



THE UKRAINIAN BIOCHEMICAL JOURNAL

Volume 88, N 5, September-October, 2016

Kyiv

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj88.05>

CONTENTS

Preface of the Editor-in-Chief	7
On the 90 th anniversary The Ukrainian Biochemical Journal (Historical excursus, 1926–2016)	8
GRIGORIEVA M. V., PETRENKO T. M. The Ukrainian Biochemical Journal: Times and Challenges	12
Review	
MINCHENKO O. H., TSYMBAL D. O., MINCHENKO D. O., RATUSHNA O. O. The role of the TNF receptors and apoptosis inducing ligands in tumor growth	18
Experimental Works	
SHYMANSKYI I. O., LISAKOVSKA O. O., MAZANOVA A. O., LABUDZYNSKYI D. O., KHOMENKO A. V., VELIKY M. M. Prednisolone and vitamin D ₃ modulate oxidative metabolism and cell death pathways in blood and bone marrow mononuclear cells	38
LABYNTSEVA R. D., BEVZA O. V., LYTVYN K. V., BOROVYK M. O., RODIK R. V., KALCHENKO V. I., KOSTERIN S. O. Calix[4]arene C-90 and its analogs activate ATPase of the myometrium myosin subfragment-1	48
SIROMOLOT A. A., OLIINYK O. S., KOLIBO D. V., KOMISARENKO S. V. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> antigens MPT63 and MPT83 increase phagocytic activity of murine peritoneal macrophages	62
PURKAN, IHSANAWATI, NATALIA D., SYAH Y. M., RETNONINGRUM D. S., KUSUMA H. S. Mutation of <i>katG</i> in a clinical isolate of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : effects on catalase-peroxidase for isoniazid activation	71
TARASENKO A. S. Effect of nitric oxide donor SNAP on GABA release from rat brain nerve terminals	82

GUDA B. B., PUSHKAREV V. V., ZHURAVEL O. V., KOVALENKO A. Ye.,
PUSHKAREV V. M., TARASCHENKO Y. M., TRONKO M. D.
Protein kinase Akt activity in human thyroid tumors 90

OLKHOVYCH N. V., GOROVENKO N. G.
Determination of frequencies of alleles, associated with the pseudodeficiency
of lysosomal hydrolases, in population of Ukraine 96

Methods

KULAKSIZOGLU S., KULAKSIZOGLU B., ELLIDAG H. Y., EREN E.,
YILMAZ N., BAYKAL A.
Measurement of methionine level with the LC-ESI-MS/MS method in schizophrenic patients 107

The History of Biochemistry

DANILOVA V. M., VYNOGRADOVA R. P., TORKHOVA S. G.
Inventive activity of the Department of Molecular Immunology of the Palladin Institute
of Biochemistry of NAS of Ukraine 116

News Items

BORYS FEDOROVYCH SUKHOMLYNOV
On his 100th birthday 136

News

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016 137

The Nobel Prize in Chemistry 2016 138

ЗМІСТ

Передне слово головного редактора	7
До 90-річчя The Ukrainian Biochemical Journal (<i>Історичний екскурс, 1926–2016</i>)	8
ГРИГОР'ЄВА М. В., ПЕТРЕНКО Т. М. The Ukrainian Biochemical Journal: часи і виклики	12
Огляди	
МІНЧЕНКО О. Г., ЦИМБАЛ Д. О., МІНЧЕНКО Д. О., РАТУШНА О. О. Роль рецепторів TNF та TNF-залежних лігандів, що індукують апоптоз, за росту пухлин	18
Експериментальні роботи	
ШИМАНСЬКИЙ І. О., ЛІСАКОВСЬКА О. О., МАЗАНОВА А. О., ЛАБУДЗИНСЬКИЙ Д. О., ХОМЕНКО А. В., ВЕЛИКИЙ М. М. Преднізолон і вітамін D ₃ модулюють окисний метаболізм і шляхи клітинної загибелі мононуклеарів крові та кісткового мозку	38
ЛАБИНЦЕВА Р. Д., БЕВЗА О. В., ЛИТВИН К. В., БОРОВИК М. О., РОДІК Р. В., КАЛЬЧЕНКО В. І., КОСТЕРІН С. О. Калікс[4]арен C-90 та його аналоги активують АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія	48
СІРОМОЛОТ А. А., ОЛІЙНИК О. С., КОЛИБО Д. В., КОМІСАРЕНКО С. В. Антигени <i>Mycobacterium tuberculosis</i> МРТ63 та МРТ83 підвищують фагоцитарну активність перитоніальних макрофагів миші	62
PURKAN, IHSANAWATI, NATALIA D., SYAH Y. M., RETNONINGRUM D. S., KUSUMA H. S. Мутація <i>katG</i> у клінічному ізоляті <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : вплив на каталазу-пероксидазу, що активує ізоніазид	71
ТАРАСЕНКО А. С. Вплив донора оксиду азоту SNAP на вивільнення ГАМК із нервових закінчень мозку щурів	82
ГУДА Б. Б., ПУШКАРЬОВ В. В., ЖУРАВЕЛЬ О. В., ПУШКАРЬОВ В. М., КОВАЛЕНКО А. Є., ТАРАЩЕНКО Ю. М., ТРОНЬКО М. Д. Активність протеїнкінази Akt у пухлинах щитоподібної залози людини	90
ОЛЬХОВИЧ Н. В., ГОРОВЕНКО Н. Г. Визначення частоти алелів, пов'язаних із псевдодефіцитом лізосомних гідролаз, серед населення України	96

Методи

KULAKSIZOGLU S., KULAKSIZOGLU B., ELLIDAG H. Y., EREN E., YILMAZ N., BAYKAL A. Визначення рівня метіоніну в плазмі крові пацієнтів із шизофренією методом LC-ESI-MS/MS	107
--	-----

Історія біохімії

ДАНИЛОВА В. М., ВІНОГРАДОВА Р. П., ТОРХОВА С. Г. Винахідницька діяльність відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України	116
--	-----

Хроніка

БОРИС ФЕДОРОВИЧ СУХОМЛИНОВ До 100-річчя від дня народження	136
---	-----

Новини

Нобелівська премія з фізіології та медицини 2016 року	137
Нобелівська премія з хімії 2016 року	138



НАУКОВІ ЗАПИСКИ Українського біохемічного інституту, том I, 1926 р.

ПЕРЕДНЄ СЛОВО

В цьому першому томі „Наукових записок“ видруковано наукові дослідження, переведені в Українському Біохемічному Інституті протягом 1925-26 академічного року. Отже, розпочавши свою діяльність з жовтня 1925 року і офіційно відкритий 9-го листопада 1925 року, Український Біохемічний Інститут в цьому збірнику й робить підсумок своїй науковій роботі за перший рік існування.

Український Біохемічний Інститут постав з колишньої науково-дослідчої кафедри біохемії (я був її керівником) при Харківському Медичному Інституті; вона своєю діяльністю і створила всі потрібні для організації та існування самостійного науково-дослідчого Інституту умови. Зрозуміла річ, що наукова робота Біохемічного Інституту в ідеї провадить далі роботу науково-дослідчої кафедри біохемії; само собою, деякі наукові проблеми (приміром, питання біохемії авітаміноз), над якими працювала кафедра біохемії, були і будуть серед тих проблем, що їх розв'язати ставить собі за ціль Український Біохемічний Інститут.

Біохемія живлення, в широкому розумінні, питання про вплив ендокринних залоз на виміну речовин, біохемія головного мозку — ось ті основні проблеми, що минулого академічного року були предметом наукових дослідів співробітників Інституту. Досліди з усіх трьох циклів питань, закінчених на осінь 1926 року, і склали матеріял для цього збірника. Перші три праці присвячено вивченню того, як впливає характер харчів на процеси синтези та окиснення, на вуглеводанову виміну підчас скорбуту та на діяння інсуліну. Друга праця, опріч того, висвітлює, чи так само впливає на вуглеводанову виміну (беручи до уваги цукор крові) брак у харчах вітамінів С, як і брак вітамінів А, В, С. Далі вміщено чотири праці з біохемії авітаміноз. Дві перші з них присвячено питанню про вплив відсутніх у харчах вітамінів на синтези гіпурової та глюкуронової кислот. Дальшу (шосту) працю переведено, щоби виявити, в якій мірі визначені в попередніх працях Біохемічного Інституту та науково-дослідчої кафедри біохемії порушення виміни речовин за авітамінози залежать од розладів функції борлакової залози. В сьомій праці вивчалось вплив авітамінози (поліневриту) на креатинову виміну в мозку. Дальшу працю присвячено біохемії мозку. Містить вона в собі наслідки досліджень, що висвітлюють вплив функції нервових центрів на їхні хемічні процеси. Далі вміщено дві праці, присвячені тому, щоби виявити, яку саме роль відіграє борлакова залоза в процесах метилювання та в креатиновій виміні. Про креатинову виміну подано в збірнику й останню працю.

Директор Інституту
Проф. А. Палладін

ПЕРЕДНЄ СЛОВО ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Якщо Ви, шановний читачу, тримаєте в руках наш журнал не вперше (і сподіваюсь, не востаннє), то наразі маєте змогу долучитися до відзначення його славного 90-річного ювілею і розділити з нами велику радість із цієї нагоди.

Для мене велика честь скласти переднє слово до ювілейного номера часопису, що його вважають рідним не тільки біохіміки, а й вчені, близькі до нас за своїми науковими інтересами. Тепер він має назву «*The Ukrainian Biochemical Journal*» (скорочено UBJ), і це не просто данина сьогодення найпоширенішій у світі мові науковців, але й свідчення того, що українська фундаментальна наука є органічною складовою світової, якою вона, власне, була завжди.

Ми прагнемо зробити «*The Ukrainian Biochemical Journal*» насправді популярним міжнародним журналом, але будемо відверті: по суті, він і дотепер залишається «Українським біохімічним ...», попри те, що серед авторів є й іноземні вчені. У тому, що UBJ є більш українським, ніж міжнародним, хтось вбачає недолік, інші вважають це перевагою, однак, він дійсно був і залишається єдиним біохімічним і, водночас, одним із кращих вітчизняних часописів для публікації наукових праць із різних галузей наук «про життя». Складно навіть уявити, яка кількість учених опублікувала результати своїх досліджень в UBJ (або у звичному для ветеранів біохімії – УБЖ), та скільки статей стали основою їхніх кандидатських і докторських дисертацій за 90 років!

На ювілеях передусім згадують видатних учених – академіків, членів-кореспондентів, відомих своїми здобутками у відповідних галузях докторів наук. Ми із вдячністю і глибокою шаную згадуємо наших учителів – патріархів вітчизняної біохімії: О. В. Палладіна, М. Ф. Гулого, В. О. Беліцера, Д. Л. Фердмана та інших. Саме вони розвинули українську біохімічну науку, здобули їй честь і славу. Але за ними – сотні, і сотні учених – молодих (і не зовсім) – авторів і співавторів статей, опублікованих в УБЖ за цей час, які хоч і не належать до когорти корифеїв, проте саме вони несли головний тягар експериментальної науки. І саме вони були найчисленнішими творцями журналу на всіх етапах його становлення. Працюючи в наукових лабораторіях, на виробництві, у медицині, в сільському господарстві, тобто там, де потрібні їхні знання та досвід, вони приносять користь науці, суспільству і країні. Не можна принагідно не згадати і наших рецензентів – висококваліфікованих і досвідчених експертів у відповідних галузях наук, які робили і роблять вагомий внесок у підвищення науково-теоретичного і методологічного рівня часопису.

Отже, журнал може пишатися своїми досягненнями. «Ювіляр» з роками виглядає дедалі молодшим (подивіться на обкладинку!) та розумнішим (почитайте опубліковані статті!). Тож привітаємо один одного і тих, хто так чи інакше причетний до ювілею, та загалом усіх, хто присвятив своє життя чи не найцікавішій та найсучаснішій науці у світі – БІОХІМІЇ.

*Академік НАН і НАМН України
С. В. Комісаренко*

ДО 90-РІЧЧЯ THE UKRAINIAN BIOCHEMICAL JOURNAL

Історичний екскурс

Головні редактори журналу



О. В. Палладін
з 1926 до 1973 р.



М. Ф. Гулий
з 1973 до 1981 р.



В. К. Лішко
з 1981 до 1989 р.

Редакційні колегії журналу

Редакційна колегія (1949 р.):

А. В. Палладін (*голов. редактор*),
Д. Л. Фердман (*заст. голов. редактора*),
В. О. Беліцер,
М. Ф. Гулий,
А. І. Силакова

Редакційна колегія (1973 р.):

М. Ф. Гулий (*голов. редактор*),
А. І. Силакова (*заст. голов. редактора*),
О. Є. Шевченко (*відп. секретар*),
Я. В. Белік,
В. О. Беліцер,
В. П. Вендт,
В. А. Григор'єва,
В. П. Короткоручко,
М. Д. Курський,
Р. В. Чаговець.

Редакційна колегія (1981 р.):

В. К. Лішко (*голов. редактор*),
Я. В. Белік (*заст. голов. редактора*),
Ю. Д. Холодова (*відп. секретар редколегії*),
В. О. Беліцер,
К. М. Веремеєнко,
Л. Л. Громашевська,
М. Ф. Гулий,
П. А. Каліман,
В. П. Короткоручко,
С. Й. Кусень,
М. Є. Кучеренко,
Г. Х. Мацука,
Г. В. Троїцький.



С. В. Комісаренко
з 1990 до 1992 р.

Редакційна колегія (1990 р.):

С. В. Комісаренко (*головний редактор*),
Ю. Д. Холодова (*заст. головного редактора*),
С. О. Костерін (*заст. головного редактора*),
Н. В. Островська (*відп. секретар*),
В. А. Березін, А. А. Болдирєв,
М. М. Великий, О. П. Демченко,
Г. В. Донченко, М. І. Калінський,
С. О. Кудінов, М. Д. Луцик,
А. В. Риндич, М. Ф. Стародуб,
Ю. В. Хмелевський, П. П. Чаяло.



Г. В. Донченко
з 1993 до 1998 р.

Редакційна колегія (1998 р.):

Г. В. Донченко (*головний редактор*),
С. О. Костерін (*заст. голов. редактора*),
О. М. Федоров (*заст. голов. редактора*),
А. П. Дем'яненко (*відп. секретар*),
Ю. І. Губський, Н. М. Гула,
П. А. Каліман, М. Д. Курський,
М. Є. Кучеренко, М. К. Малишева,
Д. О. Мельничук, М. Ф. Стародуб,
Ю. В. Хмелевський, Ю. Д. Холодова.



С. В. Комісаренко
з 1998 р. і дотепер

Редакційна колегія (2016 р.):

С. В. Комісаренко (*головний редактор*),
С. О. Костерін (*заст. головного редактора*),
О. С. Микоша (*заст. головного редактора*),
М. В. Григор'єва (*відп. секретар*),
В. Є. Досенко, Ю. І. Губський,
Н. М. Гула, В. К. Кібірев,
В. С. Кравець, С. С. Малюта,
О. П. Матишевська, М. М. Мусієнко,
С. П. Сидоренко, Л. Д. Варбанець,
М. М. Великий, Г. М. Толстанова.

- 1926 р. За редакцією академіка О. В. Палладіна виходить перший примірник журналу під назвою «Наукові записки Українського біохемічного інституту».
- 1934 р. Журнал змінює назву з «Наукові записки Українського біохемічного інституту» на «Український біохемічний журнал» (том 7, № 1).
- 1937 р. Зміна назви журналу на «Біохемічний журнал».
- 1939 р. Зміна назви журналу на «Біохімічний журнал».
- 1940 р. Секретарем редакції призначено О. Я. Рашбу (том 15, № 3).
- 1946 р. Перший післявоєнний випуск журналу. Заступником редактора призначено члена-кор. Д. Л. Фердмана (том 18, № 1).
Зміна назви журналу на «Український біохімічний журнал».
- 1949 р. Як додаток до журналу виходить перший і єдиний авторський покажчик до томів 1–20 УБЖ, 1926–1948 рр. (том 21, № 1).
- 1949 р. До редакційної колегії крім О. В. Палладіна (редактор) і Д. Л. Фердмана (заст. редактора), входять В. О. Беліцер, М. Ф. Гулий, Г. І. Силакова.
- 1951 р. До редакційної колегії входить Р. В. Чаговець (том 23, № 3).
- 1958 р. Починаючи з цього року, журнал виходить регулярно – 6 номерів на рік.
- 1960 р. Створена перша редакційна рада: О. О. Войнар, С. З. Гжицький, П. М. Зубенко, В. П. Короткоручко, К. М. Леутський, А. С. Оканенко, І. В. Савицький, Г. В. Троїцький, А. М. Утевський, Є. Ф. Шамрай (том 32, № 6).
- 1965 р. Вперше запроваджено нову посаду «відповідальний секретар», яку обіймає В. І. Силка (том 37, № 3).
- 1966 р. Редактором журналу працює І. М. Дзюба (до 1967 р., том 39, № 1–4).
- 1968 р. Відповідальним секретарем стає Т. І. Матяшевська (том 40, № 4).
- 1969 р. Відповідальним секретарем стає О. Є. Шевченко (том 41, № 6).
- 1973 р. Головним редактором стає М. Ф. Гулий (том 45, № 2).
- 1974 р. До редколегії входить О. С. Циперович (том 46, № 1).
- 1978 р. До редколегії входить В. К. Лішко (том 50, № 1).
Зміна назви журналу на «Украинский биохимический журнал». З цього року журнал індексується в SCOPUS.
- 1980 р. Призначається нова посада «науковий редактор». Науковими редакторами, починаючи з цього часу, стають: С. О. Кудінов, Я. В. Белік, Ю. Д. Холодова, М. Д. Курський, А. Г. Халмурадов, О. М. Федоров, С. О. Костерін, О. С. Микоша.
- 1981 р. Головним редактором стає В. К. Лішко (том 53, № 4).

- 1982 р. Відповідальним секретарем стає М. В. Кришень (том 54, № 4).
- 1986 р. УБЖ перевидається англійською мовою видавництвом «Allerton Press», Нью-Йорк (до 1991 р.).
- 1988 р. Відповідальним секретарем стає О. Є. Шевченко (том 60, № 1).
- 1990 р. Відповідальним секретарем стає Н. В. Островська (том 62, № 3).
- 1990 р. Головним редактором стає С. В. Комісаренко.
- 1992 р. Зміна назви журналу на «Український біохімічний журнал».
- 1993 р. Головним редактором стає Г. В. Донченко.
- 1996 р. Відповідальним секретарем стає А. П. Дем'яненко (том 68, № 4).
- 1998 р. і дотепер Головним редактором стає С. В. Комісаренко (том 70, № 5).
- 2012 р. і дотепер Відповідальним секретарем стає М. В. Григор'єва (том 84, № 1).
- 2014 р. Починаючи з цього року, журнал виходить під назвою «The Ukrainian Biochemical Journal».
- 2015 р. Створено окремий сайт журналу <http://ukrbiochemjournal.org>



Колектив редакції The Ukrainian Biochemical Journal: О. М. Кіпер, А. П. Дем'яненко, М. В. Григор'єва, С. Г. Торхова (перший ряд, зліва направо); С. О. Костерін, Т. М. Петренко, С. В. Комісаренко, О. С. Микоша (другий ряд, зліва направо)

THE UKRAINIAN BIOCHEMICAL JOURNAL: ЧАСИ І ВИКЛИКИ

У цьому році *The Ukrainian Biochemical Journal* (*Ukr. Biochem. J.*, або *UBJ*) виповнюється 90 років. Вік поважний, але для журналів він не є причиною навіть для короткого перепочинку: або йдеш у ногу з часом (а ще краще – випереджаєш час), або зникаєш з поля зору наукової спільноти.

Заснований у 1926 році видатним ученим Олександром Палладіним як «Наукові записки Українського біохемічного інституту/*Berichte des Ukrainischen Biochemischen Institutes*», журнал неодноразово змінював назву, формат, вигляд, стиль – світ навколо постійно змінюється, наука і технології стрімко розвиваються, і кожна зміна приносить нові виклики, які вимагають відповіді.

Упродовж 90 років свого існування журнал був свідком та учасником динамічного розвитку біохімічної науки: дослідження біохімії нервової та м'язової тканин, окислювальних процесів, вітамінів, гормонів, ензимів, протеїнів, нуклеїнових кислот, а з часом – дослідження структурно-функціональних властивостей біологічних макромолекул та надмолекулярних комплексів, вивчення механізмів ензиматичного каталізу, з'ясування іонних, молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. У журналі також мали місце найактуальніші питання із суміжних наук: клітинної та молекулярної біології, біофізики, біоорганічної хімії, фармакології, біотехнології. Результати своїх наукових досліджень друкували на сторінках «Українського біохімічного журналу» такі видатні вчені, як академік АН СРСР, АН УРСР та шістьох європейських академій О. В. Палладін, академіки АН УРСР В. О. Беліцер, М. Ф. Гулий, Р. В. Чаговець, член-кореспондент АН СРСР і АН УРСР Д. Л. Фердман, а також їхні учні й послідовники – академіки НАН України С. В. Комісаренко, С. О. Костерін, В. К. Лішко, Г. Х. Мацука, Г. В. Єльська, Д. О. Мельничук, члени-кореспонденти НАН України Н. М. Гула, Г. В. Донченко, Е. В. Луговської, М. В. Скок.

Глобалізація та досягнення інформаційних технологій останніх десятиліть поставили перед журналом нові вимоги. З 1978 р. УБЖ індексується в найбільшій у світі реферативній базі даних Scopus. Журнал також реферується або індексується в базах PubMed/Medline, Chemical Abstracts Service (CAS), CrossRef, Index Medicus, Current Contents, Science Citation Index, Journal Citation Reports та інших. З 2010 р. УБЖ надає свої електронні версії для розміщення на сайті Національної бібліотеки України імені В. І. Вернадського, а з 2011 р. – на порталах EBSCO компанії Elsevier. У 2016 р. подано заяву про включення *UBJ* до пошукової платформи Web of Science компанії Thomson Reuters.

Обмін ідеями, науковими результатами, фактами вимагає ширшого використання англійської мови і відповідних зусиль для підвищення рейтингу наукового журналу. У 2013 р. назва «Українського біохімічного журналу» зареєстрована англійською мовою – «The Ukrainian Biochemical Journal». Як наслідок було змінено його індекс ISSN, а в 2015 р. журнал отримав також індекс ISSN для своєї онлайн-версії.

Зміни в інформаційних технологіях спонукають впроваджувати передові технології і в наукову комунікацію. обов'язковим елементом наукового періодичного видання сьогодні є його присутність онлайн, причому не просто присутність, а наявність сучасного сайту, добре «видимого» пошуковими системами, зрозумілого для міжнародної спільноти, зручного для користувачів, із правилами для авторів, змістом номерів, реферативною інформацією, повними текстами статей та списком літератури, оформленим відповідно до

міжнародних стандартів, архівом, пошуком і багатьма іншими функціями. Саме такий новий сайт – українською, англійською та російською мовами – створено для *UBJ* навесні 2015 р. (<http://ua.ukrbiochemjournal.org/>). Крім того, наявність такого окремого сайту *UBJ* дозволила зробити наступний крок – зареєструватися в агентстві CrossRef для отримання цифрового ідентифікатора DOI (Digital Object Identifier). Тепер кожний номер журналу, кожна опублікована в ньому стаття має DOI – шлях до документа в Інтернеті.

Редакція журналу постійно вдосконалює роботу з авторами, спрямовуючи зусилля на підвищення якості викладу поданих матеріалів. У 2011 р. було запроваджено подвійне анонімне рецензування. З 2013 р. відбувається поступовий перехід на міжнародні стандарти, а саме: випуски *UBJ* і статті отримують DOI; анотації до статей стали структурованими, список літератури перекладається англійською мовою згідно з міжнародними стандартами (без цього посилання не можуть бути опрацьовані та включені до жодних рейтингових оцінок); до складу редакційної колегії увійшли іноземні науковці; редакція не приймає статей, автори яких не дотримуються Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Дотримання цих міжнародних стандартів дозволяє точніше ідентифікувати авторів, створювати їхні профілі та запобігати втраті статей у системі аналізу організацій та авторів.

Натомість, важливим напрямом подальшої роботи з підвищення престижності *UBJ*, мабуть, має стати розширення географічного й інституційного кола авторів журналу. Відома рекомендація: «уникати журналів, що мають більшість статей з 1–5 країн або 5–10 організацій» (<http://wokinfo.com/>). Наразі ситуація з *UBJ* є саме такою (рис. 1): з 250 наукових статей, надрукованих у 2013–2015 рр., більше половини (136) надійшли з п'яти установ, і майже всі – з українських інститутів.

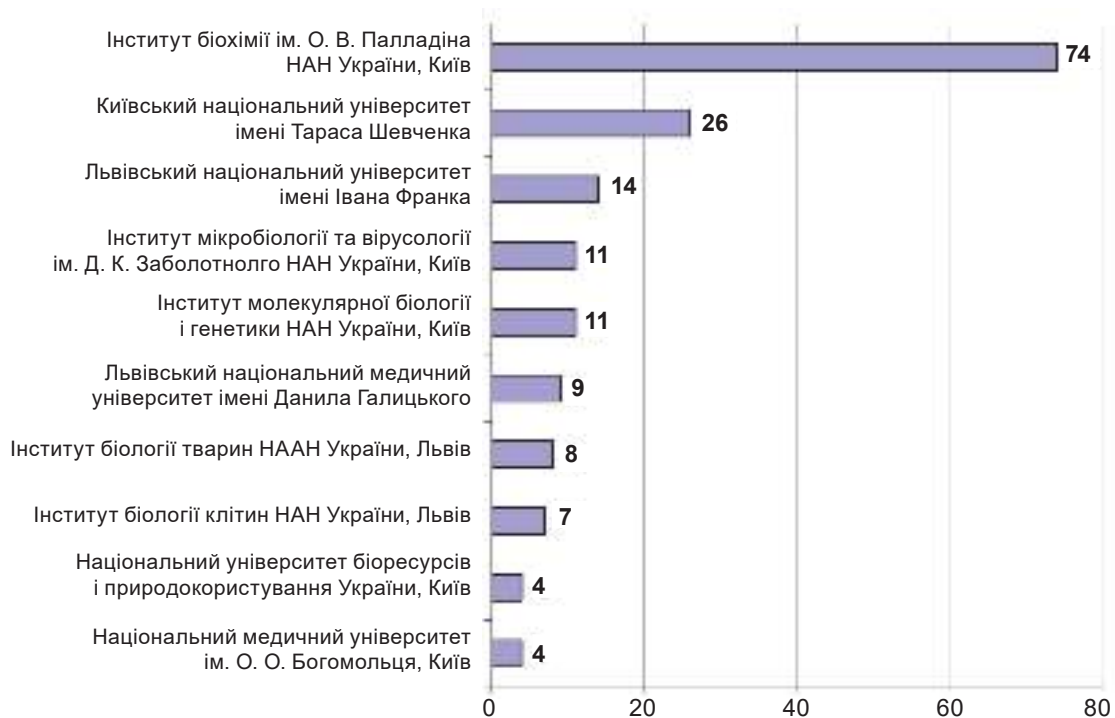


Рис. 1. Топ-10 установ за кількістю наукових статей, опублікованих в *UBJ* у 2013–2015 рр.

Вищезгадані нововведення принесли позитивні результати. У 2016 р. до журналу стали надходити роботи з країн, що не перебували у складі СРСР, і виконані не у співпраці з українськими науковцями – з Туреччини, Індії, Індонезії, Іраку. Таким чином, аудиторія та коло авторів журналу поступово змінюється з регіональної на міжнародну.

Зі зміною назви журнал взяв курс на повний перехід змісту на англійську мову. Так, у 2002–2006 рр. англійською було опубліковано 5,8% наукових статей, у 2014 р. (після перейменування журналу) – 15%, і в 2015 р. – більше половини (рис. 2). Починаючи з 2016 р., наукові статті в *UBJ* публікуються виключно англійською мовою. На цьому етапі важливим чинником стає поєднання зусиль авторів, рецензентів, редакторів і перекладачів. Зрозуміло, що рейтинг журналу залежить, насамперед, від актуальності та наукової якості опублікованих в ньому робіт. Утім, мова та логічна послідовність викладу, належне оформлення одержаних наукових результатів, професійний переклад роблять статтю «читабельною», істотно впливають на її цитування і відповідно на імпаکت-фактор журналу.

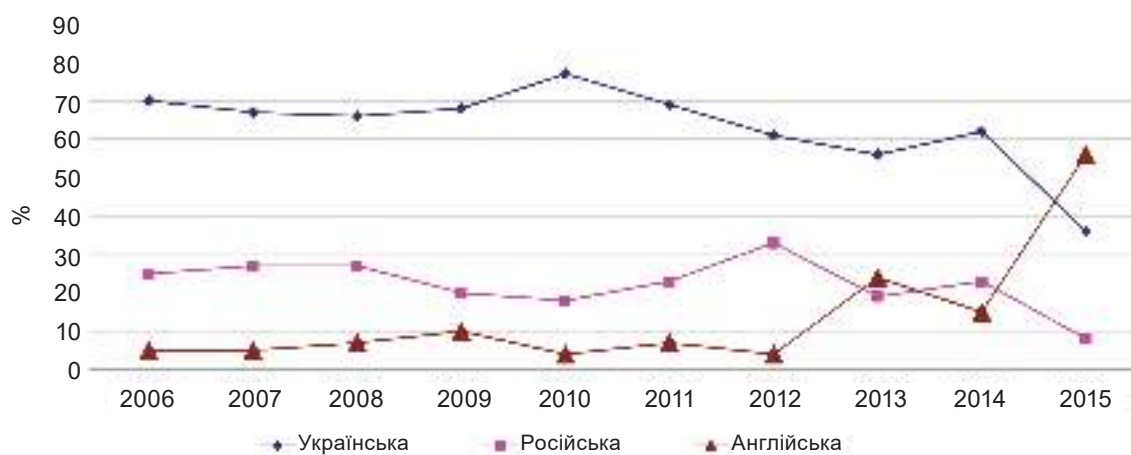


Рис. 2. Структура журналу за мовою опублікованих робіт, 2006–2015 рр. Примітка: У 2013 р. в одному з номерів «Українського біохімічного журналу» було опубліковано матеріали міжнародної конференції з біохімії «*Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine*», що пояснює відносно великий відсоток публікацій англійською мовою в тому році

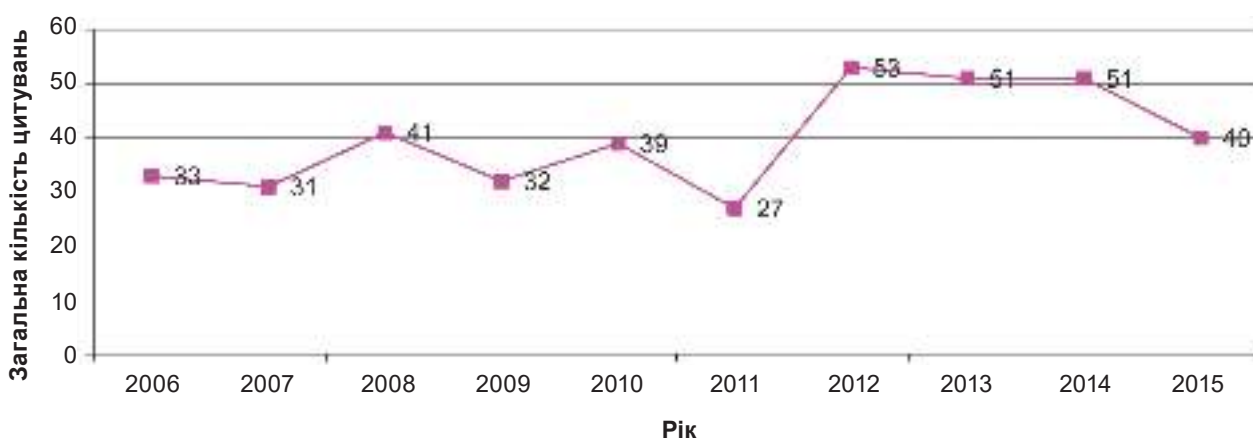


Рис. 3. Загальна кількість цитувань, отриманих за статтями, опублікованими в *UBJ*, за три попередні роки. (Джерело: <http://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100395051&tip=sid&clean=0>)

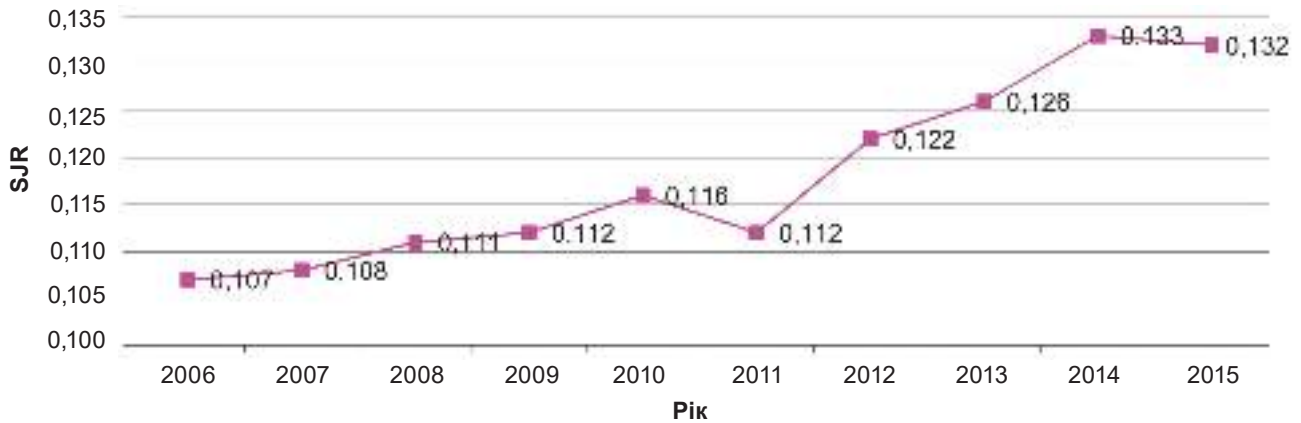


Рис. 4. Показник престижності UBJ – індикатор SCImago Journal Rank (SJR).
(Джерело: <http://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100395051&tip=sid&clean=0>)

Крім того, за даними Scimago Journal & Country Rank з 2013 р. зростає кількість цитувань статей, опублікованих в UBJ (рис. 3).

Відповідно зростає й показник престижності журналу – SJR (рис. 4). Як відомо, SJR враховує впливовість посилань, тобто посилання з престижного журналу зараховується з більшою вагою, ніж посилання з менш престижного. Таким чином, цей показник є незалежним від області знань і враховує лише рівень журналів, де було зареєстровано цитування.

Позитивну динаміку демонструє й статистика відвідувань сайту UBJ (рис. 5). За рік після створення у травні 2016 р. місячна кількість візитів сягнула 6472 при 3990 «унікальних

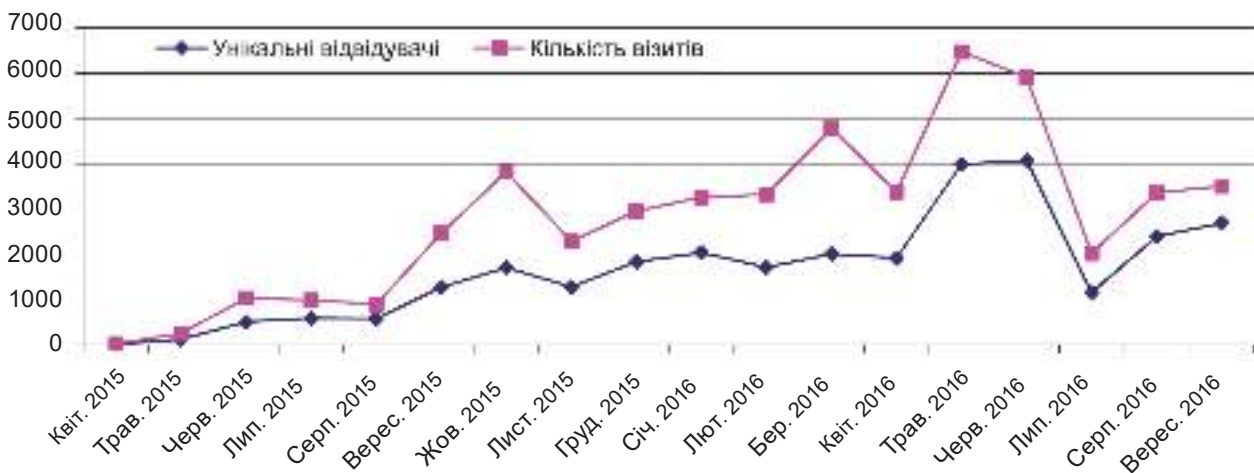


Рис. 5. Помісячні показники відвідування нового сайту UBJ з часу створення до вересня 2016 р. включно.
Примітка: «Унікальні відвідувачі» – кількість хостів (IP-адрес), які відвідали сайт (хто переглянув принаймні одну сторінку). Ця цифра віддзеркалює кількість різних відвідувачів, які зайшли на сайт протягом одного дня. «Кількість візитів» – новим відвідувачем вважається такий, якого не було на сайті понад 60 хвилин

відвідувачах». Після зрозумілого падіння відвідувань у літні місяці відпусток кількість візитів і відвідувачів знову почала зростати.

