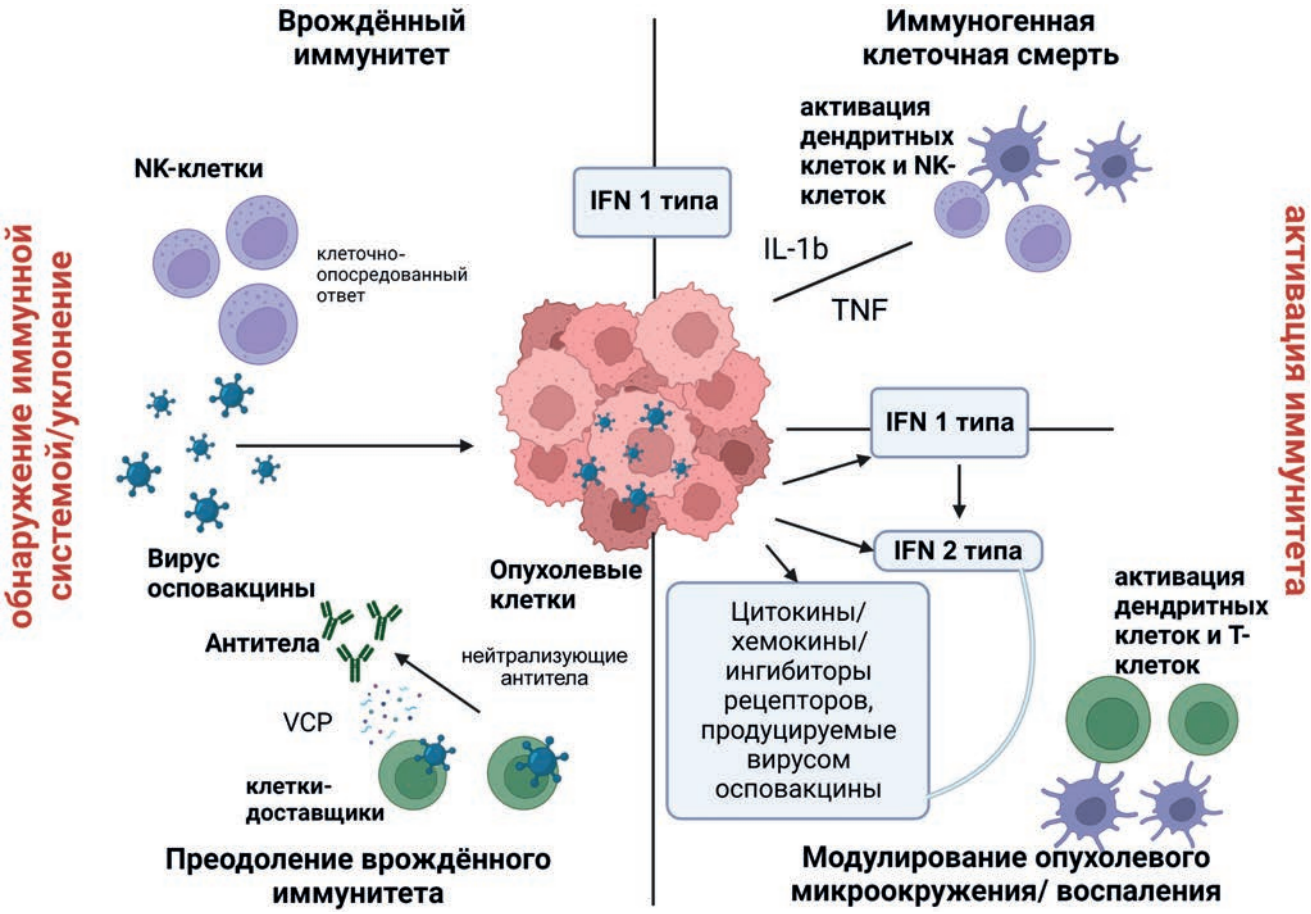

Иллюстрация взаимодействий онколитического VV с иммунной системой, приводящих к стимуляции иммунной системы и цитолизу раковых клеток

рецепторов NKp30 и NKp46 NK-клеток, связывание A56 с этими рецепторами модулирует их активность и способствует приданию NK-клеткам цитотоксичных свойств [16, 17]. Из вирусных белков VV на сегодняшний день только A56 определён как прямой модулятор NK-клеток в VV, хотя делеция ряда других белков, таких как N1, F3 и C12, также вызывала изменения ответа NK-клеток на VV-инфекцию [18].

Помимо собственных белков VV, возможно включение в геном последовательностей экзогенных иммуномодулирующих агентов, активирующих NK-клетки и усиливающих их миграцию в опухоль. Так, был создан рекомбинантный вариант VV, экспрессирующий хемотаксический цитокин CCL5, который привлекал NK-клетки в микроокружение инфицированной опухоли (TME, Tumor microenvironment) [19], а рекомбинантный VV, экспрессирующий интерлейкин-2 (IL-2), усиливал инфильтрацию NK-клеток в опухоли [20].

Система комплемента. Система комплемента разрушает инфицированные вирусами клетки и усиливает фагоцитоз вирионов. VV экспрессирует секретируемый белок VCP (vaccinia complement protein), сходный с белками контроля комплемента. Этот белок является фактором вирулентности, необходимым для преодоления системы комплемента. VCP связывается с белками C3b и C4b системы комплемента и способствует их расщеплению, вызывая нарушение работы каскада ферментов системы комплемента [21]. Было показано, что VCP связывается с гемагглютинином (белок A56), экспонированным на поверхности инфицированных клеток, помогая EEV-частицам VV противодействовать системе комплемента [22]. Другой защитный механизм VV заключается в привлечении белков организма-хозяина, контролирующих работу системы комплемента, таких как CD46, CD55 и CD59. В частности, CD55 помогает EEV избежать разрушения системой комплемента, и это объясняет, почему EEV является более устойчивой формой вируса по сравнению с IMV [23]. Таким образом, использование EEV-формы VV широко распространено в схемах виротерапии для предотвращения элиминации вируса системой комплемента [24].

Интерфероны (IFNs). IFNs I, II и III типа играют решающую роль в противовирусной защите. В ряде работ было показано, что крупные делеции на концевых участках генома VV приводят к повышению чувствительности вируса к действию IFNs, что позволяет предполагать роль этих участков в кодировании белков, противодействующих противовирусной активности IFNs. Чтобы ингибировать индукцию IFNs, VV минимизирует продукцию или распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns) [25]. Кроме того, для индукции IFNs необходим фактор транскрипции NF-κB (Nuclear factor kappa B, ядерный фактор каппа B), а множество внутриклеточных белков VV, такие как A46, A49, A52, B14, C4 и E3, ингибируют этот фактор транскрипции. Например, белок A46 связывается с адапторными молекулами, ассоциированными с цитоплазматическими хвостовыми участками Toll-подобных рецепторов (TLRs, Toll-Like Receptors), позволяя белку A46 блокировать активацию NF-κB и IFN-b. Белок A52 ингибирует активность IL-1 и деактивирует NF-κB, связываясь с IL-1-рецептор-ассоциированной киназой 2 и фактором 6, ассоциированным с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF6, Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6) [26]. Другой пример вмешательства VV в интерфероновый ответ связан с экспрессией гена B18, который кодирует аналог рецептора IFN I типа. Последний секретируется из клетки и препятствует связыванию IFN с рецептором, тем самым предотвращая его активацию [27]. В качестве примера реверсии этой активности VV против IFN был разработан рекомбинантный вариант вируса с удалением генов, кодирующих противоинтерфероновые белки. Для активации IFN-β в геном VV была вставлена кодирующая его последовательность. Онколитическая эффективность этого штамма резко возросла, так как IFN-β ингибирует пролиферацию раковых клеток, индуцирует противоопухолевый иммунный ответ и останавливает ангиогенез опухоли. С другой стороны, из-за нарушения сигнальных путей IFNs в большинстве клеток после злокачественной трансформации данный рекомбинантный штамм может быстро распространяться в опухолевой ткани [28].

Цитокины и хемокины. Цитокины, такие как IL-1, IL-15, IL-18 и фактор некроза опухоли (TNF, Tumor Necrosis Factor), участвуют в развитии адаптивного иммунного ответа на вирусную инфекцию. Эволюция VV происходила таким путём, чтобы сдерживать воздействие этих цитокинов, продуцируя растворимые рецепторы-приманки, блокирующие их протеолитическое созревание или ингибирующие сигналы, вызываемые цитокинами. VV может целенаправленно воздействовать на IL-1, ингибируя синтез NF-κB и подавляя синтез IL-1b [29]. Было показано, что VV ингибирует активность IL-18, блокируя образование зрелого белка IL-18 путём подавления белком B13 каспазы-1.

Белок C12, секретируемый VV, связывает IL-18 [30]. VV продуцирует белки, называемые вирусными рецепторами TNF (vTNFR), которые действуют как ложные рецепторы. Штамм Lister экспрессирует на клеточной поверхности vTNFR, кодируемые вирусными генами *CrmC* и *CrmE*. Эти белки-приманки обладают сходной аминокислотной последовательностью с TNFR, что приводит к снижению активности TNF [31]. Инфицирование штаммом MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara, модифицированный вирус осповакцины Анкара) индуцирует экспрессию нескольких противовирусных хемокинов, таких как CXCL10. Чтобы противостоять этому, VV продуцирует вирусные хемокин-связывающие белки (vCKBP), которые предотвращают связывание хемокинов со своими специфическими рецепторами [32]. Белки B7 и B23 штамма WR (Western Reserve) также обладают хемокин-связывающей активностью [33]. Распространённой стратегией онколитической терапии с использованием вирусов является усиление онколитических свойств VV путём его «вооружения» различными цитокинами или хемокинами, такими как GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IL-2, IL-12 и некоторыми другими, экспрессия которых способствует формированию противоопухолевого иммунитета [34]. Эта стратегия будет подробно рассмотрена ниже.

VV можно применять в качестве генетического вектора для подавления провоспалительных цитокинов и других биологически активных молекул, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, Vascular endothelial growth factor), играющий важную роль в неоангиогенезе опухоли. Блокирование VEGF достигалось путем слияния VEGF-рецептора 1 с Fc-фрагментом IgG-антитела человека (VEGFR-1-Ig) или за счёт секреции одноцепочечного наноантитела (GLAF-1) против VEGF. В обоих случаях нарушалось взаимодействие VEGF с рецепторами VEGF эндотелиальных клеток, что приводило к снижению плотности кровеносных сосудов в опухоли. Снижение степени васкуляризации опухоли

сопровождалось более быстрой её регрессией и зависело от дозы введённого вируса [35]. Gholami et al. разработали антиангиогенный VV, экспрессирующий одноцепочечное наноантитело против VEGF. Этот вирус продемонстрировал шестикратное усиление регрессии опухоли в группе мышей с ортотопической моделированной карциномой трипл-негативного рака молочной железы, получавших лечение, по сравнению с контрольной группой [36].

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ VV С ПОВЫШЕННОЙ ОНКОСЕЛЕКТИВНОСТЬЮ

Большинство штаммов VV, одобренных для применения в клинике и обладающих повышенной селективностью к опухолям, содержат делецию гена J2R, кодирующего вирусную тимидинкиназу (TK). В нормальных клетках экспрессия тимидинкиназы происходит во время S-фазы клеточного цикла. Однако в опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия этого фермента независимо от фазы клеточного цикла. Нарушение экспрессии TK в VV вынуждает вирус полагаться на внутриклеточные TK, что приводит к его преимущественной репликации в раковых клетках [37]. Нарушение открытой рамки считывания TK удобно проводить с одновременной инсерцией трансгенов в геном VV и дальнейшим отбором рекомбинантных вариантов на клетках с делецией TK, обработанных бромдезоксиуридином. Hung et al. показали, что нарушение гена тимидинкиназы путём встраивания гена люциферазы в геном VV приводит к избирательному заражению клеток рака яичников человека и мыши *in vitro* и *in vivo*, что вызывает гибель опухолевых клеток и регрессию опухоли [38]. Два наиболее хорошо изученных штамма VV, а именно Pexa-Vec (JX-594) и GL-ONC1, широко используемые в клинических испытаниях, характеризуются делецией TK [39, 40].

Всесторонние исследования биологии VV выявили дополнительные факторы, повышающие его опухолевую селективность. В частности, фактор роста VV (VGF, vaccinia growth factor) является вирусным аналогом клеточного эпидермального фактора роста (EGF, epidermal growth factor) [41]. VGF представляет собой секретируемый белок, продуцируемый на ранних стадиях вирусной инфекции. При инфицировании клеток вирусом VV этот белок индуцирует митогены для праймирования соседних неинфицированных клеток. Он в значительной мере способствует репликации вируса за счёт активации сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), зависимой от рецептора EGF. Уровень экспрессии EGF практически во всех опухолевых клетках намного превышает таковой в нормальных клетках. Делеция VGF в некоторой степени снижает репликацию вируса, однако повышает его специфичность к опухолевым клеткам [42]. Ещё один вирусный белок, O1, помогает поддерживать MAPK-зависимую передачу сигналов, инициированную VGF. Предполагается, что белок O1 отвечает за остаточную вирусную патогенность, наблюдаемую у мышей, инфицированных VV с делецией VGF [43]. Поэтому ожидается, что MAPK-зависимый рекомбинантный VV с делециями VGF и O1 будет существенно ослаблен в нормальных клетках и сможет эффективно реплицироваться в опухолевых клетках с повышенной активностью MAPK-зависимого сигнального пути [44].

Опухоли с активированными MAPK-зависимыми сигнальными путями являются подходящими мишенями для сильно ослабленных штаммов VV. Например, аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), один из наиболее агрессивных видов рака, обычно характеризуется мутацией в четырёх значимых генах, связанных с MAPK-зависимым путём: *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* и *SMAD4* [45]. Конститутивно активированный *KRAS* увеличивает эндогенную экспрессию вышестоящего рецептора эпидермального фактора роста (EGFR, epidermal growth factor receptor) и запускает передачу сигналов нижестоящего MAPK-пути [46], что делает его идеальной мишенью для MAPK-зависимых VV. В частности, для лечения PDAC был разработан MAPK-зависимый рекомбинантный VV, несущий суицидальный ген дрожжевой цитозиндезаминазы. С помощью цитозиндезаминазы и урацилфосфорибозилтрансферазы нетоксичный 5-фторцитозин превращается в высокотоксичный 5-фторурацилмонофосфат, который, в свою очередь, образует 5-фтордезоксиуридинмонофосфат, являющийся конкурентным ингибитором тимидинсинтетазы, блокирующим синтез ДНК [47]. Системное введение этого MAPK-зависимого VV показало высокую терапевтическую эффективность *in vivo* на мышиных моделях, что делает его перспективным агентом для терапии PDAC [48].

Другим методом достижения надёжной избирательности VV в отношении опухолевых клеток является делеция генов *Spi-2/Spi-1*.

Это заменимые иммуномодулирующие гены VV с антиапоптотическими и противовоспалительными свойствами. Они обладают сходной аминокислотной последовательностью с серпинами (ингибиторы сериновых протеаз), противодействующими функционированию различных каспаз организма-хозяина. Делеция генов *Spi-2/Spi-1* из генома VV делает вирус ослабленным в нормальных клетках, в то время как в раковых клетках он поддерживает репликацию и действует как мощный онколитический агент [49, 50]. Legrand et al. показали, что делеция *Spi-2/Spi-1*, сопровождающаяся экспрессией вирусного IFN-γ, улучшает индукцию иммунного ответа на введение VV и предотвращает репликацию вируса в нормальных тканях, что делает такой вектор безопасным и эффективным [51].

УСИЛЕННЫЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ VV, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЦИТОКИНЫ

Опухолевое микроокружение (TME) наиболее злокачественных опухолей характеризуется высокой активностью иммуносупрессивных факторов и отсутствием стимулирующих молекул, опухоль-специфических цитотоксических иммунных клеток и воспалительной клеточной инфильтрации [52]. Реверсия этого иммуносупрессивного TME в настоящее время является одной из основных задач иммунотерапии опухолей. Репликация онколитического вируса в опухолевой ткани сама по себе приводит к мощному воспалению в TME, вызывая иммунный ответ. Предполагается, что если при этом использовать рекомбинантный штамм, экспрессирующий провоспалительные цитокины, это ещё в большей степени будет стимулировать иммунную систему организма-хозяина к эффективному уничтожению опухолевых клеток [53] (табл. 1).

IL-2. Интерлейкин-2 является мощным цитокином, который способен активировать Т-клетки и расширять их функции, активируя противоопухолевый иммунитет. IL-2 содержит гликозилфосфатидилинозитоловый якорь с пептидным линкером, презентирующий функциональный IL-2 на поверхности опухолевых клеток [54]. Liu et al. описали опухоль-селективный рекомбинантный VV (vvDD-IL-2-RG), вызывающий экспрессию мембраносвязанного IL-2 в инфицированных опухолевых клетках, и показали усиленный онколитический эффект такого рекомбинантного VV на модели рака толстого кишечника у мышей [55]. Помимо воспалительных реакций и высвобождения неоантигенов в результате репликации этого вируса в TME, повышение IL-2 увеличивало инфильтрацию опухоль-специфическими Т-клетками, ограничивая при этом опасные для жизни побочные эффекты, связанные с системным введением интерлейкинов. Scholl et al. описали аттенуированный рекомбинантный штамм VV TG1031, экспрессирующий одновременно человеческий IL-2 и эпителиальный мембранный антиген муцин 1 (MUC1). Показана повышенная экспрессия MUC1 в большинстве опухолей молочной железы, в связи с чем этот белок представляет собой потенциальную мишень для иммунотерапии. У пациентов с рецидивирующим раком молочной железы вакцинация этим вирусом стимулировала иммунную систему и приводила к регрессии опухолей [56].

IL-10. Интерлейкин-10 был впервые описан как фактор, продуцируемый Th2-клетками (Т-хелперные клетки), ингибирующий продукцию цитокина Th1. Это мощный ингибитор противовирусного ответа с участием Т-клеток, предотвращающий активацию дендритных клеток (DC, dendritic cells) воспалительного пути $CD4^+$ Th1. Исторически IL-10 считался иммунодепрессивным цитокином, усиливающим ускользание опухолевых клеток из-под контроля иммунной системы [57]. Недавние исследования показывают, что IL-10 играет ключевую роль в установлении персистенции вируса *in vivo* [58]. Оказалось, что этот цитокин обладает иммуностимулирующими и противоопухолевыми свойствами, включая активацию NK-клеток, ингибирование ангиогенеза, усиление инфильтрации макрофагов и предотвращение метастазирования [59]. В многочисленных доклинических и клинических испытаниях была показана безопасность применения IL-10 при лечении таких заболеваний, как хронический гепатит С, псориаз и болезнь Крона, что делает его потенциально безопасным инструментом для терапии рака [60]. Сообщалось, что IL-10 улучшает терапевтическую эффективность агентов на основе VV в отношении опухолевых клеток мышей. Это связано с его способностью усиливать пролиферацию Т-клеток и его ролью в качестве хемотаксического агента для $CD8^+$ Т-клеток [61].

Chard et al. получили реплицирующийся VV с удалённым геном TK (штамм Lister), снабжённый мышиным IL-10 (VVLΔTK-IL-10). Они протестировали его подкожное введение на модели рака поджелудочной железы у трансгенных мышей. VVLΔTK-IL-10 продемонстрировал более выраженную противо-

опухолевую активность по сравнению с VV без IL-10 (VVLΔTK), приводящую к практически полной регрессии опухоли, значительному увеличению продолжительности жизни и выработке длительного противоопухолевого иммунитета [62, 63]. Авторы утверждают, что гипоксия, связанная с агрессивным и резистентным к лечению фенотипом протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, не приводила к ингибированию этого онколитического VV и может даже усиливать его активность [63].

IL-12. Интерлейкин-12 привлёк большое внимание в области иммунотерапии благодаря своей важной роли в иммунной системе и противоопухолевой активности. В основном IL-12 секретируется моноцитами и макрофагами. Он активирует клеточный иммунитет за счёт повышения цитолитической активности NK-клеток, усиления специфических цитотоксических Т-клеточных ответов и ответов аллореактивных лимфоцитов [64]. Кроме того, IL-12 индуцирует продукцию IFN лимфоцитами периферической крови и способствует дифференцировке Т-клеток в клетки Th1, которые, в свою очередь, активируют клеточно-опосредованный иммунитет [65]. Широко исследована противоопухолевая активность мышиного IL-12 (mIL-12). Системное введение рекомбинантного белка mIL-12 (rmIL-12) вызывает дозозависимое уменьшение метастазов меланомы B16 F10 и аденокарциномы толстой кишки MC-38 [66]. Регрессия опухоли и повышение выживаемости мышей наблюдались после локальной перитуморальной инъекции mIL-12 в ксенотрансплантаты карциномы яичника. Даже через месяц после образования опухоли, когда её диаметр составлял более 1,5 см, введение этого белка приводило к полной регрессии опухоли [67]. У мышей, которым делали инъекции клеток меланомы BL-6, смешанных с секретирующими белок mIL-12 фибробластами NIH3T3, наблюдалась значительная задержка развития опухоли. У мышей, иммунизированных облучёнными опухолевыми клетками BL-6, смешанными с теми же фибробластами, наблюдалась значительная задержка появления пальпируемой опухоли после повторного заражения родительскими онкогенными клетками BL-6, что позволяет предположить, что IL-12 может вызвать специфический противоопухолевый иммунитет. Meko et al. сконструировали рекомбинантный нереплицирующийся штамм VV, содержащий кодирующую последовательность mIL-12 в локусе гемагглютинина VV. Они показали, что опухолевые клетки, инфицированные этим VV, в течение 3 дней продуцировали большое количество биологически активного mIL-12. Чтобы вызвать образование опухоли у мышей, они вводили инфицированные опухолевые клетки с этим рекомбинантным вирусом, что значительно замедляло появление опухолей и уменьшало их размер по сравнению с опухолями мышей, которым вводили контрольный VV, не содержащий гена mIL-12 [68].

IL-15. Интерлейкин-15 – цитокин, способствующий выживанию, пролиферации и активации NK-клеток, $CD8^+$ Т-клеток и миелоидных DC $CD56^+$. IL-15 может избирательно стимулировать $CD8^+$ Т-клетки памяти. Несмотря на то что этот цитокин является родственным IL-2, в адаптивной иммунной системе он демонстрирует собственную активность [69]. Многочисленные исследования показывают, что IL-15, экспрессируемый в TME, может ингибировать рост опухоли путем активации Т-клеток [53, 70, 71]. Одним из уникальных свойств IL-15 является то, что его активность *in vivo* осуществляется через транспрезентацию. Это означает, что IL-15 представлен в комплексе с α-субъединицей растворимого рецептора IL-15 (IL-15Rα), нацеленном на клетки-мишени, такие как NK-, NKT- (Natural Killer T, естественные киллеры Т) и Т-клетки, при этом не взаимодействуя напрямую с мембраносвязанным рецептором IL-15. На основе этой концепции были разработаны агонисты IL-15, состоящие из IL-15 с частично или полностью растворимым IL-15Rα для улучшения его активности *in vivo* [72]. Растворимые комплексы IL-15/IL-15Rα существенно повышают время полужизни IL-15 и его биодоступность *in vivo*. Этот гибридный белок может активировать инфильтрированные в опухоли $CD8^+$ Т-клетки и способствовать разрушению уже образовавшихся опухолей [73].

Kowalsky et al. получили высокоспецифичный к опухолям онколитический штамм VV с двойной делецией генов TK и VGF, экспрессирующий гибридный мышиный белок IL-15/IL-15Rα (vvDD-IL15-Rα). Терапия мышей с раком яичника ID8 и аденокарциномой толстой кишки MC38 с помощью этого рекомбинантного VV продемонстрировала его значительную противоопухолевую активность, увеличение продолжительности жизни мышей. Кроме того, этот рекомбинантный вирус модулировал TME путём активации как Т-, так и NK-клеток [74].

Цитокины с общей g-цепью, в том числе IL-15, IL-2, IL-7 и IL-21, вызывают экспрессию белка запрограммированной смерти-1 (PD-1,

Таблица 1. Список рекомбинантных VV, экспрессирующих различные цитокины

Цитокины, экспрессируемые VV	Варианты VV	Другие модификации генетического материала	Тип рака	Результат	Ссылки
IL-2	vvDD-IL-2-RG	двойная делеция генов TK/VGF	рак толстой кишки	регрессия опухолей/ активация опухоле-специфичных Т-клеток	[55]
	TG1031	экспрессия MUC1	рак молочной железы	лечение рецидивов рака молочной железы	[56]
IL-10	VVLΔTK-IL-10	делеция TK	аденокарцинома протоков поджелудочной железы	инфильтрация макрофагов	[63]
				элиминация опухолей	[62]
IL-12	ivKT0327mIL-12	делеция гемагглютинина	меланома	полная элиминация опухоли	[68]
IL-15	vvDD-IL15-Rα	двойная делеция генов TK/VGF	колоректальная карцинома рак яичников	инфильтрация клеток $CD8^+$	[74]
		экспрессия гибридного белка IL15/IL15-рецептор α в сочетании с терапией PD1		регрессия опухолей	
IL-21	rTTVΔTK-mIL-21	делеция TK	меланома, карцинома толстой кишки	активация клеток CAR T; инфильтрация NK-клеток	[77]
	VVΔTK-STCΔN1L-mIL-21	делеция TK в сочетании с PD1-терапией	глиома	регрессия опухолей	[78]
GM-CSF	rV-GM-CSF	делеция TK	карцинома толстой кишки	привлечение NK-клеток, DC, индукция опухоль-специфичных CTLs	[87]
	JX-594	делеция TK и VGF	карцинома яичников		[86]
	VV-GMCSF-Lact	экспрессия лактапина	глиобластома, рак молочной железы	регрессия опухолей, усиленный апоптоз	[88, 92]

programmed death-1) и его лиганда (PD-L1) [75]. Совместное применение блокады белка PD-1 и VV, снабжённого геном IL-15, значительно улучшало результаты терапии по сравнению с группами, получавшими только анти-PD-1 или vvDD-IL15-Rα [74].

IL-21. Интерлейкин-21 в основном секретируется активированными $CD4^+$ Т-клетками и NKT-клетками и выполняет различные функции в подавлении опухолей [76, 77]. Внутриопухолевое введение рекомбинантного штамма Tian Tan VV, вооружённого мышиным IL-21 (rTTVΔTK-mIL-21), приводило к запуску системного ответа и значительной регрессии меланомы B16. У гуманизированных мышей с ксенографтами глиомы, меланомы или рака

толстой кишки, VV, экспрессирующий IL-21 человека, продемонстрировал синергический онколитический эффект в сочетании с CAR-T-клетками или инвариантными NK-клетками. Было показано, что рекомбинантный штамм Lister с *IL21* (VVΔTK-STCΔN1L-mIL-21) в комбинации с α-PD1 вызывает полную элиминацию глиомы GL261 после инъекции в опухоль [78].

GM-CSF. GM-CSF, или колониестимулирующий фактор 2, представляет собой мономерный гликопротеиновый цитокин, продуцируемый Т-клетками, тучными клетками, NK-клетками, эндотелиальными клетками, макрофагами и фибробластами. GM-CSF является мощным индуктором специфического и длительного противоопухолевого иммунитета, который может привлекать NK-клетки и DC и индуцировать опухолеспецифические цитотоксичные лимфоциты [79–85]. JX-594, штамм Wyeth, экспрессирующий GM-CSF, вызывал положительную динамику и быстро продвинулся в клинических испытаниях [39]. Исследования клеточной линии злокачественной карциномы яичника, устойчивой к стандартной химиотерапии и вызывающей гиперкальциемию, продемонстрировали её чувствительность к некоторым онколитическим вирусам, включая VV JX-594 [86]. Также был разработан другой рекомбинантный VV, несущий ген белка GM-CSF (rV-GM-CSF). Инфицирование этим рекомбинантным вирусом линии клеток аденокарциномы толстой кишки мыши MC-38 в конечном итоге привело к подавлению роста первичной опухоли. Эксперименты с деплецией Т-клеток *in vivo* показали, что подавление роста опухолевых клеток после терапии rV-GM-CSF зависит от инфильтрации Т-клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ [87]. Хотя дальнейшие исследования подтвердили, что индуцированный иммунитет является длительным и антиген-специфическим, подобный эффект не наблюдался при инфицировании опухолевых клеток MC-38 рекомбинантными штаммами VV, экспрессирующими IL-2 или IL-6. Было показано, что паракринное высвобождение мышиного GM-CSF опухолевыми клетками, инфицированными rV-GM-CSF, улучшает внутреннюю иммуногенность мышиной карциномы толстой кишки, приводя к антиген-специфическому Т-клеточному противоопухолевому ответу, который останавливает образование первичной опухоли при повторной инокуляции клеток [87]. Таким образом, GM-CSF был описан как высокоэффективный вакцинный адъювант, обладающий значительной противоопухолевой активностью.

Помимо этого, коэкспрессия GM-CSF с онкотоксическими молекулами, такими как апоптин и лактоферрин, приводит к повышению онколитической эффективности вирусных штаммов [88, 89]. Штамм Lister Московского института вирусных препаратов (LIVP) обладает высокой онколитической активностью [90]. В своей работе Grazhdantseva et al. создали рекомбинантный VV на основе LIVP, экспрессирующий GM-CSF человека и продуцирующий гликозилированную зрелую форму этой молекулы в GM-CSF-зависимых клетках [91]. Кроме того, для повышения цитотоксичности этого варианта онкотоксической молекулы в геном вируса был вставлен ген лактаптина. Лактаптин представляет собой полипептид, полученный из грудного молока человека, способный индуцировать апоптоз в опухолевых клетках. Описанный штамм также содержал делецию TK и VGF. Онколитическую эффективность этого рекомбинантного VV исследовали на мышиной модели рака молочной железы, в качестве контроля использовался штамм, кодирующий только GM-CSF [88]. Также было показано значительное онколитическое действие этого вируса на моделях глиобластомы человека. Данный штамм исследуется в первой фазе клинических испытаний в России [92].