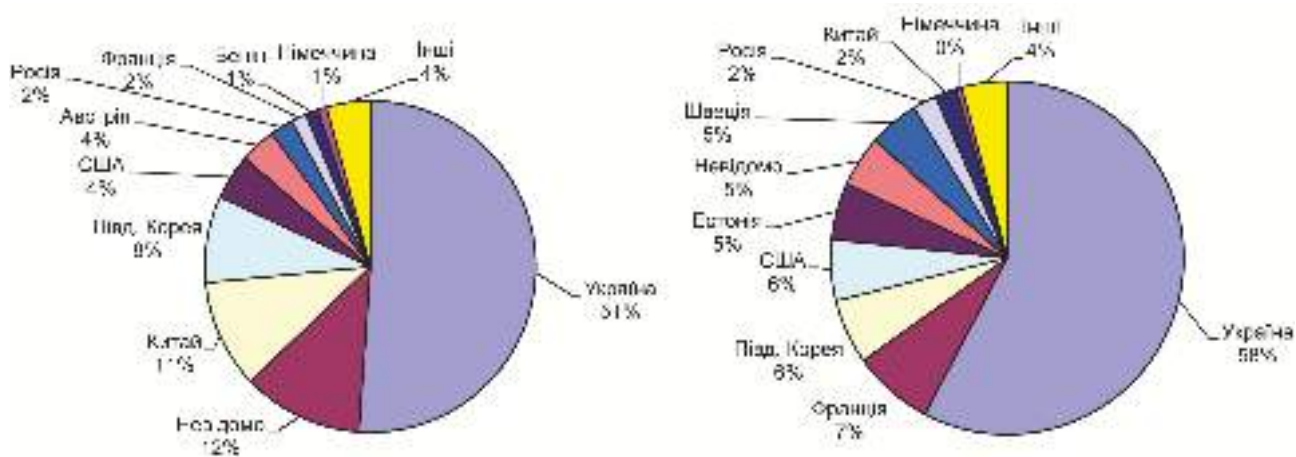


Рис. 6. Відсоток переглянутих сторінок на сайті UBJ за IP-адресами відвідувачів у 2015 і 2016 роках

Майже половина сторінок на сайті журналу переглянута відвідувачами із закордонними IP-адресами (рис. 6):

За період з 2011 до 2015 р. у журналі надруковано 420 статей загальним обсягом 438,4 авторських аркушів, з них оглядів – 52, експериментальних робіт – 335 і статей з історії біохімії – 29. Нижче наведено деякі інші статистичні дані, що характеризують роботу журналу в останні

Таблиця. Роботи, надруковані в UBJ у 2011–2015 рр.

	2011	2012	2013	2014	2015
Загальна кількість статей	72	77	87	96	83
Обсяг, авт. аркушів	71,8	84,9	108,6	89,3	83,8
Огляди	7	7	15	12	11
Експериментальні роботи	59	64	67	78	67
Статті з історії біохімії	6	6	5	6	6

Примітка: У 2013 р. в одному з номерів «Українського біохімічного журналу» було опубліковано матеріали міжнародної конференції з біохімії «Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine», що пояснює відносно великий обсяг журналу та кількість опублікованих статей в тому році.



Рис. 7. Структура журналу за типом опублікованих робіт, 2006–2015 рр.



Рис. 8. Подані, прийняті та відхилені роботи, 2011–2015 рр.

роки: структура журналу і кількість статей за типом опублікованих робіт (таблиця і рис. 7), кількість поданих та опублікованих і процент відхилених робіт (рис. 8).

Журнал розвивається завдяки зусиллям усіх наших авторів, рецензентів, членів редакційної колегії та редакційної ради, редакторів і співробітників редакції. Цей ювілей є чудовим приводом висловити подяку всім, хто вніс і вносить свої знання, час і сили в розвиток журналу.

М. В. ГРИГОР'ЄВА, Т. М. ПЕТРЕНКО

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: mvgrigorieva@biochem.kiev.ua

REVIEW

UDC 577.112:616

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj88.05.018>THE ROLE OF THE TNF RECEPTORS AND APOPTOSIS
INDUCING LIGANDS IN TUMOR GROWTHO. H. MINCHENKO¹, D. O. TSYMBAL¹, D. O. MINCHENKO^{1,2}, O. O. RATUSHNA¹¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ominchenko@yahoo.com;*²*Bohomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine*

Tumor necrosis factor (TNF) superfamily receptors and TNF apoptosis inducing ligands play an important role in the realization of TNF function and control tumor growth. The TNF-related pathways are controlled by endoplasmic reticulum stress signaling, which has a crucial role in the control of cell proliferation and tumor growth. Furthermore, the inhibition of IRE1 (inositol requiring enzyme-1), which is a central mediator of endoplasmic reticulum stress and mainly responsible for cell proliferation and apoptosis, leads to suppression of tumor growth through specific changes in the expression of genes encoding transcription factors, tumor suppressors, angiogenesis and apoptosis related proteins, including TNF superfamily receptors and TNF apoptosis inducing ligands. Therefore, changes in the expression level of TNF-related genes encoding TNF superfamily receptors and apoptosis inducing ligands possibly reflect metabolic reprogramming of cancer cells upon inhibition of IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress signaling and correlate with suppression of glioma cell proliferation.

Key words: TNF superfamily receptors, TRAIL, decoy receptors, IRE1 inhibition, glioma cells.

Tumor necrosis factor alpha (TNFA) is a multifunctional pro-inflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. TNF is a highly pleiotropic cytokine with multiple activities other than its originally discovered role of tumor necrosis in rodents. TNF is now understood to play a contextual role in driving either tumor elimination or promotion [1, 2]. It is now clear that TNF has many different functions in cancer biology. In addition to causing the death of cancer cells, TNF can activate cancer cell survival and proliferation pathways, trigger inflammatory cell infiltration of tumors and promote angiogenesis and tumor cell migration and invasion. These effects can be explained by the diverse cellular responses that TNF can initiate through distinct signal transduction pathways, opening the way for more selective targeting of TNF signalling in cancer therapy [3, 4]. This cytokine is involved in the regulation of a wide spectrum of biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism, and coagulation. It has been implicated in a variety of diseases, including autoimmune diseases,

insulin resistance, and cancer [2, 5]. TNFA is mainly secreted by macrophages and can induce cell death of certain tumor cell lines. Knockout studies in mice also suggested the neuroprotective function of this cytokine.

The tumor necrosis factor superfamily (TNFSF) contains about thirty structurally related receptors and about twenty protein ligands that bind to one or more of these receptors. TNFA can bind to, and thus functions through its receptors (members of tumor necrosis factor receptor superfamily: TNFRSF) TNFRSF1A/TNFR1 and TNFRSF1B/TNFR2 as well as through Fas-related death receptors have been discovered and include death receptors (DR3, DR4, DR5, and DR6), also known as TNFRSF25, TNFRSF10A, TNFRSF10B, and TNFRSF21, correspondingly [3, 6-9].

Death receptors have an extracellular region containing varying numbers of cysteine-rich domains and an intracellular region that contains the death domain. The death receptors are activated in a ligand-dependent or independent manner and transduce apoptotic signals via their respective intracel-

lular death domains. In addition to death receptors, several decoy molecules have also been identified and include decoy receptor 1 (DcR1), DcR2, DcR3, and DcR4, also known as TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4/TRUNDD, and TNFRSF11B or osteoprotegerin (OPG), correspondingly [10, 11]. The inhibitory decoy receptors (DcR1 and DcR2) co-expressed with death receptor 4 and 5 on the same cell can block the transmission of the apoptotic signal.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or Apo2 ligand (Apo2L) is a member of the TNF superfamily of cytokines that induces the process of cell death (apoptosis) upon binding to its death domain-containing transmembrane receptors, death receptors 4 and 5 [12,13]. TRAIL is a cytokine that is produced and secreted by most normal tissue cells. Importantly, TRAIL preferentially induces apoptosis in cancer cells while exhibiting little or no toxicity in normal cells. To date, research has focused on the mechanism of apoptosis induced by TRAIL and the processes involved in the development of TRAIL resistance. TRAIL-resistant tumors can be re-sensitized to TRAIL by a combination of TRAIL with chemotherapeutics or irradiation. Studies suggest that in many cancer cells only one of the two death-inducing TRAIL receptors is functional [14]. Schematic representation the role of TNFA superfamily receptors and TNF apoptosis inducing ligands (TRADD and TRAIL) in the regulation of apoptosis, cell survival and proliferation is shown in Fig. 1.

The extrinsic apoptosis pathway is activated when certain members of the tumor necrosis factor receptor superfamily are oligomerized by their cognate ligands that are members of the TNF superfamily. The apoptosis-inducing capacity of a member of the TNFRSF relies on the presence of a death domain in the intracellular portion of the receptor protein. Such receptors are also referred to as death receptors. Binding of a TNFSF ligand to a TNFRSF receptor that is expressed on the surface of a cell results in the formation of a receptor proximal protein complex. This protein complex is the platform for further signaling events within the cell [15]. In case of death receptors like TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TNFRSF10A/DR4/TRAILR1), TNFRSF10B (DR5/TRAILR2/KILLER), CD95 (Fas), or TNF receptor 1 (TNFR1), this complex is termed death-inducing signaling complex (DISC). The compositions of the various DISCs have

been intensively studied in the last decade. For the CD95 and the TNFRSF10A/TNFRSF10B DISCs, it is now clear that the adaptor protein Fas-associated death domain protein (FADD) forms part of these complexes and is necessary for recruitment of the proapoptotic signaling molecules caspase-8 and caspase-10 [15]. Recruitment of these proteases allows for their activation at the DISC and subsequent induction of apoptosis. The caspase-8 homologous cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) can also be recruited to the DISC, which acts as an anti-apoptotic regulator by interfering with activation of caspases 8 and 10 at the DISC. Interestingly, treatment of TRAIL-resistant tumor cells with proteasome inhibitors renders these cells sensitive for TRAIL-induced apoptosis [15].

Tumor necrosis factor receptors

Several tumor necrosis factor receptors (TNFRSF1A/TNFR1 and TNFRSF1B/TNFR2) and Fas-related death receptors (TNFRSF) have been discovered and include DR3/TNFRSF25, DR4/TNFRSF10A, DR5/TNFRSF10B, and DR6/TNFRSF21 [8,14,16]. These receptors contain an extracellular region containing varying numbers of cysteine-rich domains and an intracellular region that contains the death domain. The death receptors are activated in a ligand-dependent or independent manner and transduce apoptotic signals via their respective intracellular death domains. Recent evidence suggests that tumor suppressor protein p53 up-regulates the expression of death receptors Fas and DR5, and thus, may mediate apoptosis in part via Fas and/or DR5.

The DR3, also known as TNFRSF25 and LARD (lymphocyte-associated receptor of death), is a lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing [17]. Recently, it was shown that bee venom inhibits cervical tumor growth through enhancement of death receptor expressions and inactivation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in mice [18]. Similar inhibitory effects of bee venom on cancer growth in primary human cervical cancer cells were also found. This inhibition of cancer cell growth was mediated by the induction of apoptotic cell death in a dose dependent manner [18]. Agreed with cancer cell growth inhibition, the expression of FAS, DR3 and DR6 as well as death receptor downstream pro-apoptotic proteins including caspase-3 and BAX were concomitantly increased, but the NF- κ B activity and the expres-

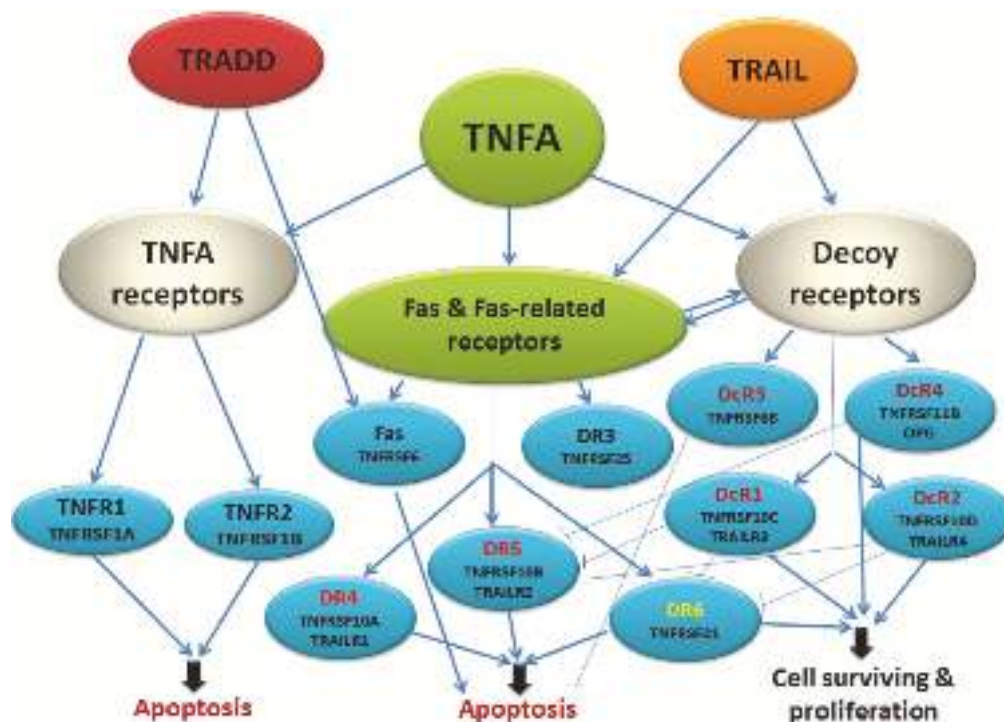


Fig. 1. Schematic representation of the role of tumor necrosis factor alpha (TNFA) superfamily receptors (TNFRSF) and TNF apoptosis inducing ligands (TRADD and TRAIL) in the regulation of apoptosis, cell survival and proliferation

sion of BCL-2 were inhibited by treatment with bee venom in tumor mice, human cancer cells and human tumor samples as well as cultured cancer cells. In addition, deletion of FAS, DR3 and DR6 by small interfering RNA significantly reversed bee venom-induced cell growth inhibitory effects as well as NF- κ B inactivation [18].

The DR4/TNFRSF10A and DR5/TNFRSF10B, also known as TRAIL-receptors 1 and 2, have pro-apoptotic properties, and pro-apoptotic receptor agonists targeting these death receptors hold promise for cancer therapy based on their selective ability to kill malignant versus healthy cells [19]. It was shown that TRAIL induces tumor-selective cell death by engaging the pro-apoptotic death receptors DR4 and DR5 in a wide variety of tumor cells while sparing vital normal cells [20, 21]. The antitumor potential of the TRAIL pathway has been targeted by several therapeutic approaches including recombinant TRAIL and TRAIL-receptor agonist antibodies among others. Interest in sensitizing tumor cells to TRAIL-mediated apoptosis has driven investigations of TRAIL-receptor gene regulation, though regulation of the *TRAIL* gene has been less studied. Furthermore, TRAIL serves as a pro-apoptotic ef-

factor molecule in the immune surveillance of cancer that is conditionally expressed by immune cells upon stimulation via an interferon-response element that was identified in early studies of the *TRAIL* gene promoter. The regulation of *TRAIL* gene expression involves several modalities of gene regulation including transcription factors, epigenetics, single-nucleotide polymorphisms and functionally distinct isoforms [20]. There is data that toll-like receptor 3 (TLR3) induces cell death via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivation of p63 isoform alpha (TAP63alpha), which is a crucial regulator downstream of TLR3 [22].

The activation of cell-surface death receptors represents an attractive therapeutic strategy to promote apoptosis of tumor cells. For this aim several recombinant human Apo2L/TRAIL and monoclonal agonist antibodies directed against death receptors-4 or -5 have been investigated [23]. Recently, it was shown that agonistic TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-specific human monoclonal antibodies (TR1-IgMs) are attractive antitumor therapeutics [24]. These antibodies dramatically inhibited tumor growth in a xenograft model through the caspase activation cascade and in human tumor

cell lines bound to TRAILR1, activated the caspase signal, and induced strong apoptosis (100-fold higher compared with the IgG form which did not demonstrate ideal apoptosis-inducing capacity in the absence of additional antibodies) [24]. It is interesting to note that cancer cells acquire TRAIL-resistance and thus avoid TRAIL-induced apoptosis and that PTBP1/HNRNP1 (Polypyrimidine Tract Binding Protein 1/Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide 1), a splicer protein that is associated with pre-mRNAs in the nucleus and appears to influence pre-mRNA processing and other aspects of mRNA metabolism and transport and plays an important role in energy metabolism, is highly expressed in TRAIL-resistant human colon cancer DLD-1 [25]. Moreover, silencing PTBP1 by using siRNA for PTBP1 (siR-PTBP1) resulted in a significant increase in TRAIL-sensitivity along with the switching of pyruvate kinase muscle (PKM) isoforms from PKM2 to PKM1, leading to impaired Warburg effect, because the intracellular ATP levels were significantly increased and the production of lactate decreased. Notably, siR-PTBP1 canceled the resistance by increasing the expression level of TNFRSF10B/DR5 and effectively inducing the translocation of DR5 to the cell surface membrane. Also, siR-PTBP1 up-regulated the expression level of cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61; CCN1), which contributed to the enhanced sensitivity to TRAIL-induced apoptosis [25].

Nogueira et al. [26] have shown that TNFRSF10B/DR5 interacts with the core microprocessor components Drosha and DGCR8, thus impairing processing of primary let-7 miRNA in pancreatic cancer cells and opened new horizons of miRNA regulation. It has been shown that Xenografting TNFRSF10B silenced pancreatic cancer cells in SCID-mice indicated that there was notable suppression of tumor growth [26]. Recently, it was shown that the TRAIL pathway is selectively activated by small molecule ONC201/TIC10 in tumor cells [27]. The anti-tumor activity of ONC201 has been demonstrated in several preclinical models of cancer, including refractory solid tumors, a transgenic lymphoma mouse model and pediatric non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines. ONC201 caused a dose-dependent reduction in the cell viability of NHL cell lines that resulted from induction of apoptosis [27]. An induction of TRAIL and its receptor TRAILR2/DR5 was also observed in these cell lines. Furthermore, dual induction of TRAIL and TNFRSF10B/

DR5 appeared to drive the observed apoptosis in these lymphoma cells.

Recently, Li et al. [28] have shown that TNFRSF10B/DR5 participate in the apoptosis of Hep G2 cancer cells, which are significantly enhanced by the combination of cisplatin with chrysin, a natural flavonoid widely found in various plants and foods and demonstrated effective anti-cancer activity. Cisplatin in combination with chrysin increased the phosphorylation and accumulation of p53 through activating ERK1/2 in Hep G2 cells, which led to the overexpression of the pro-apoptotic proteins TNFRSF10B/DR5 and Bax and the inhibition of the anti-apoptotic protein Bcl-2 [28]. In addition, combination of cisplatin and chrysin promoted both extrinsic apoptosis by activating caspase-8 and intrinsic apoptosis by increasing the release of cytochrome c and activating caspase-9 in Hep G2 cells and other human cancer cells that are resistant to cisplatin [28]. It was also shown that (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal (a MRP) induces apoptosis in human non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells by p38 MAPK-mediated suppression of NF- κ B and activation of TNFRSF10B/DR5, TNFRSF25/DR3, and TNFRSF21/DR6, which then activates the caspase-3 and caspase-9 pathways [29]. Inhibitory effect of (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal on the growth of NSCLC cells due to induction of apoptosis was concentration- and time-dependent. Concomitantly, it significantly increased the expression of apoptotic proteins such as cleaved Bax and p53, but down-regulated the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2, the inhibitor of apoptosis protein-1 and -2. Of the death receptors activated, only TNFRSF10B knock down with siRNA reversed the effect of (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal. Moreover, only pretreatment with a p38 MAPK inhibitor reversed (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal-induced cell growth inhibition, increase in cleaved caspase-3, -9 and TNFRSF10B expression, and NF- κ B inactivation [29].

To achieve optimal clustering of TNFRSF10B/DR5, a novel multivalent nanobody approach was taken with the goal of generating a significantly more potent DR5 agonist [30]. Thus, trivalent DR5 targeting nanobodies mimic the activity of natural ligand, and furthermore, increasing the valency of domains to tetramer and pentamer, markedly increased potency of cell killing on tumor cells, with pentamers being more potent than tetramers *in vitro*. The increased potency was attributed to faster kinetics of

death-inducing signaling complex assembly and caspase-8 and caspase-3 activation. Moreover, *in vivo*, multivalent nanobody molecules elicited superior anti-tumor activity compared to a conventional DR5 agonist antibody, including the ability to induce tumor regression in an insensitive patient-derived primary pancreatic tumor model [30]. Therefore, many agonistic monoclonal antibodies specific for TRAIL receptors induce apoptosis in multiple tumor cell types, but some TRAIL receptor-expressing tumor cells, including Jurkat T cells, are resistant to TRAIL receptor-specific monoclonal antibody-induced apoptosis. Kobayashi et al. [31] constructed a chimeric antigen receptor (CAR) of a TRAIL-receptor 1-specific single chain variable fragment (scFv) antibody (TRAIL-receptor 1-scFv-CAR), which killed Jurkat T cells via TRAIL-receptor 1-mediated apoptosis.

Recently, it was shown that methyl jasmonate, a botanical hormone that serves as a signal transduction intermediate and regulates cell death in stressed plants, induces cell cycle arrest, apoptosis and non-apoptotic cell death selectively in cancer cells [32]. The molecular mechanism through which methyl jasmonate induces apoptosis in human non-small cell lung cancer (NSCLC) was studied. It was found that methyl jasmonate triggered apoptosis via the DDIT3/GADD153-TNFRSF10B/DR5-CASP axis. Thus, methyl jasmonate treatment significantly decreased the expression of CFLAR (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator, an inhibitor of CASP8) in NSCLC cells, and ectopic expression of CFLAR partly protected cells from methyl jasmonate-induced apoptosis [32]. The activity of pro-apoptotic genes expression such as *TNFRSF10BDR5* or *TP63* is also regulated by the LTR12 from endogenous retrovirus 9 [33, 34]. When treating testicular cancer cells with HDAC inhibitors as well as the death ligand TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), rapid cell death was observed, this depended on TNFRSF10B expression [34]. The promoter activity of LTR12 is largely confined to the testes, silenced in testicular carcinoma, but reactivated in testicular cancer cells by broad-range histone deacetylase (HDAC) inhibitors, which also induce LTR12 activity in cells derived from many additional tumor species [33]. Moreover, HDAC inhibitors also cooperate with cisplatin to promote apoptosis in testicular cancer cells. ERV9-LTRs not only drive a large set of human transcripts, but a subset of them acts in a pro-apoptotic manner [34].

The TRAIL is a potent and specific inducer of apoptosis in cancer cells, but not all pancreatic

cancer cells respond to this apoptosis inducing ligand. To overcome resistance and improve the effectiveness of TRAIL-based therapies the constructs were created expressing soluble TRAIL variants that were rendered specific for either TRAILR1/DR4 or TRAILR2/DR5 by amino acid changes in the TRAIL ectodomain. It was shown that the TRAILR1/DR4 specific variant had higher apoptosis-inducing activity in human pancreatic carcinoma Colo357 cells as well as PancTul cells that were additionally sensitized by targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), also known as inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3) [35]. Furthermore, the TRAILR1 specific recombinant protein (DR4) was more efficacious than recombinant wild type TRAIL on Colo357 xenografts in nude mice. Thus, synthetic biological approaches can potentially enhance the therapeutic efficacy of TRAIL-based therapies in pancreatic cancer, suggesting that they can possibly become part of individualized and tumor specific combination treatments in the future [35]. Most glioma cells are also resistant to TRAIL-induced apoptosis and this resistance to TRAIL limits its potential use as a drug for therapy of glioma. Khan et al. [36] have shown that evodiamine, a major bioactive compound of the Chinese herb *Evodiae fructus*, sensitizes U87 glioblastoma cells to TRAIL and inhibit cell growth in a dose-dependent manner; however, TRAIL alone failed to exert any cytotoxic effect. Combining TRAIL with evodiamine significantly increased the apoptotic rate of U87 glioblastoma cells, as compared to evodiamine treatment alone through increased expression of death receptors DR4 and DR5 as well as caspase-8 and cleaved caspase-3 [36].

It is interesting to note that mitochondrial division inhibitor-1 (MDIVI-1), also known as dynamin 1-like (NDM1L), is able to enhance the sensitivity of human ovarian cancer cells to death receptor ligands including TRAIL, FAS ligands, and TNFA [37]. Importantly, the combination of TRAIL and NDM1L has no apparent cytotoxic effect on non-transformed human cells, indicating a significant therapeutic window. This effect is mediated by caspase-8 and not by the two important pro-apoptotic Bcl-2 family proteins Bax and Bak [37].

Hypoxia is a major problem that impairs the sensitivity of human cancer cells to death by apoptosis. Certain miRNAs that regulate apoptotic genes including miR-210 can be induced by hypoxia, resulting in cell apoptosis. Tse et al. [38] observed a

significant induction of miR-210 in primary ovarian follicular cells exposed to hypoxia, and gene ontology analysis further highlighted the potential roles of miR-210 in cell proliferation, cell differentiation, and cell apoptosis through a number of miR-210 target apoptotic genes, including TNFRSF10B/DR5, deleted in liver cancer 1 protein (DLC1), STE20-like serine/threonine-protein kinase (SLK), RNA binding motif protein 25 (RBM25), and ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP7) [38]. Moreover, ectopic expression of miR-210 would result in down-regulation of these apoptotic genes. On the other hand, the inhibition of miR-210 promoted apoptotic cell death and the expression of apoptotic marker -caspase 3 in follicular cells under hypoxic treatment, supporting the regulatory role of miR-210 in ovarian cell apoptosis [38].

Recently, it was shown that apoptosis induced by TRAIL in PC-3 cells is enhanced by inhibition of transient receptor potential melastain 7 (TRPM7), a bifunctional protein with dual structure of both ion channel and protein kinase, which participate in a wide variety of diseases including cancer [39]. The influence and potential function of TRPM7 on the PC-3 cells apoptosis induced by TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) was also demonstrated. The expression of TRPM7 is up-regulated in PC-3 cells after treating with TRAIL and subsequent induction of apoptosis. Furthermore, the suppression of TRPM7 by TRPM7 non-specific inhibitors not only markedly eliminated TRPM7 expression level, but also increased the apoptosis of TRAIL-treated PC-3 cells, which may be regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway accompanied with up-regulated expression of cleaved caspase-3, TRAIL-receptor 1/DR4, and TRAIL-receptor 2/DR5 [39].

TNFRSF21 (death receptor-6, DR6) is an orphan TNF receptor superfamily member and is expressed ubiquitously with high expression in the lymphoid organs, heart, brain and pancreas. Ectopic expression of DR6 in some cell lines leads to apoptosis and activation of the JNK and NF- κ B pathways. Some tumor cells overexpress DR6, typically in conjunction with elevated anti-apoptosis molecules. DR6 show normal development with no gross pathology in any major organs. In the absence of DR6, B-cells show increased proliferation, cell division and cell survival upon mitogenic stimulation (anti-CD40 and LPS) [16]. Thus, DR6 plays an important regulatory role for the generation of adaptive immunity.

In addition, TNFRSF21 is highly expressed in many tumor cell lines and tumor samples. Interestingly, both of its transcriptional and cell surface expression are regulated by the NF- κ B pathway and metalloproteinase in some tumor cell lines, respectively. The role of DR6 as an apoptosis-inducing receptor is less clear and perhaps cell type dependent [16]. It is interesting to note that DR6 can bind the amyloid precursor protein via the protein extracellular regions, inhibits synapse formation and is important for APP-induced dimerization and activation of cell surface TNFRSF21/DR6 [40].

Mirzaei et al. [41] have shown significant changes in the expression profile of apoptotic genes in the AGS (gastric adenocarcinoma), 5637 (bladder tumor), and U-87MG (brain tumor) cell lines transfected with OCT4B1, a newly discovered spliced variant of transcription factor OCT4, which is primarily expressed in pluripotent and tumor cells. This variant of transcription factor OCT4 is significantly overexpressed in tumors, where it endows an anti-apoptotic property to tumor cells. The expression of TNFRSF1A/TRADD, TNFRSF21/DR6, TNFRSF10B/DR5, TNFRSF11B (decoy receptor osteoprotegerin, and CASP7) is up-regulated in all three examined cell lines following OCT4B1 suppression with irrelevant siRNAs and down-regulated in cells transfected with OCT4B1 [41]. Thus, with some minor exceptions, the suppression of OCT4B1 caused up-regulation of pro-apoptotic and down-regulation of anti-apoptotic genes in tumor cells. Jang et al. [42] studied effect of the suppression of adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) by short-hairpin RNA (shRNA) on the resistance of breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo* in breast cancer cells, which frequently expressed high levels of ANT2. It was shown that ANT2 shRNA treatment sensitized MCF7, T47 D, and BT474 cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating the expression of TRAIL death receptors 4 and 5 (DR4/TNFRSF10A and DR5/TNFRSF10B) and down-regulating the TRAIL decoy receptor 2 (DcR2/TNFRSF10D). In MCF7 cells, ANT2 knock-down activated the stress kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK), subsequently stabilizing and increasing the transcriptional activity of p53 by phosphorylating it [42]. Furthermore, ANT2 shRNA-induced overexpression of DR4, DR5 and TRAIL sensitization were blocked by a p53 inhibitor, suggesting that p53 activation plays an important role in the transcriptional up-regulation of these death receptors.

However, ANT2 knockdown also up-regulated DR4 and DR5 in the p53-mutant cell lines BT474 and T47 D [42]. Treatment of the cells with a demethylation agent or JNK inhibitor prevented the ANT2 shRNA-induced down-regulation of DcR2 and activation of p53. In experiments *in vivo* using nude mice, ANT2 shRNA caused TRAIL-resistant MCF7 xenografts to undergo TRAIL-induced cell death, up-regulated DR4/TNFRSF10A and DR5/TNFRSF10B and down-regulated the TRAIL decoy receptor 2 (DcR2/TNFRSF10D). Moreover, co-treatment with adenine nucleotide translocase-2 shRNA and TRAIL efficiently suppressed tumor growth in these mice [42].

At the same time, there is cell type specificity of signaling from membrane receptors to their downstream cell-type dependent transduction networks [43]. It was shown that similar response of most cells to the same stimulus presented high functional similarity. Likewise, in cancer cells most signaling networks were generally dysfunctional and less complete than in normal cells. However, glioma emerged hyper-activated the transduction mechanism in malignant state. Receptor ATP6AP2 and TNFRSF21 induced rennin-angiotensin and apoptosis signaling were found likely to explain the glioma-specific mechanism [43]. The ubiquitin-proteasome system (UPS) has been shown to regulate TRAILR members suggesting that pharmacological inhibition of the UPS may be a novel strategy to augment TRAIL-based therapies and increase efficacies. Recently, an inhibitor of proteasome deubiquitinase activity b-API5 was identified, and exposure of tumor cell lines to this inhibitor resulted in increased TRAILR2 expression and enhanced sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis and cell death *in vitro* and *in vivo* [11].

Therefore, tumor necrosis factor receptors and Fas-related death receptors play an important role in the regulation of apoptosis and cell proliferation through downstream cell-type dependent transduction networks and are regulated by multiple factors.

Tumor necrosis factor-related decoy receptors

In addition to death receptors, several decoy receptors have also been identified and include decoy receptor 1 (DcR1), also known as TNFRSF10C/TRAILR3/TRID, DcR2, also known as TNFRSF10C/TRUNDD, DcR3, also known as TNFRSF6B, and DcR4, also known as TNFRSF11B or osteoprotegerin (OPG). The decoy receptors, which lack

the pro-apoptotic death domain, do not transduce apoptotic signals but rather compete with the death receptors for ligand binding and thereby inhibit ligand-induced apoptosis [10, 14]. DcR1 is not capable of inducing apoptosis, and is thought to function as an antagonistic receptor that protects cells from TRAIL-induced apoptosis. This gene was found to be a p53-regulated DNA damage-inducible gene. However, p53 also regulates the expression of TRAIL decoy receptors DcR1 and DR2. Although the significance of p53-dependent regulation of decoy receptors remains unclear, evidence suggests that DcR1 appears to inhibit p53-mediated apoptosis. It is, therefore, possible that p53 may blunt its DR5-dependent apoptotic effects by controlling the levels of decoy receptors. Pro-apoptotic ligand TRAIL engages the apoptotic machinery through two pro-apoptotic receptors, TRAILR1/DR4/TNFRSF10A and TRAILR2/DR5/TNFRSF10B. This cell death program is tightly controlled by two antagonistic receptors, TRAILR3/DcR1/TNFRSF10C and TRAILR4/DcR2/TNFRSF10D, both devoid of a functional death domain, an intracellular region of the receptor, required for the recruitment and the activation of initiator caspases. Upon TRAIL-binding, TRAILR4/DcR2 forms a heteromeric complex with the agonistic receptor TRAILR2/DR5 leading to reduced caspase-8 activation and apoptosis [44]. The inhibitory decoy receptors (DcR1 and DcR2) co-expressed with death receptors (DR4 and DR5) on the same cell can block the transmission of the apoptotic signal and also regulate TRAIL sensitivity at a supracellular level and thus represent a mechanism by which the microenvironment can diminish tumor TRAIL sensitivity [10].

The tissue restricted expression of the decoy receptors on normal but not cancer cells provides a therapeutic rationale for the development of selective TRAIL-mediated anti-tumor therapies. It was shown that the membrane expression of decoy receptors for TRAIL DcR1 and DcR2 is greater in the normal endometrium than endometrioid endometrial cancer [45]. Moreover, the TNFRSF10C copy number variation in patients with colorectal cancer is associated with distant metastatic disease [46]. DcR2/TRAILR4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT, may contribute to cervical carcinogenesis [44]. Furthermore, this decoy receptor can directly inhibit TRAIL-induced cell death at the membrane and also trigger the activation of signaling pathways leading

to cell survival and proliferation in HeLa cells. Shin et al. [46] demonstrate that the TNFRSF10C/DcR1 as well as TNFRSF10A/DR4 and TNFRSF10B/DR5 participate in apoptotic and antioxidant effects of vitisin A, derived from wine grapes, the underlying antitumor mechanism in prostate cancer cells. Upregulation of TNFRSF10B/DR5 and production of reactive oxygen species mediate sensitization of PC-3 prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis by vitisin A [47]. Combined treatment of PC-3 cells with vitisin A and TRAIL increased the production of reactive oxygen species, DR5 promoter activity, its cell surface expression, and enhanced cytotoxicity. Furthermore, the reactive oxygen species inhibitor NAC and silencing of DR5 by siRNA transfection inhibited the ability of combination to generate ROS [47].

Recently, it was shown that epigenetic inactivation of TRAIL decoy receptors TNFRSF10C and TNFRSF10D in the majority of cervical cancer patients downregulated expression of these decoy receptors and confers sensitivity to TNFRSF10C/trail-cisplatin combination therapy in cervical cancer [48]. Moreover, the cervical cancer cell lines harboring epigenetic inactivation of TRAIL decoy receptors effectively activate downstream caspases suggesting a critical role of inactivation of these genes in efficient execution of extrinsic apoptotic pathway and therapy response. Analysis of TNFRSF10D/DcR2 DNA-methylation status in melanoma patients revealed that methylated TNFRSF10D is associated with the survival of melanoma patients [49]. There is data that the increased DcR2 protein levels might play a role in TRAIL resistance in solid tumors and that hypoxia, which is an important feature of solid tumors and renders tumor cells resistant to some chemotherapeutic agents, including TRAIL, is responsible for this effect [50]. Thus, hypoxia upregulated DcR2 protein expression on the cell surface membrane in five different human colon cancer cell lines (HCT116, HT29, SW480, SW620, and WiDr). In contrast, hypoxia had no effect on TNFRSF10A/DR4, TNFRSF10B/DR5, or TNFRSF10C/DcR1 protein levels [50]. Furthermore, hypoxia-inducible factor 1 α played a crucial role in up-regulation of the transcription of DcR2, but that neither p53 nor NF- κ B contributed to this regulation. Moreover, TRAIL-induced cell death was attenuated under hypoxic conditions [50].

Mansour et al. [51] have recently shown that decoy receptor 1 mediates malignant glioma resistance

to temozolomide, which is used widely to treat this tumor. Resistance to temozolomide has been related to the induction of anti-apoptotic proteins including the transcription factor NF- κ B, which has been suggested to participate in promoting the survival of cells exposed to chemotherapy. It was shown that the decoy receptor DcR1 as a temozolomide response gene induced by a mechanism relying upon p50/NF- κ B1 through NF- κ B-binding site identified in the promoter of TNFRSF10C/DcR1 gene [51]. Moreover, both loss-of-function and gain-of-function studies reveal that the atypical I κ B protein, Bcl3, is also required for induction of DcR1 by temozolomide.

DcR3/TNFRSF6B also protects against apoptosis because it can neutralize the cytotoxic ligands TNFSF14/LIGHT, TNFSF15 and TNFSF6/FASL. Higher DcR3 expression was related to the status of invasion, lymph node metastasis and recurrence in bladder urothelial carcinoma [52]. Overexpression of DcR3 was found in bladder urothelial carcinomas and cell lines, with significant elevation as compared to normal bladder tissues and negatively correlated with caspase-3 and positively associated with Bcl-2, VEGF, and p53. Thus, decoy receptor 3 may play an important role as an oncogene in tumorigenesis and progress of bladder urothelial carcinoma via influencing related pathways of apoptosis, proliferation and angiogenesis [52]. DcR3 is also involved in development and prognosis of female reproductive cancers, including cervical cancer, ovarian cancer, and breast cancer [53]. Recently, it was shown that the alteration of decoy receptor 3 leads to resistance of idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts to Fas ligand-dependent apoptosis [54]. These fibroblasts interact with collagen matrix, and aberrantly activated Akt increases DcR3 expression and protects these cells from the FasL-dependent apoptotic pathway. TNFRSF6B is also induced by TNFA-induced protein 8, a recently identified protein that is considered to be associated with various malignancies, including esophageal, breast, gastric, and pancreatic cancer [55]. The expression of DcR3 is regulated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MAPK kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. The expression of TNFA-induced protein 8, ERK1/2 and DcR3 in the tumor tissues of GC was significantly increased compared with paracarcinoma tissues and TNFA-induced protein 8 expression positively correlated with DcR3 and ERK1/2 levels, which may be involved in the cell apoptosis of gastric and pancreatic cancer [55, 56].

The level of DcR3 protein and ERK1/2 phosphorylation in pancreatic carcinoma cells is up-regulated and RNAi knockdown of DcR3 expression reduced resistance to FasL-induced apoptosis and elevated expression of caspase 3, 8 and 9 as well as reduced ERK1/2 phosphorylation [56]. Thus, DcR3/TNFRSF6B enhances ERK1/2 phosphorylation and opposes FasL signaling in pancreatic cancer cells.

DcR4/TNFRSF11B, also known as osteoprotegerin (OPG), acts as decoy receptor for TNFSF11/RANKL and thereby neutralizes its function in osteoclastogenesis. TNFRSF11B may also act as a soluble decoy receptor for TNFSF10/TRAIL, plays an inhibitory role in TRAIL-induced cell apoptosis and protects against TRAIL-mediated apoptosis [57]. OPG was initially discovered to contribute to homeostasis of bone turnover due to its capability of binding to receptor activator of nuclear factor- κ B (NF- κ B), but apart from bone turnover, OPG plays important and diverse roles in many biological functions. Upon TRAIL-binding, OPG forms a heteromeric complex with the agonistic receptor TRAILR2/DR5 leading to reduced caspase-8 activation and apoptosis. Along with inhibiting TRAIL induced apoptosis, it can induce proliferation by binding to various cell surface receptors and thus turning on the canonical cell survival and proliferative pathways as well as induces angiogenesis, one of the hallmarks of cancer, thus facilitating cancer progression, especially breast cancer [57]. Furthermore, osteoprotegerin has tumor-promoting roles in the pathogenesis of lymphangioliomyomatosis, contributes to the metastatic potential of cells with a dysfunctional TSC2 tumor-suppressor gene, selectively induced migration and stimulates proliferation of cells cultured from explanted lymphangioliomyomatosis lungs, which is characterized by cystic lung destruction, lymphatic infiltration, and abdominal tumors [58]. The expression of OPG mRNA was significantly increased in lung nodules and serum OPG level was significantly higher in lymphangioliomyomatosis patients than in normal volunteers.

Bosman et al. [59] have shown that recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL) D269H/E195R is specific for TNFRSF10B/DR5 and displays a significantly decreased affinity to osteoprotegerin and overcomes TRAIL resistance mediated by the bone marrow microenvironment, which provides important signals for the survival and proliferation of hematopoietic and malignant cells. OPG also participates in osteoclast differentiation induced by vascular endothe-

lial growth factor, a key cytokine for angiogenesis, which increased the osteoblastic the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/OPG ratio and induces osteoblast proliferation, migration, and invasion potentials *in vitro* [60].

Moreover, DcR2/TRAILR4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells and can also exhibit, in a ligand independent manner, signaling properties in the cervical carcinoma cell line HeLa, through Akt [44]. Ectopic expression of TNFRSF10D/TRAILR4 in HeLa cells induced morphological changes, with cell rounding, loss of adherence and markedly enhanced cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*, but disruption of the PI3K/Akt pathway using the pharmacological inhibitor LY294002, siRNA targeting the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol-3 kinase, or by PTEN over-expression, partially restored TRAIL-mediated apoptosis in these cells [44]. Moreover, the Akt inhibitor, LY294002, restituted normal cell proliferation index in HeLa cells expressing TNFRSF10D. *TNFRSF10D* is a p53 target gene and its overexpression or *CCNG2* gene, a negative cell cycle regulator, induces cell cycle arrest and may contribute to thiopurine resistance [61]. At the same time, cross-platform array screening identifies TNFRSF10D and thrombospondin 1 as well as ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma, which was shown in a large panel of melanoma cell lines and resected melanomas [62].

Decoy receptors also regulate TRAIL sensitivity at a supracellular level and thus represent a mechanism by which the microenvironment can diminish tumor TRAIL sensitivity. Moreover, these receptors do not only act in a cell-autonomous or cis-regulatory manner, but also exert trans-cellular regulation originating from stromal cells and affect tumor cells, highlighting the potent inhibitory effect of decoy receptors in the tumor tissue and the necessity of selective targeting of the two death-inducing TRAIL receptors to maximize efficacy [10, 14]. Todorova et al. [63, 64] have shown that TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 is controlled by poly(ADP-ribose) polymerase-13 (PARP13), also known as ZC3HAV1 and zinc-finger antiviral protein (ZAP), which is an antiviral factor, regulates cellular mRNA post-transcriptionally and functions as a pro-apoptotic factor by destabilizing TRAILR4 transcript. PARP13 binds RNA via its four CCCH-type zinc-finger domains and targets it for degradation by recruiting cellular messenger RNA decay factors

such as the exosome complex and XRN1. PARP13 binds to and regulates cellular mRNAs in the absence of viral infection. Knockdown of PARP13 results in the misregulation of hundreds of transcripts including TRAILR4/DcR2. PARP13 destabilizes TRAILR4 mRNA post-transcriptionally in an exosome-dependent manner by binding to a region in its 3' untranslated region. As a consequence, PARP13 represses TRAILR4 expression and increases cell sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis, acting as a key regulator of the cellular response to TRAIL [63]. Post-transcriptional regulation of RNA is an important mechanism for activating and resolving cellular stress responses. Moreover, these functions of PARP13 are important components of the cellular response to stress. In addition, the ability of PARP13 to restrict oncogenic viruses and to repress the pro-survival cytokine receptor tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 suggests that it can be protective against malignant transformation and cancer development [64].

Recently, it was shown that the expression of TRAIL and TRAIL receptors as well as TRAIL-induced apoptosis is significantly increased in hepatocellular carcinoma by interferon- α and celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, respectively, because cyclooxygenase-2 is overexpressed in this carcinoma cells and is considered to play a role in hepatocarcinogenesis [65]. Thus, interferon- α and cyclooxygenase-2 inhibitor synergistically inhibit cell proliferation in a dose- and time-dependent manner and cooperatively mediate TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma [66]. Moreover, the regulation of interferon- α - and COX-2 inhibitor-induced cell death is impaired in a subset of TRAIL-resistant cells. It was also shown that doxorubicin-induced recruitment of death receptor 5 to the cell surface impacts the enhanced apoptotic effect that can be longitudinally monitored by apoptosis imaging [66]. It is interesting to note that pancreatic tumor samples have increased levels of nuclear TRAILR2/DR5/TNFRSF10B and that this form of TRAILR2 inhibits maturation of the microRNA let-7 in pancreatic cancer cell lines and increases their proliferation [67]. Moreover, knockdown of TRAILR2 increased Drosha-mediated processing of the let-7 microRNA precursor primary let-7 (resulting in increased levels of mature let-7), reduced levels of the let-7 targets (LIN28B and HMGA2), and inhibited cell proliferation. Nuclear TRAIL-R2 inhibits maturation of the microRNA let-7 in pancreatic cancer

cell lines and increases their proliferation [67]. Gupta et al. [6] found that a limonoid tetranortriterpene, azadirone, sensitizes human cancer cells to TRAIL, induces death receptors DR5 and DR4 signaling, down-regulates of cell survival proteins, and up-regulates of proapoptotic proteins.

Thus, targeting TRAIL and TRAIL receptors, which control many aspects of tumor cell death (Fig. 1), is important in the treatment of cancer because defective apoptosis contributes to the survival of cancer cells [10, 13, 14, 19, 68]. TRAIL-targeted therapy with an outlook towards the future included recombinant human proteins, small molecules and agonistic monoclonal antibodies targeting death receptors that trigger TRAIL-mediated apoptosis.

Endoplasmic reticulum stress modulates the expression of TNF-related genes

Recently, it was demonstrated the expression of most TNFA-related genes responsible for endoplasmic reticulum stress, which had been shown to trigger cell proliferation through reprogramming genome and cell death through apoptosis [69-71]. Apoptosis related proteins TNFRSF10D/TRAILR4, TNFRSF10B/TRAILR2/DR5, TNFRSF21/DR6, TRADD, TNFRSF11B/OPG, TNFAIP1, TNFAIP3, and TNFSF7/CD70 were among them. The endoplasmic reticulum (ER) is the primary organelle able to activate a distinct cellular stress response, termed the unfolded protein response in which an aggregate of misfolded proteins triggers activation of a complex set of signaling pathways to execute a resolution to the causative stress. Malignant tumors utilize the endoplasmic reticulum stress response to adapt to stressful, environmental conditions [72-74]. The rapid growth of solid tumors generates micro-environmental changes in association to hypoxia, nutrient deprivation and acidosis, which induce new blood vessels formation and cell proliferation and surviving [72, 74]. Those processes rely on the activation of endoplasmic reticulum stress signalling pathways. UPR is mediated by three interconnected, endoplasmic reticulum-resident sensors. IRE1 (inositol requiring enzyme-1), also known as ERN1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), is the most evolutionary conserved sensor that responds to protein misfolding with a highly tuned program aimed to either resolve the stress or direct the cell towards apoptosis in the case rectification is not viable; thus making it a key regulator of life and death processes [71, 73, 75, 76].

Inhibition of IRE1 significantly decreases glioma cell proliferation and tumor growth and affects the expression of numerous genes responsible for regulation of cell proliferation, surviving and apoptosis including TNFA related genes [69, 70, 75, 77-84]. Thus, inhibition of IRE1 signaling enzyme activity causes a strong increase (more than 8-fold) in the levels of TNFRSF21 mRNA, which is known as death receptor 6, in U87 glioma cells (Fig. 2). It is interesting to note that the changes observed in the above studied gene, which has relation to TNF-directed apoptosis, correlate well with slower cell proliferation in cells harboring dnIRE1, attesting to the fact that endoplasmic reticulum stress is a necessary component of malignant tumor growth and cell survival [72, 74, 80, 83]. There is data that TNFRSF21/DR6 induced apoptosis through a new pathway that is different from the type I and type II pathways through interacting with Bax protein [85]. Moreover, B-cells lacking TNFRSF21/DR6 show increased proliferation rate and cell survival upon mitogenic stimulation [16]. However, this gene is highly expressed in many tumor cell lines and tumor samples and the role of TNFRSF21/DR6 as an apoptosis-inducing receptor is less clear and perhaps cell type dependent.

Another death receptor, DR5/TNFRSF10B, is a receptor for TRAILR2 and can initiate the extrinsic apoptotic pathway characterized by the recruitment of death domains, assembly of the death-inducing signaling complex (DISC), caspase activation and ultimately apoptosis. At the same time, TNFRSF10B/DR5 mRNA expression is down-regulated upon inhibition of IRE1 signaling enzyme (Fig. 2). Therefore, the changes observed in the *TNFRSF10B* gene, as initiator of apoptosis, do not correlate with slower cell proliferation in cells harboring dnIRE1. It is possible that TNFRSF10B/DR5 facilitate only endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and inhibition IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress signaling causes down-regulation of this gene expression, because recently it was shown that DDIT3/CHOP and KAT2A proteins regulate TNFRSF10B expression and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human lung cancer cells via formation of the KAT2A-DDIT3-phospho-JUN complex and knockdown of KAT2A down-regulated TNFRSF10B [86].

At the same time, significant up-regulation of TRAILR4/TNFRSF10D/DcR2 and TNFRSF11B/DcR4/OPG in glioma cells upon inhibition of IRE1 was observed (Fig. 2). These decoy receptors lack

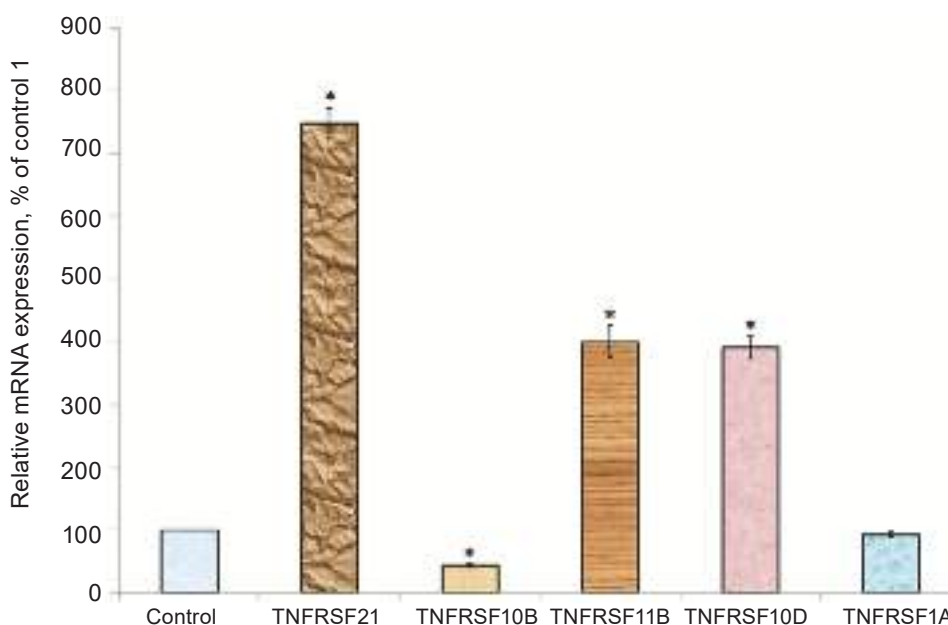


Fig. 2. Expression of DR6/TNFRSF21, DR5/TNFRSF10B, DcR4/OPG/TNFRSF11B, TNFRSF10D/DcR2/TRAILR4, and TNFRSF1A/TNFR1 mRNAs in glioma cell line U87 (Vector) and its sublines with a deficiency of both protein kinase and endoribonuclease of the signaling enzyme IRE1 (dnIRE1) measured by qPCR. The expression values of TNF receptor superfamily member mRNAs were normalized to β -actin mRNA expression and represented as percent control (vector, 100%); mean \pm SEM; n = 4; * P < 0.001 versus control [69]

the pro-apoptotic death domain, could not induce apoptosis and have been shown to play an inhibitory role in TRAIL-induced cell apoptosis [11, 44, 57]. The induction of TNFRSF10D and TNFRSF11B mRNAs in glioma cells upon inhibition of IRE1 correlates with down-regulation of TNFRSF10B/DR5. Similar negative correlation was observed in breast cancer cells treated by short-hairpin RNA for suppression of adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) [42]. Suppression of ANT2 restores susceptibility of breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by activating JNK and modulating TRAIL receptor expression: up-regulating the expression of TRAIL death receptors 4 and 5 and down-regulating the TRAILR4/DcR2 [42].

Interestingly, the silencing of TNFRSF10D is related to melanoma genesis [49]. It is possible that TRAILR4/TNFRSF10D as well as TRAILR2/TNFRSF10B have relation to regulation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. Moreover, modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent TRAILR2/TNFRSF10B/DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [70]. Therefore, a better understanding of the mechanisms underlying TRAILR4/TNFRSF10D as well as TRAILR2/TNFRSF10B is required.

Tian et al. [70] have shown that nelfinavir treatment led to endoplasmic reticulum stress-induced up-regulation of the TNFRSF10B/DR5 expression. This transactivation was mediated by the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP). Furthermore, endoplasmic reticulum stress-induced ATF4 up-regulation was responsible for modulation of CHOP. In contrast, DR4 receptor expression was unchanged by nelfinavir treatment. Combining nelfinavir with TRAIL led to a significantly enhanced level of apoptosis that was abrogated by siRNA silencing of DR5. Thus, nelfinavir-induced endoplasmic reticulum stress modulates DR5 expression in human glioblastoma multiforme cells and can enhance TRAIL efficacy [70].

Endoplasmic reticulum stress-induced sensitization of p53-deficient human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis through upregulation of DR5 was observed by Edagawa et al. [87]. They have shown that the stress response gene *ATF3* is required for endoplasmic reticulum stress-mediated TNFRSF10B/DR5 induction upon zerumbone and celecoxib

in these colorectal cancer cells. Both agents activated PERK-eIF2 α kinases and induced the expression of activating transcription factor 4 (ATF4)-CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein, which were remarkably suppressed by reactive oxygen species scavengers. In the absence of ATF3, the induction of DR5 mRNA and protein was abrogated significantly, and this was associated with reduced cell death by cotreatment of TRAIL with zerumbone and celecoxib [87]. By contrast, exogenous expression of ATF3 caused a more rapid and elevated expression of DR5, resulting in enhanced sensitivity to apoptotic cell death by TRAIL/zerumbone or TRAIL/celecoxib. A reporter assay demonstrated that at least two ATF/cAMP response element motifs as well as C/EBP homologous protein motif at the proximal region of the human DR5 gene promoter were required for zerumbone-induced DR5 gene transcription. Thus, ATF3 is an essential transcription factor for p53-independent TNFRSF10B/DR5 induction upon both zerumbone and celecoxib treatment and this may be a useful biomarker for TRAIL-based anticancer therapy [87]. Essential role of ATF3 transcription factor in synergistic cancer cell killing by a combination of histone deacetylase (HDAC) inhibitors and agonistic anti-DR5 antibody through ER stress in human colon cancer cells was also shown by Liu et al. [88]. In this case they used the combination of TRAIL/agonistic anti-DR5 monoclonal antibody and agents that increase the expression of DR5, which is expected as a novel anticancer therapeutic strategy. It was shown that six different HDAC inhibitors activated endoplasmic reticulum stress sensor PERK and eIF26 and induced the ATF4/ATF3/CHOP pathway in p53-deficient human colon cancer cells. This resulted in an increased expression of DR5 on the cell surface and sensitized cells to apoptosis by agonistic anti-DR5 monoclonal antibody. Stress response gene ATF3 was required for efficient DR5 induction by HDAC inhibitors, and DR5 reporter assay showed that ATF3 play crucial role for the HDAC inhibitors-induced activation of death receptor 5 gene transcription [88].

Recently, it was shown that hypoxia, which is a major problem that impairs the sensitivity of human cancer cells to death by apoptosis, affects the expression of most TNFA related genes responsible for apoptosis in gene specific manner and that inhibition of IRE1 significantly modulates effect of hypoxia on these genes expression in glioma cells (Fig. 3 and 4) [69].

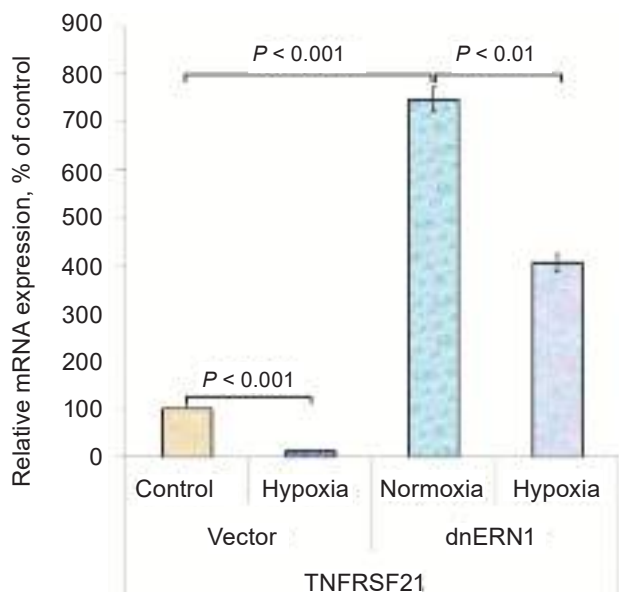


Fig. 3. Effect of hypoxia (3% oxygen – 16 h) on the expression levels of TNFRSF21/DR6 mRNA (by qPCR) in control glioma cells (Vector) and cells with a deficiency of IRE1 (dnIRE1). TNFRSF21 mRNA expressions values were normalized to β -actin mRNA expression and represented as percent control (control glioma cells transfected by vector, 100%); mean \pm SEM; $n = 4$ [69]

Hypoxia strongly suppress the expression of TNFRSF21/DR6 mRNA (8.3-fold) in control glioma cells and inhibition of IRE1 significantly reduces effect of hypoxia on this mRNA expression (Fig. 3). Thus, TNFRSF21 gene expression is responsive to hypoxia preferentially through IRE1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress [69]. At the same time, hypoxia slightly down-regulates the expression level of TNFRSF11B/DcR4 mRNA in control glioma cells (-19%), but inhibition of IRE1 strongly enhances this effect of hypoxia (2.4 fold down-regulation) (Fig. 4). It is interesting to note that the expression of genes encoding for TNFRSF10B/DR5/TRAILR2 as well as TNFRSF1A/TNFR1 does not change significantly in control glioma cells treated by hypoxia; however, inhibition of IRE1 introduces sensitivity of these gene expressions to hypoxia (up-regulation 39 and 47%, respectively) [69]. These results demonstrate that the expression of *TNFRSF10B* and *TNFRSF1A* genes is resistant to hypoxia in wild type glioma cells, but inhibition of the IRE1 activity leads to up-regulation of these genes expression. At the same time, the expression level of TNFRSF10D/TRAILR4/DcR2 mRNA is up-

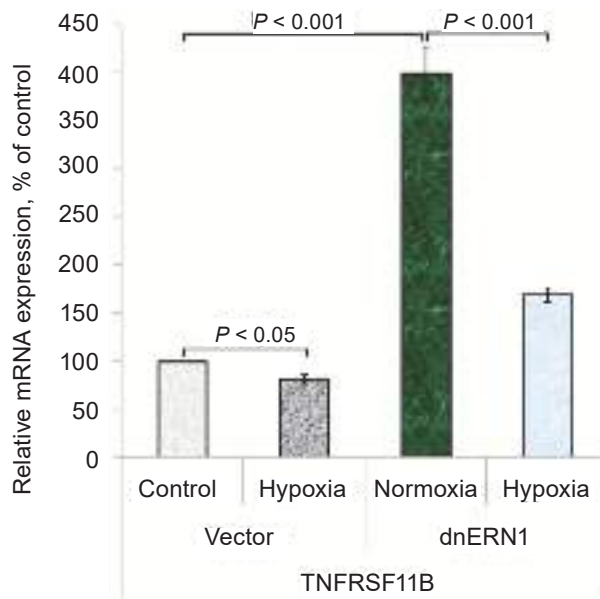


Fig. 4. Effect of hypoxia (3% oxygen – 16 h) on the expression levels of TNFRSF11B/DcR4/OPG mRNA (by qPCR) in control glioma cells (Vector) and cells with a deficiency of IRE1 (dnIRE1). TNFRSF11B mRNA expressions values were normalized to β -actin mRNA expression and represented as percent control (control glioma cells transfected by vector, 100%); mean \pm SEM; $n = 4$ [69]

regulated by hypoxia in glioma cells independent of IRE1 signaling enzyme function [69]. There is data that the increased DcR2 protein levels might play a role in TRAIL resistance in solid tumors and that hypoxia, as an important feature of solid tumors, and renders tumor cells resistant to some chemotherapeutic agents, including TRAIL, up-regulates this decoy receptor, but has no effect on TNFRSF10A/DR4, TNFRSF10B/DR5, or TNFRSF10C/DcR1 protein levels [50].

Because TRAIL-mediated apoptosis of cancer cells is responsible for endoplasmic reticulum stress and oxidative stress new approaches are created: anticancer drugs for the modulation of these stresses [89, 90]. It is important that targeting of endoplasmic reticulum stress response induced apoptosis in gliomas [89]. The endoplasmic reticulum functions as a multifunctional organelle and as a well-orchestrated protein-folding unit. It consists of sensors which detect stress-induced unfolded/misfolded proteins and it is the place where protein folding is catalyzed with chaperones. Protein folding and the generation of reactive oxygen species as a protein oxidative byproduct in endoplasmic reticulum are

crosslinked. An endoplasmic reticulum stress-induced response also mediates the expression of the apoptosis-associated gene *CHOP* and death receptor 5. The endoplasmic reticulum stress induces the up-regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor and opening new horizons for therapeutic research [90]. These findings can be used to maximize TRAIL-induced apoptosis in xenografted mice. This review summarizes the current understanding of the interplay between ER stress and ROS. It is important that natural products and drugs have shown potential in regulating endoplasmic reticulum stress and reactive oxygen species in different cancer cell lines. Drugs as inducers and inhibitors of ROS modulation may respectively exert inducible and inhibitory effects on endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. Reconceptualization of the molecular crosstalk among ROS modulating effectors and endoplasmic reticulum stress will lead to advances in anticancer therapy [89].

To date, the majority of studies on TRAIL receptors have explored the role of these receptors as initiators of apoptosis. However, sporadic reports also suggest that TRAIL receptors can lead to other outcomes such as cytokine and chemokine production, cell proliferation and cell migration. Indeed, although transformed cells frequently express TRAIL, most do not undergo apoptosis upon engagement of these receptors, and a significant effort has been devoted toward exploring how to sensitize such cells to the pro-apoptotic effects of death receptor stimulation [41, 85, 91-93].

РОЛЬ РЕЦЕПТОРІВ TNF ТА TNF-ЗАЛЕЖНИХ ЛІГАНДІВ, ЩО ІНДУКУЮТЬ АПОПТОЗ, ЗА РОСТУ ПУХЛИН

*О. Г. Мінченко¹, Д. О. Цимбал¹,
Д. О. Мінченко^{1,2}, О. О. Ратушина¹*

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
Національної академії наук України, Київ;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

²Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

Суперродина рецепторів фактора некрозу пухлин (TNF) та TNF-залежних лігандів, що індують апоптоз, відіграють важливу роль у реалізації функції TNF і контролюють ріст пухлин. Залежні від TNF шляхи регуляції контро-

люються сигналами, опосередкованими стресом ендоплазматичного ретикулула, який відіграє ключову роль у контролі проліферації клітин та росту пухлин. Більше того, пригнічення IRE1 (inositol requiring enzyme-1), який є центральним медіатором стресу ендоплазматичного ретикулула і значною мірою відповідає за проліферацію і апоптоз клітин, опосередковує пригнічення росту пухлин шляхом специфічних змін в експресії генів. Серед них важливе місце займають ті гени, що кодуєть транскрипційні фактори, пухлинні супресори, а також протеїни, відповідальні за ангиогенез і апоптоз, включаючи суперродину рецепторів TNF та TNF-залежних лігандів, які індують апоптоз. Таким чином, зміни рівня експресії TNF-залежних генів, що кодуєть протеїни суперродини рецепторів TNF та TNF-залежних лігандів можливо віддзеркалюють метаболічне репрограмування пухлинних клітин за умов інгібування IRE1-опосередкованого сигналювання стресу ендоплазматичного ретикулула і корелюють із пригніченням проліферації клітин гліоми.

Ключові слова: суперродина рецепторів TNF, TRAIL, декой-рецептори, пригнічення IRE1, клітини гліоми.

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ TNF И TNF-ЗАВИСИМЫХ ЛИГАНДОВ, ИНДУЦИРУЮЩИХ АПОПТОЗ, ПРИ РОСТЕ ОПУХОЛЕЙ

*О. Г. Минченко¹, Д. О. Цимбал¹,
Д. О. Минченко^{1,2}, О. О. Ратушина¹*

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
Национальной академии наук Украины, Киев;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

²Национальный медицинский университет
им. А.А. Богомольца, Киев, Украина

Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей (TNF) и TNF-зависимых лигандов, индуцирующих апоптоз, играют важную роль в реализации функции TNF и контролируют рост опухолей. Зависимые от TNF пути регуляции контролируются сигналами, опосредованными стрессом эндоплазматического ретикулула, который играет ключевую роль в контроле пролиферации клеток и роста опухолей. Более того, угнетение IRE1 (inositol requiring enzyme-1), который является центральным медиатором

стресса эндоплазматического ретикулума и в значительной степени отвечает за пролиферацию и апоптоз клеток, опосредует угнетение роста опухолей путем специфических изменений в экспрессии генов. Среди этих генов важное место занимают те, которые кодируют транскрипционные факторы, супрессоры опухолей, а также протеины, ответственные за ангиогенез и апоптоз, включая суперсемейство рецепторов TNF и TNF-зависимых лигандов, индуцирующих апоптоз. Таким образом, изменения уровня экспрессии TNF-зависимых генов, которые кодируют протеины суперсемейства рецепторов TNF и TNF-зависимых лигандов возможно отображают метаболическое репрограммирование опухолевых клеток при ингибировании опосредованного IRE1 сигналинга стресса эндоплазматического ретикулума и коррелируют с угнетением пролиферации клеток глиомы.

Ключевые слова: суперсемейство рецепторов TNF, TRAIL, декой-рецепторы, угнетение IRE1, клетки глиомы.

References

1. Lebec H, Ponce R, Preston BD, Iles J, Born TL, Hooper M. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. *Curr Med Res Opin.* 2015; 31(3): 557-574.
2. Jang MK, Kim HS, Chung YH. Clinical aspects of tumor necrosis factor- α signaling in hepatocellular carcinoma. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(17): 2799-2808.
3. Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor and cancer. *J Pathol.* 2013; 230(3): 241-248.
4. Isaac ST, Tan TC, Polly P. Endoplasmic Reticulum Stress, Calcium Dysregulation and Altered Protein Translation: Intersection of Processes That Contribute to Cancer Cachexia Induced Skeletal Muscle Wasting. *Curr Drug Targets.* 2016; 17(10): 1140-1146.
5. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013; 328(2): 222-225.
6. Song Y, Buchwald P. TNF superfamily protein-protein interactions: feasibility of small-molecule modulation. *Curr Drug Targets.* 2015; 16(4): 393-408.
7. Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R, Farrow SN. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature.* 1996; 384(6607): 372-375.
8. Cullen SP, Martin SJ. Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 39: 26-34.
9. de Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H, Martinez-Lostao L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* 2016; 23(5): 733-747.
10. O'Leary L, van der Sloot AM, Reis CR, Deegan S, Ryan AE, Dhimi SP, Murillo LS, Cool RH, Correa de Sampaio P, Thompson K, Murphy G, Quax WJ, Serrano L, Samali A, Szegezdi E. Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene.* 2016; 35(10): 1261-1270.
11. Sarhan D, D'Arcy P, Lundqvist A. Regulation of TRAIL-receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(10): 18557-18573.
12. Dai X, Zhang J, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Kumar AP, Ahn KS, Sethi G. Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240(6): 760-773.
13. Fulda S. Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Adv Exp Med Biol.* 2014; 818: 167-180.
14. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(3): 280-288.
15. Walczak H, Haas TL. Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol.* 2008; 414: 221-239.
16. Benschop R, Wei T, Na S. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21: TNFR-related death receptor-6, DR6. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 647: 186-194.
17. Screaton GR, Xu XN, Olsen AL, Cowper AE, Tan R, McMichael AJ, Bell JI. LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(9): 4615-4619.
18. Lee HL, Park SH, Kim TM, Jung YY, Park MH, Oh SH, Yun HS, Jun HO, Yoo HS, Han SB,

- Lee US, Yoon JH, Song MJ, Hong JT. Bee venom inhibits growth of human cervical tumors in mice. *Oncotarget*. 2015; 6(9): 7280-7292.
19. Yang A, Wilson NS, Ashkenazi A. Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22(6): 837-844.
 20. Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol Ther*. 2012; 13(12): 1143-1151.
 21. Sun R, Zhang Y, Lv Q, Liu B, Jin M, Zhang W, He Q, Deng M, Liu X, Li G, Li Y, Zhou G, Xie P, Xie X, Hu J, Duan Z. Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform alpha (TAP63alpha). *J Biol Chem*. 2011; 286(18): 15918-15928.
 22. Twomey JD, Kim SR, Zhao L, Bozza WP, Zhang B. Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells. *Drug Resist Updat*. 2015; 19: 13-21.
 23. Holland PM. Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(2): 185-193.
 24. Piao X, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology*. 2016; 5(5): e1131380.
 25. Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Takai T, Kuranaga Y, Sugito N, Akao Y. Perturbation of the Warburg effect increases the sensitivity of cancer cells to TRAIL-induced cell death. *Exp Cell Res*. 2016; 347(1): 133-142.
 26. Nogueira DR, Yaylim I, Aamir Q, Kahraman OT, Fayyaz S, Kamran-ul-Hassan Naqvi S, Farooqi AA. TRAIL mediated signaling in pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(15): 5977-5982.
 27. Talekar MK, Allen JE, Dicker DT, El-Deiry WS. ONC201 induces cell death in pediatric non-Hodgkin's lymphoma cells. *Cell Cycle*. 2015; 14(15): 2422-2428.
 28. Li X, Huang JM, Wang JN, Xiong XK, Yang XF, Zou F. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53. *Chem Biol Interact*. 2015; 232: 12-20.
 29. Kollipara PS, Jeong HS, Han SB, Hong JT. (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal has an antiproliferative effect on NSCLC cells induced by p38 MAPK-mediated suppression of NF- κ B and up-regulation of TNFRSF10B (DR5). *Br J Pharmacol*. 2013; 168(6): 1471-1484.
 30. Huet HA, Growney JD, Johnson JA, Li J, Bilic S, Ostrom L, Zafari M, Kowal C, Yang G, Royo A, Jensen M, Dombrecht B, Meerschaert KR, Kolkman JA, Cromie KD, Mosher R, Gao H, Schuller A, Isaacs R, Sellers WR, Ettenberg SA. Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *MAbs*. 2014; 6(6): 1560-1570.
 31. Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nakagawa H, Jin A, Lin Z, Muraguchi A. A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 453(4): 798-803.
 32. Zhang M, Su L, Xiao Z, Liu X, Liu X. Methyl jasmonate induces apoptosis and pro-apoptotic autophagy via the ROS pathway in human non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res*. 2016; 6(2): 187-199.
 33. Krönung SK, Beyer U, Chiaramonte ML, Dolfini D, Mantovani R, Dobbstein M. LTR12 promoter activation in a broad range of human tumor cells by HDAC inhibition. *Oncotarget*. 2016; 7(23): 33484-33497.
 34. Beyer U, Krönung SK, Leha A, Walter L, Dobbstein M. Comprehensive identification of genes driven by ERV9-LTRs reveals TNFRSF10B as a re-activatable mediator of testicular cancer cell death. *Cell Death Differ*. 2016; 23(1): 64-75.
 35. Yu R, Albarenque SM, Cool RH, Quax WJ, Mohr A, Zwacka RM. DR4 specific TRAIL variants are more efficacious than wild-type TRAIL in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15(12): 1658-1666.
 36. Khan M, Bi Y, Qazi JI, Fan L, Gao H. Evodiamine sensitizes U87 glioblastoma cells to TRAIL via the death receptor pathway. *Mol Med Rep*. 2015; 11(1): 257-262.
 37. Wang J, Hansen K, Edwards R, Van Houten B, Qian W. Mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) enhances death receptor-mediated apoptosis in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 456(1): 7-12.
 38. Tse AC, Li JW, Chan TF, Wu RS, Lai KP. Hypoxia induces miR-210, leading to anti-

- apoptosis in ovarian follicular cells of marine medaka *Oryzias melastigma*. *Aquat Toxicol.* 2015; 165: 189-196.
39. Lin CM, Ma JM, Zhang L, Hao ZY, Zhou J, Zhou ZY, Shi HQ, Zhang YF, Shao EM, Liang CZ. Inhibition of Transient Receptor Potential Melastain 7 Enhances Apoptosis Induced by TRAIL in PC-3 cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(10): 4469-4475.
 40. Xu K, Olsen O, Tzvetkova-Robev D, Tessier-Lavigne M, Nikolov DB. The crystal structure of DR6 in complex with the amyloid precursor protein provides insight into death receptor activation. *Genes Dev.* 2015; 29(8):785-790.
 41. Mirzaei MR, Najafi A, Arababadi MK, Asadi MH, Mowla SJ. Altered expression of apoptotic genes in response to OCT4B1 suppression in human tumor cell lines. *Tumour Biol.* 2014; 35(10): 9999-10009.
 42. Jang JY, Jeon YK, Choi Y, Kim CW. Short-hairpin RNA-induced suppression of adenine nucleotide translocase-2 in breast cancer cells restores their susceptibility to TRAIL-induced apoptosis by activating JNK and modulating TRAIL receptor expression. *Mol Cancer.* 2010; 9: 262.
 43. He Y, Yu Z, Ge D, Wang-Sattler R, Thiesen HJ, Xie L, Li Y. Cell type specificity of signaling: view from membrane receptors distribution and their downstream transduction networks. *Protein Cell.* 2012; 3(9): 701-713.
 44. Lalaoui N, Morlé A, Mérino D, Jacquemin G, Iessi E, Morizot A, Shirley S, Robert B, Solary E, Garrido C, Micheau O. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. *PLoS One.* 2011; 6(5): e19679.
 45. Gottwald L, Pasz-Walczak G, Piekarski J, Szwalski J, Kubiak R, Szych M, Suzin J, Tyliński W, Sęk P, Jeziorski A. Membrane expression of trail receptors DcR1 and DcR2 in the normal endometrium, endometrial atypical hyperplasia and endometrioid endometrial cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2014; 34(4): 346-349.
 46. Tanenbaum DG, Hall WA, Colbert LE, Bastien AJ, Brat DJ, Kong J, Kim S, Dwivedi B, Kowalski J, Landry JC, Yu DS. TNFRSF10C copy number variation is associated with metastatic colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2016; 7(3): 306-314.
 47. Shin D, Kwon HY, Sohn EJ, Nam MS, Kim JH, Lee JC, Ryu SY, Park B, Kim SH. Upregulation of Death Receptor 5 and Production of Reactive Oxygen Species Mediate Sensitization of PC-3 Prostate Cancer Cells to TRAIL Induced Apoptosis by Vitisin A. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 36(3): 1151-1162.
 48. Narayan G, Xie D, Ishdorj G, Scotto L, Mansukhani M, Pothuri B, Wright JD, Kaufmann AM, Schneider A, Arias-Pulido H, Murty VV. Epigenetic inactivation of TRAIL decoy receptors at 8p12-21.3 commonly deleted region confers sensitivity to Apo2L/trail-Cisplatin combination therapy in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016; 55(2): 177-189.
 49. Ratzinger G, Mitteregger S, Wolf B, Berger R, Zelger B, Weinlich G, Fritsch P, Goebel G, Fiegl H. Association of TNFRSF10D DNA-methylation with the survival of melanoma patients. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(7): 11984-11995.
 50. Pei GT, Wu CW, Lin WW. Hypoxia-induced decoy receptor 2 gene expression is regulated via a hypoxia-inducible factor 1 α -mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391(2): 1274-1279.
 51. Mansour NM, Bernal GM, Wu L, Crawley CD, Cahill KE, Voce DJ, Balyasnikova IV, Zhang W, Spretz R, Nunez L, Larsen GF, Weichselbaum RR, Yamini B. Decoy Receptor DcR1 Is Induced in a p50/Bcl3-Dependent Manner and Attenuates the Efficacy of Temozolomide. *Cancer Res.* 2015; 75(10): 2039-2048.
 52. Jiang YQ, Zhong TF, Dang YW, Zou LS, Yang L, Yang X, Chen G. Overexpression and clinicopathological contribution of DcR3 in bladder urothelial carcinoma tissues. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(21): 9137-9142.
 53. Jiang M, Lin X, He R, Lin X, Liang L, Tang R, Xiong D, Wei K, Dang Y, Feng Z, Chen G. Decoy Receptor 3 (DcR3) as a Biomarker of Tumor Deterioration in Female Reproductive Cancers: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 1850-1857.
 54. Im J, Kim K, Hergert P, Nho RS. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of decoy receptor 3. *J Pathol.* 2016; 240(1): 25-37.
 55. Hu R, Liu W, Qiu X, Lin Z, Xie Y, Hong X, Paerhati R, Qi Z, Zhuang G, Liu Z. Expression of tumor necrosis factor- α -induced protein 8 in stage III gastric cancer and the correlation with

- DcR3 and ERK1/2. *Oncol Lett.* 2016; 11(3): 1835-1840.
56. Zhang Y, Li D, Zhao X, Song S, Zhang L, Zhu D, Wang Z, Chen X, Zhou J. Decoy receptor 3 suppresses FasL-induced apoptosis via ERK1/2 activation in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 463(4): 1144-1151.
 57. Goswami S, Sharma-Walia N. Osteoprotegerin rich tumor microenvironment: implications in breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Apr 8. [Epub ahead of print].
 58. Steagall WK, Pacheco-Rodriguez G, Glasgow CG, Ikeda Y, Lin JP, Zheng G, Moss J. Osteoprotegerin contributes to the metastatic potential of cells with a dysfunctional TSC2 tumor-suppressor gene. *Am J Pathol.* 2013; 183(3): 938-950.
 59. Bosman MC, Reis CR, Schuringa JJ, Vellenga E, Quax WJ. Decreased affinity of recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL) D269H/E195R to osteoprotegerin (OPG) overcomes TRAIL resistance mediated by the bone microenvironment. *J Biol Chem.* 2014; 289(2): 1071-1078.
 60. Huang H, Ma L, Kyrkanides S. Effects of vascular endothelial growth factor on osteoblasts and osteoclasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016; 149(3): 366-373.
 61. Chouchana L, Fernández-Ramos AA, Dumont F, Marchetti C, Ceballos-Picot I, Beaune P, Gurwitz D, Loriot MA. Molecular insight into thiopurine resistance: transcriptomic signature in lymphoblastoid cell lines. *Genome Med.* 2015; 7(1): 37.
 62. Bonazzi VF, Nancarrow DJ, Stark MS, Moser RJ, Boyle GM, Aoude LG, Schmidt C, Hayward NK. Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma. *PLoS One.* 2011; 6(10): e26121.
 63. Todorova T, Bock FJ, Chang P. PARP13 regulates cellular mRNA post-transcriptionally and functions as a pro-apoptotic factor by destabilizing TRAILR4 transcript. *Nat Commun.* 2014; 5: 5362.
 64. Todorova T, Bock FJ, Chang P. Poly(ADP-ribose) polymerase-13 and RNA regulation in immunity and cancer. *Trends Mol Med.* 2015; 21(6): 373-384.
 65. Zuo C, Qiu X, Liu N, Yang D, Xia M, Liu J, Wang X, Zhu H, Xie H, Dan H, Li Q, Wu Q, Burns M, Liu C. Interferon- α and cyclooxygenase-2 inhibitor cooperatively mediates TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res.* 2015; 333(2): 316-326.
 66. Weber TG, Pöschinger T, Galbán S, Rehemtulla A, Scheuer W. Noninvasive monitoring of pharmacodynamics and kinetics of a death receptor 5 antibody and its enhanced apoptosis induction in sequential application with doxorubicin. *Neoplasia.* 2013; 15(8): 863-874.
 67. Haselmann V, Kurz A, Bertsch U, Hübner S, Olempska-Müller MI, Fritsch J, Häsler R, Pickl A, Fritsche H, Annewanter F, Engler C, Fleig B, Bernt A, Röder C, Schmidt H, Gelhaus C, Hauser C, Egberts JH, Heneweier C, Rohde AM, Böger C, Knippschild U, Röcken C, Adam D, Walczak H, Schütze S, Janssen O, Wulczyn FG, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells. *Gastroenterology.* 2014; 146(1): 278-290.
 68. Lim B, Allen JE, Prabhu VV, Talekar MK, Finnberg NK, El-Deiry WS. Targeting TRAIL in the treatment of cancer: new developments. *Expert Opin Ther Targets.* 2015; 19(9): 1171-1185.
 69. Minchenko OH, Kryvdiuk IV, Minchenko DO, Riabovol OO, Halkin OV. Inhibition of IRE1 signaling affects expression of a subset of genes encoding for TNF-related factors and receptors and modifies their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endoplasm Reticul Stress Dis.* 2016; 3(1): 1-15.
 70. Tian X, Ye J, Alonso-Basanta M, Hahn SM, Koumenis C, Dorsey JF. Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem.* 2011; 286(33): 29408-29416.
 71. Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* 2015; 5(6): 586-597.

72. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012; 197(7): 857-867.
73. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(9): 703-719.
74. Manié SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014; 307(10): C901-C907.
75. Auf G, Jabouille A, Guérit S, Pineau R, Delugin M, Bouchecareilh M, Magnin N, Favereaux A, Maitre M, Gaiser T, von Deimling A, Czabanka M, Vajkoczy P, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(35): 15553-15558.
76. Malhotra JD, Kaufman RJ. ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(9): a004424.
77. Minchenko DO, Kharkova AP, Halkin OV, Karbovskiy LL, Minchenko OH. Effect of hypoxia on the expression of genes encoding insulin-like growth factors and some related proteins in U87 glioma cells without IRE1 function. *Endocr Regul.* 2016; 50(2): 43-54.
78. Minchenko OH, Tsymbal DO, Minchenko DO, Riabovol OO, Ratushna OO. Hypoxic regulation of the expressions of proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of IRE1 signaling. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(1): 11-21.
79. Minchenko OH, Kryvdiuk IV, Riabovol OO, Minchenko DO, Danilovskiy SV, Ratushna OO. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(2): 25-34.
80. Auf G, Jabouille A, Delugin M, Guérit S, Pineau R, North S, Platonova N, Maitre M, Favereaux A, Vajkoczy P, Seno M, Bikfalvi A, Minchenko D, Minchenko O, Moenner M. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer.* 2013; 13: 597.
81. Minchenko DO, Danilovskiy SV, Kryvdiuk IV, Bakalets TV, Lypova NM, Karbovskiy LL, Minchenko OH. Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells. *Endoplasm Reticul Stress Dis.* 2014; 1(1): 18-26.
82. Minchenko DO, Karbovskiy LL, Danilovskiy SV, Moenner M, Minchenko OH. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the expression of retinoblastoma and retinoblastoma-related genes in ERN1 knockdown glioma U87 cell line. *Am J Mol Biol.* 2012; 2(1): 21-31.
83. Minchenko DO, Kharkova AP, Karbovskiy LL, Minchenko OH. Expression of insulin-like growth factor binding protein genes and its hypoxic regulation in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. *Endocr Regul.* 2015; 49(2): 73-83.
84. Minchenko OH, Kharkova AP, Minchenko DO, Karbovskiy LL. Effect of hypoxia on the expression of genes that encode some IGFBP and CCN proteins in U87 glioma cells depends on IRE1 signaling. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(6): 52-63.
85. Zeng L, Li T, Xu DC, Liu J, Mao G, Cui MZ, Fu X, Xu X. Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein. *J Biol Chem.* 2012; 287(34): 29125-29133.
86. Li T, Su L, Lei Y, Liu X, Zhang Y, Liu X. DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2015; 290(17): 11108-11118.
87. Edagawa M, Kawauchi J, Hirata M, Goshima H, Inoue M, Okamoto T, Murakami A, Maehara Y, Kitajima S. Role of activating transcription factor 3 (ATF3) in endoplasmic reticulum (ER) stress-induced sensitization of p53-deficient human colon cancer cells to tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) by zerumbone and celecoxib. *J Biol Chem.* 2014; 289(31): 21544-21561.
88. Liu J, Edagawa M, Goshima H, Inoue M, Yagita H, Liu Z, Kitajima S. Role of ATF3 in synergistic cancer cell killing by a combination of HDAC inhibitors and agonistic anti-DR5 antibody through ER stress in human colon

- cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(2): 320-326.
89. Farooqi AA, Li KT, Fayyaz S, Chang YT, Ismail M, Liaw CC, Yuan SS, Tang JY, Chang HW. Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Tumour Biol.* 2015; 36(8): 5743-5752.
90. Hu R, Du Q, Yin X1, Li J, Wang T, Zhang L. Agonist antibody activates death receptor 6 downstream signaling involving TRADD recruitment. *FEBS Lett.* 2014; 588(3): 401-407.
91. Johnson GG, White MC, Grimaldi M. Stressed to death: targeting endoplasmic reticulum stress response induced apoptosis in gliomas. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(3): 284-292.
92. Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis. *Biofactors.* 2013; 39(4): 343-354.
93. Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol.* 2013; 169(8): 1723-1744.

Received 02.09.2016

EXPERIMENTAL WORKS

UDC 577.161.2:616.71-007.234+577.175.5:576.385

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj88.05.038>

PREDNISOLONE AND VITAMIN D₃ MODULATE OXIDATIVE METABOLISM AND CELL DEATH PATHWAYS IN BLOOD AND BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS

I. O. SHYMANSKYI, O. O. LISAKOVSKA, A. O. MAZANOVA,
D. O. LABUDZYNSKYI, A. V. KHOMENKO, M. M. VELIKY

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ishymansk@inbox.ru*

The study was designed to evaluate reactive oxygen species (ROS)/nitric oxide (NO) formation and apoptotic/necrotic cell death elicited by prednisolone in peripheral blood and bone marrow mononuclear cells and to define the efficacy of vitamin D₃ to counter glucocorticoid (GC)-induced changes. It was shown that prednisolone (5 mg per kg of female Wistar rat's body weight for 30 days) evoked ROS and NO overproduction by blood mononuclear cells (monocytes and lymphocytes) that correlated with increased cell apoptosis and necrosis. In contrast, prednisolone did not affect ROS/NO levels in bone marrow mononuclear cells that corresponded to lower level of cell death than in the control. Alterations of prooxidant processes revealed in mononuclear cells and associated with GC action were accompanied by vitamin D₃ deficiency in animals, which was assessed by the decreased level of blood serum 25-hydroxvitamin D₃ (25OHD₃). Vitamin D₃ administration (100 IU per rat daily for 30 days, concurrently with prednisolone administration) completely restored 25OHD₃ content to the control values and significantly reversed ROS and NO formation in blood mononuclear cells, thus leading to decreased apoptosis. In bone marrow, vitamin D₃ activated ROS/NO production and protein nitration that may play a role in prevention of prednisolone-elicited increase in bone resorption. We conclude that vitamin D₃ shows a profound protection against GC-associated cellular damage through regulating intracellular ROS/NO formation and cell death pathways.

Key words: osteoporosis, prednisolone, vitamin D₃, blood/bone marrow mononuclear cells, reactive oxygen/nitrogen species, nitric oxide, apoptosis, necrosis.

Several adverse effects caused by long-term glucocorticoid (GC) therapy are emerging health problem that limits GC use for the treatment of patients with various inflammatory and autoimmune diseases, allergies and lymphoproliferative disorders. Osteoporosis is among the most devastating side effects of chronic GC administration associated with significant alterations of mineral metabolism and bone formation [1]. Glucocorticoid-induced osteoporosis causes an increase in bone fractures, delays healing of fractures, and affects the quality of life.

It is known that osteoblasts, together with osteoclasts, control the amount of bone tissue and regulate bone remodeling. The underlying mechanism of osteoporosis is associated with the prevalence of osteoclast-dependent bone resorption over its osteo-

blast-mediated formation and mineralization leading to loss of bone mass and mineral density [1]. GCs modify osteoblastic and osteoclastic cell differentiation, number, and function either directly or via influencing the recruitment of their precursors from the bone marrow [2]. Osteoblasts were shown to be originated from bone marrow mesenchymal progenitor cells. Multinucleated osteoclasts are the principle bone resorbing cells that derive from hematopoietic precursors of the monocytic lineage common to peripheral blood monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells. Pre-osteoclasts circulate in monocyte fraction of the peripheral blood until they reach the sites of bone resorption.

A common pathologic feature of GC-induced cell disturbances is the development of oxidative stress. Although the effects of prednisolone on cell

function are largely mediated through glucocorticoid receptors and metabolic changes, recent studies have demonstrated the involvement of reactive oxygen (ROS)/nitrogen species (RNS)-induced modifications of critical cellular macromolecules in modulation of signal transduction cascades and cell death pathways [3]. We have previously described and discussed the pathological role of synthetic glucocorticoid prednisolone in activation of ROS/RNS-mediated hepatocellular death [4]. Currently, insufficient attention was focused on the generation of active metabolites of oxygen and nitrogen in progenitor cells as one of the major determinants contributing to cell dysfunction and abnormalities of bone remodeling.

Alleviating excessive prooxidant reactions might be a promising strategy to prevent or delay the onset of pathological changes induced by GCs. The positive effects of vitamin D₃ (cholecalciferol) in maintaining functional activity of different cells may be useful in correcting cellular dysfunction caused by glucocorticoid therapy. Being a ligand for nuclear receptor (VDR), the hormonally active form of vitamin D₃ (1,25 (OH)₂D₃) regulates the expression of a variety of nuclear genes [5]. The recent discovery of VDR in different cell types has expanded the known function of 1,25(OH)₂D₃ from a role in calcium homeostasis to physiological process of bone formation/resorption and immune cell modulation. Vitamin D₃ acting via VDR has been implicated in the mechanisms by which cells proliferate, differentiate, become functionally active or die [6]. Nevertheless, the possible pathogenetic role of impaired vitamin D₃ metabolism in the mechanism of GC-induced side effects on bone tissue remodeling still requires better understanding.

Growing evidence suggests that inadequate supply with vitamin D₃ is a crucial factor that significantly increases the risk of a number of common pathologies, such as cancer, cardiovascular, infectious, autoimmune and diabetes mellitus [6]. We have recently found that chronic liver injury associated with long-term prednisolone action can be a major cause of vitamin D₃ deficiency because liver is known to play a principle role in the synthesis of the prohormone – 25OHD₃ [4]. Available scientific data also show that vitamin D₃ possesses direct and indirect antioxidant effects in normal and diseased states, effectively inhibiting lipid peroxidation and oxidative damage to proteins in cells of different types, that leads at the structural level to improvement and better preservation of cellular integrity (cell protective effect) and restoration of functional activity of

damaged cells [7]. Vitamin D₃ is thought to provide anti-inflammatory, immunomodulatory and cytoprotective effects in various tissues [5, 6]. However, there is a lack of consistent information regarding the vitamin D₃ ability to prevent ROS/RNS-mediated cell dysfunction associated with the deleterious effects of long-term prednisolone administration in bone marrow.

The present study was therefore aimed at investigating prednisolone-associated modulation of ROS/nitric oxide (NO) formation and cell death pathways in mononuclear cells from peripheral blood and bone marrow and to evaluate how vitamin D₃ administered concurrently with prednisolone attenuates GC-induced disturbances.

Materials and Methods

Animals. Female Wistar rats weighing 100 ± 5 g had unrestricted access to food and water and were housed in temperature and humidity controlled rooms. Animals were randomly divided into 3 groups: 1 – control rats (*n* = 8); 2 – rats that orally received prednisolone at a dose 5 mg/kg of body weight (daily for 30 days, *n* = 8); 3 – rats that orally received prednisolone at a dose 5 mg/kg of body weight and 100 IU of vitamin D₃ (daily for 30 days, *n* = 8). All animal procedures were performed in accordance with international recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Research and Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), General Ethical Principles of Animal Experimentation, approved by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001).

Peripheral blood and bone marrow mononuclear cell isolation. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using Histopaque-1083 (Sigma, USA) in accordance with the standard manufacturer's protocol. Bone marrow cells were obtained as briefly described below. Rat femurs were excised, dissected and bone marrow cells were harvested by repeated flushing of the femoral cavities with 1 ml syringe using phosphate-buffered saline (PBS) 10 times. Total marrow isolate was collected by centrifugation at 400 g for 1 min at 4 °C and resuspended in PBS. The resultant cell suspension was filtered through successive 70 and 40 μm nylon cell strainers followed by washes at 400 g for 5 min at 4 °C. Subsequently, red blood cells (RBC) were lysed with RBC Lysis Buffer and the bone marrow mononuclear cells were washed twice, centrifuged and final pellet was resuspended in PBS.

Serum 25OHD₃. Blood was obtained by cardiac puncture for mononuclear cells isolation and analysis of serum 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃). The content of 25-hydroxyvitamin D₃ in serum was assayed using a commercial ELISA kit (The IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA, USA) as described by the manufacturer's protocol.

DCFH oxidation measurement. Fluorescence detection of intracellular reactive oxygen species (ROS) production was analyzed using the fluorogenic probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma, USA). ROS generated by cells oxidizes DCFH-DA to produce highly fluorescent green compound (2',7'-dichlorofluorescein). Isolated cells (approximately $0.5 \cdot 10^6$) were incubated in Hank's balanced salt solution with DCFH-DA concentration of 10 μ M for 30 min (37 °C) in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Subsequently, the cells were washed, centrifuged, resuspended and fluorescence was measured with an EPICS XLTM flow cytometer (Beckman Coulter, USA) using the excitation/emission wavelengths of 485/530 nm. Results were expressed as a relative fluorescence of the samples in comparison to control. Analysis of the results of all studies obtained by flow cytometry was performed using the FCS Express V3 software.

Evaluation of nitric oxide synthesis. Intracellular nitric oxide production in isolated cells was estimated using the specific fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; Sigma, USA). Upon entering the cells, the diacetate bond of the probe is cleaved by intracellular esterases liberating DAF, which specifically reacts with the nitric oxide (NO), producing the fluorescent 4,5-diaminofluorescein triazole as an indicator of NO production in the cell. Immediately after isolation, the cells (approximately $0.5 \cdot 10^6$) were incubated in Hank's balanced salt solution with dye concentration of 10 μ M for 30 min (37 °C) in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The fluorescence intensity was measured by EPICS XLTM flow cytometer (Beckman Coulter, USA) using the excitation/emission wavelengths of 495/515 nm. Results were normalized to control cells and expressed as a relative fluorescence intensity.

Detection of cell death (apoptosis vs. necrosis assay). Annexin V-EGFP/propidium iodide (PI) double staining was used to differentiate apoptotic vs necrotic cells. In brief, 5 μ l of Annexin V-EGFP (Abcam, USA) and 5 μ l of PI (Sigma, USA) (50 μ g/ml) were diluted with 500 μ l of binding buffer and then the mixture was added to the samples ($5 \cdot 10^5$ bone

marrow or blood mononuclear cells). Cells were incubated at room temperature, in the dark, for 15 min and analyzed by an EPICS XLTM flow cytometer (Beckman Coulter, USA) using the excitation/emission wavelengths of 488/530 nm and 530/645 nm, respectively. A minimum of 10,000 cells in gated region was analyzed and results were interpreted by the percentage of total cells appearing in each quadrant.

Western blot analysis of 3-nitrotyrosine. Whole bone marrow cell extracts were prepared as described previously [8]. Bone marrow cells isolated from rats were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (PIC, Sigma, USA). Samples of 50 μ g of protein were loaded on 10% SDS polyacrylamide gel. After electrophoresis, the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. For protein signal detection, the samples were blocked with a phosphate-buffered saline containing 5% fat-free milk and 0.05% Tween-20 for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated with anti-3-nitrotyrosine antibody (1:4000; Millipore, USA) overnight at 4 °C. After extensive washing, the membrane was incubated with horseradish-peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibody at a dilution of 1:1000 for 1 h at room temperature. The bands were visualized by enhanced chemoluminescence agents p-coumaric acid (Sigma, USA) and luminol (AppliChem GmbH, Germany). To provide equal protein loading, membranes were incubated with anti- β -actin peroxidase conjugated antibody (1:50 000; Sigma, USA) for 1 h. The immunoreactive bands were quantified with Gel-Pro Analyzer 32.

Statistics. Data are expressed as mean \pm SEM for at least six rats per group. Student's *t*-test was used for all analyses and values of $P < 0.05$ were considered to indicate statistically significant difference. All calculations were performed using the Microsoft Excel software for *t*-test analysis.

Results and Discussion

As a close relation exists between vitamin D₃ deficiency and increased risk of most deleterious side effects induced by glucocorticoids, we conducted an assessment of 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) level in blood serum as a reliable biomarker of vitamin D₃ bioavailability. Those rats that chronically received prednisolone demonstrated severe vitamin D₃ deficiency, since more than 2.5-fold decrease in 25OHD₃ was found in blood serum compared with the control group (Fig. 1).

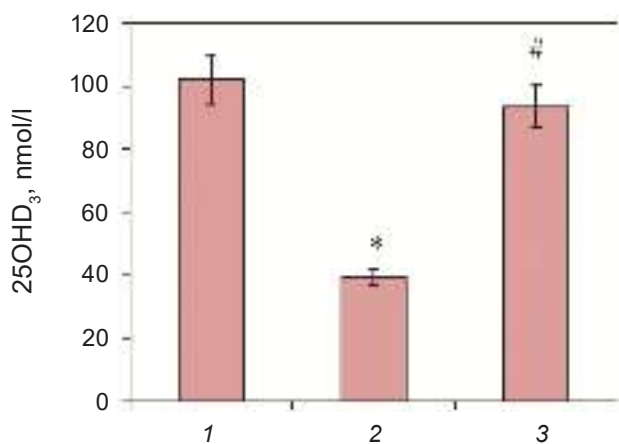


Fig. 1. Effects of prednisolone and vitamin D₃ administration on 25-hydroxyvitamin D₃ level in blood serum of three animal groups: 1 – control; 2 – prednisolone administration; 3 – prednisolone and vitamin D₃ administration. All data are presented as mean \pm SEM ($n = 8$); * $P < 0.05$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. prednisolone administration

These results indicate the negative effect of prednisone on the metabolism of cholecalciferol, which may be linked to significant changes in protein content and activity of vitamin D₃ 25-hydroxylase isoenzymes in liver cells that we have previously established [9]. Vitamin D₃ treatment led to complete restoration of 25OHD₃ level. On the background of prednisolone-induced impairment of vitamin D₃ metabolism and D₃-deficiency significant changes in oxidative metabolism were detected.

Oxidative/nitrosative stress associated with increased generation of reactive oxygen and nitrogen species as well as impaired effectiveness of antioxidant defense has recently been recognized as one of the key mechanisms in the pathogenesis of various disorders associated with 25OHD₃ deficiency [10]. To clarify whether alterations of oxidative metabolism are involved in the development of cellular

dysfunction associated with GCs, we examined the levels of free radicals formation in mononuclear cells isolated from peripheral blood and bone marrow using DCFH-DA. As DCFH-DA has no specificity in detecting actual oxygen species [11], we use the term ROS as it is generally accepted to encompass the initial species generated by oxygen reduction, as well as their secondary reactive products. DCFH oxidation that reflects the intensity of pro-oxidant processes in cells, are presented in Table 1.

It was found that chronic administration of prednisolone stimulated ROS production in isolated blood mononuclear cells by 35% compared with the control animals. Vitamin D₃ treatment showed antagonistic effect on the level of ROS generation induced by glucocorticoid hormone. In contrast to mononuclear blood cells, the rate of ROS formation in bone marrow cells remained unchanged after prednisolone administration. Despite the fact that prednisolone had no influence on ROS production in bone marrow cells, vitamin D₃ treatment slightly increased the level of intracellular oxidants when compared with the control and GC-administered groups.

Cytotoxic and mutagenic effects of ROS/RNS are caused by increased free radical oxidation of physiologically important macromolecules. Moreover, redox modulation of cellular signaling by NO is central to regulation of cell proliferation, differentiation and death pathways. To assess the potential involvement of nitric oxide and its metabolites in the mechanism of prednisolone-induced changes we next investigated the levels of NO production by isolated cells. It was found using NO-sensitive fluorescent probe, DAF-2DA, that administration of prednisolone results in a significant elevation of NO synthesis in blood mononuclear cells (by 30%) as compared with controls (Fig. 2).

Vitamin D₃ diminished the level of NO formation in these cells compared with the group of animals administered with the glucocorticoid. Similarly

Table 1. Intracellular ROS production in mononuclear cells isolated from rat bone marrow and peripheral blood after prednisolone and vitamin D₃ administration, ($M \pm m$, $n = 8$)

Groups	Control, a.u.	Prednisolone administration, a.u.	Prednisolone and vitamin D ₃ administration, a.u.
Mononuclear cells from peripheral blood	452.3 \pm 21.2	668.7 \pm 46.31*	535.1 \pm 23.6#
Mononuclear cells from bone marrow	150.5 \pm 9.9	140.9 \pm 10.4	186.3 \pm 13.7#

Note: the ROS levels are shown as mean (fluorescence intensity, a.u. – arbitrary units) \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. prednisolone administration.

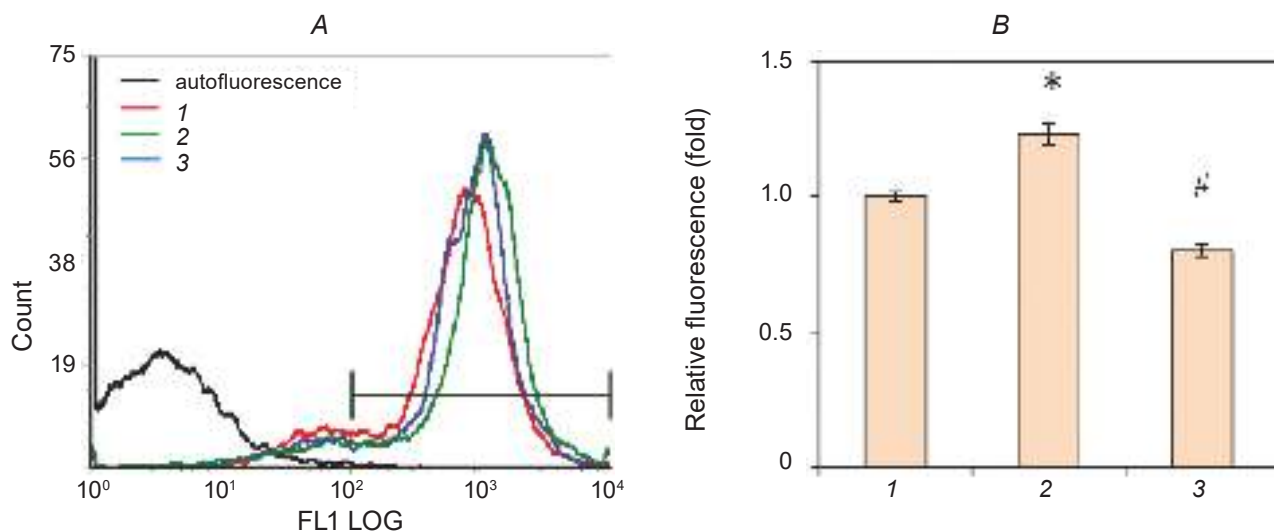


Fig. 2. Effects of prednisolone and vitamin D₃ administration on nitric oxide formation in rat peripheral blood mononuclear cells. Representative histograms of DAF fluorescence (count – the number of events; FL1 LOG – fluorescence intensity) (A); quantification of DAF oxidation documented by flow cytometry analysis: 1 – control; 2 – prednisolone administration; 3 – prednisolone and vitamin D₃ administration (B). Results are shown as mean ± SEM (n = 8); * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. prednisolone administration

to what we observed in the case of DCFH oxidation, no changes in nitric oxide formation were seen in bone marrow cells in the group of animals that received prednisolone (Fig. 3). Vitamin D₃ treatment enhanced NO production to the level almost 2.5-fold as much as in the control group.

Given that free oxygen and nitrogen species under the conditions of their excess production can mediate either regulatory or cytotoxic effects on cells, it was essential to define whether dependence exists between the intensity of ROS/RNS formation and cell death following prednisolone and vi-

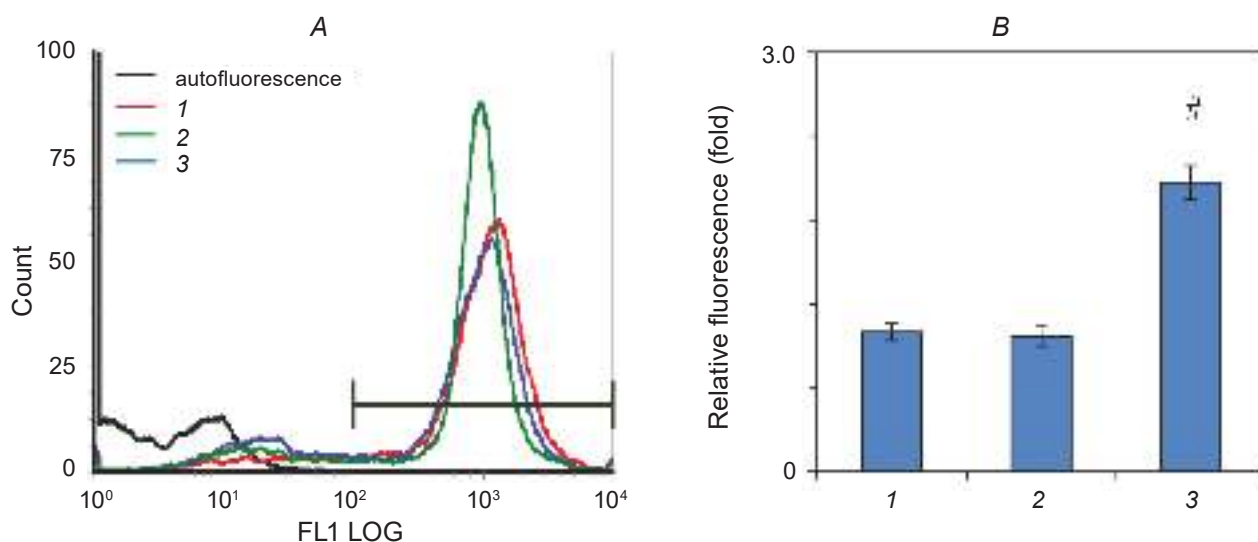


Fig. 3. Effects of prednisolone and vitamin D₃ administration on nitric oxide formation in mononuclear cells isolated from rat bone marrow. Representative histograms of DAF fluorescence (count – the number of events; FL1 LOG – fluorescence intensity) (A); quantification of DAF oxidation documented by flow cytometry analysis: 1 – control; 2 – prednisolone administration; 3 – prednisolone and vitamin D₃ administration (B). Results are shown as mean ± SEM (n = 8); * P < 0.05 vs. control, # P < 0.05 vs. prednisolone administration

tamin D₃ administration. Quantitative evaluation of apoptosis and necrosis using Annexin V-EGFP/PI double staining was analyzed by flow cytometry. As shown in Table 2, the rate of blood mononuclear cells with apoptosis and necrosis raised to 14.70 and 10.52% of total cells after prednisolone administration compared with 11.50 and 7.91% in control rats, respectively. Treatment with vitamin D₃ prevented prednisolone-induced apoptosis without affecting cell necrosis. Prednisolone provided opposite effect on cell death within the bone marrow as compared with peripheral blood mononuclear cells. Following prednisolone administration, a significant reduction of Annexin V-EGFP⁺ and PI⁺ cells to 6.87 and 0.95% from 12.85 and 2.07% in control was established. Vitamin D₃ caused a marked increase in apoptotic cell death compared with prednisolone without influencing the number of necrotic cells.

Apoptosis in rat bone marrow cells after vitamin D₃ treatment can potentially be ascribed to excess ROS/RNS production. To further confirm that the occurring cell death correlates with oxidative-nitrosative damage to biomolecules, we measured the level of 3-nitrotyrosine by western blotting (Fig. 4).

It is known that tyrosine residues of proteins are sensitive targets for the active nitrating agent peroxynitrite (ONOO⁻), which is formed by interaction of nitric oxide with superoxide anion radicals. Therefore, the content of 3-nitrotyrosine is regarded as a specific and reliable marker of nitrosative stress. As Fig. 4 depicts, there was no difference in

protein nitration between prednisolone-administered and control groups. Compared with prednisolone-administered rats, bone marrow cells displayed a 2.3-fold induction of nitrosylated proteins after cholecalciferol treatment that corresponds to the level of ROS and NO production by these cells.

Collectively, our findings indicate the development of essential prednisolone-induced alterations of oxidative metabolism and cell death pathways that can be discussed from two following points of view, namely (1) how discrepancies in the effects of prednisolone and cholecalciferol on ROS/RNS production in blood cells and bone marrow cells can be interpreted; and (2) what the functional consequences of the described disturbances could be for bone formation/resorption.

Revealed alterations of oxidative metabolism elicited by chronic prednisolone administration are clearly consistent with the results of cell dysfunction published previously [3, 12]. Excessive GCs-evoked production of ROS and oxidative stress were observed in a variety of cell types [13, 14]. By contrast, recent evidence also suggests a protective role of hormonal therapy against oxidative damage to cells [15]. Discrepancies in glucocorticoid ability to modulate pro-/antioxidant status of cells could be accounted for by different experimental conditions. They include doses and administration routes, experimental models, endogenous versus exogenous GC excess, underlying disease for which GCs were administered; and most importantly, there is increa-

Table 2. Evaluation of apoptotic (Annexin V-EGFP-positive) and necrotic (PI-positive) mononuclear cells isolated from rat bone marrow and peripheral blood after prednisolone and vitamin D₃ administration, ($M \pm m$; $n = 8$)

Group	Control		Prednisolone administration		Prednisolone and vitamin D ₃ administration	
	Annexin V-EGFP ⁺ , %	PI ⁺ , %	Annexin V-EGFP ⁺ , %	PI ⁺ , %	Annexin V-EGFP ⁺ , %	PI ⁺ , %
Blood mononuclear cells	11.50 ± 1.02	7.91 ± 0.45	14.70 ± 1.31*	10.52 ± 0.84*	9.31 ± 0.61 [#]	9.24 ± 0.55
Bone marrow mononuclear cells	12.85 ± 1.09	2.07 ± 0.13	6.87 ± 0.49*	0.95 ± 0.06*	8.12 ± 0.63 [#]	0.78 ± 0.04

Note: Mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood were stained by Annexin V-EGFP and PI and analyzed by flow cytometry. Summarized data of all measurements are presented as mean (fluorescence intensity, a.u.) ± SEM, * $P < 0.05$ vs. control, [#] $P < 0.05$ vs. prednisolone administration.

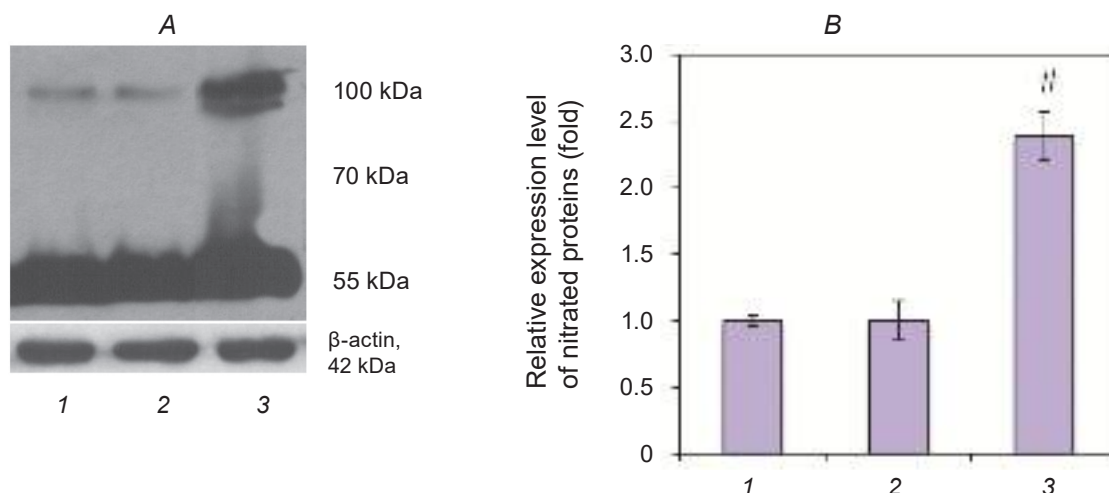


Fig. 4. Effects of prednisolone and vitamin D₃ administration on the levels of nitrated proteins in bone marrow: 1 – control; 2 – prednisolone administration; 3 – prednisolone and vitamin D₃ administration. Western blot analysis of total bone marrow lysates was performed using the antibody against 3-nitrotyrosine. Representative immunoblot (A) and quantification of three experiments (B) are shown. The mean protein expression level was quantified as the sum of the densities of immunoreactive bands in each track corresponding to proteins with molecular masses from 50 to 130 kDa. Protein levels were normalized to β -actin. All data are shown as mean \pm SEM ($n = 6$); * $P < 0.05$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. prednisolone administration

sing evidence that early effects may be opposite to effects of prolonged GC action in therapeutically relevant doses.

We can hypothesize that negative impact of chronically administered prednisolone on cellular function may be mediated via impaired interaction of glucocorticoid receptors with prooxidant and/or inflammatory transcription factors to repress transcriptional activity, i.e. transrepression. More recently it has been proposed that transrepression mediates most of the beneficial effects of GCs, whereas transactivation promotes most of their adverse effects [16]. The possible reason for prednisolone-associated cell injury may lie in the inhibitory glucocorticoid action on the expression of factors that not only facilitate ROS/RNS formation but also reduce or limit oxidative stress.

In the present study we followed the prevention paradigm to diminish pathogenic changes caused by chronic administration of prednisolone using concurrent vitamin D₃ treatment. Our results have clearly shown the antioxidant effect of vitamin D₃ in blood mononuclear cells, while prooxidant action of cholecalciferol on bone marrow progenitor cells was observed. The potent antioxidant activity of vitamin D₃ has been reported by others [6, 7]. At the same time several studies also suggest an increase in ROS/RNS production [17]. The dual behavior re-

vealed in different tissues shows that the outcome from challenge with an oxidative stress may have relevance to the integration of a series of intracellular signaling mechanisms that depending on cell type involved could both protect against or promote oxidative-nitrosative stress. Modulation of oxidative metabolism by vitamin D₃ can largely be mediated by the effects of its hormonally active metabolite – 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through VDR [5]. Overall, vitamin D₃ may effectively regulate the rate of free radicals formation in liver cells and their survival via changes of pro/antioxidant and pro/antiapoptotic genes expression [5-7].

Our data may also have significance for understanding a pivotal role of ROS/RNS in osteoblast and osteoclast formation from progenitor marrow cells in the regulation of bone remodeling by steroids. Although glucocorticoids were shown to inhibit bone formation through increasing the death of mature osteoblasts and blocking osteoblastic differentiation from precursor cells, the character of steroid action on osteoclast activity and bone resorption is still a controversial subject. Sustained stimulation of bone matrix degradation by isolated osteoclasts incubated with GCs as well as their cytotoxic effects on osteoclasts have been reported in recent studies [18]. The increase in osteoclast-mediated bone resorption is likely responsible for the initial bone destruction

after GC administration. In contrast, chronic exposure of high GC doses has inhibiting effects both on bone formation and resorption [19] that largely corresponds to experimental design of the present investigation. Notably, prednisolone-induced pathological changes in bone tissue were confirmed in our previous studies by assessment of bone formation/resorption markers indicative of osteoporosis development.