ШТАММЫ VV, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕНЫ ПОВЫШЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТИ

Вирусные штаммы семейства поксвирусов зарекомендовали себя как эффективные и весьма безопасные индукторы Т- и В-клеточного ответа. Лицензированная вакцина против оспы третьего поколения, MVA-BN®, являющаяся сильно аттенуированным ортопоксвирусом, демонстрирует превосходный профиль безопасности и иммуногенность [93]. Однако эффективность виротерапии с помощью VV может сильно снижаться вследствие активации иммунного ответа на собственные антигены вирусного вектора. Особенно это касается VV, поскольку подавляющее большинство людей старшего поколения были вакцинированы VV в рамках программы ликвидации оспы [94]. Вирусные векторы на основе VV, экспрессирующие различные целевые антигены, способны стимулировать усиленные клеточные и гуморальные иммунные ответы и могут быть использованы как для разработки вакцин против инфекционных заболеваний, так и для иммунотерапии рака [32] (табл. 2).

Костимулирующие молекулы. Одной из стратегий повышения иммуногенности является экспрессия с помощью VV-векторов белков, напрямую стимулирующих Т-клетки. Например, костимулирующая молекула B7.1 (CD80) представляет собой интегральный мембранный белок, обнаруживаемый на поверхности активированных антиген-презентирующих клеток. Когда на поверхности Т-клеток происходит связывание этой молекулы с белком CD152 или CD28, это служит костимулирующим сигналом для повышения или снижения активности Т-клеток [95]. Было проведено несколько успешных исследований рекомбинантных штаммов VV, кодирующих иммунные костимулирующие молекулы [96]. Hodge et al. показали, что терапия двумя штаммами VV, один из которых экспрессировал канцероэмбриональный антиген (CEA, carcinoembryonic antigen), а другой – костимулирующую молекулу B7.1, вызывала появление оптимальных CEA-специфичных Т-клеточных ответов и предотвращала возникновение CEA^+ карциномы толстой кишки у мышей [97]. Позднее авторы разработали поксвирусный вектор TRICOM, кодирующий три костимулирующие молекулы: B7.1, ICAM (intercellular adhesion molecule, молекула межклеточной адгезии) и LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3, антиген 3, ассоциированный с функцией лимфоцитов). Было показано, что этот вектор вызывает усиленную активацию Т-клеток по сравнению с клетками, инфицированными аналогичным вирусом, кодирующим одну или две из этих костимулирующих молекул [98].

Иммуносупрессивное микроокружение опухолей вызывает локальную толерантность к Т-клеткам за счёт подавления костимулирующих молекул, таких как B7.1 (CD80). Были проведены клинические испытания рекомбинантного VV, экспрессирующего B7.1, с участием 12 пациентов с меланомой с использованием 2 различных доз вирусного препарата (фаза I). У всех пациентов наблюдалось повышение уровня антител и Т-клеток. Такое лечение хорошо переносилось, сообщалось лишь о случаях небольшого повышения температуры, боли в мышцах и утомляемости. У двух пациентов наблюдалась стабилизация, а один пациент перенёс вакцинацию без осложнений и прожил более 59 месяцев после неё [96].

Другой важной для противоопухолевой активности костимулирующей молекулой является гликозилированный мембранный белок типа 1, называемый 4-1BBL, который связывается с 4-1BB на активированных Т-клетках. Белок 4-1BBL, в частности, необходим для пролиферации Т-клеток и индукции $CD8^+$ Т-клеток памяти. Онколитический VV, экспрессирующий 4-1BBL (rV-4-1BBL), обладал заметной противоопухолевой активностью с увеличением количества опухолевых антиген-специфичных Т-клеток в TME на модели опухолевых ксенографтов у трансгенных мышей [99].

Флагеллин. Как только патогены достигают поверхности слизистых оболочек, они сталкиваются с первой линией защиты, представленной врождённой иммунной системой. Врождённый иммунитет активируется за счёт взаимодействия с кодируемыми зародышевой линией рецепторами распознавания образов (PRR, pattern-recognition receptors), экспрессируемыми на клетках врождённого иммунитета посредством уникальных микробных компонентов, таких как PAMP, или DAMP (damage-associated molecular patterns) – эндогенных молекулярных паттернов, связанных с повреждением. Семейства PRR включают мембраносвязанные TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6 и 10) и эндосомальные TLR (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 и 13) рецепторы [51]. Первоначально сообщалось, что бактериальный белок флагеллин связывает и активирует TLR5 на поверхности DC, что приводит к миелоидно-зависимому высвобождению провоспалительных цитокинов [100]. Позже было установлено, что цитозольный флагеллин также может восприниматься NOD-подобными рецепторами NAIP5 и NLRC4, что приводит к образованию инфламмасомы [101].

Флагеллин в настоящее время исследуется во многих вакцинах в качестве мощного адъюванта, включая вакцины для слизистых оболочек, используемые отдельно с антигеном или вводимые вместе в виде слитых белков [102]. Флагеллин использовался в качестве адъюванта при создании терапевтической вакцины против отдельных типов рака и продемонстрировал высокую эффективность на моделях генитального рака и мышиной меланомы [103]. Помимо индукции врождённых иммунных ответов, флагеллин влияет на адаптивный иммунитет, индуцируя пролиферацию антиген-специфических $CD4^+$ Т-клеток и активируя гуморальный ответ [104].

Sanos et al. разработали рекомбинантный штамм MVA, кодирующий флагеллин *Salmonella typhimurium*. Авторы показали, что иммунизация этим вирусом системно усиливала гуморальный и клеточный иммунный ответ на участках слизистой оболочки. Он индуцировал секрецию IL-1β и TNF-α на слизистых оболочках, что приводило к усилению ответа IgA как при бронхоальвеолярном, так и

при кишечном лаваже и активации миграции $CD8^+$ Т-клеток в мезентериальные лимфатические узлы [105].

Колоректальный рак является одним из самых распространённых и третьим по смертности злокачественным новообразованием в мире [106]. Несмотря на разработку новых таргетных препаратов, общая пятилетняя выживаемость при колоректальном раке составляет всего 46% [107]. Рекомбинантный поксвирус (на основе штамма вируса Tanapox), экспрессирующий флагеллин (кодируемый геном *fliC Salmonella enterica*), вызывал регрессию ксенотрансплантатов колоректальной карциномы HCT-116 человека у иммунодефицитных бестимусных мышей [108]. В этом эксперименте рекомбинантные вирусы имели делецию гена *2L* (кодирует TNF-связывающий белок), гена *66R* (кодирует тимидинкиназу) или обоих генов сразу. Кроме того, штаммы экспрессировали мышиный гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (mGM-CSF), мышиный хемотаксический белок 1 (mCCL2/mMCP-1) или бактериальный флагеллин (FliC). Терапию проводили путем внутриопухолевой инъекции одного из этих рекомбинантных поксвирусов. Значительная регрессия наблюдалась в опухолях, в которые вводили штамм, экспрессирующий флагеллин, с двойной делецией генов *2L* и *66R* (TPV/*Δ2L/Δ66R/fliC*). Авторы предполагают, что этот рекомбинантный вариант может быть эффективен и для терапии колоректального рака человека [108].

Wang et al. разработали рекомбинантную противоопухолевую вакцину на основе вируса осповакцины, экспрессирующую сурвивин T34A (SurT24A) и флагеллин (FliC), на базе штамма WR VV [109]. Сурвивин (или Birc-5) является членом семейства белков, ингибирующих апоптоз, он может стимулировать противоопухолевый цитотоксический Т-клеточный ответ [110]. В исследовании были продемонстрированы терапевтические эффекты SurT34A и показано усиление иммуногенности FliC. Их комбинация в конечном итоге привела к синергическому усилению противоопухолевой активности в экспериментах на моделях рака желудка [109].

Нашей группой недавно был разработан рекомбинантный штамм LIVP VV, кодирующий субъединицу B флагеллина *Vibrio vulnificus*, показавший усиленную регрессию опухоли на моделях мышей с меланомой B16. Онколитическая терапия этим штаммом повышала уровень TNF-α, GM-CSF, увеличивала количество макрофагов в TME и способствовала лучшему выживанию животных с экспериментальными аллографтами меланомы B16 [111].

Блокада иммунных контрольных точек. В последние годы одной из активно развивающихся областей иммунотерапии рака стала разработка ингибиторов иммунных контрольных точек. В особенности активно шёл поиск антител к PD1 – фактору программируемой клеточной смерти, имеющему два лиганда, PD-L1 и PD-L2, и CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) – гликопротеину цитотоксических Т-лимфоцитов-4. Сообщалось, что экспрессия PD-1 повышается у мышей с деплецией $CD8^+$ Т-клеток, инфицированных вирусом лимфоцитарного хориоменингита, а блокада PD-1/PD-L1 способствует активации $CD8^+$ Т-клеток и снижает вирусную нагрузку [112].

Был получен рекомбинантный штамм WR VV, экспрессирующий антитела к PD-1 человека. Доклинические исследования на мышах с моделированным раком молочной железы и карциномы лёгкого показали, что такой VV повышает экспрессию IFN-γ и активирует опухоль-специфические цитотоксические Т-клетки и, таким образом, представляет большой интерес для дальнейших клинических испытаний [113].

CTLA-4, также известный как белок CD152, экспрессируется в основном регуляторными Т-клетками (Treg) и опосредует ослабление иммунного ответа, связываясь с белками CD86 или CD80 на поверхности антиген-презентирующих клеток. Рекомбинантный VV BT-001, экспрессирующий рекомбинантный мышиный анти-CTLA-4, оказался эффективным противоопухолевым агентом, показавшим хороший эффект на животных моделях с имплантированными опухолевыми клетками линий C38, CT26, A20 и EMT6. Анти-CTLA-4 уменьшал иммуносупрессивное действие Treg и, наряду с экспрессией GM-CSF, позволил полностью элиминировать опухоли у экспериментальных животных [114].

Новой мишенью для стратегии ингибирования иммунных контрольных точек является TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), экспрессия которого значительно повышена в опухолевых клетках. Иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) представляет собой консервативную последовательность аминокислот, обнаруженную на цитоплазматических доменах многих ингибирующих рецепторов иммунных клеток, включая Т-клетки. Рецепторы, содержащие ITIM-домен, действуют как

Таблица 2. Сведения о модификациях генома VV, направленных на усиление его онколитических свойств

Генетические модификации	Описание вариантов	Задействованные клетки иммунной системы	Тип злокачественного новообразования	Результат	Ссылки
Экспрессия костимулирующих молекул	TRICOM; экспрессия B7.1, ICAM и LFA-3	Т-клетки	меланома	усиленная активация Т-клеток, регрессия опухолей в фазе I клинических испытаний	[96, 98]
	rV-4-1BBL; экспрессия 4-1BBL	$CD8^+$ Т-клетки	карцинома	повышение уровня Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам, в TME	[99]
Бактериальный флагеллин	rMVA-fla; кодирующий флагеллин из *S. typhimurium*	$CD8^+$ Т-клетки	рак желудочно-кишечного тракта	IL-1β и TNF-α, приводящие к повышению уровня ответа иммуноглобулина G (IgG)2c и антител CTL	[105]
	TPV/Δ*2L*/Δ*66R*/*fliC;* Танапокс (Tanapox), экспрессирующий флагеллин из *Salmonella enterica*/делеция генов *2L* и *66R*	нейтрофилы	колоректальный рак		[108]
	SurT24A; экспрессирующий сурвивин и флагеллин (FliC)	цитотоксические Т-клетки	рак желудка	синергетическое привлечение Т-клеток, регрессия опухолей	[109]
Блокада иммунного чекпойнта	ΔTK-Armed-VACV; экспрессирующий человеческие антитела против PD1	цитотоксические Т-клетки	рак молочной железы/ карцинома легких	повышенный уровень IFN-γ	[113]
	BT-00; экспрессия антител против CTLA4	Т-клетки	карцинома толстой кишки	оптимизированная активность по удалению Treg/мыши на 100% свободные от опухолей	[114]
	VV-α-TIGIT; экспрессирует антитела против иммуноглобулинов Т-клеток и домена ITIM	$CD8^+$ Т-клетки	гепатоцеллюлярная карцинома	70% полной регрессии опухоли/ опухоль-специфичная иммунологическая память	[116]
Медиаторы некроптоза/ апоптоза	WR/TK-/MLKL; делеция TK и экспрессия мышиных MLKL	$CD8^+$ Т-клетки	меланома	надёжный иммунитет, направленный против неоэпитопов/гибели иммуногенных клеток	[119]
	VVdGF-ApoS24/2; делеция VGF и экспрессия апоптина	$CD8^+$ Т-клетки	эпидермоидная карцинома	оказывает влияние на путь апоптоза	[120, 121]

врождённые ингибирующие рецепторы, вызывая негативную регуляцию на разных уровнях иммунного ответа [115]. Zuo et al. сконструировали рекомбинантный онколитический штамм VV, кодирующий полное моноклональное антитело к TIGIT (VV-α-TIGIT). Изучение противоопухолевой эффективности этого вируса *in vivo* показало полную регрессию экспериментальной гепатоцеллюлярной карциномы в 70%. Авторы показали, что VV-α-TIGIT способствовал привлечению активированных $CD8^+$ Т-клеток в TME. Более того, у излеченных животных не возникали опухоли при повторном прививании опухолевых клеток, что свидетельствовало о наличии у них долговременной опухолеспецифической иммунологической памяти [116].

Медиаторы некроптоза и апоптоза. Согласно современным взглядам на механизмы лечения рака, гибель опухолевых клеток вследствие действия иммунной системы – например, некроптоз, сочетающий черты некроза и апоптоза – является ключевым этапом противоопухолевого ответа [117]. Запуск некроптоза регулируется через фосфорилирование белка MLKL (mixed lineage kinase domain-like) после его прикрепления к плазматической мембране. Недавно было показано, что доставка мРНК, кодирующей MLKL, внутрь опухоли способствует формированию устойчивого противоопухолевого иммунитета в экспериментах на мышиных моделях [118]. Заражение опухолевых клеток VV, экспрессирующим MLKL, приводило к гибели клеток *in vitro* в результате некроптоза. Впоследствии введение этого штамма в опухоль приводило к активации интенсивного противоопухолевого Т-клеточного ответа на опухолевые неоантигены и способствовало гибели инфицированных иммуногенных раковых клеток *in situ* после заметного улучшения противоопухолевой активности в моделях меланомы у мышей [119].

Апоптин представляет собой богатый остатками пролина неструктурный белок, выделенный из вируса куриной анемии. Этот белок может индуцировать апоптоз в раковых клетках и является новым противоопухолевым средством. Kochneva et al. сконструировали рекомбинантный VV, имеющий делецию гена VGF и экспрессирующий апоптин, вызывающий апоптоз преимущественно в опухолевых клетках. Исследования *in vitro* показали значительный цитолитический эффект этого штамма на различных культурах опухолевых клеток человека, включая A549, A431, U87MG, RD и MCF7 [120]. Описанный вирусный штамм вызывал резкую регрессию опухоли у мышей с ксенотрансплантированной эпидермоидной карциномой A431 человека. Авторы также показали локализации этого рекомбинантного вируса в цитоплазме инфицированных клеток и его влияние на путь апоптоза [121].

Дальнейшие модификации для повышения иммуногенности. Продукты некоторых вирусных генов, в том числе A49, A52, B15, K1 и K7, ингибируют NF-κB-зависимые сигнальные пути различными способами. Di Pilato et al. изучили влияние генов A52, B15 и K7, действующих как ингибиторы NF-κB, на иммунную систему мышей. Делеция этих генов приводит к запуску NF-κB при инфицировании клеток и продукции провоспалительных цитокинов или хемокинов, которые рекрутируют нейтрофилы (Nα и Nβ), DC и NK-клетки [122]. В другом исследовании было показано, что делеция A44, A46 и C12 из генома MVA усиливает его иммуногенность с участием клеток врождённого иммунитета и запускает специфический Т-клеточный ответ [123]. Данные векторы ещё не были протестированы на моделях опухолей, но они могут быть потенциальными кандидатами для использования в онколитической виротерапии.