In spite of the fact that there is still no clear explanation for a direct effect of GCs on osteoclastic precursors, GCs could modulate recruitment of osteoclasts. Our findings may suggest that pre-osteoclast maturation rather than their formation is impaired in GC-induced osteoporosis. Demonstrated here decreasing effect of prednisolone on apoptosis of bone marrow cells that occurs concomitantly with unchanged rate of ROS/RNS production, most likely reflects the enhancement of bone marrow cells proliferation. As osteoclasts are formed from marrow-derived cells that circulate in the monocyte fraction, we also isolated blood mononuclear cells enriched in monocytes to evaluate oxidative metabolism and apoptosis. An increase in oxidative stress and apoptotic death of blood mononuclears suggests a possible prednisolone-induced inhibition of osteoclast differentiation from an early stage of circulating precursor cells. Together, these data are in accordance with a systemic suppression of osteoclast activation by prednisolone that can be related to glucocorticoid influence on early precursors of osteoclasts in the bone marrow and their subsequent differentiation rather than on mature osteoclasts of bone tissue.

It seems quite likely that vitamin D₃ can abrogate prednisolone-induced disruptions of key steps in the differentiation and activation of osteoblasts or/and osteoclasts by modulating intracellular redox state as well as survival and death pathways in progenitor cells. Based on the evidence that reactive oxygen species act as signal mediators in cell differentiation, the established ability of vitamin D₃ to induce ROS and NO production in bone marrow may suggest additional role for cholecalciferol, beyond its capacity to increase bone mineralization, to promote osteoblast/osteoclast differentiation from hematopoietic precursors. Simultaneous increase in osteoblast and osteoclast formation with subsequent activation of these cells naturally can lead to augmentation of bone turnover that ameliorate prednisolone-evoked loss of bone mass and mineral density. Because of the recent observation that nitric oxide

can counter prednisolone-induced osteoporosis [20], induction of NO synthesis in bone marrow cells by cholecalciferol can also be referred to as an important mechanism of osteotropic action of vitamin D₃.

In summary, the present study provides support for ROS/RNS and mononuclear cells from blood and bone marrow as therapeutic targets in prednisolone-induced osteoporosis. It was shown that ROS/nitric oxide production and cell death are differentially regulated by prednisolone depending on cell type. All the alterations associated with GC action were accompanied by vitamin D₃ deficient state of animal organism. Vitamin D₃ co-administration with prednisolone and restoration of 25OHD₃ content may prevent osteoporosis by normalizing impaired oxidative metabolism in mononuclear blood cells and stimulating NO pathway in bone marrow cells. This indicates that vitamin D₃ has potential usefulness in the prevention and/or treatment of pathological changes associated with the chronic administration of glucocorticoids.

ПРЕДНІЗОЛОН І ВІТАМІН D₃ МОДУЛЮЮТЬ ОКИСНИЙ МЕТАБОЛІЗМ І ШЛЯХИ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ МОНОНУКЛЕАРІВ КРОВІ ТА КІСТКОВОГО МОЗКУ

*I. O. Шиманський, О. О. Лісаковська,
А. О. Мазанова, Д. О. Лабудзинський,
А. В. Хоменко, М. М. Великий*

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна,
НАН України, Київ;
e-mail: ishymansk@inbox.ru

Проведено оцінку інтенсивності генерування активних форм кисню (ROS)/оксида азоту (NO) і шляхів апоптичної/некротичної загибелі мононуклеарів периферичної крові та кісткового мозку за дії преднізолону і встановлено ефективність вітаміну D₃ у запобіганні розвитку глюкокортикоїд (GC)-індукованих порушень. Показано, що введення преднізолону (5 мг на 1 кг маси тіла шурів-самиць лінії Wistar протягом 30 днів) зумовлювало надмірне продукування ROS та NO в мононуклеарах крові (моноцити і лімфоцити), що корелювало з підвищеними рівнями апоптичної і некротичної загибелі клітин. На противагу цьому, преднізолон не впливав на генерування ROS/NO в монону-

клеарах кісткового мозку, що приводило до зниження рівня загибелі клітин у порівнянні з контролем. Виявлені зміни прооксидантних процесів супроводжувалися розвитком дефіциту вітаміну D₃ у тварин, який оцінювали за зниженням концентрації сироваткового 25OHD₃. Введення щурам вітаміну D₃ (100 МО в день протягом 30 днів одночасно із введенням преднізолону) повністю відновлювало вміст 25OHD₃ до рівня контрольних значень та істотно знижувало продукування ROS і NO в клітинах крові, що приводило до зниження їх апоптозу. У клітинах кісткового мозку введення вітаміну D₃ спричинювало посилене утворення ROS/NO та нітрування протеїнів, що може відігравати роль у запобіганні індукованої преднізолоном інтенсифікації резорбції кісткової тканини. Таким чином, вітамін D₃ ефективно протидіє пошкодженню клітин, асоційованому із тривалим введенням преднізолону, забезпечуючи регуляторний вплив на формування ROS/NO та шляхи клітинної загибелі.

Ключові слова: остеопороз, преднізолон, вітамін D₃, мононуклеари крові/кісткового мозку, активні форми кисню/азоту, оксид азоту, апоптоз, некроз.

ПРЕДНИЗОЛОН И ВИТАМИН D₃ МОДУЛИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И ПУТИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА

*И. А. Шиманский, О. А. Лисаковская,
А. А. Мазанова, Д. О. Лабудзинский,
А. В. Хоменко, Н. Н. Великий*

Институт биохимии им. А. В. Палладина,
НАН Украины, Киев;
e-mail: ishymanisk@inbox.ru

Проведена оценка интенсивности генерации активных форм кислорода (ROS)/оксида азота (NO) и путей апоптической/некротической гибели мононуклеарных клеток периферической крови и костного мозга на фоне введения преднизолона, а также определена эффективность витамина D₃ в предотвращении развития глюкокортикоид (GC)-индуцированных изменений. Показано, что преднизолон (5 мг на 1 кг массы тела самок крыс линии Wistar в течение

30 дней) вызывал чрезмерную продукцию ROS и NO в мононуклеарах крови (моноциты и лимфоциты), что коррелировало с повышенными уровнями апоптической и некротической гибели клеток. В противоположность этому, преднизолон не влиял на генерирование ROS/NO в мононуклеарах костного мозга, что приводило к снижению уровня гибели клеток по сравнению с контролем. Выявленные изменения прооксидантных процессов сопровождались развитием дефицита витамина D₃ у животных, который оценивали по снижению концентрации сывороточного 25OHD₃. Введение крысам витамина D₃ (100 МЕ в день в течение 30 дней одновременно с введением преднизолона) полностью восстанавливало содержание 25OHD₃ до уровня контрольных значений и значительно снижало выработку ROS и NO в клетках крови, что приводило к снижению апоптоза. В клетках костного мозга введение витамина D₃ вызывало усиленное образование ROS/NO и нитрование протеинов, что может играть роль в предотвращении индуцированного преднизолоном повышения резорбции костной ткани. Таким образом, витамин D₃ эффективно противодействует повреждению клеток, ассоциированному с продолжительным введением преднизолона, обеспечивая регуляторное воздействие на формирование ROS/NO и пути клеточной гибели.

Ключевые слова: остеопороз, преднизолон, витамин D₃, мононуклеарные клетки крови/костного мозга, активные формы кислорода/азота, оксид азота, апоптоз, некроз.

References

1. Hartmann K, Koenen M, Schauer S, Wittig-Blaich S, Ahmad M, Baschant U, Tuckermann JP. Molecular actions of glucocorticoids in cartilage and bone during health, disease, and steroid therapy. *Physiol Rev.* 2016; 96(2): 409-447.
2. Buehring B, Viswanathan R, Binkley N, Busse W. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on effects and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132(5): 1019-1030.
3. Lin H, Gao X, Chen G, Sun J, Chu J, Jing K, Li P, Zeng R, Wei B. Indole-3-carbinol as inhibitors of glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblastic cells through blocking ROS-mediated Nrf2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 460(2): 422-427.

4. Shymanskyi IO, Khomenko AV, Lisakovska OO, Labudzynski DO, Apukhovska LI, Veliky MM. The ROS-generating and antioxidant systems in the liver of rats treated with prednisolone and vitamin D₃. *Ukr Biochem J*. 2014; 86(5): 111-125. (In Ukrainian).
5. Saccone D, Asani F, Bornman L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene*. 2015; 561(2): 171-180.
6. Basit S. Vitamin D in health and disease: a literature review. *Br J Biomed Sci*. 2013; 70(4): 161-172.
7. Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 437(1): 7-11.
8. Cheng Q, Barboule N, Frit P, Gomez D, Bombarde O, Couderc B, Ren GS, Salles B, Calsou P. Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(22): 9605-9619.
9. Khomenko AV. Cholecalciferol hydroxylation in rat hepatocytes under the influence of prednisolone. *Ukr Biokhim Zhurn*. 2013; 85(3): 90-95. (In Ukrainian).
10. Keeney JT, Förster S, Sultana R, Brewer LD, Latimer CS, Cai J, Klein JB, Porter NM, Butterfield DA. Dietary vitamin D deficiency in rats from middle to old age leads to elevated tyrosine nitration and proteomics changes in levels of key proteins in brain: implications for low vitamin D-dependent age-related cognitive decline. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65: 324-334.
11. Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, Mann GE, Radi R, Roberts LJ 2nd, Vina J, Davies KJ. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med*. 2015; 78: 233-235.
12. Shymanskyi IO, Lisakovska OO, Mazanova AO, Riasniy VM, Veliky MM. Effects of vitamin D₃ and vitamin E on prednisolone-induced alterations of phagocyte function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(7): 1379-1383.
13. Shi J, Wang L, Zhang H, Jie Q, Li X, Shi Q, Huang Q, Gao B, Han Y, Guo K, Liu J, Yang L, Luo Z. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. *Bone*. 2015; 79: 222-232.
14. Omori Y, Mano T, Ohtani T, Sakata Y, Takeda Y, Tamaki S, Tsukamoto Y, Miwa T, Yamamoto K, Komuro I. Glucocorticoids induce cardiac fibrosis via mineralocorticoid receptor in oxidative stress: contribution of elongation factor eleven-nineteen lysine-rich leukemia (ELL). *Yonago Acta Med*. 2014; 57(3): 109-116.
15. Olteanu D, Filip A, Mureşan A, Nagy A, Tabaran F, Moldovan R, Decea N, Catoi C, Clichici S. The effects of chitosan and low dose dexamethasone on extrahepatic cholestasis after bile duct ligation in Wistar rats. *Acta Physiol Hung*. 2012; 99(1): 61-73.
16. Stahn C, Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008; 4(10): 525-533.
17. Rizvi A, Farhan M, Naseem I, Hadi SM. Calcitriol-copper interaction leads to non enzymatic, reactive oxygen species mediated DNA breakage and modulation of cellular redox scavengers in hepatocellular carcinoma. *Apoptosis*. 2016; 21(9): 997-1007.
18. Benvenuti S, Brandi ML. Corticosteroid-induced osteoporosis: pathogenesis and prevention. *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18(4 Suppl 20): S64-S66.
19. Kim HJ. New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep*. 2010; 43(8): 524-529.
20. Pennisi P, D'Alcamo MA, Leonetti C, Clementi A, Cutuli VM, Riccobene S, Parisi N, Fiore CE. Supplementation of L-arginine prevents glucocorticoid-induced reduction of bone growth and bone turnover abnormalities in a growing rat model. *J Bone Miner Metab*. 2005; 23(2): 134-139.

Received 28.09.2016

CALIX[4]ARENE C-90 AND ITS ANALOGS ACTIVATE ATPase OF THE MYOMETRIUM MYOSIN SUBFRAGMENT-1

R. D. LABYNTSEVA¹, O. V. BEVZA¹, K. V. LYTVYN¹, M. O. BOROVYK¹,
R. V. RODIK², V. I. KALCHENKO², S. O. KOSTERIN¹

¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua;*

²*Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua*

Numerous female reproductive abnormalities are consequences of disorders in uterus smooth muscle (myometrium) contractile function. In this work, we described activators of ATPase, which could be used for development of effective treatments for correcting this dysfunction. Myosin ATPase localized in the catalytic domain of myosin subfragment-1 transforms a chemical energy deposited in macroergic bonds of ATP into mechanical movement. It was shown that calix[4]arene C-90 and its structural analogs functionalized at the upper rim of macrocycle with four or at least two N-phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups, are able to activate ATP hydrolysis catalyzed by myometrium myosin subfragment-1. It was shown with the method of computer modeling that N-phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups of calix[4]arene C-90 interact with responsible for binding, coordination and the hydrolysis of ATP amino acid residues of myosin subfragment-1. The results can be used for further research aimed at using calix[4]arene C-90 and its analogs as pharmacological compounds that can effectively normalize myometrium contractile hypofunction.

Key words: myosin subfragment-1, ATPase activity, calix[4]arene C-90, docking, myometrium smooth muscles.

Myometrium contractile function is associated with the activity of the main structural and contractile protein of uterus smooth muscle – actomyosin, in which myosin exhibits enzyme activity, namely the ability to hydrolyze ATP. Myosin ATPase, localized in the catalytic domain of subfragment-1 (S1 or head), is called a biomolecular motor. It uses the free energy of ATP hydrolysis deposited in ATP macroergic bonds for cyclic changes in the structure of the myosin head. The conformational changes in myosin active site due to ATP hydrolysis are enhanced with the assistance of switch 1, switch 2, relay and converter and transferred to the regulatory domain – lever arm, which plays an essential role in the generation of force and movement [1-3]. As a result, myosin moves along the actin filament causing the muscle contraction. That is why myosin catalyzed ATP hydrolysis is considered as one of the most important processes in the molecular mechanism of the myometrium contraction.

The known pathologies of uterus contractile function (weak labor contraction, preterm birth, miscarriage, atony, hypo- and hypertonicity of the uterus, etc.) occur due to the uterine smooth muscle contraction-relaxation dysfunction [4]. Therefore, it is vital to develop new effective pharmacological substances capable of normalizing uterine function. The molecular basis for designing potentially bioactive compounds could be calix[4]arenes – synthetic macrocyclic phenol oligomers, which have a cup-shaped structure with various (by their chemical nature) substituents at the upper and lower rims. Calix[4]arenes formed by four functionalized arene fragments are characterized by rather a flexible macrocycle conformation, low toxicity of the matrix and the ability to penetrate into the cell. All these properties make calix[4]arenes promising agents for developing new effective drugs [5, 6].

Calix[4]arenes are able to modify the functional activity of certain proteins, particularly the activity of enzymes. We have previously shown that calix[4]a-

rene C-90 (5,11,17,23-tetra(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methylamino-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene) at concentration of 100 μM activated ATPase of the myometrium actomyosin complex more than 2-fold [7]. Veklich et al. [8] showed that 100 μM calix[4]arene C-90 effectively (by 75% relative to control) inhibited the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in the fraction of uterus plasma membrane myocytes, and practically did not affect the activity of Mg^{2+} -independent Ca^{2+} -dependent ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase localized at the same membrane structure.

The aim of this study was to investigate the effect of calix[4]arene C-90 and its structural analogs, such as calix[4]arenes C-956, C-957, C-960, C772, C-716, C-715, as well as the calix[4]arene cup itself without substituents (C-150), and the structural fragment of the C-90 molecule – N-(4-ethoxyphenyl)-N'-(phenylsulfonyl)-trifluoromethylacetimidoamide (M-1) on the ATPase activity of myosin S1, which is a myosin catalytic unit, isolated from uterine smooth muscle. Using computer modeling we investigated the mechanisms of action of calix[4]arene C-90 and its analogs on the hydrolytic activity of myosin S1.

Materials and Methods

Preparation of actomyosin was obtained from swine uterus smooth muscle by the modified Barany method [9]. Preparation of myosin S1 was obtained from swine actomyosin by the modified Suzuki method [10]. The purity of the samples was controlled by PAAG-SDS electrophoresis [11].

ATPase activity of myosin S1 was determined in a 96-well plate at 37 °C in an incubation medium (total volume 0.1 ml) of the following composition (mM): tris-HCl buffer (pH 7.2) – 20, KCl – 100, CaCl_2 – 0.01, MgCl_2 – 5, ATP – 3 (standard conditions). Protein (myosin S1) concentration was 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Incubation time was 5 min. Samples containing all components of the incubation medium without myosin S1 were taken as control of non-enzyme ATP hydrolysis. The amount of inorganic phosphate cleaved from ATP during hydrolase reaction was determined by the Chen method [12], by measurement of optical absorbance of the solution at 820 nm using a microplate reader μQuant (Biotek Instruments, Inc., USA) and expressed as P_i $\text{nmol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein.

In the experiments on the effect of calix[4]arenes on the ATPase activity of myosin S1 we used standard incubation medium, to which 10 μl of

a 1 mM solution of calix[4]arenes (to a final concentration of 100 μM) was added. The value of ATP-hydrolase activity in the absence of calix[4]arenes in the incubation medium was taken as 100% (0 point).

Calix[4]arene C-90, its analogs, as well as calix[4]arene cup (C-150) and the model structure M-1 (Fig. 1) were synthesized and characterized using NMR techniques and IR spectroscopy in the Phosphoranes Chemistry Department of the Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine headed by Corresponding member NAS of Ukraine Prof. V. I. Kalchenko. Synthesis of calix[4]arene C-90 has been described previously [13, 8]. Calix[4]arene studied in the work:

C-90 (5,11,17,23-tetra(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methylamino-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene);

C-772 (5,11-di(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methylamino-17,23-di-tert-butyl-26,27-dipropoxycalix[4]arene);

C-716 (5,17-di(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methylamino-11,23-di-tert-butyl-25,27-dipropoxycalix[4]arene);

C-960 (5,17-di(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methylamino-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene);

C-957 (5,11,7-tri(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methyl-amino-23-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene);

C-956 (5,11,17,23-tetra(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino))-methylamino-25,27-dioctyloxy-26,28-dipropoxycalix[4]arene);

C-150 (26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene);

M-1 (N-(4-ethoxyphenyl)-N'-(phenylsulfonyl)-trifluoromethylacetimidoamide);

C-715 5,17-di(trifluoro)acetamido-11,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene.

Calix[4]arenes were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted with water to the desired concentration. Compound M-1 was dissolved in water.

The apparent activation constants K_a and Hill coefficients n_H were calculated using the concentration dependence of calix[4]arenes effect on the ATPase activity of myosin S1, plotted in logarithmic coordinates according to the linearized Hill equation:

$$\log [(V_{\max} - V)/(V - V_0)] = n_H \log K_a - n_H \lg A,$$

where V is specific enzyme activity, V_0 is specific enzyme activity in the absence of activator in the

A

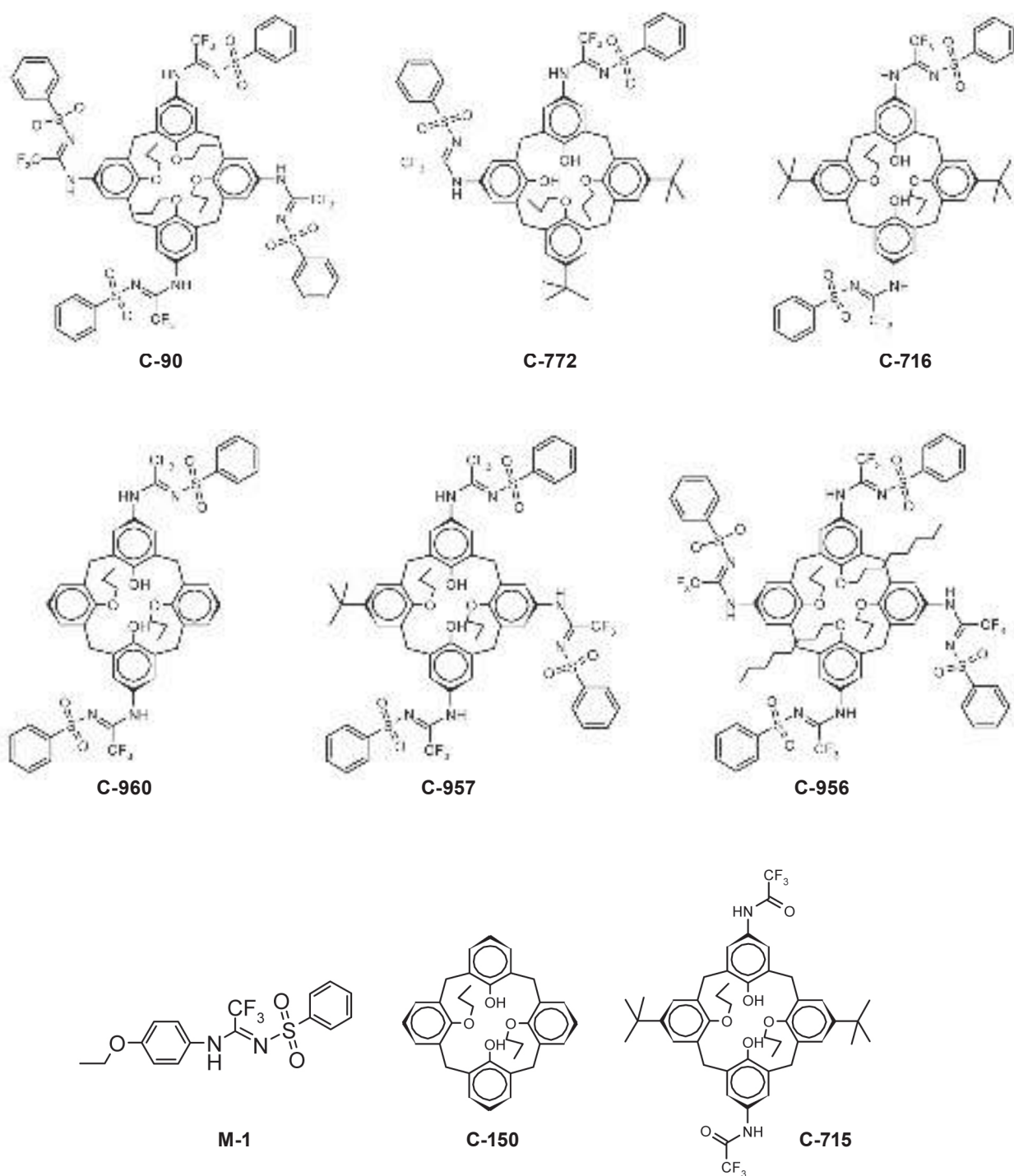


Fig. 1. The structural formulas of the studied calix[4]arene C-90 and its analogs (A)

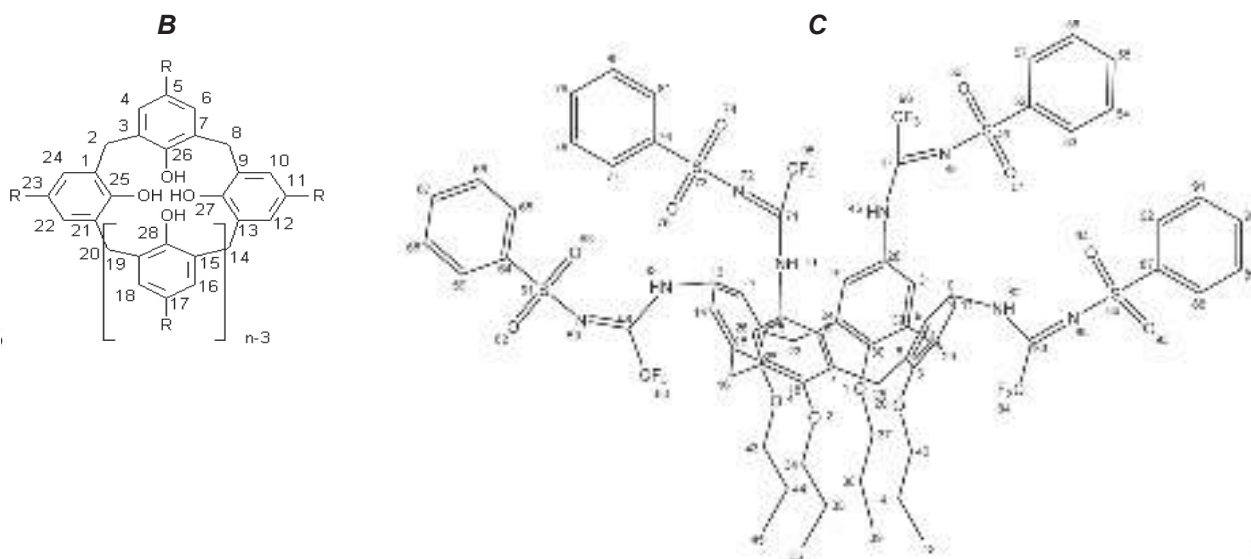


Fig. 1. Schematic representation of calix[4]arene molecule with numbered atoms (B); and schematic representation of calix[4]arene C-90 with numbered atoms (C)

incubation medium, V_{\max} is maximal enzyme activity (at the saturating concentration of activator), A is the activator concentration in the incubation medium [14]. Statistical processing of the obtained data was performed using standard methods of variation statistics [15]. Kinetic and statistical calculations were performed using MS Excel software.

In the experiments the following reagents were used: serum albumin, EGTA, EDTA, ATP, ascorbic acid, tris, dithiothreitol, acrylamide, (Sigma, USA), glycine (Merck, Germany), N,N'-methylenebisacrylamide (Acros organics, Belgium) N,N,N',N'-tetramethylenediamine (Reanal, Hungary), and other reagents (R-grade, Ukraine). The solutions were prepared in water purified on Crystal Bio System (Adrona, Latvia). The water conductance was less than 0.9 μS . The concentration of the divalent metal cations in solution was determined by Mohr method.

Computer modeling of the interaction between ligands (calix[4]arene C-90 and its analogs, model bindings) and receptor (myosin S1) was performed using AutoDock software, version 4.2 [16]. In our research, we used the enzyme three-dimensional structure with the 1b7t identifier in RSCB PDB [17]. Computer modeling of the calix[4]arene C-90 structural peculiarities was carried out using HyperChem 7.01. Molecular dynamics calculations were carried out by the MM2 method with the semi-empirical methods (CNDO).

AutoDockTools software was used for preliminary "processing" of interacting molecules. 100 runs of Lamarckian genetic algorithms (population size – 100, the maximal number of energy evaluations – 106) were conducted. To analyze and visualize the docking results we used the programs Chimera [18] and Yassara [19]. Calculation of the minimal total binding energy was performed considering Van der Waals forces, electrostatic and hydrophobic interactions, and hydrogen bonds. The optimal ligand positions in the complex "receptor-ligand" were determined according to the energy values obtained by docking software calculator for binding energy in complex "receptor-ligand". Thus, we selected a series of complexes with the lowest total energy, and then calculated the optimal geometry of the complexes and determined the most energetically preferred arrangement of the ligands in the space of myosin S1 binding domain.

Results and Discussion

In our previous studies, it was shown that 100 μM calix[4]arene C-90 effectively activated (more than 2-fold) ATP hydrolysis catalyzed by swine myometrium actomyosin [7]. The enzyme activity of actomyosin complex is associated with the operation of the active center of myosin ATPase localized in the catalytic domain of myosin S1. The myosin head is the main catalytic and functional unit of myosin. Even in the isolated state, it retains the properties of

native myosin, such as the ATPase activity and the ability to interact with actin.

The study of the effect of 100 μM calix[4]arene C-90 on the ATP-hydrolase activity of myometrium myosin S1 showed that myosin head, similar to actomyosin complex, activated enzyme ATP hydrolysis, and the activating effect was $76 \pm 23\%$ compared to control (without the addition of calix[4]arene) taken as 100%. Greater effect of calix[4]arene C-90, compared to myosin S1, on the ATPase activity of myometrium actomyosin complex may be account for the presence of actin and regulatory proteins in the complex, which activate ATP hydrolysis and can probably be affected by calix[4]arene. The calix[4]arene C-90 influence on the actomyosin ATPase activity can be also realized owing to its ability to bind to the myosin head. That is, it was assumed that one of the targets of the calix[4]arene C-90 action on the contractile complex is myosin S1.

To identify the substituents, which are responsible for the calix[4]arene C-90 activating effect on the myosin head ATPase, we investigated the influence of structurally similar to C-90 calix[4]arenes: C-956, C-957, C-960, C-772, C-716, C-715, as well as the calix[4]arene cup itself without substituents (compound C-150) and the model compound M-1 on the ATP hydrolysis catalyzed by myosin S1 (Fig. 1).

The structural formulas of calix[4]arene C-90 and its analogs are presented in Fig. 1.

The obtained results have demonstrated (Fig. 2) that calix[4]arene cup C-150 without substituent

groups at the upper rim at a concentration of 100 μM practically did not affect the ATPase activity of myosin S1. Model non-macrocyclic compound M-1 at a concentration of 100 μM tended to slight activation of ATP hydrolysis catalyzed by myometrium myosin S1 compared to the control (without the addition of calix[4]arenes).

Calix[4]arene C-715 with two *tert*-butyl and two trifluoroacetamide groups at the upper rim at a concentration of 100 μM practically did not affect ATP hydrolysis catalyzed by myosin S1 compared to control.

Other studied calix[4]arenes C-956, C-957, C-960, C-772, and C-716, which have at least two substituent groups inherent in calix[4]arene 90 at the upper rim, at a concentration of 100 μM enhanced the ATPase activity of myosin S1.

It was also found that calix[4]arene C-772 exhibited the highest (after calix[4]arene C-90) activating effect. Calix[4]arene C-772 has two phenylsulfonyltrifluoroacetamide and two *tert*-butyl groups at the upper rim. Two propoxy groups at the lower rim were substituted for two hydroxyl groups. This calix[4]arene at a concentration of 100 μM activated myosin S1 catalyzed ATP hydrolysis by an average 60% compared to control.

Compound C-716 has two phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups and two *tert*-butyl groups and differ from calix[4]arene C-772 in geometric (proximal and distal) position of the substituents at the macrocyclic platform. Calix[4]arene C-716 at a

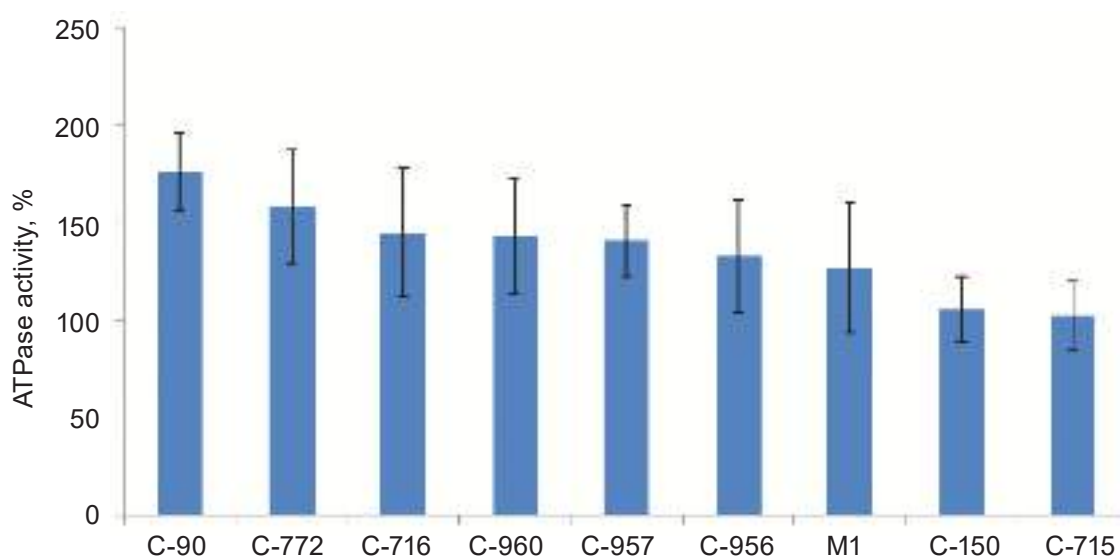


Fig. 2. Effect of calix[4]arene C-90 and its analogs on the ATPase activity of myometrium myosin S1 ($M \pm m$, $n = 6$). The ATPase activity in the absence of calix[4]arenes was taken as 100%

concentration of 100 μM activated myosin S1 catalyzed ATP hydrolysis by almost 50% compared to the control.

ATPase activity of myosin S1 in the presence of 100 μM of the compound C-960, which does not contain *tert*-butyl group at the macrocycle upper rim, increased by an average 43% compared to control.

The activating effect of the compound C-957, which has three N-phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups at the upper rim, at a concentration of 100 μM was found to be on the average 40% relative to control.

The compound C-956, which differs by the presence of two lipophilic octyl groups at the lower rim, activated ATP hydrolysis by 32% at an average compared to the control.

In our further research, we focused on the study of the kinetic characteristics of the action of calix[4]arenes, which exhibited the greatest activating effect (more than 50%) on the enzyme catalyzed ATP hydrolysis, namely, calix[4]arenes C-90 and C-772. To determine characteristic constants of the effect of these calix[4]arenes on the myosin ATP-hydrolase activity, we studied the dependence of ATPase activity on the calix[4]arenes concentrations (10^{-5} - 10^{-4} M) (Fig. 3).

The values of apparent activation constants K_a and Hill coefficients n_H for calix[4]arenes C-90 and C-772 were almost the same (Table 1).

Table 1. Kinetics parameters of calix[4]arenes effect on the ATP-hydrolase activity of myometrium myosin S1

Calix[4]arenes	Constant K_a , μM	Hill coefficient, n_H
C-90	34.5 ± 9.3	2.2 ± 0.3
C-772	34.3 ± 1.6	1.9 ± 0.7

Comparing the obtained data as to the effect of the calix[4]arene C-90 structural analogs on the ATP hydrolysis catalyzed by myosin S1, it should be noted that the activating effect of these calix[4]arenes is defined by the structure of the macrocycle upper rim. Calix[4]arene C-90 analogs, which contain phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups at the macrocycle upper rim, activated the myosin S1 ATPase. Propoxy groups at the lower rim of calix[4]arenes C-772, C-716, C-960 and C-957 and octyloxy groups at the lower rim of calix[4]arene C-956, which are responsible for higher hydrophobicity of these compounds compared to calix[4]arene C-90, had a small effect on the ability of these calix[4]arenes to activate the myosin S1 catalyzed ATP hydrolysis. Amid all studied calix[4]arenes (except C-150 and M-1), only calix[4]arene C-715, which contains trifluoroacetamide groups instead of phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups, did not exhibit the activating effect.

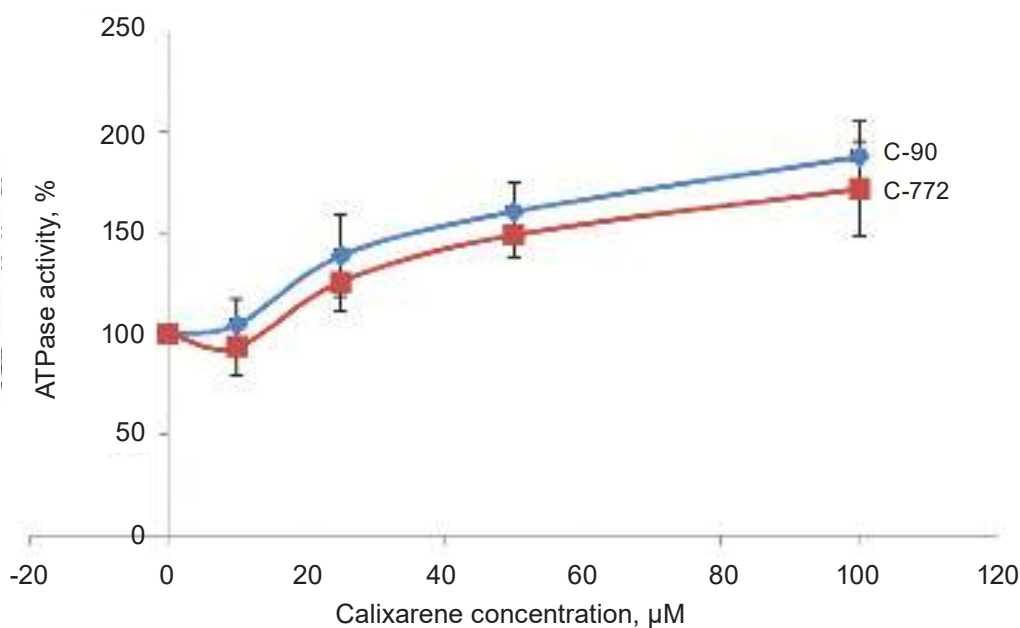


Fig. 3. Concentration dependence of the effect of calix[4]arenes C-90 and C-772 on the ATPase activity of myometrium myosin S1 ($M \pm m$, $n = 5$). The ATPase activity without addition of calix[4]arenes was taken as 100%

Thus, phenylsulfonyltrifluoroacetamide residues at the upper rim of calix[4]arene C-90 and its studied analogs are most likely to define their activating effect on the ATPase activity of myosin S1.

Interestingly, the calix[4]arene C-90 affected differently the activity of important enzymes involved in the functioning of the uterus SM and related to providing energy for its contraction (myosin ATPase), as well as the maintenance of intracellular ion homeostasis (plasma membrane ATPase). Thus, the specific enzyme activities of Mg^{2+} -independent Ca^{2+} -dependent ATPase and Mg^{2+} -dependent $-Na^+,K^+$ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of plasma membranes are not sensitive to the action of calix[4]arene C-90 [8]. At the same time, this compound at a concentration of 100 μ M inhibited effectively the activity of Ca^{2+},Mg^{2+} -ATPase localized at the same membrane structure [8]. As it was shown in our study the calix[4]arene C-90 effectively activates the ATPase activity of myosin S1. Different susceptibility of ATPases of the contractile protein and plasma membrane of uterus myocytes to the calix[4]arene C-90 action can be attributed to their structural and functional peculiarities related to the role of these enzyme systems in myocytes. This fact should be borne in mind when studying the calix[4]arene C-90 influence on the contractile and electrical activity of myometrium cells.

To understand the molecular mechanisms of calix[4]arene C-90 the activating effect on myometrium myosin S1 catalyzed ATP hydrolysis, we performed computer modeling of the interaction between this compound and the S1. First, we searched for the optimal conformations of the calix[4]arene C-90 molecule using molecular mechanics (force field MM2). At that, some energy-minimized conformers were selected. The total energy of these structures was recalculated using the semi-empirical method (CNDO field) and then one structure with the lowest total energy was chosen.

The total energy of calix[4]arene C-90 after the "minimizing" was 410.6 kcal/mol. It was a cone-shaped conformation with small deviations in the positions 5 and 28 of the calix[4]arene's "cup". The distance between nearest oxygen atoms of propoxy residues at the lower rim was about 0.3 nm. The phenyl moieties of the two substituents extended from the C10 and C13 atoms of the calix[4]arene's C-90 upper rim were arranged distally. Moreover, these substituents are located almost orthogonal to the macrocycle plane and easily accessible to inter-

molecular interactions. At the same time, phenyl moieties of two other substituents at the upper rim extended from the C5 and C28 atoms are aligned in parallel.

We also developed three-dimensional models of calix[4]arene C-90 analogs and performed "minimization" of their total energy. We obtained the following values (kcal/mol): C-715 – 272.2, C-716 – 293.7, C-772 – 278.5, C-956 – 417.3, C 957 – 367.2, C-960 – 286.4, M-1 – 49.6, C-150 – 104.6. It is obvious that with the increasing of the complexity of calix[4]arene structures their total minimal energy increases.

Development of three-dimensional model of calix[4]arene C-90 and "minimization" of its total energy enabled us to perform the computer modeling of potential sites of interaction between calix[4]arene C-90 and myosin S1. Also, we studied calix[4]arene C-715 with two *tert*-butyl and two trifluoroacetamide groups at the upper rim, calix[4]arene C-150, which is calix[4]arene cup itself without any functional groups, and non-macrocyclic model compound M-1. The presence of binding sites at the studied ligands with S1 was confirmed by the values of the calix[4]arenes minimal binding energy and the amino acid environment. Given the size, geometric conformation and the presence or absence of certain substituent groups, it was expected that the calix[4]arenes C-90 and C-715 would have different affinity for the myosin S1 binding sites, and that the ligand-binding sites of the studied compounds would be formed with the involvement of different amino acid residues of the polypeptide chain.

It is known that myosin active center is formed with participation of: seven-stranded β -sheet linked with P-loop (Gly176-Lys187), switch 1 (amino acid residues Gly230-Phe243) and switch 2 (amino acid residues Ile461-Ser471), and 50 kDa "upper" subdomain, relay (amino acid residues Leu475-Glu506) and converter (amino acid residues Phe716-Glu772), which are shown to be important for binding, coordination and the process of ATP hydrolysis. These structures are also involved in and spreading the conformational changes from myosin ATP-hydrolase center to the actin-binding site, affecting the position of myosin regulatory domain and its movement relative to actin filaments [2, 3].

P-loop (phosphate-binding loop) is a glycine-rich motif with conserved Lys182 residue that transfers a charge + 1 and forms hydrogen bonds with the oxygen of β - and γ -phosphates of ATP. Ser178

and Thr186 contain polar side chains, which facilitate interaction with the substrate. Thr186 stabilizes γ -phosphate by a hydrogen bond and oxygen of Thr186 hydroxyl reacts with Mg^{2+} , essential for ATP binding and hydrolysis. Glu187 provides additional contact with Mg-ATP.

P-loop does not undergo substantial conformational changes upon binding and further hydrolysis of ATP, whereas the conformation of the switches 1 and 2 is dependent to a great extent on the presence or absence of nucleoside triphosphate γ -phosphate [2]. Switches 1 and 2 also contain a large number of reactive groups. The conserved switch 1 contains three residues with side polar chains (Asn237, Ser240, and Ser241) [20]. Switch 2 has three universal conserved residues, two of which (Asp460 and Glu465) transfer a formal charge 1 [2]. The salt bridge between Arg219 of switch 1 and Glu465 of switch 2 prevents the release of the ATP hydrolysis products at the myosin active site up to the moment when myosin head binds to the actin. It is assumed that Glu465 of the smooth muscle myosin plays important role in the positioning of the water molecule in the active site of the nucleophilic attack on the ATP γ -phosphate [1].

Given the complex structure of calix[4]arene C-90, which contains both the hydrophilic amidine and hydrophobic phenyl groups at the upper rim, as well as its large size, at first, it was necessary

to analyze myosin S1 surface for possible binding sites (Fig. 4, 1). In so doing we primarily considered “cavity” close to the myosin S1 active site (Fig. 4, 2). Calix[4]arene C-715 was taken as a comparison pattern.

It was found that calix[4]arene C-90 can be complexed with the enzyme in the area, which is structurally close to the high-affinity binding site of Mg^{2+} , which is involved in ATP binding and catalysis of its hydrolysis. This myosin S1 site is close to the switch 2 and contacts with the switch 1 and P-loop, near to the relay helix. Under these conditions two substituent groups (1 and 2) at the upper rim of calix[4]arene C-90 interact with the amino acid residues in the areas closest to the nucleoside binding center. The other two groups (3 and 4) and calix[4]arene C-90 cup are fixed in the “cavity” of the myosin S1 motor domain farther away from the ATPase site by some amino acid residues. In particular, the phenyl moieties of the calix[4]arene cup and the side groups of calix[4]arene C-90 are fixed by the residues of aromatic amino acids Tyr274, Tyr282, Phe464, Phe467, and Phe469.

It is obvious from the obtained experimental data that the phenylsulfonyltrifluoroacetamide clusters of calix[4]arene C-90 and its analogs are likely to define their activating effect on ATPase of myosin S1. Therefore, it was essential to identify, with which amino acid residues of the enzyme, the

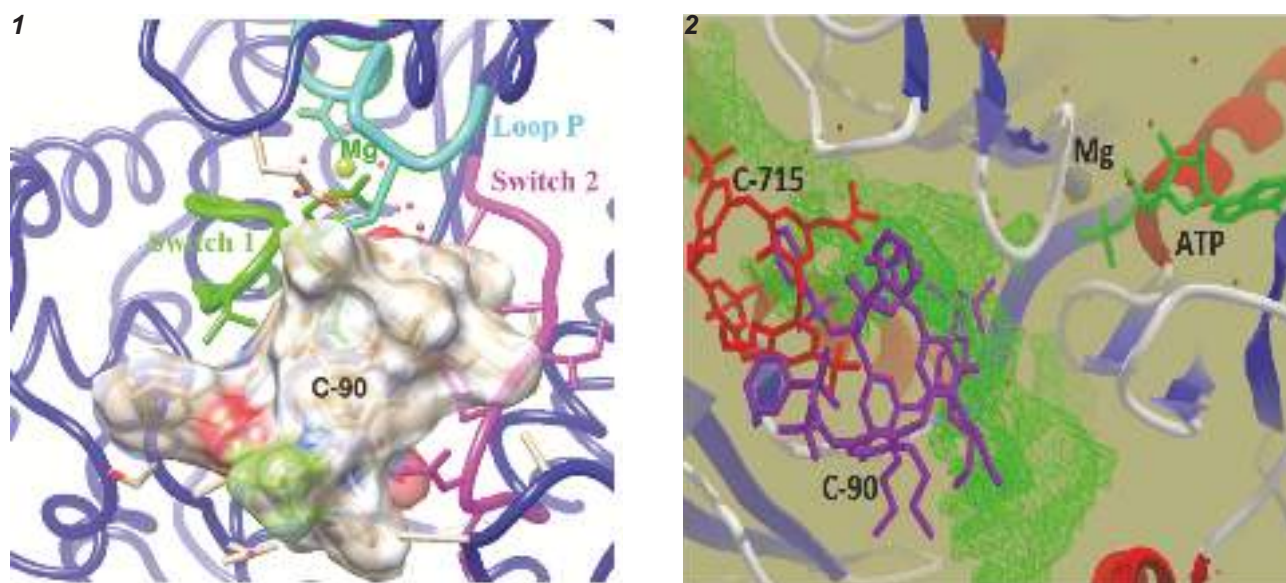


Fig. 4. 1 – Docking of calix[4]arene C-90 into myosin S1 molecule. Colors in the figure: P-loop – turquoise, switch 1 – green, switch 2 – pink. 2 – Analysis of functionally active site of myosin to identify the most likely binding region of calix[4]arenes C-90 (purple) and C-715 (red); cavities are marked by the green net

calix[4]arene C-90 phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups can interact. By docking of calix[4]arene C-90 into myosin subfragment-1, it was found that one of the residue **1** extends from C13 of calix[4]arene cup. Under these conditions nitrogen (N33) of this residue reacts with Thr235, and nitrogen (N59) – with Thr234 and Glu279, oxygen (O62) interacts with Arg242, and oxygen (O63) interacts with Arg236. The phenyl ring of this cluster is in the steric interaction with Phe464. Moreover, this phenylsulfonylamidine residue may directly affect functionally important residue Ser178, containing polar side chain, which facilitates interaction with the substrate [20]. Other functionally important phenylsulfonyltrifluoroacetamide residue **2** extends from C10 of calix[4]arene cup. Nitrogen (N82) of this residue interacts with Glu465, oxygen (O94) interacts with Gln276. The phenyl ring of the residue is in the steric interactions with Tyr274 (here, the steric effect is a factor that includes the influence of calix[4]arene and amino acids conformation and/or spatial arrangement on their interaction).

Two other phenylsulfonyltrifluoroacetamide residues **3** and **4**, presumably, perform a secondary but yet important function. They help calix[4]arene C-90 to take the most optimal conformational position. Under these conditions the positively and negatively charged atoms of this residues interact with polar side chains of amino acid residues – Arg271, Arg570, Asn572, Ser277, Asp468 and Glu675 (Fig. 5, 1). However, we cannot exclude that these residues

interact with allosteric regions of myosin S1 and affect the operation of the active center.

Amino acid residues Ser178, Arg236, Gln276, Glu675, Glu279, Glu465 and two water molecules (in Fig. 6 marked as small red spheres), involved in the enzyme structure stabilization, can form hydrogen bonds. Fragments of the calix[4]arene cup are arranged in the space formed by the amino acid residues: Phe464, Phe467, Phe469, involved in π - π -stacking interactions; and the residues: Thr234, Thr235, Ser277, Ile466, and Ile477, involved in steric interactions.

Thus, binding of calix [4] arene C-90 with myosin S1 occur owing to hydrogen bonds, π - π -stacking interactions between aromatic rings of the calix[4]arene cup and aromatic rings of hydrophobic amino acids of myosin head, as well as steric interactions. The presence of the hydrophobic platform and the side residue phenyl groups at the upper rim of calix[4]arene C-90 can facilitate its fixing on the enzyme hydrophobic sites. Some amino acid residues, involved in the fixing of the side groups of the calix[4]arene C-90 upper rim, are part of the myosin S1 seven-strand β -sheet and bound to it polypeptide regions of switch 1 and switch 2.

We also performed computer modeling of the interaction between calix[4]arene C-715 and ligand-binding sites of myosin S1 (Fig. 5, 2). Hydrophobic cup of calix[4]arene C-715 is fixed by hydrophobic cluster – aromatic amino acid residues Phe467, Phe469, Phe472, and Tyr274. Some of these

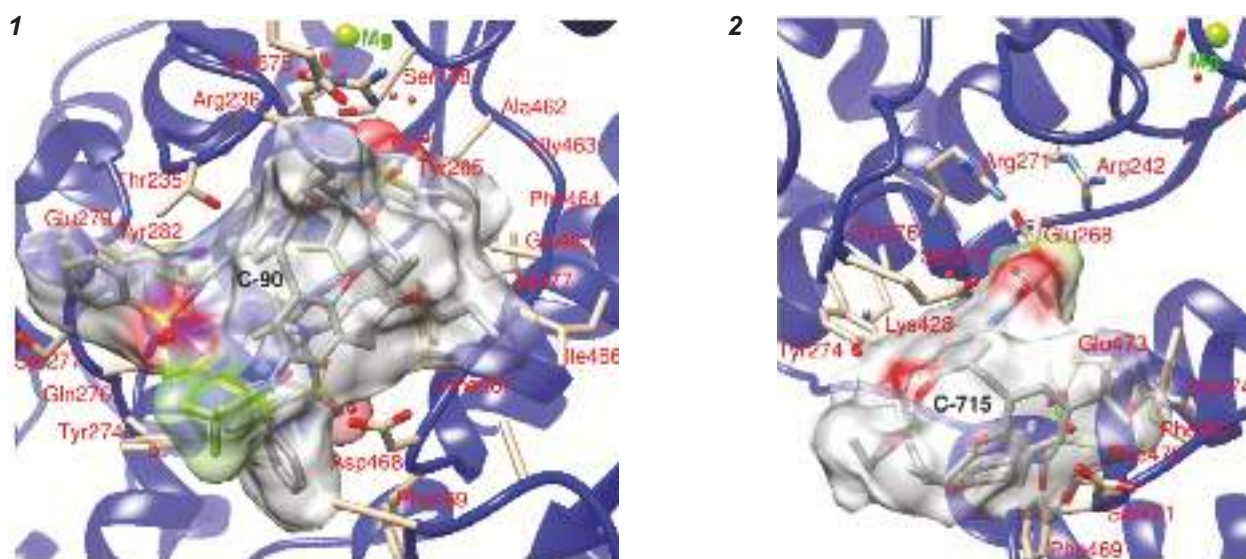


Fig. 5. The structure of the calix[4]arene C-90 (1) and the calix[4]arene C-715 (2) complexes with amino acid residues of myosin S1 (obtained by docking of the ligand into myosin S1)

amino acid residues are involved in the fixing of calix[4]arene C-90 cup. However, configuration of calix[4]arene C-715 in the structure of myosin S1 differs from calix[4]arene C-90 (Fig. 4, 2), which can be a result of the lack of the significant substituent groups of the calix[4]arene C-90 upper rim. Fixation of the *tert*-butyl and trifluoroacetamide groups of calix[4]arene C-715 in this region occur owing to such amino acid residues as Lys428, Ser270, Ser471, Ser590, and Ile466. Positively and negatively charged atoms of calix[4]arene C-715 interact with polar side chains of amino acid residues – Arg271, Gln276, Gln473, and Glu474.

The obtained values of the total energy (Table 2) for each amino acid residue of myosin S1, which interacts with calix[4]arenes C-90 and C-715, indicate the ability of these residues to interact with the studied ligands, as well as the distance, in which these interactions occur, and geometric parameters of these interactions. Here, the geometric parameters of interaction mean the arrangement of calix[4]arene and the protein amino acid residues relative to each other that affects the conformation of this interaction and the distance between the interacting sites of calix[4]arene and amino acids, that in turn affects

the energy parameters. High energy value for a particular amino acid residue may indicate a stronger bond between the studied calix[4]arene and the corresponding residue.

As it can be seen (Table 2), the number of myosin S1 amino acid residues that interact with the substituent groups of calix[4]arene C-90 was significantly greater than that of interacting with substituent groups of calix[4]arene C-715 that correlates with a smaller size of the latter. Moreover, two amino acid residues (Arg271 and Gln276) were revealed to be common for fixation of the substituent groups of both calix[4]arenes. When comparing their energy characteristics, it is evident that Arg271 and Gln276 are located at the greater distance from the functional groups of calix[4]arene C-715 compared to calix[4]arene C-90 that can cause the different ability of calix[4]arenes to interact with these amino acid residues. Obviously, the stronger binding of myosin subfragment-1 with Arg271 and Gln276 of calix[4]arene C-90 occurred.

To analyze the obtained results we investigated the calix[4]arenes C-90 and C-715 binding sites with myosin S1 as to hydrophobic and hydrophilic environment, as well as electrostatic interactions

Table 2. The energy characteristics of the myosin S1 amino acid residues, which interact with the substituent groups of calix[4]arenes C-90 and C-715 (results of docking of the studied ligands)

C-90			C-715		
Amino acid	No residue	Total energy, (relative units)	Amino acid	No residue	Total energy, (relative units)
Arg	236	16.7887	Arg	271	3.43011
Arg	242	5.55218	Gln	276	7.7219
Arg	271	0.307643	Gln	473	1.70776
Arg	570	0.51949	Glu	474	5.6253
Asn	572	5.27188	Ile	466	0.783888
Gln	276	4.65522	Lys	428	0.406284
Glu	279	2.1556	Ser	270	3.07315
Glu	465	1.90631	Ser	471	6.4307
Glu	675	8.24882	Ser	590	0.800814
Phe	464	2.56445			
Ser	178	1.80049			
Ser	277	9.63614			
Thr	234	2.35446			
Thr	235	8.39194			
Tyr	274	4.47047			

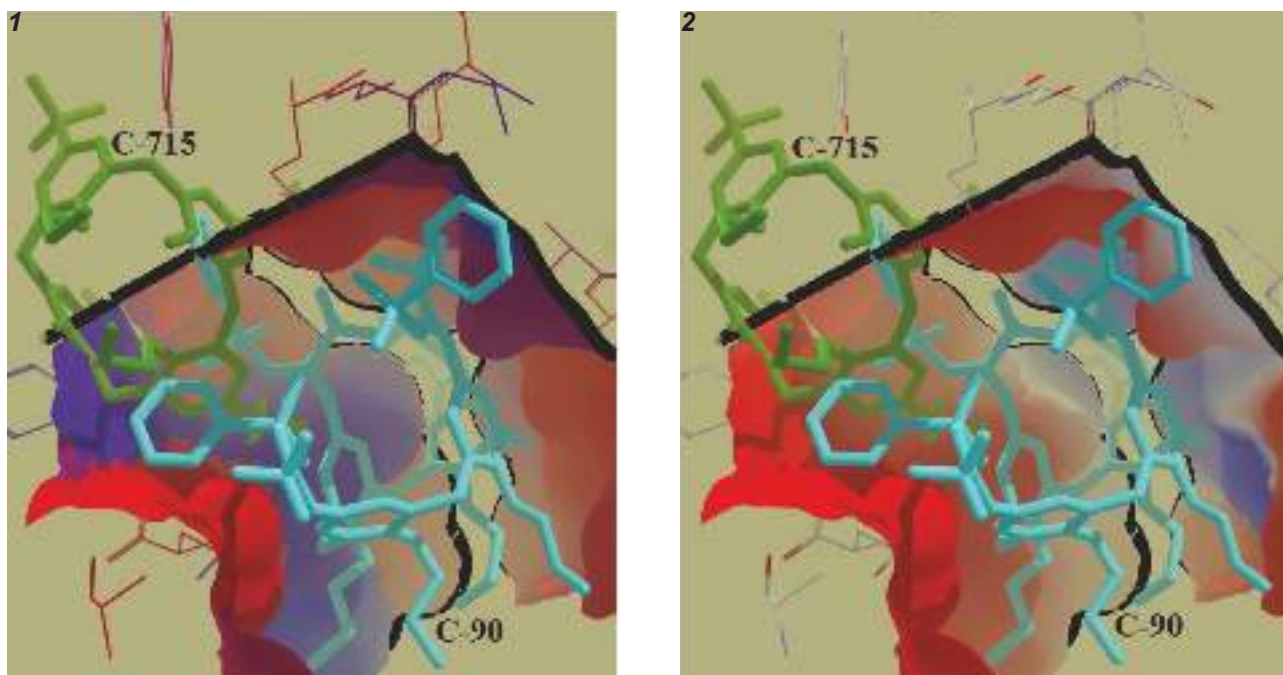


Fig. 6. Analysis of the binding sites of calix[4]arenes C-90 (turquoise) and G-715 (green) with myosin S1 in terms of 1 – hydrophobic (red) and hydrophilic (blue) environment; 2 – electrostatic environment: red is positive, blue is negative

(Fig. 6). Presumably, the presence of four complex as to their composition side clusters at the upper rim of calix[4]arene C-90, compared to two *tert*-butyl and trifluoroacetamide groups of calix[4]arene C-715, enabled calix[4]arene C-90 to interact with the large number of functionally important amino acid residues and thereby affect ATP hydrolysis. Our research showed that the quite large calix[4]arene platform is important in the direct interaction with the enzyme, while substitutions in the upper rim define a vector, in which calix[4]arene is directed.

We also investigated the possible interaction of calix[4]arene cup C-150 and model non-macrocyclic compound M-1 with myosin S1. It was found that calix[4]arene C-150 is most likely to interact with the enzyme in the area, which is rich in hydrophobic amino acid residues. In this case, calix[4]arene C-150, in contrast to calix[4]arene C-90, is located farther from the enzyme active center, and its hydrophobic cup is fixed by the following amino acid residues: Phe467, Phe469, Glu473, Thr231, Ser237, and Asp320. The absence of the side cluster limits the ability of calix[4]arene C-150 to interact with the enzyme active center and influence on its activity.

The obtained experimental data as to the model fragment M-1, which is $\frac{1}{4}$ part of calix[4]arene C-90 and tends to activate ATP hydrolase of myosin S1,

are consistent with the results of computer modeling. It was shown that M-1 is able to interact with some amino acid residues, involved in fixation of calix[4]arene C-90 (data are not shown). The presence of phenylsulfonyltrifluoroacetamidine cluster and hydrophobic phenol ring in the structure of M-1 facilitates interaction between M-1 and amino acid residues of S1. However, the interaction of one substituent group of calix[4]arene C-90, which is in the M-1 structure, with amino acid residues of myosin S1 probably does not refer to all sites of the enzyme related to the calix[4]arene C-90 activating the effect on ATPase.

The hydrolysis of ATP is accompanied by conformational changes in the myosin S1 structural elements, which form its active center [20, 21]. First of all, it concerns important for binding, coordination and realization of ATP hydrolysis P-loop, switch 1 and switch 2. The found myosin S1 amino acid residues, which can interact with substituent groups of calix[4]arene C-90, belong to the mentioned above structures. Calix[4]arene C-90 interacting with the three main loops of the myosin ATP- hydrolase site (Fig. 4, 1) is likely to influence the conformational flexibility of the enzyme structure and to stabilize the conformation of these loops in the position most favorable for dissociation of Pi from Mg-ADP com-

plex, and thus activate ATP hydrolysis. In our study using docking, we found that phenylsulfonyltrifluoroacetamide residue of calix[4]arene C-90, attached to C10 of its cup, interacts with Ser178 of myosin S1 phosphate-binding loop. The polar side chain of Ser178 facilitates interaction of ATP with the myosin active center [1] that contributes to ATP hydrolysis. We have also shown that nitrogen (N82) of phenylsulfonyltrifluoroacetamide residue extended from C4 of calix[4]arene C-90 cup (Fig. 5, 1), takes part in the interaction with Glu465 of myosin S1. It is known that Glu465 in the structure of smooth muscle myosin is essential for the water molecule assembly in the enzyme active center for the nucleophilic attack on gamma-phosphate of ATP [1]. Probably, upon binding of calix[4]arene C-90 with Glu465, the “active” water molecule changes its position in the myosin active center, more intensively attacking ATP macroergic bonds and positively affecting nucleosidetriphosphate hydrolysis catalyzed by myosin S1.

Thus, calix[4]arene C-90 and its analogs, namely calix[4]arenes: C-956, C-957, C-960, C-772, and C-716, which have at least two functional phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups at the upper rim, at concentration of 100 μ M, activated ATPase of the myometrium myosin S1; whereas the calix[4]arene cup without substituent groups C-150 and the model non-macrocyclic compound M-1 did not exhibit an activating effect. Computer modeling revealed that the phenylsulfonyltrifluoroacetamide groups of calix[4]arene C-90, which is likely to define its activating effect on the enzyme, reacted with the important for binding, coordination and realization ATP hydrolysis amino acid residues of the myosin S1 polypeptide chain.

This work was financially supported by the State Targeted Scientific and Technical Program “Nanotechnology and nanomaterials” No 0110U005970, the Targeted Comprehensive Interdisciplinary Research Program of NAS of Ukraine “Molecular and cellular biotechnology for medicine, industry and agriculture”, the Targeted Comprehensive Interdisciplinary Research Program of NAS of Ukraine “Fundamentals of molecular and cellular biotechnology” No 0110U005971, the Targeted Comprehensive Fundamental Research Program of NAS of Ukraine “Molecular design, synthesis and biological research of calix[4]arene regulators of intracellu-

lar calcium homeostasis in the smooth muscle under normal conditions and upon contractile dysfunction” No 0112U004262.

КАЛІКС[4]АРЕН С-90 ТА ЙОГО АНАЛОГИ АКТИВУЮТЬ АТР-ГІДРОЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ СУБФРАГМЕНТА-1 МІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ

Р. Д. Лабинцева¹, О. В. Бевза¹, К. В. Литвин¹, М. О. Боровик¹, Р. В. Родік², В. І. Кальченко², С. О. Костерін¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;

e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua;

²Інститут органічної хімії НАН України, Київ;

e-mail: vik@ioch.kiev.ua

Багато патологій репродуктивної системи в жінок є наслідком порушення скоротливої функції гладенького м'яза матки (міометрія). У зв'язку з цим виникає потреба в розробленні ефективних методів корекції таких порушень. Міозинова АТРаза перетворює хімічну енергію, депоновану в макроергічних зв'язках АТР, у механічну зі спрямованим рухом і локалізована в каталітичному домені субфрагмента-1 міозину. Показано, що калікс[4]арен С-90 та його структурні аналоги, які функціоналізовані на верхньому вінці макроциклу чотирма або принаймні двома N-фенілсульфонілтрифторацетамідиновими групами, активують гідроліз АТР, каталізований субфрагментом-1 міозину міометрія. Методом комп'ютерного моделювання встановлено, що N-фенілсульфонілтрифторацетамідинові групи калікс[4]арену С-90 взаємодіють з амінокислотними залишками поліпептидного ланцюга субфрагмента-1 міозину, важливими для зв'язування, координації та здійснення процесу гідролізу АТР. Одержані результати у подальшому можуть бути використані в дослідженнях, спрямованих на використання калікс[4]арену С-90 та його аналогів як сполук, здатних ефективно нормалізувати скоротливу гіпофункцію міометрія.

Ключові слова: субфрагмент-1 міозину, АТРаза активність, калікс[4]арен С-90, докінг, гладенькі м'язи, матка.

КАЛИКС[4]АРЕН С-90 И ЕГО АНАЛОГИ АКТИВИРУЮТ АТФ-ГИДРОЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ СУБФРАГМЕНТА-1 МИОЗИНА МИОМЕТРИЯ

Р. Д. Лабынцева¹, А. В. Бевза¹,
Е. В. Литвин¹, М. А. Боровик¹, Р. В. Родик²,
В. И. Кальченко², С. А. Костерин¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua;

²Институт органической химии
НАН Украины, Киев;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

Многие патологии репродуктивной системы у женщин являются следствием нарушений сократительной функции гладких мышц матки (миометрия). В связи с этим возникает необходимость разработки эффективных методов коррекции таких нарушений. Миозиновая АТРаза превращает химическую энергию, депонированную в макроэргических связях АТР, в механическую с направленным движением, и локализована в каталитическом домене субфрагмента-1 миозина. Показано, что каликс[4]арен С-90 и его структурные аналоги, функционализованные по верхнему ободу макроцикла четырьмя или по крайней мере двумя N-фенилсульфонилтрифторацетамидиновыми группами, активируют гидролиз АТР, катализированный субфрагментом-1 миозина миометрия. Методом компьютерного моделирования установлено, что N-фенилсульфонилтрифторацетамидиновые группы каликс[4]арена С-90 взаимодействуют с аминокислотными остатками полипептидной цепи субфрагмента-1 миозина, важными для связывания, координации и осуществления процесса гидролиза АТР. Полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы в исследованиях, направленных на использование каликс[4]арена С-90 и его аналогов в качестве соединений, способных эффективно нормализовать сократительную гиподисфункцию миометрия.

Ключевые слова: субфрагмент-1 миозина, АТРазная активность, каликс[4]арен С-90, докинг, гладкие мышцы, матка.

References

- Burghardt TP, Neff KL, Wieben ED, Ajtai K. Myosin individualized: single nucleotide polymorphisms in energy transduction. *BMC Genomics*. 2010; 11: 172.
- Decarreau JA, James NG, Chrin LR, Berger CL. Switch I closure simultaneously promotes strong binding to actin and ADP in smooth muscle myosin. *J Biol Chem*. 2011; 286(25): 22300-22307.
- Bloemink MJ, Melkani GC, Bernstein SI, Geeves MA. The Relay/Converter Interface Influences Hydrolysis of ATP by Skeletal Muscle Myosin II. *J Biol Chem*. 2016; 291(4): 1763-1773.
- Wray S. Insights from physiology into myometrial function and dysfunction. *Exp Physiol*. 2015; 100(12): 1468-1476.
- Rodik RV, Boyko VI, Kalchenko VI. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr Med Chem*. 2009; 16(13): 1630-1655.
- Nimse SB, Kim T. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem Soc Rev*. 2013; 42(1): 366-386.
- Labyntseva RD, Slinchenko NM, Veklich TO, Rodik RV, Cherenok SO, Boiko VI, Kalchenko VI, Kosterin SO. Comparative investigation of calixarenes influence on Mg²⁺-dependent ATP-hydrolase enzymatic systems from smooth muscle cells of the uterus. *Ukr Biokhim Zhurn*. 2007; 79(3): 44-54. (In Ukrainian).
- Veklich TO, Shkrabak AA, Mazur YuYu, Rodik RV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Kinetics of inhibitory effect of calix[4]arene C-90 on activity of transporting plasma membrane Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of smooth muscle cells. *Ukr Biochem J*. 2014; 86(5): 37-46. (In Ukrainian).
- Labyntseva RD, Bobrovska OM, Chunikhin OJu, Kosterin SO. Influence of heavy metal ions on the ATPase activity of actomyosin complex and myosin subfragment-1 from smooth muscle of the uterus. *Ukr Biokhim Zhurn*. 2011; 83(4): 84-93. (In Ukrainian).
- Suzuki H, Kondo Y, Carlos AD, Seidel JC. Effects of phosphorylation, MgATP, and ionic strength on the rates of papain degradation of heavy and light chains of smooth muscle heavy meromyosin at the S1-S2 junction. *J Biol Chem*. 1988; 263(22): 10974-10979.

11. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987; 166(2): 368-379.
12. Chen PS, Toribara TY, Warner H. Micro-determination of phosphorus. *Anal Chem.* 1956; 28(11): 1756-1758.
13. Rodik R, Boiko V, Danylyuk O, Suwińska K, Tsymbal I, Slinchenko N, Babich L, Shlykov S., Kosterin S., Lipkowski J., Kalchenko V. Calix[4]-arenesulfonylamidines. Synthesis, structure and influence on Mg²⁺, ATP-dependent calcium pumps. *Tetrahedron Letters.* 2005; 46(43): 7459-7462.
14. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 2004. Portland Press, London, 3rd edn. 422 p.
15. Kokunin VA. Statistical processing of data from a small number of experiments. *Ukr Biokhim Zhurn.* 1975; 47(6): 776-791. (In Ukrainian).
16. Cassidy CE, Setzer WN. Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic Lonchocarpus flavonoids: a molecular docking analysis. *J Mol Model.* 2010; 16(2): 311-326.
17. Houdusse A, Kalabokis VN, Himmel D, Szent-Györgyi AG, Cohen C. Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell.* 1999; 97(4): 459-470.
18. Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature.* 2010; 468(7324): 705-708.
19. Krieger E, Koraimann G, Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA – a self-parameterizing force field. *Proteins.* 2002; 47(3): 393-402.
20. Himmel DM, Gourinath S, Reshetnikova L, Shen Y, Szent-Györgyi AG, Cohen C. Crystallographic findings on the internally uncoupled and near-rigor states of myosin: further insights into the mechanics of the motor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(20): 12645-12650.
21. Minehardt TJ, Marzari N, Cooke R, Pate E, Kollman PA, Car R. A classical and ab initio study of the interaction of the myosin triphosphate binding domain with ATP. *Biophys J.* 2002; 82(2): 660-675.

Received 22.07.2016

***Mycobacterium tuberculosis* ANTIGENS MPT63 AND MPT83 INCREASE PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF MURINE PERITONEAL MACROPHAGES**

A. A. SIROMOLOT^{1,2}, O. S. OLIINYK², D. V. KOLIBO^{2,1}, S. V. KOMISARENKO²

¹Educational and Scientific Centre Institute of Biology,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: saa0205@ukr.net

Macrophages (MΦ) are the most described and characterized target and host of mycobacteria. Like other cells of innate immunity MΦ have a wide range of receptor molecules which interact with different pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Immunodominant proteins MPT63 and MPT83 that are synthesized in abundance by Mycobacterium bovis or Mycobacterium tuberculosis strains could be involved in development of tuberculosis infection. The aim of this study was to search for effects of these mycobacterial antigens on target cells. For this aim full-sized sequences of MPT83 (rMPT83full) and MPT63 antigens were cloned into plasmid pET24a(+). The increase of phagocytic activity of murine peritoneal macrophages was demonstrated, but not of macrophage-like cells from J774 cell line, which were treated by rMPT63 and rMPT83full proteins for 24 h. This effect of such antigens can be considered as a way to facilitate the consumption of mycobacterial cells by macrophages to avoid other effector mechanisms of innate and adaptive immunity.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, macrophages, phagocytosis, MPT63, MPT83.*

Knowledge about mechanisms of pathogenesis and development of tuberculosis (TB) is rapidly growing. The arising of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium* (MDR-TB) promotes finding new effective therapeutic agents. Interactions of bacterial pathogenic factors with target molecules lead to particular effects in host. Thus, the investigation of features and functions of a number of tuberculosis bacilli antigens is a prerequisite for prevention and treatment of TB.

The genome of *Mycobacterium* contains consists of about 3989 genes that encode functional products, only 30% of them performing the known functions and 70% being classified as hypothetical [1]. Identification of cellular and molecular targets for immunodominant proteins MPT63 and MPT83 could fill certain gaps in understanding the mechanism of tuberculosis pathogenesis. Also, it remains unclear whether some *M. tuberculosis* antigens, including MPT63 and MPT83, are involved in avoiding bacteria degradation in endosomes. Therefore, the study of the role of *M. tuberculosis* proteins with unknown functions in the development of infection in susceptible hosts is one of the priority tasks.

The innate immune system, including MΦ, is the main chain of all immune networks, which is responsible for elimination and deactivation of numerous pathogens. However, inner environment of MΦ is a favorable place for reproduction and survival of *M. tuberculosis* [2]. Apparently, active phagocytosis of different bacilli by MΦ leads to pathogen lysis and future patient recovery. However, pathogenic mycobacterial strains survive inside macrophages by arresting the normal maturation of their phagosome and limiting fusion with pre-formed lysosomes [3]. Obviously, the components of bacteria cell wall and some proteins products are involved in these processes.

MPT63 is 16kDa secreted protein that had relatively high expression level in mycobacteria. Firstly this antigen was obtained from *M. tuberculosis* culture fluid in 1991 by Nagai and colleagues [4]. Analysis of the nucleotide sequence of *mpt63* identified open reading frame, and it was shown that the protein consists of 159 amino acids and contains two components: a signal peptide that has 29 amino acids and entire MPT63, which contains 130 amino acids [5]. The orthologs MPB63 from *M. bovis* and

MPT63 from *M. tuberculosis* have difference of one nucleotide in their gene sequences but are not distinguished in functional products. The recombinant MPT63 isolated from *Escherichia coli* and natural protein of *M. tuberculosis* MPT63 did not differ by the results of serological tests [6, 7].

Moreover, homologs of MPT63 have been found in different strains, but polyclonal antibodies against MPT63 from *M. tuberculosis* do not cross-react with them [8, 9]. Some mycobacterial species have *mpt63* gene which are not translated into protein product [8]. Therefore, rMPT63 is a valuable target for immunological studies.

Though the function of MPT63 remains unknown, there have been few studies of MPT63 effect on *in vitro* systems. However there is little information available about targets of MPT63 on cells and activation cascades associated with them. As a rule, bacteria proteins have effect on cytokine production, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6). Degranulation and release of histamine and hexaminidase from mast cells caused by MPT63 is demonstrated [10]. Surprisingly, that other *M. tuberculosis* antigens ESAT-6 and MTSA-10 showed a similar result.

Another important immunodominant antigen of *M. tuberculosis* is a membrane binding lipoprotein MPT83 [11]. This molecule is one of the ligands for toll-like receptor 2 (TLR-2) and could bind with human TLR-2 with affinity about 4.42×10^{-8} M [12]. Also *M. tuberculosis* has a number of molecules that bind and activate TLR-2 (lipoproteins LpqH, LprG, LprA and PhoS1, lipoarabinomannan, lipomannan and phosphatidylinositol mannoside (PIM). Prolonged stimulation of macrophages with these ligands leads to the production of immunosuppressive cytokines (including IL-10 and IL-4) and reduction of major histocompatibility complex (MHC) class II expression and inhibition of antigen processing [13]. Probably, TLR-2 is not the only possible target for MPT83. Thus, MPT83 stimulation of M ϕ from TLR-2 knockout mice resulted in a significant increase of TNF- α , IL-6 and IL-12 synthesis, although lower than for wild-type mice macrophages [14]. Similarly, the blocking of TLR-2 with antibodies reduces but not abolishes MPT83 effects [12].

Chambers and colleagues [12] offered that glycosylated and acetylated protein could take influence on matrix metalloproteinase (MMP) expression through interaction with TLR-2, TLR-1 or TLR-4. Nevertheless, it was shown that recombinant protein

(not glycosylated and not acetylated) could activate the production of metalloproteinases too. The above evidence provides the value and adequacy for using the recombinant proteins MPT63 and MPT83 in investigation of their functions.

According to the literature macrophages and macrophage-like cells are the main target of mycobacteria, but for many *Mycobacterium* antigens the functions have not been found yet. Our goal was to show some effects of *M. tuberculosis*/*M. bovis* antigens MPT63 and MPT83 on selected cells models.

We have chosen two models to achieve the objective, primary culture of macrophages from peritoneal cavity of mice and macrophage-like cells of J774 cell line source which is also murine. Effects could differ after treatment of primary culture and malignant cells by antigens. The absence of registered changes in phagocytosis assay in J774 cell line has focused our investigation on peritoneal macrophages only.

We previously cloned MPT63 and fragment of MPT83 that corresponded to sequence 115-220 aa of fasciclin-like domain (FLD) (94-217 aa) [6]. In the current study we focused on the effects of rMPT63 and rMPT83full on macrophages phagocytosis activity. Our results have shown that both rMPT63 and rMPT83 increase percentage of macrophages that actively consume EGFP expressed *E. coli*. Moreover, such influence of recombinant antigens did not depend on *E. coli* expression system, because control proteins, which were expressed and obtained from similar expression system, had no effect on phagocytosis.