Другой стратегией повышения иммуногенности вирусной терапии является использование метода гетерологичного прайм-бустинга путём применения двух несовпадающих поксвирусов. Например, использование комбинации векторов MVA и оспы птиц, экспрессирующих два человеческих антигена, MUC1 и CEA, наряду с TRICOM, привело к развитию специфического иммунного ответа против опухолевых антигенов [124].

Ещё одним интересным подходом является использование оболочечных онколитических вирусов, включая EEV-форму VV, для расширения ответа на опухолевые антигены путём физического прикрепления опухолеспецифических пептидов, таких как эпитопы MHC класса I или II, к вирусной оболочке. Например, эти покрытые пептидом оболочки VV вызывали сильный Т-клеточный специфический иммунный ответ на опухолевые антигены в моделях меланомы [125].

СОЧЕТАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ VV С ДРУГИМИ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПОДХОДАМИ

Ген-направленная терапия с использованием пролекарств и ферментов. Ещё одним подходом к усилению онколитического действия

VV является терапия опухолей с использованием пролекарства и ген-специфичного фермента (GDEPT, gene-directed enzyme prodrug therapy). В этом случае нетоксичное пролекарство превращается в токсичное лекарство уже внутри TME, убивая опухолевые клетки, продуцирующие фермент. Кроме того, диффузия лекарства приводит к гибели клеток, локализованных рядом с клетками, продуцирующими ферменты, даже если они сами не экспрессируют белок, превращающий пролекарство в лекарство. Ключевым ферментом в VV-опосредованном методе GDEPT является цитозиндезаминаза в сочетании с 5-фторцитозином, которого нет в клетках млекопитающих [126]. Как уже упоминалось выше, это пролекарство под действием цитозиндезаминазы и урацилфосфорибозилтрансферазы превращается в токсичный для клеток продукт 5-фторурацилмонофосфат [47]. Такая система в рекомбинантных штаммах VV продемонстрировала лучшие терапевтические результаты, чем монотерапия онколитическими вирусами. Chalikonda et al. разработали рекомбинантный VV, который экспрессирует ген *FCY1*, кодирующий цитозиндезаминазу из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с двойной делецией генов TK и VGF. Этот рекомбинантный VV избирательно инфицировал опухоли яичников и вызывал их регрессию. Кроме того, сочетание этого VV с пролекарством 5-фторцитозином привело к долгосрочной выживаемости иммунокомпетентных мышей, несущих опухоли. На этом основании можно предположить, что комбинированная терапия с онколитическими вирусами является многообещающим средством для лечения рака яичников [126]. Аналогичные результаты были получены в другом исследовании по лечению PDAC с использованием MAPK-зависимого VV, экспрессирующего суицидальный ген цитозиндезаминазы дрожжей и ген урацилфосфорибозилтрансферазы [48].

Другим пролекарством, используемым в этой области, является Seco-аналог, полученный из антибиотика дуокармицина SA. β-Галактозидаза переводит это пролекарство в токсичную форму. Лечение рекомбинантным VV, экспрессирующим β-галактозидазу, в сочетании с Seco-аналогом оказало положительное влияние на животных моделях рака молочной железы [127].

Сочетание с лекарствами. Для повышения эффективности виротерапии могут использоваться фармацевтические препараты, способные влиять на регуляцию врождённой или адаптивной иммунной системы. Например, сочетание с ингибиторами гистондеацетилазы (HDI, histone deacetylase inhibitors) способствует репликации вируса и повышает эффективность терапии [128]. Дальнейшие исследования показали, что HDI усиливает репликацию вируса и распространение онколитического VV внутри опухоли за счёт снижения клеточного IFN-ответа и усиления вирус-индуцированного апоптоза [129].

Francis et al. показали, что лечение онколитическими VV совместно с коктейлем, состоящим из IFN-α, поли I: C и ингибитора COX-2, повышает экспрессию Th1-привлекающих хемокинов, снижает уровень Treg-привлекающих хемокинов (CCL22 и CXCL12) и увеличивает количество опухоль-инфильтрирующих NK-клеток и $CD8^+$ Т-клеток в пределах TME. Эта комбинация привела к долгосрочному выживанию мышей с карциномой толстой кишки MC38 [130].

В другом исследовании комбинация перорального низкомолекулярного многоцелевого ингибитора рецепторной тирозинкиназы (сунитиниба) с mpJX-594 VV показала, что вирус нацеливается на кровеносные сосуды опухоли, распространяясь в опухолевых клетках и вызывая их гибель, опосредованную $CD8^+$ Т-клетками, активированными под влиянием иммуномодулирующего действия сунитиниба [131]. Эти исследования демонстрируют, что фармацевтические препараты в сочетании с онколитическим вирусом могут регулировать врождённый и адаптивный противоопухолевый иммунный ответ в TME для достижения устойчивого терапевтического эффекта.

Сочетание VV с химио- и радиотерапией. Различные варианты использования онколитических вирусов в сочетании с химиотерапией за счёт их взаимодополняющего действия стали новой платформой для повышения противоопухолевой эффективности [132]. Клинические испытания фазы I внутривенной инъекции штамма GL-ONC1 VV на пациентах с распространённым раком головы/шеи, проходящих химиотерапию (с использованием цисплатина) и лучевую терапию, подтвердили безопасность и эффективность этого лечения. Это дало возможность проводить испытания фазы II [133]. Исследования фазы II комбинированного лечения штаммом VV TG4010 с химиотерапией у пациентов с немелкоклеточным раком лёгких на стадии III/IV показало значительную регрессию опухоли и увеличение показателей выживаемости [134]. По-видимому, эффективность химиотерапии повышается в присутствии иммунотерапии VV за счёт усиления опухолевых антиген-

специфичных $CD8^+$ Т-клеток, праймируемых введением VV [135]. Кроме того, применение метода высокодозной стереотаксической лучевой терапии в режиме гипофракционирования (SBRT, hypofractionated stereotactic body radiotherapy) вместе с VV усиливало противоопухолевый эффект *in vivo* и повышало противоопухолевое действие Т-клеток [136].

Сочетание VV с другими иммунотерапевтическими подходами. Чтобы усилить иммуностимулирующие эффекты VV, многие исследователи комбинируют вирусы с агонистами иммунных костимулирующих молекул или антагонистами иммунных коингибирующих молекул (например, ингибиторами иммунных контрольных точек) или другими методами иммунотерапии. Одной из стратегий коррекции иммунотерапии является использование режима немиелоаблативной лимфодеплеции организма-хозяина перед клеточной терапией рака, такой как терапия CAR-T или адоптивная Т-клеточная терапия. Обычно эта процедура включает короткий курс химиотерапии для уничтожения Т-клеток [137]. Kim et al. использовали лимфодеплецию организма-хозяина в качестве дополнения к иммунотерапии с использованием VV. Они сконструировали VV, экспрессирующий белок суперсемейства TNF, названный 4-1BBL (rV-4-1BBL), в качестве костимулирующей молекулы, и оценили его онколитическую активность в сочетании с методом лимфодеплеции на моделях меланомы. Поскольку лимфодеплеция блокирует ответ антител против вируса, выживаемость вируса в TME увеличивается, что приводит к значительному повышению его противоопухолевой активности [138].

Как обсуждалось ранее, блокада иммунных контрольных точек играет важную роль в иммунотерапии. Например, ипилимумаб, гуманизированное моноклональное антитело, специфичное к CTLA-4, является первым одобренным FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) препаратом из нового класса иммунотерапии рака. Ипилимумаб увеличивает среднюю общую выживаемость пациентов с метастатической меланомой и вызывает стойкую регрессию опухоли [139]. Кроме того, ниволумаб является первым человеческим моноклональным антителом IgG4 против PD-1. Клинические испытания ниволумаба у пациентов с прогрессирующей неоперабельной метастатической меланомой продемонстрировали удовлетворительные результаты с меньшим количеством токсических побочных эффектов по сравнению с химиотерапией [140]. Кроме того, сочетание рекомбинантных VV с этими ингибирующими препаратами даёт оптимальный иммунный ответ против опухолей. Например, введение ранее упомянутого vvDD-IL-2-RG с антителами, блокирующими иммунную контрольную точку PD-1/PD-L1, приводило к регрессии запущенных опухолей у большинства мышей [55]. А введение TG4010, хорошо изученного варианта MVA, экспрессирующего человеческий MUC1 и IL-2, в сочетании с лигандом TLR9 [141] и блокадой PD-1 специфическим антагонистом обеспечивало оптимальные терапевтические результаты в клинических и доклинических исследованиях [142].

Foy et al. исследовали влияние комбинации блокады CTLA-4 с рекомбинантным модифицированным MVA, снабжённым внеклеточным доменом рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (MVA-BN-HER2). Противоопухолевую эффективность MVA-BN-HER2 отдельно или в сочетании с блокадой CTLA-4 оценивали на моделях мышей с метастазами в лёгкие. MVA-BN-HER2 значительно повышал общую выживаемость мышей по сравнению с контролем (без лечения) или только с блокадой CTLA-4, что сопровождалось значительной инфильтрацией опухоли CTLs и коэкспрессией TNF-α и IFN-γ. Кроме того, комбинация с блокадой CTLA-4 значительно усиливала HER2-специфичные Т-клеточные ответы с высокой долей коэкспрессии TNF-α и IL-2 с IFN-γ. При этом индуцируемый белок-костимулятор Т-клеток (ICOS) экспрессировался на эффекторных Т-клетках $CD4^+$ и $CD8^+$, но не на регуляторных Т-клетках (Treg). Напротив, контрольные мыши, не получавшие лечения или получавшие только блокаду CTLA-4, имели повышенный уровень $ICOS^+$ Treg – фенотип, связанный с высокой супрессией TME [143, 144].

ВЫВОДЫ

VV, являющийся первым онколитическим вирусом, широко изученным в клинических испытаниях, демонстрирует многообещающие терапевтические результаты. За последнее десятилетие с помощью различных биоинженерных подходов получено большое количество его рекомбинантных штаммов с улучшенной онколитической активностью. Модификации VV включают экспрессию проапоптотических молекул, усиливающих прямое цитопатическое действие вируса на опухоль, факторов, усиливающих онкоселективность, или

иммуномодулирующих белков, усиливающих противоопухолевый иммунный ответ. Весьма перспективно комбинирование онколитической виротерапии с другими иммунотерапевтическими подходами, обеспечивающими снижение гуморального ответа на вирусные антигены и индукцию противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов.

Вклад авторов. Я. Шакиба – концепция обзора, анализ литературы, написание рукописи. Я. Шакиба, П.О. Воробьев, М. Махмуд, А. Хамад, Д.В. Кочетков, Г.М. Юсубалиева, А.В. Липатова – анализ литературы и написание рукописи. В.П. Баклаушев, П.М. Чумаков, А.В. Липатова – редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10157). Часть работы, связанная с анализом сочетания лечения с онколитическими вирусами и другими иммунотерапевтическими подходами, была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-64-00057).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания исследований с участием людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (2005) Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans, *J. Gen. Virol.*, **86**, 1279-1290, doi: 10.1099/vir.0.80831-0.
2. Roberts, K. L., and Smith, G. L. (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination, *Trends Microbiol.*, **16**, 472-479, doi: 10.1016/j.tim.2008.07.009.
3. Levaditi, C., and Nicolau, S. (1922) On the culture of the vaccinal virus in epithelial neoplasia [in French], *CR Soc. Biol.*, **86**, 928.
4. Guse, K., Cerullo, V., and Hemminki, A. (2011) Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **11**, 595-608, doi: 10.1517/14712598.2011.558838.
5. Schlom, J. (2012) Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward, *J. Natl. Cancer Inst.*, **104**, 599-613, doi: 10.1093/jnci/djs033.
6. Fenner, F. (1989) Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign, *Res. Virol.*, **140**, 465-466; discussion 487-491, doi: 10.1016/s0923-2516(89)80126-8.
7. Fenner, F. (1993) Smallpox: emergence, global spread, and eradication, *Hist. Philos. Life Sci.*, **15**, 397-420.
8. Thorne, S. H., Bartlett, D. L., and Kirn, D. H. (2005) The use of oncolytic vaccinia viruses in the treatment of cancer: a new role for an old ally? *Curr. Gene Ther.*, **5**, 429-443, doi: 10.2174/1566523054546215.
9. Hermiston, T. (2000) Gene delivery from replication-selective viruses: arming guided missiles in the war against cancer, *J. Clin. Invest.*, **105**, 1169-1172, doi: 10.1172/JCI9973.
10. Thorne, S. H., Hwang, T. H., and Kirn, D. H. (2005) Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **7**, 359-365.
11. Gammon, D. B., Gowrishankar, B., Duraffour, S., Andrei, G., Upton, C., and Evans, D. H. (2010) Vaccinia virus-encoded ribonucleotide reductase subunits are differentially required for replication and pathogenesis, *PLoS Pathog.*, **6**, e1000984, doi: 10.1371/journal.ppat.1000984.
12. Wang, L. C., Lynn, R. C., Cheng, G., Alexander, E., Kapoor, V., Moon, E. K., Sun, J., Fridlender, Z. G., Isaacs, S. N., Thorne, S. H., and Albelda, S. M. (2012) Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFNβ illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity, *Mol. Ther.*, **20**, 736-748, doi: 10.1038/mt.2011.228.
13. Thorne, S. H. (2012) Next-generation oncolytic vaccinia vectors, *Methods Mol. Biol.*, **797**, 205-215, doi: 10.1007/978-1-61779-340-0_14.
14. Smith, G. L., Benfield, C. T. O., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S. W. J., Ferguson, B. J., and Sumner, R. P. (2013) Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity, *J. Gen. Virol.*, **94**, 2367-2392, doi: 10.1099/vir.0.055921-0.
15. Hu, W., Wang, G., Huang, D., Sui, M., and Xu, Y. (2019) Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities, *Front. Immunol.*, **10**, 1205, doi: 10.3389/fimmu.2019.01205.
16. Kirwan, S., Merriam, D., Barsby, N., McKinnon, A., and Burshtyn, D. N. (2006) Vaccinia virus modulation of natural killer cell function by direct infection, *Virology*, **347**, 75-87, doi: 10.1016/j.virol.2005.11.037.
17. Chisholm, S. E., and Reyburn, H. T. (2006) Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors, *J. Virol.*, **80**, 2225-2233, doi: 10.1128/JVI.80.5.2225-2233.2006.
18. Benfield, C. T. O., Ren, H., Lucas, S. J., Bahsoun, B., and Smith, G. L. (2013) Vaccinia virus protein K7 is a virulence factor that alters the acute immune response to infection, *J. Gen. Virol.*, **94**, 1647-1657, doi: 10.1099/vir.0.052670-0.

19. Li, F., Sheng, Y., Hou, W., Sampath, P., Byrd, D., Thorne, S., and Zhang, Y. (2020) CCL5-armed oncolytic virus augments CCR5-engineered NK cell infiltration and antitumor efficiency, *J. Immunother. Cancer*, **8**, e000131, doi: 10.1136/jitc-2019-000131.
20. Karupiah, G., Coupar, B. E., Andrew, M. E., Boyle, D. B., Phillips, S. M., Mullbacher, A., Blanden, R. V., and Ramshaw, I. A. (1990) Elevated natural killer cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL-2, *J. Immunol.*, **144**, 290-298.
21. McKenzie, R., Kotwal, G. J., Moss, B., Hammer, C. H., and Frank, M. M. (1992) Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein, *J. Infect. Dis.*, **166**, 1245-1250, doi: 10.1093/infdis/166.6.1245.
22. Girgis, N. M., Dehaven, B. C., Xiao, Y., Alexander, E., Viner, K. M., and Isaacs, S. N. (2011) The Vaccinia virus complement control protein modulates adaptive immune responses during infection, *J. Virol.*, **85**, 2547-2556, doi: 10.1128/JVI.01474-10.
23. Isaacs, S. N., Kotwal, G. J., and Moss, B. (1992) Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 628-632, doi: 10.1073/pnas.89.2.628.
24. Jefferson, A., Cadet, V. E., and Hielscher, A. (2015) The mechanisms of genetically modified vaccinia viruses for the treatment of cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **95**, 407-416, doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.04.001.
25. Thorne, S. H. (2011) Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus, *Immunol. Res.*, **50**, 286-293, doi: 10.1007/s12026-011-8211-4.
26. Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K., and O'Neill, L. A. (2000) A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10162-10167, doi: 10.1073/pnas.160027697.
27. Alcami, A., Symons, J. A., and Smith, G. L. (2000) The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN, *J. Virol.*, **74**, 11230-11239, doi: 10.1128/jvi.74.23.11230-11239.2000.
28. Kirn, D. H., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J., and Thorne, S. H. (2007) Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus, *PLoS Med.*, **4**, e353, doi: 10.1371/journal.pmed.0040353.
29. Gerlic, M., Faustin, B., Postigo, A., Yu, E. C., Proell, M., Gombosuren, N., Krajewska, M., Flynn, R., Croft, M., Way, M., Satterthwait, A., Liddington, R. C., Salek-Ardakani, S., Matsuzawa, S., and Reed, J. C. (2013) Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7808-7813, doi: 10.1073/pnas.1215995110.
30. Symons, J. A., Adams, E., Tscharke, D. C., Reading, P. C., Waldmann, H., and Smith, G. L. (2002) The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model, *J. Gen. Virol.*, **83**, 2833-2844, doi: 10.1099/0022-1317-83-11-2833.
31. Alcamí, A., Symons, J. A., Collins, P. D., Williams, T. J., and Smith, G. L. (1998) Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus, *J. Immunol.*, **160**, 624-633.
32. Lehmann, M. H., Kastenmuller, W., Kandemir, J. D., Brandt, F., Suezer, Y., and Sutter, G. (2009) Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression, *J. Virol.*, **83**, 2540-2552, doi: 10.1128/JVI.01884-08.
33. Alejo, A., Ruiz-Argüello, M. B., Ho, Y., Smith, V. P., Saraiva, M., and Alcami, A. (2006) A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5995-6000, doi: 10.1073/pnas.0510462103.
34. Ylosmaki, E., and Cerullo, V. (2020) Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **65**, 25-36, doi: 10.1016/j.copbio.2019.11.016.
35. Guse, K., Sloniecka, M., Diaconu, I., Ottolino-Perry, K., Tang, N., Ng, C., Le Boeuf, F., Bell, J. C., McCart, J. A., Ristimäki, A., Pesonen, S., Cerullo, V., and Hemminki, A. (2010) Antiangiogenic arming of an oncolytic vaccinia virus enhances antitumor efficacy in renal cell cancer models, *J. Virol.*, **84**, 856-866, doi: 10.1128/JVI.00692-09.
36. Gholami, S., Marano, A., Chen, N. G., Aguilar, R. J., Frentzen, A., Chen, C. H., Lou, E., Fujisawa, S., Eveno, C., Belin, L., Zanzonico, P., Szalay, A., and Fong, Y. (2014) A novel vaccinia virus with dual oncolytic and anti-angiogenic therapeutic effects against triple-negative breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **148**, 489-499, doi: 10.1007/s10549-014-3180-7.
37. Moss, B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11341-11348, doi: 10.1073/pnas.93.21.11341.
38. Hung, C. F., Tsai, Y. C., He, L., Coukos, G., Fodor, I., Qin, L., Levitsky, H., and Wu, T. C. (2007) Vaccinia virus preferentially infects and controls human and murine ovarian tumors in mice, *Gene Ther.*, **14**, 20-29, doi: 10.1038/sj.gt.3302840.
39. Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbach, C. J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H. Y., Chung, H. C., Kim, C. W., Burke, J., Lencioni, R., Hickman, T., Moon, A., Lee, Y. S., Kim, M. K., Daneshmand, M., Dubois, K., Longpre, L., Ngo, M., et al. (2013) Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer, *Nat. Med.*, **19**, 329-336, doi: 10.1038/nm.3089.

40. Mori, K. M., Giuliano, P. D., Lopez, K. L., King, M. M., Bohart, R., and Goldstein, B. H. (2019) Pronounced clinical response following the oncolytic vaccinia virus GL-ONC1 and chemotherapy in a heavily pretreated ovarian cancer patient, *Anticancer Drugs*, **30**, 1064-1066, doi: 10.1097/CAD.0000000000000836.
41. McCart, J. A., Ward, J. M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H. R., Libutti, S. K., Moss, B., and Bartlett, D. L. (2001) Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes, *Cancer Res.*, **61**, 8751-8757.
42. Buller, R. M., Chakrabarti, S., Cooper, J. A., Twardzik, D. R., and Moss, B. (1988) Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence, *J. Virol.*, **62**, 866-874, doi: 10.1128/JVI.62.3.866-874.1988.
43. Schweneker, M., Lukassen, S., Späth, M., Wolferstätter, M., Babel, E., Brinkmann, K., Wielert, U., Chaplin, P., Suter, M., and Hausmann, J. (2012) The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes viral virulence, *J. Virol.*, **86**, 2323-2336, doi: 10.1128/JVI.06166-11.
44. Wee, P., and Wang, Z. (2017) Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways, *Cancers (Basel)*, **9**, 52, doi: 10.3390/cancers9050052.
45. Li, S., Balmain, A., and Counter, C. M. (2018) A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 767-777, doi: 10.1038/s41568-018-0076-6.
46. Yuan, T. L., Amzallag, A., Bagni, R., Yi, M., Afghani, S., Burgan, W., Fer, N., Strathern, L. A., Powell, K., Smith, B., Waters, A. M., Drubin, D., Thomson, T., Liao, R., Greninger, P., Stein, G. T., Murchie, E., Cortez, E., Egan, R. K., Procter, L., et al. (2018) Differential effector engagement by oncogenic KRAS, *Cell Rep*, **22**, 1889-1902, doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.051.
47. Gopinath, P., and Ghosh, S. S. (2008) Implication of functional activity for determining therapeutic efficacy of suicide genes *in vitro*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1913-1921, doi: 10.1007/s10529-008-9787-1.
48. Kurosaki, H., Nakatake, M., Sakamoto, T., Kuwano, N., Yamane, M., Ishii, K., Fujiwara, Y., and Nakamura, T. (2021) Anti-tumor effects of MAPK-dependent tumor-selective oncolytic vaccinia virus armed with CD/UPRT against pancreatic ductal adenocarcinoma in mice, *Cells*, **10**, 985, doi: 10.3390/cells10050985.
49. Guo, H., Callaway, J. B., and Ting, J. P. (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics, *Nat. Med.*, **21**, 677-687, doi: 10.1038/nm.3893.
50. Guo, Z. S., Naik, A., O'Malley, M. E., Popovic, P., Demarco, R., Hu, Y., Yin, X., Yang, S., Zeh, H. J., Moss, B., Lotze, M. T., and Bartlett, D. L. (2005) The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2, *Cancer Res.*, **65**, 9991-9998, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1630.
51. Legrand, F. A., Verardi, P. H., Chan, K. S., Peng, Y., Jones, L. A., and Yilma, T. D. (2005) Vaccinia viruses with a serpin gene deletion and expressing IFN-gamma induce potent immune responses without detectable replication *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2940-2945, doi: 10.1073/pnas.0409846102.
52. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., and Ribas, A. (2017) Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy, *Cell*, **168**, 707-723, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
53. Pearl, T. M., Markert, J. M., Cassady, K. A., and Ghonime, M. G. (2019) Oncolytic virus-based cytokine expression to improve immune activity in brain and solid tumors, *Mol. Ther. Oncolytics*, **13**, 14-21, doi: 10.1016/j.omto.2019.03.001.
54. Yang, J. C., Sherry, R. M., Steinberg, S. M., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., White, D. E., Liewehr, D. J., Merino, M. J., and Rosenberg, S. A. (2003) Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer, *J. Clin. Oncol.*, **21**, 3127-3132, doi: 10.1200/JCO.2003.02.122.
55. Liu, Z., Ge, Y., Wang, H., Ma, C., Feist, M., Ju, S., Guo, Z. S., and Bartlett, D. L. (2018) Modifying the cancer-immune set point using vaccinia virus expressing re-designed interleukin-2, *Nat. Commun.*, **9**, 4682, doi: 10.1038/s41467-018-06954-z.
56. Scholl, S., Squiban, P., Bizouarne, N., Baudin, M., Acres, B., Von Mensdorff-Pouilly, S., Shearer, M., Beuzeboc, P., Van Belle, S., Uzielly, B., Pouillart, P., Taylor-Papadimitriou, J., and Miles, D. (2003) Metastatic breast tumour regression following treatment by a gene-modified vaccinia virus expressing MUC1 and IL-2, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2003**, 194-201, doi: 10.1155/S111072430320704X.
57. Yigit, R., Massuger, L. F., Figdor, C. G., and Torensma, R. (2010) Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination, *Gynecol. Oncol.*, **117**, 366-372, doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.019.
58. Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B., and Oldstone, M. B. (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*, *Nat. Med.*, **12**, 1301-1309, doi: 10.1038/nm1492.
59. Stearns, M. E., Wang, M., Hu, Y., Garcia, F. U., and Rhim, J. (2003) Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines, *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1191-1199.
60. Schock, S. N., Chandra, N. V., Sun, Y., Irie, T., Kitagawa, Y., Gotoh, B., Coscoy, L., and Winoto, A. (2017) Induction of necroptotic cell death by viral

activation of the RIG-I or STING pathway, *Cell Death Differ.*, **24**, 615-625, doi: 10.1038/cdd.2016.153.

61. Emmerich, J., Mumm, J. B., Chan, I. H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D. M., and Oft, M. (2012) IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8$^+$ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs, *Cancer Res.*, **72**, 3570-3581, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0721.
62. Tanaka, F., Tominaga, K., Shiota, M., Ochi, M., Kuwamura, H., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Iwao, H., and Arakawa, T. (2008) Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the peritoneal cavity, *Cancer Gene Ther.*, **15**, 51-59, doi: 10.1038/sj.cgt.7701104.
63. Chard, L. S., Maniati, E., Wang, P., Zhang, Z., Gao, D., Wang, J., Cao, F., Ahmed, J., El Khouri, M., Hughes, J., Wang, S., Li, X., Denes, B., Fodor, I., Hagemann, T., Lemoine, N. R., and Wang, Y. (2015) A vaccinia virus armed with interleukin-10 is a promising therapeutic agent for treatment of murine pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 405-416, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0464.
64. Trinchieri, G., and Scott, P. (1994) The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy, *Immunol. Today*, **15**, 460-463, doi: 10.1016/0167-5699(94)90189-9.
65. Scott, P. (1993) IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity, *Science*, **260**, 496-497, doi: 10.1126/science.8097337.
66. Nastala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A., Brunda, M. J., Gately, M. K., Wolf, S. F., Schreiber, R. D., and Storkus, W. J. (1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production, *J. Immunol.*, **153**, 1697-1706.
67. Mu, J., Zou, J. P., Yamamoto, N., Tsutsui, T., Tai, X. G., Kobayashi, M., Herrmann, S., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (1995) Administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes, *Cancer Res.*, **55**, 4404-4408.
68. Meko, J. B., Tsung, K., and Norton, J. A. (1996) Cytokine production and antitumor effect of a nonreplicating, noncytopathic recombinant vaccinia virus expressing interleukin-12, *Surgery*, **120**, 274-282; discussion 282-273, doi: 10.1016/s0039-6060(96)80298-4.
69. Waldmann, T. A. (2015) The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy, *Cancer Immunol. Res.*, **3**, 219-227, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0009.
70. Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., and Waldmann, T. A. (2019) Cytokines in the treatment of cancer, *J. Interferon Cytokine Res.*, **39**, 6-21, doi: 10.1089/jir.2018.0019.
71. Rhode, P. R., Egan, J. O., Xu, W., Hong, H., Webb, G. M., Chen, X., Liu, B., Zhu, X., Wen, J., You, L., Kong, L., Edwards, A. C., Han, K., Shi, S., Alter, S., Sacha, J. B., Jeng, E. K., Cai, W., and Wong, H. C. (2016) Comparison of the superagonist complex, ALT-803, to IL15 as cancer immunotherapeutics in animal models, *Cancer Immunol. Res.*, **4**, 49-60, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0093-T.
72. Van den Bergh, J. M., Lion, E., Van Tendeloo, V. F., and Smits, E. L. (2017) IL-15 receptor alpha as the magic wand to boost the success of IL-15 antitumor therapies: the upswing of IL-15 transpresentation, *Pharmacol. Ther.*, **170**, 73-79, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.10.012.
73. Epardaud, M., Elpek, K. G., Rubinstein, M. P., Yonekura, A. R., Bellemare-Pelletier, A., Bronson, R., Hamerman, J. A., Goldrath, A. W., and Turley, S. J. (2008) Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8$^+$ T cells, *Cancer Res.*, **68**, 2972-2983, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0045.
74. Kowalsky, S. J., Liu, Z., Feist, M., Berkey, S. E., Ma, C., Ravindranathan, R., Dai, E., Roy, E. J., Guo, Z. S., and Bartlett, D. L. (2018) Superagonist IL-15-armed oncolytic virus elicits potent antitumor immunity and therapy that are enhanced with PD-1 blockade, *Mol. Ther.*, **26**, 2476-2486, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.07.013.
75. Kinter, A. L., Godbout, E. J., McNally, J. P., Sereti, I., Roby, G. A., O'Shea, M. A., and Fauci, A. S. (2008) The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands, *J. Immunol.*, **181**, 6738-6746, doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6738.
76. Moroz, A., Eppolito, C., Li, Q., Tao, J., Clegg, C. H., and Shrikant, P. A. (2004) IL-21 enhances and sustains CD8$^+$ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21, *J. Immunol.*, **173**, 900-909, doi: 10.4049/jimmunol.173.2.900.
77. Chen, T., Ding, X., Liao, Q., Gao, N., Chen, Y., Zhao, C., Zhang, X., and Xu, J. (2021) IL-21 arming potentiates the anti-tumor activity of an oncolytic vaccinia virus in monotherapy and combination therapy, *J. Immunother. Cancer*, **9**, e001647, doi: 10.1136/jitc-2020-001647.
78. Sun, Y., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, N., Wang, P., Chu, Y., Chard Dunmall, L. S., Lemoine, N. R., and Wang, Y. (2022) An effective therapeutic regime for treatment of glioma using oncolytic vaccinia virus expressing IL-21 in combination with immune checkpoint inhibition, *Mol. Ther. Oncolytics*, **26**, 105-119, doi: 10.1016/j.omto.2022.05.008.