Materials and Methods

Mice and cells. BALB/c female white mice (30-35 g of body mass) were used in the experiments. Mice were kept in cages of research vivarium, fed a standard diet and had free access to water. The animals ($n = 12$) were used for obtaining peritoneal macrophages.

The experiments are consistent with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and with ethical norms as laid down in the laws of Ukraine.

Sterile saline was injected in the plot of peritoneal cavity. Belly was massaged gently for M ϕ washed per 1 min. A small patch of skin was cut by scissors without damage of the peritoneal cavity in-

tegrity. Using a syringe carefully selected fluid with cells and transferred it to clean dishes. The liquid was centrifuged during 5 min at 300 g, the supernatant was collected and cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS). Cells' precipitate was resuspended in RPMI-1640 medium with L-glutamine, 50 mg/l cefalotin and with addition fetal bovine serum (FBS) to final concentration of 10% and transferred to a new dish. Peritoneal M Φ and macrophage-like cells of J774 cell line were cultivated in cell culture flasks and maintained at 37 °C in a humidified incubator in 5% CO₂ atmosphere. After M Φ adhesion to the bottom of the dish there are twice washed by PBS from on the medium, serum and red blood cells. Cells were removed by 30 mM EDTA solution in PBS for 15 min at 37 °C and active mixing.

Cloning of MPT83full in Escherichia coli. Fragment of *mpt83*(full) gene was amplified by PCR from vaccine strain *M. bovis* BCG-Russia by 2 oligonucleotides: MPT83 L SP 5'-TGGATCCAG-CACCAAACCCGTGTCGCA-3' and MPT83 L ASP 5'-AATCTCGAGCTGTGCCGGGGGCATCAG-CA-3'. PCR amplification was performed under the following conditions: incubation at 94 °C for 3 min; 28 cycles at 94 °C for 30 s, at 55 °C for 30 s and at 72 °C for 1 min; and extension at 72 °C for 7 min. PCR products were extracted and purified using GeneJet Gel Extraction Kit. Plasmid DNA was obtained by GeneJet Plasmid Miniprep Kit. All manipulations were performed according to the manufacturer's manual recommendations. The amplified *mpt83*(full) gene was ligated with the *E. coli* expression vector pET24a(+) (Novagen, Germany) using *Bam*HI and *Xho*I restriction sites. The obtained construct was used to transform *E. coli* Rosetta (DE3) host cells (Novagen, Germany) for protein expression. Several clones verified with PCR were frozen.

Immobilized-metal affinity on-column chromatography of His-tag proteins. MPT63 and MPT83full expressed *E. coli* cells were grown in LB medium with 50 µg/ml kanamycin and 1% glucose at 37 °C and active mixing (250 rpm) to optical density A₆₀₀ 0.3-0.5. The expression of mycobacterial proteins was induced by 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cell precipitates of MPT63 expressed *E. coli* were resuspended in wash buffer (50 mM Na₂HPO₄, (pH 8.0), 0.5 M NaCl), which contains 6 M urea and treated on ice with ultrasonic disintegrator Labsonic (Sartorius, Germany) and centrifuged during 20 min at 13,000 rpm.

The supernatant was applied to a pre-equilibrated Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany) column and washed with 6 M urea buffer. Elution of purified proteins was conducted in buffer with 250 mM imidazole and 6 M urea. After purification recombinant protein was dialyzed in PBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄, pH 7.4).

MPT83full expressed *E. coli* cells were resuspended in PBS and were treated and centrifuged as described above. MPT83full protein extraction was carried out in non-denaturing conditions using wash buffer without urea reagent.

SDS-PAGE and Western blotting. Protein molecules were separated by 10% SDS-PAAG electrophoresis under denaturing condition in Tris-tricine buffer system. We used a buffer sample that contained β-mercaptoethanol for prevention of dimers formation and buffer without disulfide reduction components. Staining was performed using Coomassie Brilliant Blue G-250. Protein concentration was determined by densitometry using special computer program TotalLab TL120.

Protein transfer to nitrocellulose membrane was performed using semi-dry Western blot during 2 h and current strength 38 mA in the buffer which contained 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20% methanol, 192 mM glycine.

After transferring the membrane was blocked by 5% non-fat milk dissolved in PBS during 1 h at 37 °C. Then the membrane was washed three times by T-PBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄, 0.04% Tween-20, pH 7.4) and incubated with anti-His tag antibodies (1:3000) conjugated with horseradish peroxidase. Bands have been detected by 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogenic substrate.

Flow cytometry and Phagocytosis assay. Peritoneal M Φ and macrophage-like cells from J774 cell line incubated in cell culture flasks (1×10⁶ cells/dish) with rMPT63, rMPT83 and mCherry (0.25×10⁻⁶ mM) as a control for 0.5, 1, 2 and 24 h. After cultivation the macrophages were incubated with EGFP expressed *E. coli* cells during 30 min at 37 °C in the ratio of 100 bacterial cells per one macrophage. Cells were washed from not phagocytized bacteria and in PBS-BSA (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄, pH 7.4, 2% BSA). Samples were analyzed by flow cytometry (Beckman Coulter Epics XL) using FL1 channel laser and calibrator with 50 000 total events/sample.

The temperature, lack of sodium azide meet conditions for active uptake of EGFP expressed *Escherichia* by macrophages. Bacteria with the accumulated protein fluoresces actively even after the takeover by macrophages. Green laser channel was identified increase in fluorescence, which means an increase of phagocytized bacteria by a permanent amount of macrophages.

Results and Discussion

Vector construction for rMPT83full expression. Full *mpt83* gene was amplified by PCR (Fig. 1, A) and cloned into vector for protein expression pET24a(+) (Novagen, Germany) by restriction sites *Bam*HI and *Xho*I (Fig. 1, B). The number of copies of pET24a-*mpt83*(full) vector were amplified in *E. coli* DH10B strain. The *mpt63* gene was cloned into pET24 vector previously [6].

E. coli Rosetta DE3 strain cells were transformed by pET24a-*mpt83*. Cells were grown on solid culture medium LB at 37 °C with addition of selective antibiotic kanamycin. Selected clones were tested for the presence of the correct inserted gene fragment by PCR (Fig. 1, C). The expected amplified fragment length was approximately 900 b.p.

Expressed recombinant proteins obtaining and purification. Selected clones of MPT83full and MPT63 expressed *E. coli* were induced with 1 mM IPTG and incubated for 4 h at 30 °C with intensive aeration. His-tag labeled proteins were isolated by IMAC on Ni-NTA agarose (Qiagen, the Netherlands). Elution was performed by competitive displacement of protein molecules with 250 mM imidazole solution in wash buffer under denaturing (MPT63) and non-denaturing (MPT83full) conditions. Final fractions had been analyzed by 10% SDS-PAGE (Fig. 2, A). Also, the electrophoretic mobility of the rMPT83full protein depends on the presence or absence of disulfide reduction component in sample buffer (Fig. 2, B).

The cloning of the full length rMPT83 mycobacterial protein was needed to study the effect of all sequence of the antigen, but not only FLD rMPT83(115-220) [6], on MΦ. Despite the lower yield of protein from 1 liter of *E. coli* culture, full-size MPT83 was identified in the soluble cytoplasmic fraction that gives it in correctly folded conformation. In contrast, FLD rMPT83 (115-220) was identified in insoluble inclusion bodies (Fig. 2, A). Furthermore, full-size MPT83 does not form dimers,

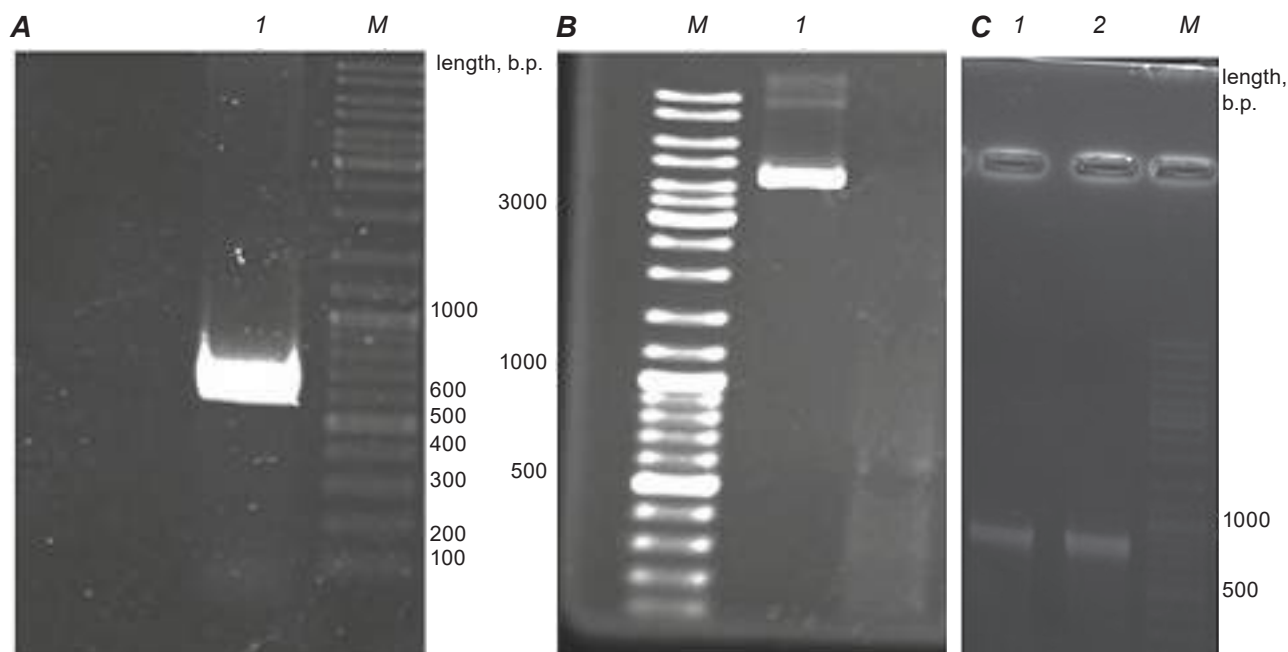


Fig. 1. Construction of pET24a-*mpt83*(full) vector for protein expression. A – the *mpt83*(full) gene amplified by PCR from *M. bovis*-BCG Russia. B – construct of *mpt83*(full) gene sequence cloning into pET24a(+) vector by restriction sites *Bam*HI and *Xho*I. C – correct gene insert from *E. coli* transformed cell colonies was verified by PCR within pair pET-oligos

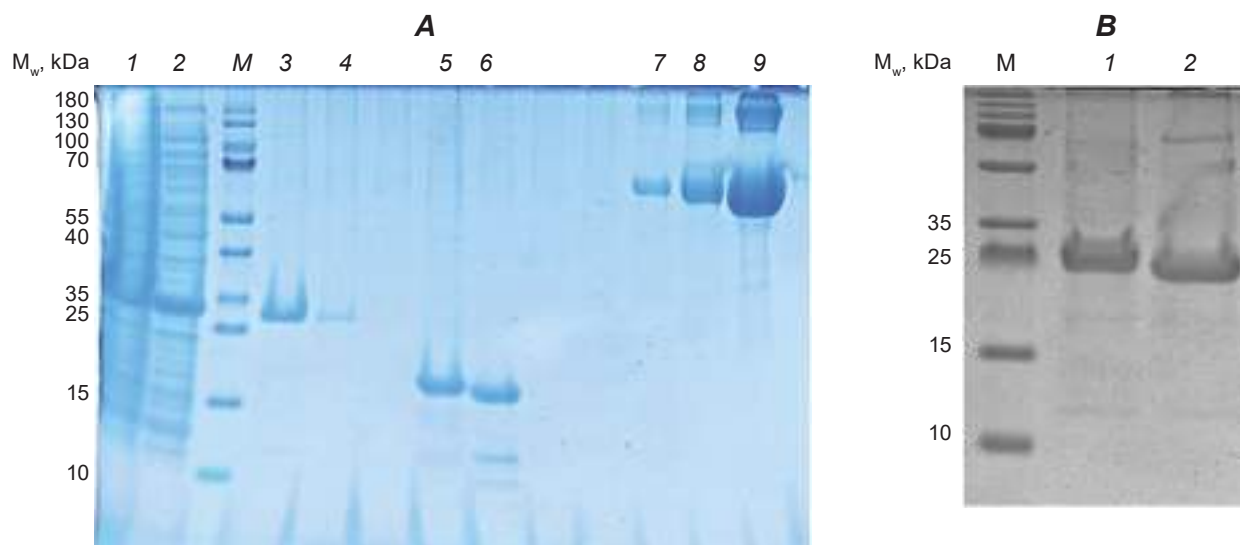


Fig. 2. Electrophoresis assay of novel obtained protein MPT83full. A – lane 1 and 2 – insoluble and soluble fractions of *E. coli* cell lysates, which contain non-purified MPT83full. Lane 3, 4 – MPT83full purified on Ni-NTA agarose under denaturing conditions. Lane 5, 6 – FLD rMPT83 obtained and purified under denaturing conditions. Samples 7, 8, 9 – BSA for protein concentration calibration. B – electrophoretic mobility of MPT83full within the sample buffer without (lane 1) and with (lane 2) disulfide bonds reduction reagent DTT. Different mobility of MPT83full provides existence of the inner disulfide bond

unlike its short analog (Fig. 2, B; Fig. 4). This also proves the value feasibility of using the product of a full gene sequence in which the N'-terminal amino acids play a potentially important role in protein folding. Therefore, the action of FLD rMPT83 (115-220) on phagocytosis assay was not studied.

Primary culture but not malignant macrophages have higher phagocytic activity after 24 h rMPT63 and rMPT83full stimulation. For phagocytosis test we used a transformed green fluorescent protein *E. coli*, according to the protocol described in Gille et al [15]. Protocol has been tested on J774 cells. Phagocytosis level was estimated by flow cytometry in order to obtain data for the large number of cells.

After rMPT63 and rMPT83full stimulation the number of phagocytic peritoneal M Φ was increased. However, any significant differences in phagocytosis level for incubation period of 30 min, 1 or 2 h was not found. However after 24 h rMPT63 and rMPT83full stimulation of peritoneal M Φ the number of phagocytic cells was increased twice. The control proteins did not lead to such effect and the number of phagocytic cells was at the level of unstimulated cells (Fig. 3, A, B).

Unlike peritoneal murine M Φ the malignant macrophage-like cells from J774 cell line were not

characterized by any increase in phagocytosis, even after 24 h of stimulation.

The goal of our study was to investigate by flow cytometry the quantitative parameters of phagocytosis of EGFP expressed *E. coli* cells by mouse M Φ under application of mycobacterium proteins to them. Flow cytometry allows analyzing a larger sample of cells compared with the conventional microscopic analysis [16, 17]. Furthermore, the method allows an objective quantitation of the phagocytic activity to give two parameters, such as phagocytic rate and index. The present results show that the phagocytic activity of cultured mouse peritoneal M Φ increased after the exposure to rMPT63 or rMPT83full. While preincubation of the cells with mCherry or EGFP showed a negligible change in the amount of actively phagocytic M Φ , we concluded that the effect of rMPT63 and rMPT83full was specific.

There are two potential ways to increase activity of phagocyte link of innate immunity of the host. First of them is the increase of the number of phagocytic cells which intake the same number of particles (e.g. EGFP expressed *E. coli*). Another way implies intensification of phagocytosis activity of each individual cell, which is belonging by constant rate to cell population. However, intensification of

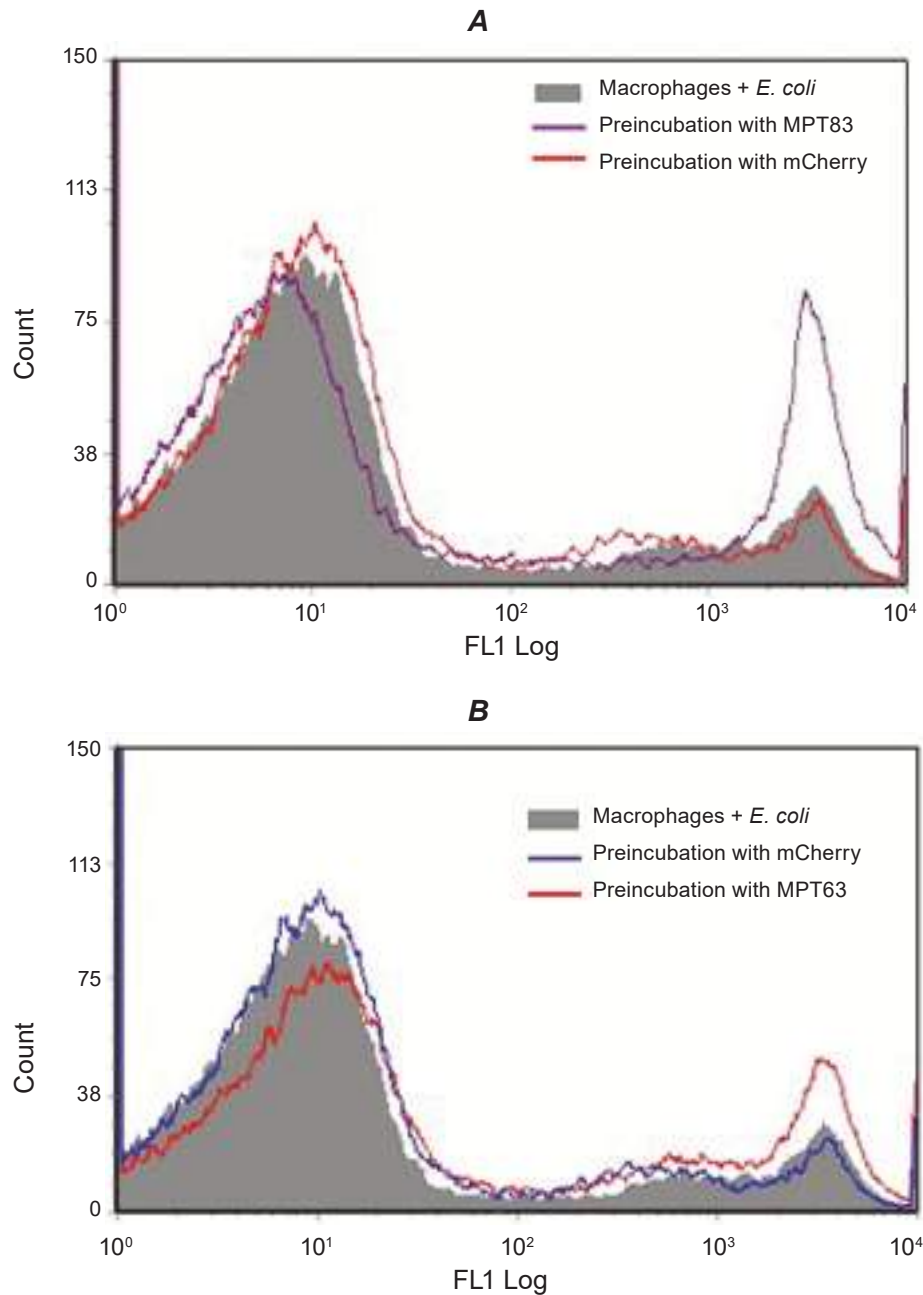


Fig. 3. Recombinant MPT63 and MPT83full induce active intake of EGFP expressed E. coli by peritoneal macrophages after 24 h preincubation. The level of bright luminous macrophages after EGFP expressed E. coli capture was observed by flow cytometry after exposure to MPT63 and MPT83 compared to control antigen. The percentage of actively phagocytic cells was increased 2 times for both mycobacterial antigens (A, B) compared with unstimulated macrophages and stimulated by mCherry

phagocytosis also may occur by both mechanisms simultaneously.

Using flow cytometry we have shown not only the increase of the intensity, but also of the number of phagocytic cells, which grew twofold in both cases under the action of studied mycobacterial proteins. The percentage of stained cells increased

to 19.1% after MPT63 treatment in comparison with 10.5% of intact (without treatment) cells and 10.9% which were in preincubation with mCherry and to 19.8% after MPT83full stimulation in comparison with 10.5% of intact cells and 10.9% which were pre-incubated with mCherry (Fig. 3). Furthermore, this effect was caused by long-term stimulation of

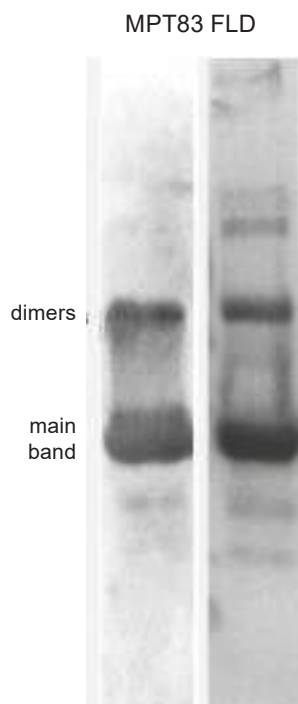


Fig. 4. Dimers of FLD rMPT83 identified by Western blot with anti-HisTag-HRP conjugate

cells. Treatment of mouse M Φ for 0.5, 1 and 2 h had no effect on the increase of phagocytic activity compared with control samples. This effect was caused only after 24 h of incubation, which was probably related to changes in gene expression than to release from the inner cell store molecules which had been involved in phagocytosis.

The fact that malignant mouse macrophage-like cells from J774 cell line did not respond to the effect of mycobacterium proteins observed in primary cultures of M Φ is to be discussed. Some malignant cell lines have excessive activation, including phagocytic activity rate [18]. Therefore, we cannot detect changes in phagocytic activity of these cells under stimulation with mycobacterial proteins. Also we suppose that molecular targets of the investigated proteins on the cell surface may be expressed on discrete population at the distinct stage of differentiation, which is better represented in primary culture.

The control antigens, like EGFP and mCherry, which were used in the phagocytosis assay, as well as rMPT63 and rMPT83full, were cloned in identical prokaryotic expression system and obtained and purified under the same conditions. So, we can exclude the effect of contamination and hence the effect

caused by the bacterial wall components, like other features of products from recombinant origin.

For many infection diseases M Φ provide the last niches for pathogen degradation and elimination, whereas mycobacteria can evade and coexist with these cells of host organism. Tuberculosis bacilli affect M Φ and persist in these cells avoiding endosome-lysosome fusion [3]. As a result, vesicles do not become acidic and bacteria survive.

The authors proposed that M Φ were the first target of MPT63 and MPT83 proteins of mycobacteria and their receptor molecules are localized at the surface of these cells. Also, we suggest that these immunodominant mycobacterial proteins facilitate bacteria cell phagocytosis for their survival inside M Φ . This can represent one of the ways how bacteria could escape from the environment outside the cell in the organism, which has many factors of innate and adaptive immunity that can eliminate pathogen.

As a consequence of phagocytosis mycobacteria are able to grow and reproduce within phagocyte. Perhaps, one of the many actions of MPT63 and MPT83 could be directed precisely to such “specific” protecting of the pathogen from the host immune system. Of course, this is only the first evidence, and further study of these antigens is required.

Thus, obtained previously MPT63 and for the first time cloned and obtained MPT83full strengthen phagocytic function of immune system cells. The value of full-size antigen in comparison with its short fragment FLD rMPT83(115-220) obtained previously in our lab shows its identification in the soluble fraction, which indicates the correct folding of molecules in spite of a lower yield of new protein. The ability to induce phagocytosis by products of contamination of prokaryotic expression system (e.g. lipopolysaccharide (LPS), teichoic acids) were offset by no increase of phagocytosis after control proteins treatment despite the same plasmid DNA, where their genes were inserted and obtained and purified by the same methods as for MPT63 and MPT83. The investigated effect caused by the chosen mycobacterial antigens was observed in the primary culture, but not in malignant cells, probably due to genetic determinism over activation of the latter. The enhancing of bacteria phagocytosis by macrophages after the exposure to mycobacterial antigens can be explained as the deception of immune system by mycobacteria, seeking to be captured by phagocytes for future survival and reproduction within the host.

Acknowledgments

Authors thank Andrii Labyntsev, Mykhailo Guzyk and Kyrylo Pyrshev for technical support with flow cytometry. This work was supported by the State order for scientific and technical products.

АНТИГЕНИ *Mycobacterium tuberculosis* МРТ63 ТА МРТ83 ПІДВИЩУЮТЬ ФАГОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ ПЕРИТОНІАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ МИШИ

A. A. Сіромолот^{1,2}, О. С. Олійник²,
Д. В. Колибо^{2,1}, С. В. Комисаренко²

¹ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: saa0205@ukr.net

Макрофаги – найбільш описана та охарактеризована мішень та клітина-хазяїн для мікобактерій. І, як й іншим клітинам природного імунітету, макрофагам притаманний широкий спектр рецепторних молекул, що взаємодіють із різноманітними патогенасоційованими молекулярними паттернами. Імунодомінантні антигени МРТ63 та МРТ83, що продукуються в значній кількості в штаммах *Mycobacterium bovis* та *Mycobacterium tuberculosis*, можуть бути залучені до розвитку інфекції. Метою нашого дослідження був пошук деяких ефектів цих мікобактеріальних антигенів на клітини-мішені. Для цього було клоновано повнорозмірний антиген МРТ83 та МРТ63 в плазмідній ДНК рЕТ24а(+). Показано зростання фагоцитарної активності макрофагів із перитонеальної порожнини миші, але не макрофагоподібних клітин лінії J774, які були стимульовані гМРТ63 та гМРТ83full протягом 24 год. Ефект цих антигенів можна розглядати як спосіб сприяння захоплення мікобактерій макрофагами для уникнення інших механізмів дії природного та набутого імунітету.

Ключові слова: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, макрофаги, фагоцитоз, МРТ63, МРТ83.

АНТИГЕНЫ *Mycobacterium tuberculosis* МРТ63 И МРТ83 ПОВЫШАЮТ ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШИ

A. A. Сиромолот^{1,2}, Е. С. Олейник²,
Д. В. Колибо^{2,1}, С. В. Комисаренко²

¹УНЦ «Институт биологии», Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: saa0205@ukr.net

Макрофаги – наиболее описанная и охарактеризованная мишень и клетка-хозяин для микобактерий. И, как и другим клеткам естественного иммунитета, макрофагам присущ широкий спектр рецепторных молекул, взаимодействующих с разнообразными патогенассоциированными молекулярными паттернами. Имунодоминантные антигены МРТ63 и МРТ83, которые продуцируются в значительном количестве в штаммах *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis*, могут быть задействованы в развитии инфекции. Целью нашего исследования был поиск некоторых эффектов этих микобактериальных антигенов на клетки-мишени. Для этого были клонированы полноразмерные антигены МРТ83 и МРТ63 в плазмидной ДНК рЕТ24а(+). Показан рост фагоцитарной активности макрофагов в перитонеальной полости мыши, но не макрофагоподобных клеток линии J774, которые стимулировались гМРТ63 и гМРТ83full на протяжении 24 ч. Эффект этих антигенов можно рассматривать как способ содействия захвату микобактерий макрофагами во избежание других механизмов действия естественного и приобретенного иммунитета.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, макрофаги, фагоцитоз, МРТ63, МРТ83.

References

- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393(6685): 537-544.
- Palomino JC. Tuberculosis: from basic science to patient care. Palomino J.C., Leao S.C., Rittaco V. Brazil publishing, 2007. 686 p.
- Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(1): 39-47.
- Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1991; 59(1): 372-382.
- Manca C, Lyashchenko K, Wiker HG, Usai D, Colangeli R, Gennaro ML. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1997; 65(1): 16-23.
- Redchuk TA, Oliinyk OS, Kaberniuk AA, Burkalova DO, Romaniuk SI, Kolibo DV, Komisarenko SV. Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* antigens MPB63 and MPB83 in *Escherichia coli*. *Rep Nat Acad Sci Ukraine*. 2007; 9: 161-166. (In Ukrainian).
- Redchuk TA, Korotkevich NV, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Labyntsev AI, Romaniuk SI, Kolibo DV, Busol VA, Komisarenko SV. Statistical analysis of the distribution of the antibody levels to *Mycobacterium bovis* antigens for bovine tuberculosis diagnostics. *Cytol Genet*. 2010; 44(5): 280-285.
- Goulding CW, Parseghian A, Sawaya MR, Cascio D, Apostol MI, Gennaro ML, Eisenberg D. Crystal structure of a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis*-MPT63 at 1.5-Å resolution. *Protein Sci*. 2002; 11(12): 2887-2893.
- Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 2002; 148(Pt 10): 2967-2973.
- Muñoz S, Hernández-Pando R, Abraham SN, Enciso JA. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol*. 2003; 170(11): 5590-5596.
- Wiker HG. MPB70 and MPB83 – major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scand J Immunol*. 2009; 69(6): 492-499.
- Chambers MA, Whelan AO, Spallek R, Singh M, Coddeville B, Guerardel Y, Ellass E. Non-acylated *Mycobacterium bovis* glycoprotein MPB83 binds to TLR1/2 and stimulates production of matrix metalloproteinase 9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 400(3): 403-408.
- Saraav I, Singh S, Sharma S. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? *Immunol Cell Biol*. 2014; 92(9): 741-746.
- Chen ST, Li JY, Zhang Y, Gao X, Cai H. Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. *J Immunol*. 2012; 188(2): 668-677.
- Gille C, Spring B, Tewes L, Poets CF, Orlikowsky T. A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults. *Cytometry A*. 2006; 69(3): 152-154.
- Steinkamp JA, Wilson JS, Saunders GC, Stewart CC. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science*. 1982; 215(4528): 64-66.
- Stewart CC, Lehnert BE, Steinkamp JA. *In vitro* and *in vivo* measurement of phagocytosis by flow cytometry. *Methods Enzymol*. 1986; 132: 183-192.
- Lugini L, Lozupone F, Matarrese P, Funaro C, Luciani F, Malorni W, Rivoltini L, Castelli C, Tinari A, Piris A, Parmiani G, Fais S. Potent phagocytic activity discriminates metastatic and primary human malignant melanomas: a key role of ezrin. *Lab Invest*. 2003; 83(11): 1555-1567.

Received 29.08.2016

MUTATION OF *katG* IN A CLINICAL ISOLATE OF *Mycobacterium tuberculosis*: EFFECTS ON CATALASE-PEROXIDASE FOR ISONIAZID ACTIVATION

PURKAN¹, IHSANAWATI², D. NATALIA², Y. M. SYAH²,
D. S. RETNONINGRUM³, H. S. KUSUMA⁴

¹Biochemistry Research Division, Department of Chemistry, Faculty of Sciences
and Technology, Airlangga University; Surabaya, Indonesia;
e-mail: purkan@fst.unair.ac.id;

²Biochemistry Research Division, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia;

³School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia;

⁴Department of Chemical Engineering, Institut Teknologi
Sepuluh Nopember, Surabaya, Indonesia;
e-mail: heriseptyakusuma@gmail.com

Mutations in *katG* gene are often associated with isoniazid (INH) resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strain. This research was performed to identify the *katG* mutation in clinical isolate (L8) that is resistant to INH at 1 µg/ml. In addition to characterize the catalase-peroxidase of KatG L8 and perform the *ab initio* structural study of the protein to get a more complete understanding in drug activation and the resistance mechanism. The *katG* gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*, then followed by characterization of catalase-peroxidase of KatG. The structure modelling was performed to know a basis of alterations in enzyme activity. A substitution of A713G that correspond to Asn238Ser replacement was found in the L8 *katG*. The Asn238Ser modification leads to a decline in the activity of catalase-peroxidase and INH oxidation of the L8 KatG protein. The catalytic efficiency (K_{cat}/K_M) of mutant KatG_{Asn238Ser} respectively decreases to 41 and 52% for catalase and peroxidase. The mutant KatG_{Asn238Ser} also shows a decrease of 62% in INH oxidation if compared to a wild type KatG (KatGwt). The mutant Asn238Ser might cause instability in the substrate binding site of KatG, because of removal of a salt bridge connecting the amine group of Asn238 to the carboxyl group of Glu233, which presents in KatGwt. The lost of the salt bridge in the substrate binding site in mutant KatG_{Asn238Ser} created changes unfavorable for enzyme activities, which in turn emerge as INH resistance in the L8 isolate of *M. tuberculosis*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, INH resistance, *katG*, catalase-peroxidase.

Tuberculosis (TB) is well known as an infectious disease that is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The disease is currently ranked as the seventh most common causes of death in the world, and still estimated to remain in the top 10 causes of death until 2030. Recently, TB is reported as the second leading cause of death in adults and recorded as the deadliest of all infectious diseases. Indonesia is classified as a country with the large number of TB cases and occupies the fifth rank of the 22 countries with high potential of TB. In the country, there are about 500,000 new cases of TB annually and 175,000 of them are deaths [1, 2]. Two percent of new cases and twelve percent of the recurring cases of TB found in Indonesia are the multid-

rug-resistant (MDR) cases [1]. A better understanding in the antituberculous drug resistance is needed to make easy in the TB therapy.

Isoniazid (isonicotinic acid hydrazide; INH) has commonly been recommended by the World Health Organization (WHO) to treat tuberculosis since 1952 because the drug has a high bactericidal effect and a low price [3]. The bactericidal effect of INH as TB drug depends on catalase-peroxidase of *M. tuberculosis* which is encoded by *katG* gene. The enzyme plays a role to convert isoniazid absorbed by the *M. tuberculosis* to be in active form, an isonicotinoyl acyl radical, to trigger the death of mycobacteria. This might occur because an isonicotinoyl acyl radical is a potential inhibitor for enoyl-acyl

carrier protein reductase (InhA) and β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase (KasA), the two key enzymes for the biosynthesis of mycolic acids, a cell wall component of mycobacteria [4, 5].

KatG mediates the sensitivity of *M. tuberculosis* to INH. The *katG* deficiency strain of *M. tuberculosis*, which is resistant to INH, can restore the sensitivity to INH when it is complemented with a functional *katG* [6]. Meanwhile, total deletion of *katG* gene in *M. tuberculosis* raised resistance to INH [6-8]. Nevertheless, the loss of catalase-peroxidase in *M. tuberculosis* has not yet explained completely the mechanism of INH resistance, because the total deletion of *katG* is rarely found in clinical isolates [4, 9].

It has been reported that 50-70% of INH-resistant *M. tuberculosis* strains are associated with the mutation in the *katG* gene [3, 4]. The mutation types are very diverse, with missense mutations being the most common alteration. The mutations in *katG* also reveal unique types in INH resistant strain from different geographical areas. The frequency of mutation types in *katG* is often only associated with drug resistance and rarely linked directly to the change of INH sensitivity or to the effect of the enzymatic activity of KatG. The *katG* mutations that affect catalase-peroxidase activity have been found in either all part of the gene and encode the N-terminal or the C-terminal part of the protein [10, 5]. Many variants of KatG associated with INH resistance exhibits a decrease in catalase-peroxidase activities. The decreasing scale of the activity among the mutants of *katG* does not directly correlate with INH resistance [11, 12]. This is the basis of the argument that the INH resistance in clinical isolates is not linked directly to the ability of variants of KatG in INH activation.

The mutant KatG Ser315Thr, that is commonly found in clinical isolates and associated with INH resistance, decreases the activities of catalase-peroxidase and INH oxidation [13, 14]. The amino acid Ser315 in KatG is closely put in the active environment. So that, the genetic modifications in this part are easily understood as the producer of importantly affected enzymatic function and thus isoniazid resistance. As many as 50% variants of *katG* associated with INH resistance are not modified in Ser315Thr. Biochemical analysis of variants of *katG* other than Ser315Thr is necessary to examine the relation between INH resistance with the changes in the function and structure of the mutants.

Some clinical isolates of INH-resistant *M. tuberculosis* from Indonesian TB patients are not mutated at codon 315 of *katG*. Among these isolates, an isolate, namely L8 isolate, shows resistance to INH at 1 $\mu\text{g/ml}$. This paper shows the correlation of *katG* mutation in the isolate with the biochemical properties of catalase-peroxidase, especially for isoniazid oxidation. This paper also examines the ab initio structural study of the mutant KatG L8 with the aim of gaining a more complete understanding of drug activation and the resistance mechanism.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids. A clinical isolate of *M. tuberculosis* was obtained from sputum of a TB patient in Bandung, Indonesia. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as hosts for cloning of *katG* of INH resistant and sensitive *M. tuberculosis*. The *E. coli* BL21 (DE3) (Promega, Madison, USA) was employed as an expression host of KatG. The plasmid pGEM[®]-T (Invitrogen) and pCold II-DNA (Kinki University) were used as a cloning and expression vector, respectively.

Preparation of chromosomal DNA. Chromosomal DNAs of *M. tuberculosis* of wild type and clinical isolates were prepared by an alkaline lysis method in 5 mM Tris-Cl buffer (pH 8.5) containing 0.5% (b/v) Tween-20 and 0.2 mg/ml proteinase K at 50 °C for 60 min. The mixture then was heated at 95 °C for 5 min. Cellular debris was collected at 12,000 g for 10 min and the supernatant containing chromosomal DNA of *M. tuberculosis* was used for PCR [15].

Amplification of *katG* gene. The full length of the *katG* gene was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) technique using FG and RG primers (Table 1). PCR was performed in a total reaction volume of 50 μl containing 50 ng chromosomal DNA; 1xPCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 0.1 mM of each primer, 200 μM dNTPs; 1.5 mM MgCl_2 ; and 0.25 unit of *Taq* DNA polymerase (Amersham). The amplification process was done by a GeneAmp[®] PCR System 2700 (PerkinElmer), and set at the following steps: pre-denaturation at 94 °C for 4 min, 25 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 57 °C for 1 min, and an extension at 72 °C for 3 min. The process was terminated by post-elongation at 72 °C for 7 min. All PCR products were analyzed using agarose gel electrophoresis and purified by GFX purification kit (Amersham).

Table 1. The oligonucleotide primers for sequencing of *katG* gene

Name of Primer	Nucleotide sequence of primers (5'→3')
SP6 promoter	catacgatttaggtgacactatag
T7 promoter	taatacactcactataggg
FG	gttattgaattcgatgcccagcaacacccac
RG	ttcatagcggcgcgcgcacgtcgaacctgtc
KF	gcagatggggctgatctacg
FDPRK	cgacgagttcgccaaggc

Cloning of the *katG* gene. The PCR products corresponding to the *katG* gene was inserted into pGEM®-T vector, then the recombinant vector was used to transform *E. coli* TOP10 using the CaCl₂ method. [16] Transformants were screened in Luria Bertani (LB) solid medium containing ampicillin 100 µg/ml, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside (X-gal) and isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG). The target transformants which carried recombinant pGEM-T-*katG* plasmid were selected by a restriction analysis.