79. Gasson, J. C. (1991) Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood*, **77**, 1131-1145.
80. Bauer, T. V., Tregubchak, T. V., Maksyutov, A. Z., Kolosova, I. V., Maksyutov, R. A., and Gavrilova, E. V. (2020) Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer [in Russian], *Vopr. Virusol.*, **65**, 49-56, doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-49-56.
81. Deng, L., Yang, X., Fan, J., Ding, Y., Peng, Y., Xu, D., Huang, B., and Hu, Z. (2020) An oncolytic vaccinia virus armed with GM-CSF and IL-24 double genes for cancer targeted therapy, *Onco Targets Ther.*, **13**, 3535-3544, doi: 10.2147/OTT.S249816.
82. Duggan, M. C., Jochems, C., Donahue, R. N., Richards, J., Karpa, V., Foust, E., Paul, B., Brooks, T., Tridandapani, S., Olencki, T., Pan, X., Lesinski, G. B., Schlom, J., and Carson III, W. E. (2016) A phase I study of recombinant (r) vaccinia-CEA(6D)-TRICOM and rFowlpox-CEA(6D)-TRICOM vaccines with GM-CSF and IFN-alpha-2b in patients with CEA-expressing carcinomas, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**, 1353-1364, doi: 10.1007/s00262-016-1893-7.
83. Heinrich, B., Klein, J., Delic, M., Goepfert, K., Engel, V., Geberzahn, L., Lusky, M., Erbs, P., Preville, X., and Moehler, M. (2017) Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes, *Onco Targets Ther.*, **10**, 2389-2401, doi: 10.2147/OTT.S126320.
84. Inoue, T., Byrne, T., Inoue, M., Tait, M. E., Wall, P., Wang, A., Dermyer, M. R., Laklai, H., Binder, J. J., Lees, C., Hollingsworth, R., Maruri-Avidal, L., Kirn, D. H., and McDonald, D. M. (2021) Oncolytic vaccinia virus gene modification and cytokine expression effects on tumor infection, immune response, and killing, *Mol. Cancer Ther.*, **20**, 1481-1494, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0863.
85. Kannanganat, S., Wyatt, L. S., Gangadhara, S., Chamcha, V., Chea, L. S., Kozlowski, P. A., LaBranche, C. C., Chennareddi, L., Lawson, B., Reddy, P. B., Styles, T. M., Vanderford, T. H., Montefiori, D. C., Moss, B., Robinson, H. L., and Amara, R. R. (2016) High doses of GM-CSF inhibit antibody responses in rectal secretions and diminish modified vaccinia Ankara/Simian immunodeficiency virus vaccine protection in TRIM5alpha-restrictive macaques, *J. Immunol.*, **197**, 3586-3596, doi: 10.4049/jimmunol.1600629.
86. Witmer-Pack, M. D., Olivier, W., Valinsky, J., Schuler, G., and Steinman, R. M. (1987) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells, *J. Exp. Med.*, **166**, 1484-1498, doi: 10.1084/jem.166.5.1484.
87. McLaughlin, J. P., Abrams, S., Kantor, J., Dobrzanski, M. J., Greenbaum, J., Schlom, J., and Greiner, J. W. (1997) Immunization with a syngeneic tumor infected with recombinant vaccinia virus expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces tumor regression and long-lasting systemic immunity, *J. Immunother.*, **20**, 449-459, doi: 10.1097/00002371-199711000-00004.
88. Kochneva, G., Sivolobova, G., Tkacheva, A., Grazhdantseva, A., Troitskaya, O., Nushtaeva, A., Tkachenko, A., Kuligina, E., Richter, V., and Koval, O. (2016) Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy, *Oncotarget*, **7**, 74171-74188, doi: 10.18632/oncotarget.12367.
89. Koval, O., Kochneva, G., Tkachenko, A., Troitskaya, O., Sivolobova, G., Grazhdantseva, A., Nushtaeva, A., Kuligina, E., and Richter, V. (2017) Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells, *Biomed Res. Int.*, **2017**, 3620510, doi: 10.1155/2017/3620510.
90. Shakiba, Y., Naberezhnaya, E., Kochetkov, D., Yusubalieva, G., Vorobyev, P., Chumakov, P., Baklaushev, V., and Lipatova, A. (2023) Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains LIVP-RFP and MVA-RFP against solid tumors, *Bull. RSMU*, **2023**, doi: 10.24075/brsmu.2023.010.
91. Grazhdantseva, A. A., Sivolobova, G. F., Tkacheva, A. V., Gileva, I. P., Kuligina, E. V., Rikhter, V. A., and Kochneva, G. V. (2016) Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **52**, 685-691, doi: 10.1134/S0003683816070036.
92. Vasileva, N., Ageenko, A., Dmitrieva, M., Nushtaeva, A., Mishinov, S., Kochneva, G., Richter, V., and Kuligina, E. (2021) Double recombinant vaccinia virus: a candidate drug against human glioblastoma, *Life (Basel)*, **11**, 1084, doi: 10.3390/life11101084.
93. Von Krempelhuber, A., Vollmar, J., Pokorny, R., Rapp, P., Wulff, N., Petzold, B., Handley, A., Mateo, L., Siersbol, H., Kollaritsch, H., and Chaplin, P. (2010) A randomized, double-blind, dose-finding Phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE, *Vaccine*, **28**, 1209-1216, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.030.
94. Verardi, P. H., Titong, A., and Hagen, C. J. (2012) A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication, *Hum. Vaccin Immunother.*, **8**, 961-970, doi: 10.4161/hv.21080.
95. Collins, M., Ling, V., and Carreno, B. M. (2005) The B7 family of immune-regulatory ligands, *Genome Biol.*, **6**, 223, doi: 10.1186/gb-2005-6-6-223.

96. Kaufman, H. L., Deraffele, G., Mitcham, J., Moroziewicz, D., Cohen, S. M., Hurst-Wicker, K. S., Cheung, K., Lee, D. S., Divito, J., Voulo, M., Donovan, J., Dolan, K., Manson, K., Panicali, D., Wang, E., Hörig, H., and Marincola, F. M. (2005) Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma, *J. Clin. Invest.*, **115**, 1903-1912, doi: 10.1172/JCI24624.
97. Hodge, J. W., McLaughlin, J. P., Abrams, S. I., Shupert, W. L., Schlom, J., and Kantor, J. A. (1995) Admixture of a recombinant vaccinia virus containing the gene for the costimulatory molecule B7 and a recombinant vaccinia virus containing a tumor-associated antigen gene results in enhanced specific T-cell responses and antitumor immunity, *Cancer Res.*, **55**, 3598-3603.
98. Hodge, J. W., Sabzevari, H., Yafal, A. G., Gritz, L., Lorenz, M. G., and Schlom, J. (1999) A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation, *Cancer Res.*, **59**, 5800-5807.
99. Kudo-Saito, C., Hodge, J. W., Kwak, H., Kim-Schulze, S., Schlom, J., and Kaufman, H. L. (2006) 4-1BB ligand enhances tumor-specific immunity of poxvirus vaccines, *Vaccine*, **24**, 4975-4986, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.042.
100. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature*, **410**, 1099-1103, doi: 10.1038/35074106.
101. Kofoed, E. M., and Vance, R. E. (2011) Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity, *Nature*, **477**, 592-595, doi: 10.1038/nature10394.
102. Weimer, E. T., Lu, H., Kock, N. D., Wozniak, D. J., and Mizel, S. B. (2009) A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.*, **77**, 2356-2366, doi: 10.1128/IAI.00054-09.
103. De Melo, F. M., Braga, C. J., Pereira, F. V., Maricato, J. T., Origassa, C. S., Souza, M. F., Melo, A. C., Silva, P., Tomaz, S. L., Gimenes, K. P., Scutti, J. A., Juliano, M. A., Zamboni, D. S., Câmara, N. O., Travassos, L. R., Ferreira, L. C., and Rodrigues, E. G. (2015) Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10, *Immunol. Cell Biol.*, **93**, 86-98, doi: 10.1038/icb.2014.74.
104. Mizel, S. B., and Bates, J. T. (2010) Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential, *J. Immunol.*, **185**, 5677-5682, doi: 10.4049/jimmunol.1002156.
105. Sanos, S. L., Kassub, R., Testori, M., Geiger, M., Pätzold, J., Giessel, R., Knallinger, J., Bathke, B., Gräbnitz, F., Brinkmann, K., Chaplin, P., Suter, M., Hochrein, H., and Lauterbach, H. (2017) NLRC4 inflammasome-driven immunogenicity of a recombinant MVA mucosal vaccine encoding flagellin, *Front. Immunol.*, **8**, 1988, doi: 10.3389/fimmu.2017.01988.
106. Chen, W., Zheng, R., Zhang, S., Zhao, P., Li, G., Wu, L., and He, J. (2013) The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009, *Chin. J. Cancer*, **32**, 106-112, doi: 10.5732/cjc.013.10018.
107. Strong, V. E., Wu, A. W., Selby, L. V., Gonen, M., Hsu, M., Song, K. Y., Park, C. H., Coit, D. G., Ji, J. F., and Brennan, M. F. (2015) Differences in gastric cancer survival between the U.S. and China, *J. Surg. Oncol.*, **112**, 31-37, doi: 10.1002/jso.23940.
108. Conrad, S. J., El-Aswad, M., Kurban, E., Jeng, D., Tripp, B. C., Nutting, C., Eversole, R., Mackenzie, C., and Essani, K. (2015) Oncolytic tanapoxvirus expressing FliC causes regression of human colorectal cancer xenografts in nude mice, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **34**, 19, doi: 10.1186/s13046-015-0131-z.
109. Wang, M., Luo, Y., Sun, T., Mao, C., Jiang, Y., Yu, X., Li, Z., Xie, T., Wu, F., Yan, H., and Teng, L. (2020) The ectopic expression of survivinT34A and FilC can enhance the oncolytic effects of vaccinia virus in murine gastric cancer, *Onco Targets Ther.*, **13**, 1011-1025, doi: 10.2147/OTT.S230902.
110. Andersen, M. H., Svane, I. M., Becker, J. C., and Straten, P. T. (2007) The universal character of the tumor-associated antigen survivin, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 5991-5994, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0686.
111. Shakiba, Y., Vorobyev, P. O., Naumenko, V. A., Kochetkov, D. V., Zajtseva, K. V., Valikhov, M. P., Yusubalieva, G. M., Gumennaya, Y. D., Emelyanov, E. A., Semkina, A. S., Baklaushev, V. P., Chumakov, P. M., and Lipatova, A. V. (2023) Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models, *Viruses*, **15**, 828.
112. Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., and Ahmed, R. (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection, *Nature*, **439**, 682-687, doi: 10.1038/nature04444.
113. Shi, Z., Liu, B., Huang, C., Xie, W., Cen, Y., Chen, L., and Liang, M. (2021) An oncolytic vaccinia virus armed with anti-human-PD-1 antibody and anti-human-4-1BB antibody double genes for cancer-targeted therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **559**, 176-182, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.078.
114. Marchand, J.-B., Semmrich, M., Fend, L., Rehn, M., Silvestre, N., Teige, I., Foloppe, F., Mårtensson, L., Quéméneur, E., and Frendeus, B. (2020) BT-001, an oncolytic vaccinia virus armed with a Treg-depletion-optimized recombinant human anti-CTLA4 antibody and GM-CSF to target the tumor microenvironment, *Cancer Res.*, **8**, doi: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0594.
115. Dushek, O., Goyette, J., and van der Merwe, P. A. (2012) Non-catalytic tyrosine-phosphorylated receptors, *Immunol Rev*, **250**, 258-276, doi: 10.1111/imr.12008.

116. Zuo, S., Wei, M., He, B., Chen, A., Wang, S., Kong, L., Zhang, Y., Meng, G., Xu, T., Wu, J., Yang, F., Zhang, H., Wang, S., Guo, C., Wu, J., Dong, J., and Wei, J. (2021) Enhanced antitumor efficacy of a novel oncolytic vaccinia virus encoding a fully monoclonal antibody against T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT), *EBioMedicine*, **64**, 103240, doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103240.
117. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2017) Immunogenic cell death in cancer and infectious disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 97-111, doi: 10.1038/nri.2016.107.
118. Van Hoecke, L., Van Lint, S., Roose, K., Van Parys, A., Vandenabeele, P., Grooten, J., Tavernier, J., De Koker, S., and Saelens, X. (2018) Treatment with mRNA coding for the necroptosis mediator MLKL induces antitumor immunity directed against neo-epitopes, *Nat. Commun.*, **9**, 3417, doi: 10.1038/s41467-018-05979-8.
119. Van Hoecke, L., Riederer, S., Saelens, X., Sutter, G., and Rojas, J. J. (2020) Recombinant viruses delivering the necroptosis mediator MLKL induce a potent antitumor immunity in mice, *Oncoimmunology*, **9**, 1802968, doi: 10.1080/2162402X.2020.1802968.
120. Kochneva, G. V., Babkina, I. N., Lupan, T. A., Grazhdantseva, A. A., Iudin, P. V., Sivolobova, G. F., Shvalov, A. N., Popov, E. G., Babkin, I. V., Netesov, S. V., and Chumakov, P. M. (2013) Apoptin enhances the oncolytic activity of vaccinia virus [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **47**, 842-852.
121. Kochneva, G., Zonov, E., Grazhdantseva, A., Yunusova, A., Sibolobova, G., Popov, E., Taranov, O., Netesov, S., Chumakov, P., and Ryabchikova, E. (2014) Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression, *Oncotarget*, **5**, 11269-11282, doi: 10.18632/oncotarget.2579.
122. Di Pilato, M., Mejías-Pérez, E., Sorzano, C. O. S., and Esteban, M. (2017) Distinct roles of vaccinia virus NF-κB inhibitor proteins A52, B15, and K7 in the immune response, *J. Virol.*, **91**, doi: 10.1128/JVI.00575-17.
123. Holgado, M. P., Falivene, J., Maeto, C., Amigo, M., Pascutti, M. F., Vecchione, M. B., Bruttomesso, A., Calamante, G., Del Médico-Zajac, M. P., and Gherardi, M. M. (2016) Deletion of A44L, A46R and C12L vaccinia virus genes from the MVA genome improved the vector immunogenicity by modifying the innate immune response generating enhanced and optimized specific T-cell responses, *Viruses*, **8**, 139, doi: 10.3390/v8050139.
124. Tsang, K. Y., Palena, C., Yokokawa, J., Arlen, P. M., Gulley, J. L., Mazzara, G. P., Gritz, L., Yafal, A. G., Ogueta, S., Greenhalgh, P., Manson, K., Panicali, D., and Schlom, J. (2005) Analyses of recombinant vaccinia and fowlpox vaccine vectors expressing transgenes for two human tumor antigens and three human costimulatory molecules, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 1597-1607, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1609.
125. Ylösmäki, E., Malorzo, C., Capasso, C., Honkasalo, O., Fusciello, M., Martins, B., Ylösmäki, L., Louna, A., Feola, S., Paavilainen, H., Peltonen, K., Hukkanen, V., Viitala, T., and Cerullo, V. (2018) Personalized cancer vaccine platform for clinically relevant oncolytic enveloped viruses, *Mol. Ther.*, **26**, 2315-2325, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.06.008.
126. Chalikonda, S., Kivlen, M. H., O'Malley, M. E., Eric Dong, X. D., McCart, J. A., Gorry, M. C., Yin, X. Y., Brown, C. K., Zeh, H. J., Guo, Z. S., and Bartlett, D. L. (2008) Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene, *Cancer Gene Ther.*, **15**, 115-125, doi: 10.1038/sj.cgt.7701110.
127. Seubert, C. M., Stritzker, J., Hess, M., Donat, U., Sturm, J. B., Chen, N., von Hof, J. M., Krewer, B., Tietze, L. F., Gentschev, I., and Szalay, A. A. (2011) Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a β-galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA, *Cancer Gene Ther.*, **18**, 42-52, doi: 10.1038/cgt.2010.49.
128. Marchini, A., Scott, E. M., and Rommelaere, J. (2016) Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade, *Viruses*, **8**, 9, doi: 10.3390/v8010009.
129. MacTavish, H., Diallo, J. S., Huang, B., Stanford, M., Le Boeuf, F., De Silva, N., Cox, J., Simmons, J. G., Guimond, T., Falls, T., McCart, J. A., Atkins, H., Breitbach, C., Kirn, D., Thorne, S., and Bell, J. C. (2010) Enhancement of vaccinia virus based oncolysis with histone deacetylase inhibitors, *PLoS One*, **5**, e14462, doi: 10.1371/journal.pone.0014462.
130. Francis, L., Guo, Z. S., Liu, Z., Ravindranathan, R., Urban, J. A., Sathaiah, M., Magge, D., Kalinski, P., and Bartlett, D. L. (2016) Modulation of chemokines in the tumor microenvironment enhances oncolytic virotherapy for colorectal cancer, *Oncotarget*, **7**, 22174-22185, doi: 10.18632/oncotarget.7907.
131. Kim, M., Nitschké, M., Sennino, B., Murer, P., Schriver, B. J., Bell, A., Subramanian, A., McDonald, C. E., Wang, J., Cha, H., Bourgeois-Daigneault, M. C., Kirn, D. H., Bell, J. C., De Silva, N., Breitbach, C. J., and McDonald, D. M. (2018) Amplification of oncolytic vaccinia virus widespread tumor cell killing by sunitinib through multiple mechanisms, *Cancer Res.*, **78**, 922-937, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3308.
132. Zhang, B., and Cheng, P. (2020) Improving antitumor efficacy via combinatorial regimens of oncolytic virotherapy, *Mol. Cancer*, **19**, 158, doi: 10.1186/s12943-020-01275-6.
133. Mell, L. K., Brumund, K. T., Daniels, G. A., Advani, S. J., Zakeri, K., Wright, M. E., Onyeama, S. J., Weisman, R. A., Sanghvi, P. R., Martin, P. J., and Szalay, A. A. (2017) Phase I trial of intravenous oncolytic vaccinia virus (GL-ONC1) with cisplatin

and radiotherapy in patients with locoregionally advanced head and neck carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 5696-5702, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3232.
134. Ramlau, R., Quoix, E., Rolski, J., Pless, M., Lena, H., Levy, E., Krzakowski, M., Hess, D., Tartour, E., Chenard, M. P., Limacher, J. M., Bizouarne, N., Acres, B., Halluard, C., and Velu, T. (2008) A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-Il2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer, *J. Thorac. Oncol.*, **3**, 735-744, doi: 10.1097/JTO.0b013e31817c6b4f.
135. Song, C. K., Han, H. D., Noh, K. H., Kang, T. H., Park, Y. S., Kim, J. H., Park, E. S., Shin, B. C., and Kim, T. W. (2007) Chemotherapy enhances $CD8^+$ T cell-mediated antitumor immunity induced by vaccination with vaccinia virus, *Mol. Ther.*, **15**, 1558-1563, doi: 10.1038/sj.mt.6300221.
136. Chen, W. Y., Chen, Y. L., Lin, H. W., Chang, C. F., Huang, B. S., Sun, W. Z., and Cheng, W. F. (2021) Stereotactic body radiation combined with oncolytic vaccinia virus induces potent anti-tumor effect by triggering tumor cell necroptosis and DAMPs, *Cancer Lett.*, **523**, 149-161, doi: 10.1016/j.canlet.2021.09.040.
137. Klebanoff, C. A., Khong, H. T., Antony, P. A., Palmer, D. C., and Restifo, N. P. (2005) Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy, *Trends Immunol.*, **26**, 111-117, doi: 10.1016/j.it.2004.12.003.
138. Kim, H. S., Kim-Schulze, S., Kim, D. W., and Kaufman, H. L. (2009) Host lymphodepletion enhances the therapeutic activity of an oncolytic vaccinia virus expressing 4-1BB ligand, *Cancer Res.*, **69**, 8516-8525, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2522.
139. Prieto, P. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hughes, M. S., Kammula, U. S., White, D. E., Levy, C. L., Rosenberg, S. A., and Phan, G. Q. (2012) CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.*, **18**, 2039-2047, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1823.
140. Vaddepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., and Chandra, A. B. (2020) Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence, *Cancers (Basel)*, **12**, 738, doi: 10.3390/cancers12030738.
141. Schaedler, E., Remy-Ziller, C., Hortelano, J., Kehrer, N., Claudepierre, M. C., Gatard, T., Jakobs, C., Préville, X., Carpentier, A. F., and Rittner, K. (2017) Sequential administration of a MVA-based MUC1 cancer vaccine and the TLR9 ligand Litenimod (Li28) improves local immune defense against tumors, *Vaccine*, **35**, 577-585, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.020.
142. Remy-Ziller, C., Thioudellet, C., Hortelano, J., Gantzer, M., Nourtier, V., Claudepierre, M. C., Sansas, B., Préville, X., Bendjama, K., Quemeneur, E., and Rittner, K. (2018) Sequential administration of MVA-based vaccines and PD-1/PD-L1-blocking antibodies confers measurable benefits on tumor growth and survival: preclinical studies with MVA-βGal and MVA-MUC1 (TG4010) in a murine tumor model, *Hum. Vaccin Immunother.*, **14**, 140-145, doi: 10.1080/21645515.2017.1373921.
143. Foy, S. P., Mandl, S. J., dela Cruz, T., Cote, J. J., Gordon, E. J., Trent, E., Delcayre, A., Breitmeyer, J., Franzusoff, A., and Rountree, R. B. (2016) Poxvirus-based active immunotherapy synergizes with CTLA-4 blockade to increase survival in a murine tumor model by improving the magnitude and quality of cytotoxic T cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**, 537-549, doi: 10.1007/s00262-016-1816-7.
144. Mandl, S. J., Rountree, R. B., Dalpozzo, K., Do, L., Lombardo, J. R., Schoonmaker, P. L., Dirmeier, U., Steigerwald, R., Giffon, T., Laus, R., and Delcayre, A. (2012) Immunotherapy with MVA-BN®-HER2 induces HER-2-specific Th1 immunity and alters the intratumoral balance of effector and regulatory T cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, **61**, 19-29, doi: 10.1007/s00262-011-1077-4.

RECOMBINANT STRAINS OF ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

Review

Y. Shakiba[1,2], P. O. Vorobyev[2], M. Mahmoud[2], A. Hamad[2], D. V. Kochetkov[2], G. M. Yusubalieva[2,3,4], V. P. Baklaushev[2,3,4], P. M. Chumakov[2], and A. V. Lipatova[2]*

[1] *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

[2] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: lipatovaanv@gmail.com*

[3] *Federal Research Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical-Biological Agency (FMBA), 115682 Moscow, Russia*

[4] *Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the FMBA of Russia, 117513 Moscow, Russia*

Cancer virotherapy is an alternative therapeutic approach based on the viruses that selectively infect and kill tumor cells. Vaccinia virus (VV) is a member of the *Poxviridae* family of enveloped viruses with a large linear double-stranded DNA genome. The proven safety of VV strains as well as considerable transgene capacity of the viral genome, make VV an excellent platform for creating recombinant oncolytic viruses for cancer therapy. Furthermore, various genetic modifications can increase tumor selectivity and therapeutic efficacy of VV by arming it with the immune-modulatory genes or proapoptotic molecules, boosting the host immune system, and increasing cross-priming recognition of the tumor cells by T-cells or NK cells. In this review, we summarized the data on bioengineering approaches to develop recombinant VV strains for enhanced cancer immunotherapy.

Keywords: oncolytic virus, recombinant virus, immunosuppression, immunomodulation, cytokine, vaccinia virus

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 1035 – 1039

ДИСКУССИЯ

УДК 579.22

ЛИПОКСИГЕНАЗА ГИГАНТСКОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ: ЭВОЛЮЦИОННОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ РАЗМЕРА И СЛОЖНОСТИ?

© 2023 Г.Ф. Куракин

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия; электронная почта: georgykurakin@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2023
После доработки 17.04.2023
Принята к публикации 02.05.2023

Открытие бактерии *Thiomargarita magnifica* – исключительно крупного представителя гигантских серных бактерий – заставляет обратить дополнительное внимание на гигантских серных бактерий и пересмотреть наши недавние результаты биоинформатического исследования, в котором липоксигеназы были обнаружены у представителей рода *Beggiatoa*. Эти близкие родственники бактерии *T. magnifica* отвечают на сходные требования к размеру путём образования многоклеточных структур. Мы предполагаем, что их липоксигеназы – часть системы оксилипиновой сигнализации, обеспечивающей высокий уровень сложности межклеточной коммуникации, который позволяет им достигать больших размеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Beggiatoa*, многоклеточность, липоксигеназа, *Thiomargarita magnifica*.

DOI: 10.31857/S0320972523060118, **EDN:** EFSPAI

ВВЕДЕНИЕ

Оксилипины – это окисленные производные полиненасыщенных жирных кислот. Они участвуют в различных процессах межклеточной сигнализации у многоклеточных эукариот и действуют как:

- медиаторы стресса и повреждения у животных, растений и различных групп водорослей;
- феромон-подобные вещества у грибов, бурых и диатомовых водорослей;
- сигналы, связанные с процессами развития, у грибов и (частично) у растений.

Во всех вышеперечисленных группах в биосинтезе оксилипинов участвуют липоксигеназы (ЛОГ). Ферменты этой группы высоко консервативны и также присутствуют у некоторых групп бактерий, таких как цианобактерии и миксобактерии [1]. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что бактериальные ЛОГ функциональны и синтезируют оксилипины из полиненасыщенных жирных кислот [2–5]. Однако функции этих оксилипинов остаются неясными, за исключением оксилипинов *Pseudomonas aeruginosa* – продуктов ЛОГ, которые могут участвовать в подавлении защитных реакций организма хозяина [6].

Принятые сокращения: ЛОГ – липоксигеназы.

ЛИПОКСИГЕНАЗА ГИГАНТСКОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ

В статье, недавно опубликованной в журнале *Biochemistry (Moscow)* [1], мы представили результаты своего биоинформатического исследования, демонстрирующего эволюционные ассоциации липоксигеназ с многоклеточностью (даже в примитивных формах) и взаимоотношениями «микроорганизм–хозяин» (рис. 1). В настоящей статье дополнительно обсуждаем первую ассоциацию – связь липоксигеназ и многоклеточности.

В домене бактерий липоксигеназы и многоклеточность встречались вместе у цианобактерий и миксобактерий. Эти два таксона – самые известные примеры бактериальной многоклеточности, и именно они сформировали статистическую картину большей распространённости липоксигеназ в многоклеточных таксонах, поэтому они были включены в дальнейшее обсуждение.

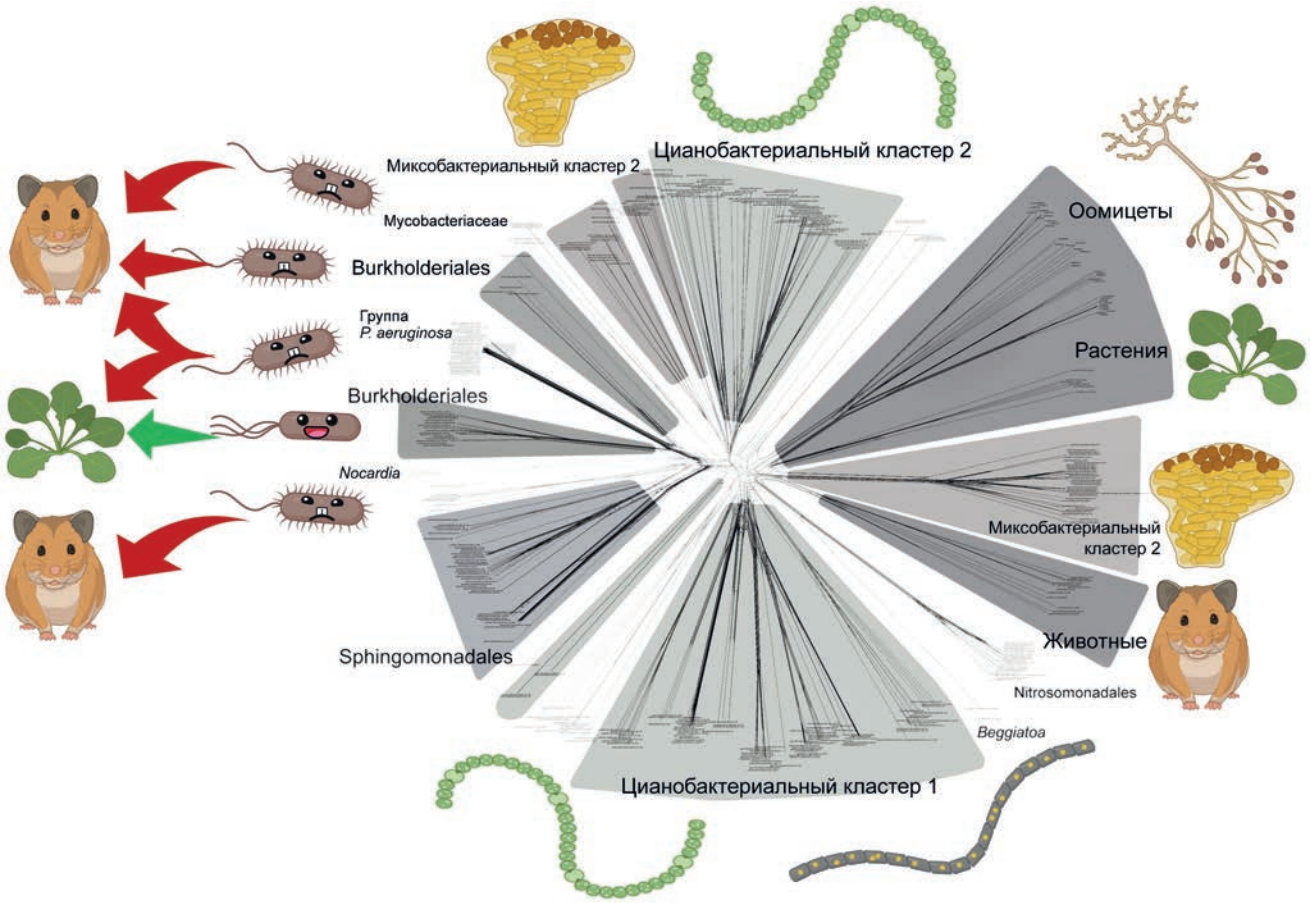

Рис. 1. Филогенетическая сеть бактериальных и эукариотических липоксигеназ (из нашей предыдущей статьи [1]) с отображением экофизиологии соответствующих бактерий. Большинство кластеров липоксигеназ ассоциированы с многоклеточными организмами, и только небольшой сектор представлен липоксигеназами патогенных (красные стрелки) и симбиотических (зелёная стрелка) бактерий. Это позволяет предположить, что липоксигеназы необходимы бактериям либо для того, чтобы самим быть многоклеточными, либо для взаимодействия с многоклеточным хозяином. Источник изображения: статья Kurakin et al., 2020 [1] (с изменениями)

Однако в нашем предыдущем исследовании ЛОГ были обнаружены ещё в одном бактериальном таксоне. Это род *Beggiatoa*, принадлежащий к группе, называемой «большими серными бактериями» или «гигантскими серными бактериями» [7, 8]. Это название отражает их биохимические особенности: они являются хемолитоавтотрофами и получают энергию за счёт окисления сульфида (S^{2-}) до сульфата (SO_4^{2-}) с использованием кислорода или нитрата в качестве окислителя. Название также отражает их необычно большой размер: *Beggiatoa* spp. образуют филаменты длиной от нескольких мкм до 10 см, а диаметр их клеток варьируется приблизительно от 1 до 200 мкм. Длина филаментов *Thioploca* spp. составляет 2–5 см при диаметре 2,5–80 мкм [9].

Представители этих двух родов (так же, как и других родов гигантских серных бактерий) многоклеточные. Их длинные филаменты состоят из нескольких сотен клеток [7], что делает их похожими на нитчатых цианобактерий. Несмотря на это, мы проигнорировали их в ходе нашего предыдущего анализа [1], так как обнаружили ЛОГ только у представителей рода *Beggiatoa*, которые не внесли существенного вклада в статистику распространённости ЛОГ на уровне порядков и в общую картину статистической ассоциации между ЛОГ и многоклеточностью. Однако стоит отметить, что присутствие ЛОГ у *Beggiatoa* было также подтверждено биоинформатическим исследованием Chrisnasari et al. [10].

Недавнее открытие заставляет посмотреть на этот род с другой точки зрения. В июне 2022 г. в журнале *Science* была описана новая гигантская серная бактерия [11]. Эта бактерия, названная *Thiomargarita magnifica*, может достигать до сантиметра в длину и быть видима невооружённым глазом. Это абсолютный рекорд размера в бактериальном мире, который даже был представлен в спецвыпуске «2022 Breakthrough of the Year» («Прорывы 2022 года») [12]. Тот факт, что род *Thiomargarita* – один из самых

близких родственников рода *Beggiatoa* [7], наводит на мысль, что среди видов *Beggiatoa* следует искать любые маркеры повышенной сложности организации, включая липоксигеназы. Это особенно важно, так как до открытия рода *Thiomargarita* бактерии *Beggiatoa* spp. были рекордсменами в плане размера: их клетки могут достигать >100 мкм [8]. Так как один филамент содержит сотни клеток, он может достигать до нескольких сантиметров в длину [7]. Таким образом, род *Beggiatoa* также заставляет пересмотреть наши представления об ограничениях размера прокариот [8].

Эти ограничения обусловлены биоэнергетическими причинами: АТР-синтазы, вырабатывающие энергию для клеток, могут быть расположены только на мембранах, а у большинства бактерий единственной мембраной является цитоплазматическая мембрана. Поэтому максимальный размер клетки ограничен наименьшим отношением площади поверхности к объёму, при котором клетка ещё может получать достаточные количества АТР.

С другой стороны, гигантские серные бактерии обитают на границах раздела сульфида и кислорода (или сульфида и нитрата) и должны иметь достаточную длину, чтобы перекрывать собой пул сульфида и пул окислителя и использовать их вместе в своём метаболизме. Более того, они должны иметь достаточный объём клетки. Большинство гигантских серных бактерий достигает этого путём развития многоклеточных форм, что позволяет им образовывать большие организмы, не превышая предельного размера клетки. *T. magnifica* – интересное исключение, обходящее эти ограничения за счёт увеличения сложности клетки: сложной сети внутренних мембран и напоминающих ядра органелл, называемых пепинами (pepins), где расположены АТР-синтазы [11]. Это позволяет увеличить суммарную поверхность мембран для синтеза АТР без формирования многоклеточного организма.

Другой представитель рода *Thiomargarita* – *Thiomargarita namibiensis* – также обходится без многоклеточности, вместо этого используя свою способность к хранению больших количеств нитрата. Он накапливает нитрат во время пассивной ресуспензии из донного осадка, чтобы дальше использовать его в биохимических процессах во время нахождения в осадке, богатом сульфидом. Эта стратегия получила образное название «стратегия выжидания» [13] или «задержка бактерией дыхания» [14].

Роды *Beggiatoa*, *Thioploca* и *Thiomargarita* близко родственны друг другу в пределах семейства Beggiatoaceae, но при этом они используют разные способы приспособления к условиям границы раздела сред, содержащих окислитель и восстановитель. В то время как *T. magnifica* обходится без многоклеточности, *Thioploca* и *Beggiatoa* образуют многоклеточные филаменты. Однако представители рода *Thioploca* также известны своей более сложной поведенческой адаптацией: они могут активно двигаться между слоем нитрата и богатыми сульфидом осадками, накапливая нитрат для дальнейшего использования в богатой сульфидом среде [9, 15]. *Beggiatoa* spp., наоборот, зависят от одновременной доступности окислителя (кислорода) и сульфида [9, 15]. Таким образом, многоклеточность является для представителей рода *Beggiatoa* почти единственной стратегией, позволяющей пространственно связывать оба необходимых им субстрата.

Мы предполагаем, что для этого может быть необходим более высокий уровень межклеточной коммуникации и интеграции. В свою очередь, согласно нашей гипотезе, это может быть причиной присутствия липоксигеназ у *Beggiatoa*

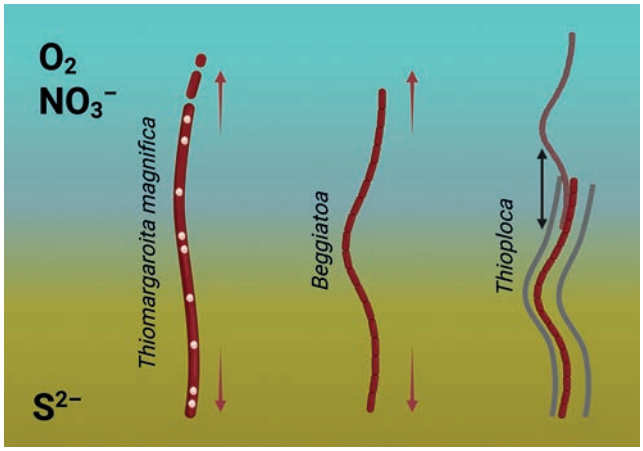

Рис. 2. *Beggiatoa*, *Thioploca* и *Thiomargarita magnifica* – близкие родственники, формирующие исключительно длинные структуры для использования двух пространственно разделённых пулов сульфида (S^{2-}, жёлтый) и кислорода либо нитрата (O_2/NO_3^-, голубой). Это создаёт давление отбора, направленное на увеличение длины (обозначено стрелками). Но они используют разные стратегии для преодоления ограничений на размер. *T. magnifica* увеличивает общую поверхность вырабатывающих АТР мембран путём усложнения единственной клетки, в то время как *Thioploca* и *Beggiatoa* – многоклеточные. Однако в случае *Thioploca* давление отбора частично ослабляется за счёт способности этих бактерий к скользящему движению вверх-вниз относительно слизистого чехла. В отличие от них, *Beggiatia* зависит от контакта с двумя соединениями одновременно и поэтому отвечает на давление отбора в той же степени, как и *T. magnifica*. Мы предполагаем, что это эволюционное требование удовлетворяется за счёт увеличения сложности межклеточной сигнализации, и ЛОГ представителей рода *Beggiatoa* играют фактически ту же роль, что пепины и внутренние мембраны *T. magnifica*

и их отсутствия у *Thioploca*. Данные липоксигеназы могут быть сигнатурой оксилипиновой сигнализации у представителей рода *Beggiatoa*, развившейся в ответ на эволюционное требование большей сложности.

Предложенная гипотеза хорошо согласуется с нашим общим предположением о связи липоксигеназ, оксилипиновой сигнализации и многоклеточности. В настоящее время эта связь установлена или предполагается для животных, растений, грибов, оомицет, диктиостелиевых слизевиков, плазмодиофорид, цианобактерий и миксобактерий. Сейчас мы можем добавить в этот список *Beggiatoa* spp. Валидация этой связи потребует экспериментальных исследований оксилипиновой сигнализации в вышеперечисленных бактериальных таксонах.

Благодарности. Рисунки были созданы с помощью сервиса научной графики *BioRender.com*. Автор также благодарит Лебедеву Алину Алексеевну (ассистента кафедры теории языка, перевода и французской филологии Тверского государственного университета) за литературное редактирование английской версии этой статьи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurakin, G. F., Samoukina, A. M., and Potapova, N. A. (2020) Bacterial and Protozoan lipoxygenases could be involved in cell-to-cell signaling and immune response suppression, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1048-1063, doi: 10.1134/S0006297920090059.
2. Andreou, A. Z., Vanko, M., Bezakova, L., and Feussner, I. (2008) Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms, *Phytochemistry*, **69**, 1832-1837, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.002.
3. Lang, I., Göbel, C., Porzel, A., Heilmann, I., and Feussner, I. (2008) A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120, *Biochem. J.*, **410**, 347-357, doi: 10.1042/BJ20071277.
4. An, J. U., Hong, S. H., and Oh, D. K. (2018) Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1863**, 823-833, doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.014.
5. Vance, R. E., Hong, S., Gronert, K., Serhan, C. N., and Mekalanos, J. J. (2004) The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2135-2139, doi: 10.1073/pnas.0307308101.
6. Morello, E., Pérez-Berezo, T., Boisseau, C., Baranek, T., Guillon, A., Bréa, D., Lanotte, P., Carpena, X., Pietrancosta, N., Hervé, V., Ramphal, R., Cenac, N., and Si-Tahar, M. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase LoxA contributes to lung infection by altering the host immune lipid signaling, *Front. Microbiol.*, **10**, 1826, doi: 10.3389/fmicb.2019.01826.
7. Salman, V., Bailey, J. V. and Teske, A. (2013) Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **104**, 169-186, doi: 10.1007/s10482-013-9952-y.
8. Jørgensen, B. (2010) Big sulfur bacteria, *ISME J.*, **4**, 1083-1084, doi: 10.1038/ismej.2010.106.
9. Teske, A., and Nelson, D. C. (2006) in *The Prokaryotes* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E., eds) Springer, N. Y., pp. 784-810, doi: 10.1007/0-387-30746-X_27.
10. Chrisnasari, R., Hennebelle, M., Vincken, J. P., van Berkel, W. J., and Ewing, T. A. (2022) Bacterial lipoxygenases: biochemical characteristics, molecular structure and potential applications, *Biotechnol. Adv.*, **61**, 108046, doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.108046.
11. Volland, J. M., Gonzalez-Rizzo, S., Gros, O., Tyml, T., Ivanova, N., Schulz, F., Goudeau, D., Elisabeth, N. H., Nath, N., Udwary, D., Malmstrom, R. R., Guidi-Rontani, C., Bolte-Kluge, S., Davies, K. M., Jean, M. R., Mansot, J. L., Mouncey, N. J., Angert, E. R., Woyke, T., and Date, S. V. (2022) A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles, *Science*, **376**, 1453-1458, doi: 10.1126/science.abb3634.
12. Pennisi, E., Stokstad, E., Gibbons, A., Stone, R., Cohen, J., Savitsky, Z., Voosen, P., Hutson, M., and Kaiser, J. (2022) Runners-up, *Science*, **378**, 1162-1167, doi: 10.1126/science.adg2799.
13. Schulz, H. N., and Riechmann, D. (2000) *Thiomargarita namibiensis*: A giant with staying power [in German], *BioSpektrum*, **6**, 116-117.
14. Schulz, H. N. (2002) *Thiomargarita namibiensis*: Giant microbe holding its breath, *ASM News*, **68**, 122-127, doi: 10.1128/AEM.68.11.5746-5749.2002.
15. Kuenen, G. (1999) in *Biology of the Prokaryotes* (Lengeler, J. W., Drews, G., and Schlegel, H. G., eds) Thieme Stuttgart, N. Y., pp. 234-260, doi: 10.1002/9781444313314.ch10.

LIPOXYGENASE IN A GIANT SULFUR BACTERIUM: AN EVOLUTIONARY SOLUTION FOR SIZE AND COMPLEXITY?

G. Kurakin

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

Discovery of *Thiomargarita magnifica* – an exceptionally large giant sulfur bacterium – urges us to pay additional attention to the giant sulfur bacteria and to revisit our recent bioinformatic finding of lipoxygenases in the representatives of the genus *Beggiatoa*. These close relatives of *Thiomargarita magnifica* meet the similar size requirements by forming multicellular structures. We hypothesize that their lipoxygenases are a part of the oxylipin signaling system that provides high level of cell-to-cell signaling complexity which, in turn, enables them to reach large sizes.

Keywords: *Beggiatoa*, multicellularity, lipoxygenase, *Thiomargarita magnifica*

БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 6, с. 1040

НЕКРОЛОГ

ВАСИЛИЙ НИКОЛАЕВИЧ ПОПОВ
(26.08.1974 – 13.04.2023)

DOI: 10.31857/S032097252306012X, **EDN:** EFXKLN

Василий Николаевич Попов был выдающимся учёным и талантливым организатором науки и образования. Его ранняя смерть в возрасте 48 лет стала невосполнимой утратой. Он известен научному сообществу своими работами по биоэнергетике митохондрий у растений и животных, биохимии старения, биохимической генетике рака, нейробиологии.

Василий Николаевич Попов – выпускник Воронежского государственного университета. Его кандидатская (1997 г.) и докторская (2003 г.) диссертации были посвящены изучению окислительных процессов в митохондриях. Им впервые было показано, что активация альтернативной оксидазы в митохондриях растений защищает клетку от образования активных форм кислорода. За проведённые исследования он был удостоен премии Европейской Академии (European Academy of Science) и Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники для молодых учёных. Он стажировался в университетах Бразилии, Голландии и США, а по возвращении в Россию активно сотрудничал с НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. С 2006 года Василий Николаевич являлся президентом Российского союза молодых учёных.

В 2008 году он возглавил кафедру генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского университета, где продолжил изучение митохондриального дыхания. Он организовал на кафедре молекулярно-генетические исследования, которые нашли применение как в биомедицине, так и в агробиотехнологиях. В 2018 году это нашло общественное признание, когда коллективу исследователей кафедры был присвоен статус ведущей научной школы.

В 2018 году Василий Николаевич был избран профессором Российской академии наук, а в 2019 году – возглавил Воронежский государственный университет инженерных технологий, при этом продолжая работать на кафедре генетики, цитологии и биоинженерии. Он был великолепным лектором и педагогом. Под его руководством были защищены более 15 кандидатских и 1 докторская диссертация.

Светлая Вам память,
дорогой Василий Николаевич!

Редакционная коллегия
журнала «Биохимия»