DNA sequencing. The nucleotide of the *katG* gene in the recombinant plasmid was sequenced by an automatic nucleotide sequencer (ABI PRISM, Macrogen, Seoul, Korea). The recombinant pGEM®-T, namely pGEM-T-*katG* was used for DNA template. All oligonucleotides primers used for the sequencing were presented in Table 1.

Alignment analysis. The *katG* genes of wild type and clinical isolate of *M. tuberculosis* were analyzed *in silico* by aligning the nucleotide sequences of the genes and their deduced amino acid sequences, using the SeqManTMII and MegAlignTM DNASTAR program (Lasergene). The nucleotides of the genes were also compared with *katG* nucleotides in Genbank (accession number X68081).

Subcloning of the *katG* gene. The *katG* gene fragment in pGEM-T-*katG* was taken by digestion of plasmid recombinant with NdeII and XbaI. The digestion product was purified and inserted into plasmid pCold II DNA, which previously had been digested with the same restriction enzymes. The ligation product was transformed to *E. coli* BL21 (DE3) and the transformed bacteria were then grown on a selective LB agar plate.

***KatG* gene expression.** A single colony of *E. coli* BL21 (DE3) containing recombinant plasmid (pCold II-*katG*) was cultured in LB liquid medium

containing ampicillin 100 µg/ml, then followed by shaking at 37 °C to obtain an optical density (OD) at λ 600 nm approximately of 0.4-0.5. The culture was then immediately cooled at 15 °C for 30 minutes without shaking. To induce the expression of recombinant protein, the culture was added by 0.1 mM IPTG, and followed by shaking at 15 °C for 24 h. The culture was then centrifugated at 5,000 g for 10 min to harvest the cells. The resulted cells were washed and re-suspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), and then disrupted by sonication. The cellular debris was removed by centrifugation at 12,000 g for 15 min. The *KatG* protein that remained in the supernatant was then purified.

Protein purification. The recombinant protein of *KatG* was purified by affinity chromatography using HisTrap™-HP column (GE Healthcare, Freiburg, Germany) containing Ni-sepharose matrix. The purification steps were run according to the manufacturer's protocol. The recombinant protein was eluted gradually by 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.0, containing imidazole of 50-200 mM. The purified protein was analyzed by a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Catalase-peroxidase activity and INH oxidation assays. The recombinant *KatG* was assayed regarding its activity on catalase-peroxidase and INH oxidation. Catalase activity was determined by the Patti and Bonet-Maury method, based on the formed color from the reaction of titanium with H₂O₂ [17]. The reaction was carried out in 10 mM K-phosphate buffer pH 7.0 with a total volume of 1 ml containing 12.5 mM H₂O₂ substrate and *KatG* protein. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 2.5 ml of titanium reagent, in turn the formed yellow color was observed at λ 410 nm [17]. One unit of catalase activity was defined as the amount of enzyme decomposing 1 mmol of H₂O₂ per min.

Peroxidase activity was determined by reacting of 100 µM o-dianisidine in 100 ml of 50 mM potassium buffer (pH 4.5) containing 25 mM *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) with 12.5 mM H₂O₂. The absorbance of the reaction product, i.e. o-dianisidin quinone diimine was observed at λ 460 nm ($\epsilon_{460} = 11.86 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [13]. One unit of peroxidase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of one µmol product per min at 30 °C.

The activity of *katG* on INH oxidation was carried out by the Shoeb method [18]. A mixture

of 0.65 g KatG protein in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 was reacted with 13.1 mM phenol and 6.25 mM H₂O₂ in a total volume of 3 ml at 37 °C for 7 min, then followed by addition of 2.4 mM INH. The reaction was continued at 37 °C for 1 h [18]. The absorbance of the reaction product, i.e. benzo-quinone was monitored at λ 444 nm ($\epsilon_{444} = 0.393 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). One unit of the activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of benzo-quinone product per min at 37 °C.

Structure alignment. Three-dimensional structure of the mutant KatG protein was generated by SWISS-MODEL, an automated protein homology modeling server, using the known crystal structure of a wild type KatG protein structure (PDB code 1SJ2) as a template. The minimization of the structural model was conducted with Amber 10 [19]. The modeled structure was visualized using PyMOL 1.3 (www.pymol.org). Root mean square deviation of the model was compared to the 1SJ2 structure by Super Pose version 10.

Results and Discussion

Cloning of *katG* gene from INH-resistant *M. tuberculosis* strain. The open reading frame (ORF) of *katG* gene from L8 Isolate of INH-resistant *M. tuberculosis* strain was amplified by PCR using FG and RG primers. The 2.2 kb fragment of PCR-product then was inserted in pGEM-T vector (3.0 kb) to construct pGEMT-*katG* recombinant. The recombinant plasmid exhibited two fragments (3.0 and 2.2 kb) then it was digested by both *EcoRI* and *NotI* restriction enzymes (Fig. 1). The 3.0 kb fragment corresponded to pGemT vector, and the 2.2 kb fragment had the size of the *katG* gene. The 2.2 kb fragment of L8 isolate carried a mutation, the guanine instead of adenine at position 713 (Fig. 3).

The *katG* gene was then subcloned to pColdII-DNA as expression vector. Insertion of *katG* fragment (2.2 kb) in vector pCold II-DNA (4.3 kb) yielded a pCold II-*katG* recombinant (6.5 kb). Single digestion of the recombinant with *NdeI* and *XbaI* restriction enzymes yielded a DNA fragment (6.5 kb), respectively, while the digestion with both the enzymes yielded two fragments consisting of 2.2 and 4.3 kb (Fig. 2). The nucleotides sequences of the *katG* gene from the L8 *M. tuberculosis* isolate showed a substitution of adenine to guanine at position 713 compared to the *katG* from INH susceptible *M. tuberculosis*, the H37Rv strain (Fig. 3). The

mutation altered the amino acid of KatG protein, the serine instead of asparagine at position 238 through *in silico* translation (Fig. 3).

The KatG expression. To express the *katG*, the *E. coli* BL21 (DE3) that bring pCold-*katG* recombinant was grown in LB medium containing ampicillin, then followed the induction of the culture with IPTG. After the cell of *E. coli* was collected by centrifugation, the cell pellets were lysed to release its extract protein. Analysis of the extract protein in SDS PAGE showed a high intensity of protein band with a molecular mass of 80 kDa that belonged to KatG protein (Fig. 4).

Catalase-peroxidase activities of mutant KatG_{Asn238Ser}. The kinetic properties of catalase-peroxidase of mutant KatG_{Asn238Ser} and wild type had been determined, i.e. K_M , K_{cat} and K_{cat}/K_M . The mutant KatG_{Asn238Ser} exhibited the K_{cat}/K_M value for catalase and peroxidase lower than KatGwt. The K_{cat}/K_M value mean as the catalytic efficiency of enzyme. The high K_{cat}/K_M suggested that an enzyme could bind its substrate effectively and decompose its substrate into a product well, and vice versa. KatGwt has K_{cat}/K_M value as $8.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{S}^{-1}$ for catalase and $1.99 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{S}^{-1}$ for peroxidase. Meanwhile KatG_{Asn238Ser} mutants have a low K_{cat}/K_M value, i.e. $5.12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{S}^{-1}$ for catalase and $0.96 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{S}^{-1}$ for peroxidase (Table 2). In addition to the kinetic properties, the mutant KatG_{Asn238Ser} took also a declining activity to oxidize INH. The mutant KatG_{Asn238Ser} activity in oxidation of isoniazid remained 42.5% from that of KatGwt (Fig. 5).

Structural Model of mutant KatG_{Asn238Ser}. Structure modeling of KatG_{Asn238Ser} was done to know the effect of amino acid substitution in the mutant protein. Superposition of α framework of the mutant model with the KatGwt structure exhibited root mean square deviations (RMSD) of 0.073. This result showed that The mutant KatG_{Asn238Ser} shared similar structure with KatGwt of *M. tuberculosis* H37Rv. Moreover, the amino acid substitution of Asn238Ser found in the mutant KatG L8 eliminate the salt bridge interaction around the substrate binding site, which connects between the amine group in side chain of Asn238 residue with the carboxyl group of Glu233 in KatGwt (Fig. 6).

KatG is the only enzyme in *M. tuberculosis* that could generate isoniazid susceptibility. Therefore it plays a central role in the development of at least one type of isoniazid resistance [20]. Mutations in *katG* are often associated with INH resistance. A substitution of adenine to guanine at position 713 in

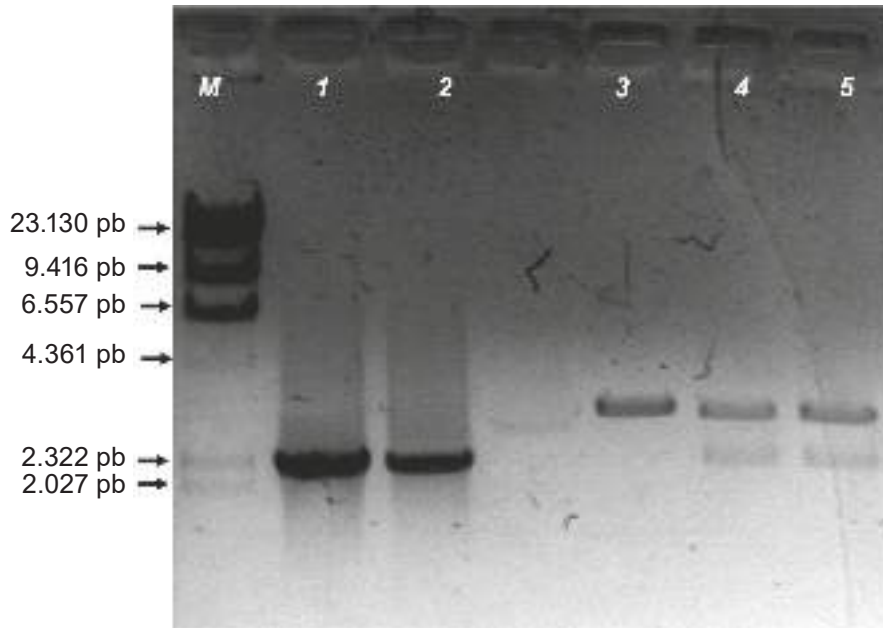


Fig. 1. The restriction map of pGemT-katG recombinant. Marker DNA λ /HindIII (M); the 2.2 kb fragment of PCRproduct from L8 and H37Rv isolate (1 and 2); The purified katG (3); the pGemT-katG pGemT-katG (L8 and H37Rv) which digested by EcoRI and NotI (4 and 5). Each digestion resulted two fragments at 3.0 kb and 2.2 kb. The 3.0 fragment correspond to pGemT vector, then the 2.2 kb fragment correspond to the katG gene

katG gene that correspond to Asn238Ser replacement was found in the L8 clinical isolate which had a resistance level to INH at 1 μ g/ml. Minimal inhibitor concentration (MIC) of INH for growing *M. tuberculosis* has been reported as 0.02 to 0.06 μ g/ml [3]. The INH resistance is classified as a low level for MIC value < 1 μ g/ml, and a high level for MIC value \geq 1 μ g/ml [21]. Many papers showed that the level of INH resistance of clinical isolates of *M. tuberculosis* are not directly correlated with the number of mutations in katG. There are many clinical isolates resistant to INH at low level, having multiple mutations in katG, and vice versa, single mutation is connected with high resistance to INH [5, 21, 22].

Direct relationship between mutation in katG with INH resistance phenotype is still insufficient to understand the emergence of INH resistance in clinical isolates, because the mutation events might connect with other biological traits. As confirmation that the substitution Asn238Ser connected with INH resistance in clinical isolate of L8, it was determined the activities of catalase-peroxidase and INH oxidation by the mutant.

The mutant KatG_{Asn238Ser} of the L8 isolate exhibited lower catalase and peroxidase activity than that of KatGwt. The mutant has a binding affinity

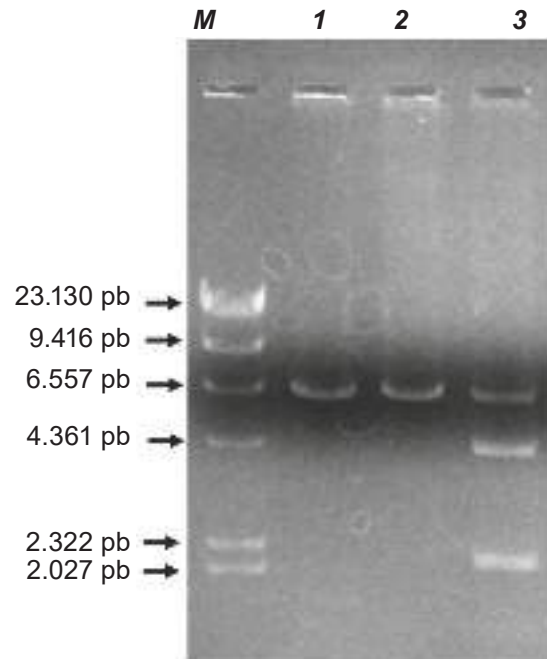


Fig. 2. The restriction map of pCold II-katG recombinant. Marker DNA λ /HindIII (M), pCold II-DNA/XbaI (1), pCold II-katG/NdeI (2), pCold II-katG/NdeI + XbaI (3). Digestion of the recombinant with both the enzymes yielded two fragments consisting of 2.2 and 4.3 kb

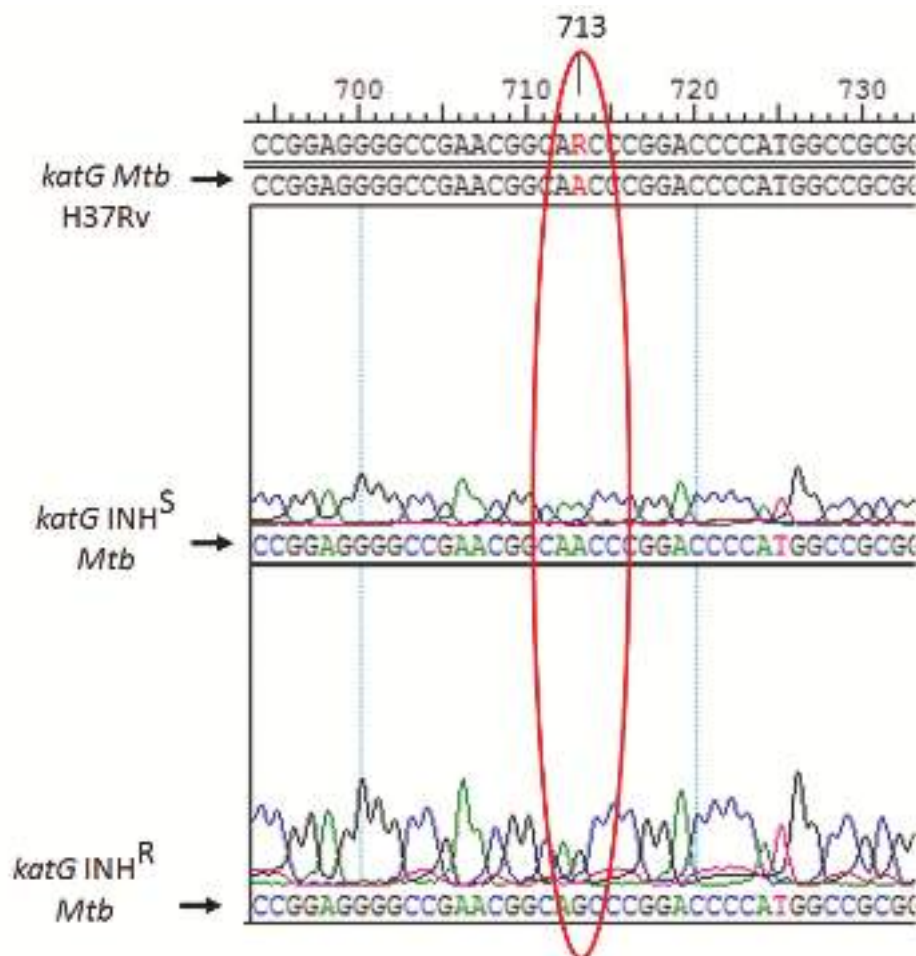


Fig. 3. Nucleotides alignment of the *katG* of INH resistant *M. tuberculosis* strain (L8) againsts the *katG* from INH sensitive strain (H37Rv) and GenBank. Comparing with H37Rv and genbank *katG*, The L8 *katG* exhibited a varian nucleotide at position 713, guanine instead of adenine, then substituted Asn with Ser at position 238. Mutation is marked with a red oval

to the substrate is lower than the KatGwt, because it has a value of K_M for each catalase and peroxidase, 1.4 times higher than KatGwt (Table 2). Substitution Asn238Ser reduced 40% of substrate binding affinity for catalase-peroxidase of the mutant. Comparing with KatGwt, the mutant KatG_{Asn238Ser} also displayed a decrease of K_{cat} value by 17% for catalase and 32% for peroxidase. This means that the mutant lost 17 and 32% ability of catalase and peroxidase respectively in the converting of substrate into product. The catalytic efficiency that symbolized by K_{cat}/K_M for the mutant KatG_{Asn238Ser} decreased by 41% for catalase and 52% for peroxidase activity (Table 2). The mutant KatG_{Asn238Ser} decreased in both the binding affinity and the converting activity of substrate into product. Several papers reported that the catalase-peroxidase activity among variants of *katG*

were not correlated with the resistance level of INH [11, 12]. This can be triggered due to the measurement of enzyme activity *in vitro*, but it is connected directly with INH resistance phenotype which is actually derived from the *in vivo* process.

The INH oxidation test of KatG_{Asn238Ser} showed that the mutant lost 62% of the activity compared with that of KatGwt (Table 2). The Asn238Ser modification in KatG of INH resistant isolate (L8) is connected with the decline in the activity of catalase-peroxidase and INH oxidation of the protein. Decreasing of catalytic efficiency (K_{cat}/K_M) of mutant KatG_{Asn238Ser} as 41% for catalase and 52% for peroxidase accompanied the reduction of 62% in INH oxidation activity of the mutant. The decline of INH activation in many variants of KatG, i.e. Ala110Val, Asp735Ala, Ala139Pro, Ser315Asn, Leu619Pro, and

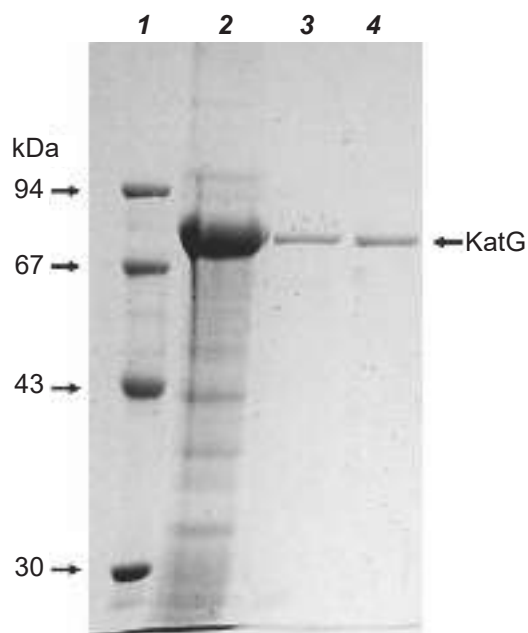


Fig. 4. Electrophoregram of KatG protein in SDS PAGE. Protein marker (1), crude extract of KatG (2), purify product of L8 and H37Rv KatG (3 and 4). The KatG protein was eluted by 100 mM imidazole buffer

Leu634Phe have exhibited a highly correlated with the change level of catalase-peroxidase activity for the mutants [23].

The catalytic function of KatG is carried out effectively by amino acid residues in the active site, i.e. Arg-104, Trp-107 and His-108 residues in the distal pocket, and His270, Trp321 and Asp381 residues in the proximal pocket. INH binds to KatG via interacting with amino acids in the distal pocket. Other residues such as Val230, Asn231, Pro232 and Ser315 have been reported to be involved in interacting with INH [24-26]. The stability in the active site environ-

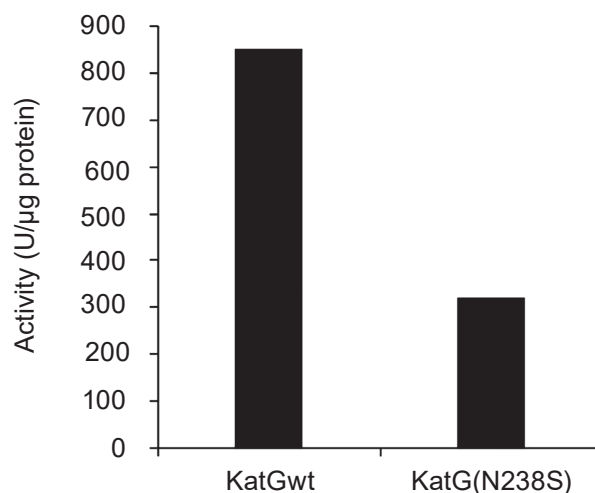


Fig. 5. The INH oxidation activity of wild type and mutant KatG

ment of KatG is required to support the INH activation by the protein.

The failure role of KatG in the INH activating has been shown in detail by the mutant KatG_{Ser315Thr} [12, 13, 27]. The Ser315Thr substitution in KatG impacts on the shifting of substrate binding channel from 6.0 to 4.7 Å [27]. Consequently the mutant failed to bind the INH, and subsequently decreased 160 times in the INH activation compared with KatGwt [14].

By using a structure model, the basis of a decrease in the catalytic efficiency for catalase-peroxidase and INH oxidation activity in the mutant KatG_{Asn238Ser} was described. In the KatGwt structure, the amino acid 238 is put closely to the substrate binding site, i.e. Asn137, Val230, Asn231, Pro232 and Ser315 residues. It is found that Asn231 residue makes hydrogen bond with Glu233 and Van Der Walls interaction with Asn236. These interactions

Table 2. Kinetic parameters of catalase-peroxidase of KatGwt and KatG_{Asn238Ser}

Activity	Isolate	Kinetic parameters		
		K_{cat} (S ⁻¹)	K_M (mM)	K_{cat}/K_M (M ⁻¹ ·S ⁻¹)
Catalase				
Wild type KatG	H37Rv	272.3	3.16	8.62×10 ⁴
KatG (Asn238Ser)	L8	227.5	4.44	5.12×10 ⁴
Peroxidase				
Wild type KatG	H37Rv	49.0	0.25	1.99×10 ⁵
KatG (Asn238Ser)	L8	33.3	0.35	0.96×10 ⁵

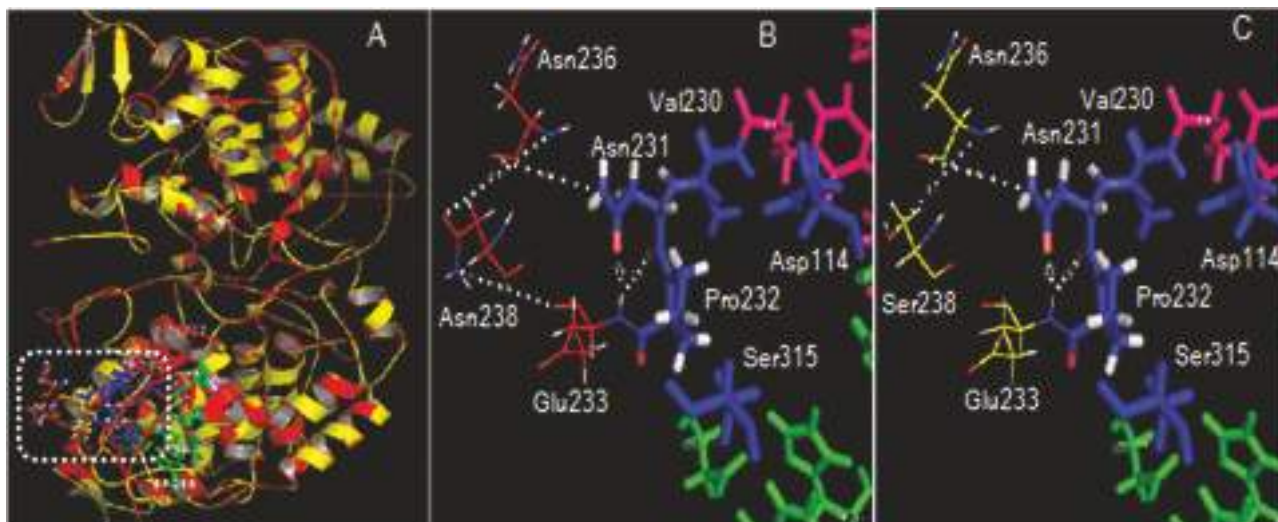


Fig. 6. Illustration of Asn238Ser substitution effect in KatG L8. Superposition of mutant KatG structure (L8) (yellow) to the KatGwt (red) (A). The blue rod-shaped amino acids represented the residues for substrate binding; green rod-shaped amino acids represented catalytic residues, and magenta are the residue for cross links. In the KatGwt, the Asn238 stabilized the active site environment through linkage to the Glu233 and Asn236 (B). In the mutant KatG L8, the Ser238 residue could not make interaction with Glu233

are stabilized by the presence of salt bridge which connects between the amine group in side chain of Asn238 residue with the carboxyl group of Glu233 in KatGwt (Fig. 6). This salt bridge was lost due to modification of Asn238Ser in the mutant KatG L8. The lost of the salt bridge created unfavorable for enzyme activities, then in turn it emerged the INH resistance in the L8 isolate of *M. tuberculosis*. The model analysis of KatG_{Asn238Ser} should be further confirmed by a real crystal structure of the mutant.

Conflicts of interest. All authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

A partial funding of this research was supported by DIPA Secretariat of Research and Development Agency, The Ministry of Health, Republic of Indonesia, Number: 0682/034-11.1.01/00/2011. We also thank Prof. Shigeru Shigeoka, PhD., Plant Molecular Physiology Lab, Dept of Advance Bioscience, Kinki University, Japan for giving pCold II-DNA plasmid and laboratory support for this research.

МУТАЦІЯ *katG* У КЛІНІЧНОМУ ІЗОЛЯТІ *Mycobacterium tuberculosis*: ВПЛИВ НА КАТАЛАЗУ-ПЕРОКСИДАЗУ, ЩО АКТИВУЄ ІЗОНІАЗИД

Purkan¹, Ihsanawati², D. Natalia², Y. M. Syah², D. S. Retnoningrum³, H. S. Kusuma⁴

¹Biochemistry Research Division, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology, Airlangga University; Surabaya, Indonesia; e-mail: purkan@fst.unair.ac.id;

²Biochemistry Research Division, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia;

³School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia;

⁴Department of Chemical Engineering, Institute Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, Indonesia; e-mail: heriseptyakusuma@gmail.com

Мутації в гені *katG* часто пов'язані із резистентністю штаму *Mycobacterium tuberculosis* до ізоніазиду. Дослідження проведено з метою виявлення мутації *katG* в клінічному ізоляті (L8) з *M. tuberculosis*, стійкими до ізоніазиду за концентрації 1 мкг/мл. У роботі охарактеризовано каталазу-пероксидазу KatG L8 і проведено вивчення структури протеїну з метою глибше зрозуміти процес активації препарату і механізм резистентності до нього *M. tuberculosis*. Ген *katG* був клонований і експресований в *Escherichia coli*, вивчено властивості каталази-пероксидази KatG. Проведено моделювання структури протеїну для з'ясування причин зміни ензиматичної активності. Встановлено заміщення каталази-пероксидази A713G, що відповідає заміні Asn238Ser в L8 *katG*. Модифікація Asn238Ser у протеїні L8 KatG призводила до зниження активності каталази-пероксидази і окислення ізоніазиду. Каталітична ефективність (K_{cat}/K_M) мутантного KatG_{Asn238Ser} зменшувалась для каталази і пероксидази до 41 і 52% відповідно. Мутант KatG_{Asn238Ser} також знижував окислення ізоніазиду на 62% порівняно з диким типом KatG (KatGwt). Показано, що мутація Asn238Ser може призвести до нестабільності в сполучній ділянці KatG через вилучення електростатичного зв'язку, що з'єднує аміногрупу Asn238 із карбоксильною групою Glu233, яка представлена в KatGwt. Втрата електростатичного зв'язку в місці зв'язування субстрату в му-

танта KatG_{Asn238Ser} знижує активність ензимів, що, в свою чергу, зумовлює резистентність *M. tuberculosis* до ізоніазиду в ізоляті L8.

Ключові слова: *Mycobacterium tuberculosis*, резистентність до ізоніазиду, *katG*, каталаза-пероксидаза.

МУТАЦИЯ *katG* В КЛИНИЧЕСКОМ ИЗОЛЯТЕ *Mycobacterium tuberculosis*: ВЛИЯНИЕ НА КАТАЛАЗУ-ПЕРОКСИДАЗУ, АКТИВИРУЮЩУЮ ИЗОНИАЗИД

Purkan¹, Ihsanawati², D. Natalia², Y. M. Syah², D. S. Retnoningrum³, H. S. Kusuma⁴

¹Biochemistry Research Division, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology, Airlangga University; Surabaya, Indonesia; e-mail: purkan@fst.unair.ac.id;

²Biochemistry Research Division, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia;

³School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia;

⁴Department of Chemical Engineering, Institute Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, Indonesia; e-mail: heriseptyakusuma@gmail.com

Мутации в гене *katG* часто связаны с резистентностью штамма *Mycobacterium tuberculosis* к изониазиду. Это исследование проведено для определения мутации *katG* в клиническом изоляте (L8) с *M. tuberculosis*, устойчивыми к изониазиду при концентрации 1 мкг/мл. В работе охарактеризована каталаза-пероксидаза KatG L8 и выполнены первоначальные структурные исследования протеина с целью более полного понимания процесса активации препарата и механизма резистентности к нему *M. tuberculosis*. Ген *katG* был клонирован и экспрессирован в *Escherichia coli*, затем изучены свойства каталазы-пероксидазы KatG. Проведено моделирование структуры протеина для выяснения причин изменения энзиматической активности. Установлено замещение каталазы-пероксидазы A713G, что соответствует замене Asn238Ser в L8 *katG*. Модификация Asn238Ser в протеине L8 KatG приводила к снижению активности каталазы-пероксидазы и окисления изониазида. Каталитическая эффективность (K_{cat}/K_M) мутантного KatG_{Asn238Ser} уменьшалась для каталазы

и пероксидазы до 41 и 52% соответственно. Мутант KatG_{Asn238Ser} также снижал окисление изониазида на 62%, по сравнению с диким типом KatG (KatGwt). Показано, что мутация Asn238Ser может привести к нестабильности в связывающем участке KatG из-за удаления электростатической связи, соединяющей аминокислотную группу Asn238 с карбоксильной группой Glu233, которая представлена в KatGwt. Потеря электростатического взаимодействия в месте связывания субстрата в мутанте KatG_{Asn238Ser} снижает активность энзимов, что, в свою очередь, обуславливает резистентность к изониазиду *M. tuberculosis* в изоляте L8.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, резистентность к изониазиду, *katG*, каталаза-пероксидаза.

References

1. Anonymous. Tuberculosis. <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>. Retrieved 2014-11-25.
2. Purkan, Ma'rif MJA, Retnowati W, Baktir A, Puspaningsih NNT. Mutation in *pncA* and distortion in PZase model structure as a basis of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Chem Pharm Res.* 2015; 7(1): 312-318.
3. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, Shikama Mde L, Mamizuka EM, Hirata RD, Hirata MH. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(9): 3373-3381.
4. Pretorius GS, van Helden PD, Sirgel F, Eisenach KD, Victor TC. Mutations in *katG* gene sequences in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* are rare. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(10): 2276-2281.
5. Purkan, Ihsanawati, Syah Y, Retnoningrum D, Noer A, Shigeoka S, Natalia D. Novel mutations in *katG* gene of a clinical isolate of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Biologia.* 2012; 67(1): 41-47.
6. Zhang Y, Dhandayuthapani S, Deretic V. Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(23): 13212-13216.
7. Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1999; 79(4): 267-271.
8. Rouse DA, DeVito JA, Li Z, Byer H, Morris SL. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol.* 1996; 22(3): 583-592.
9. Atalay F, Akar N, Ernam Turgut D, Aysev D, Ergün P, Erdoğan Y. Catalase-Peroxidase Gene (*KatG*) Deletion in Isoniazid Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *T Klin J Med Sci.* 2004; 24(3): 243-246.
10. Yu S, Chouchane S, Magliozzo RS. Characterization of the W321F mutant of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase *KatG*. *Protein Sci.* 2002; 11(1): 58-64.
11. Ghiladi RA, Medzihradzky KF, Rusnak FM, Ortiz de Montellano PR. Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* *KatG*. *J Am Chem Soc.* 2005; 127(38): 13428-13442.
12. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* *KatG*: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci.* 2010; 19(3): 458-474.
13. Wengenack NL, Lane BD, Hill PJ, Uhl JR, Lukat-Rodgers GS, Hall L, Roberts GD, Cockerill FR 3rd, Brennan PJ, Rodgers KR, Belisle JT, Rusnak F. Purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* *KatG*, *KatG*(S315T), and *Mycobacterium bovis* *KatG*(R463L). *Protein Expr Purif.* 2004; 36(2): 232-243.
14. Kapetanaki SM, Zhao X, Yu S, Magliozzo RS, Schelvis JP. Modification of the active site of *Mycobacterium tuberculosis* *KatG* after disruption of the Met-Tyr-Trp cross-linked adduct. *J Inorg Biochem.* 2007; 101(3): 422-433.
15. Noviana H, Nurachman Z, Ramdani M, Noer AS. Multiplex PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Bandung, Indonesia. *Microbiology (Indonesia).* 2007; 1(3): 114-118.
16. Sambrook JF, Maniatis T. Molecular Cloning Laboratory Manual. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.

17. Patti F, Bonet-Maury P. Colorimetric method for determination of catalase. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*. 1953; 35(10): 1177-1180.
18. Shoeb HA, Bowman BU Jr, Ottolenghi AC, Merola AJ. Evidence for the generation of active oxygen by isoniazid treatment of extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 27(3): 404-407.
19. Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, et al. AMBER 9. San Francisco: University of California; 2006.
20. Johnsson K, Froland WA, Schultz PG. Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 1997; 272(5): 2834-2840.
21. Rahimi MK, Bostanabad ZS, Adimi P, Shekarabei M, Habibollah M, Shirmohammadi F, Bigdeli Kh, Faraji A, Delalat B, Tayebi Z, Masoumi M, Jabbarzadeh E, Pourazar Sh, Titov LP. Multiple-mutations in the katG encoding catalase peroxidase in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates correlate with high-level of resistance in patients with active pulmonary tuberculosis in Iran. *J Microbiol Antimicrob*. 2009; 1(1): 1-8.
22. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T. Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5): 1793-1799.
23. Wei CJ, Lei B, Musser JM, Tu SC. Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(2): 670-675.
24. Bertrand T, Eady NA, Jones JN, Jesmin, Nagy JM, Jamart-Grégoire B, Raven EL, Brown KA. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J Biol Chem*. 2004; 279(37): 38991-38999.
25. Pierattelli R, Banci L, Eady NA, Bodiguel J, Jones JN, Moody PC, Raven EL, Jamart-Grégoire B, Brown KA. Enzyme-catalyzed mechanism of isoniazid activation in class I and class III peroxidases. *J Biol Chem*. 2004; 279(37): 39000-39009.
26. Smulevich G, Jakopitsch C, Droghetti E, Obinger C. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *J Inorg Biochem*. 2006; 100(4): 568-585.
27. Zhao X, Yu H, Yu S, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry*. 2006; 45(13): 4131-4140.

Received 29.08.2016

EFFECT OF NITRIC OXIDE DONOR SNAP ON GABA RELEASE FROM RAT BRAIN NERVE TERMINALS

A. S. TARASENKO

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: tas@biochem.kiev.ua*

In this work we investigated the effect of nanomolar concentrations of nitric oxide on the release of gamma-aminobutyric acid (GABA) from rat brain nerve terminals using a radioisotope method with [3 H]GABA and a spectrofluorimetric method with Ca^{2+} -sensitive probe Fluo-4 AM. It was shown that in the presence of dithiothreitol (DTT), nitric oxide donor SNAP at concentration, in which it produces NO in the nanomolar range, caused Ca^{2+} -independent [3 H]GABA release from nerve terminals. The applications of 4-aminopyridine (4-AP) and nipecotic acid (NA), as the inducers of GABA release from vesicular and cytoplasmic pools, showed that the maximum of SNAP/+DTT-induced [3 H]GABA release was registered at 10th min of incubation and coincided in time with significant increase (almost double) in NA-induced [3 H]GABA release. At this time point, 4-AP-induced release of [3 H]GABA was drastically reduced. At the 15th min of incubation of nerve terminals with SNAP/+DTT, the opposite picture was observed: the decrease in NA- and increase in 4-AP-induced [3 H]GABA release. Thus, nitric oxide in the form of S-nitrosothiols at nanomolar concentrations causes Ca^{2+} -independent GABA leakage from synaptic vesicles into cytosol with subsequent release from nerve terminals. The reuptake of the neurotransmitter and its re-accumulation in synaptic vesicles occur later.

Key words: nitric oxide, GABA release, vesicular and cytoplasmic pool.

Nitric oxide (NO) is a unique signalling molecule that is involved in key body's vital processes. In the central nervous system, nitric oxide modulates the efficiency of synaptic transmission and affects the formation of prolonged connections between neurons that underlies the cognitive brain functions: memory and learning. The physiological function of NO in brain is closely related to its ability to modulate the release of neurotransmitters. Freely diffusing into the presynaptic terminal, nitric oxide affects the release of almost all known classes of neurotransmitters, exhibiting both stimulating [1] and inhibitory [2] effects on neurotransmission. Some authors believe that NO acting on the presynapse exhibits multidirectional effect, namely reducing the stimulated release of neurotransmitters and, at the same time, increasing the spontaneous release of neurotransmitters [3].

GABA is one of the key inhibitory neurotransmitters, which controls neural tissue excitability and affects high integrative brain functions. *In vivo* GABAergic neurotransmission can be modulated by nitric oxide released from NO-containing drugs, glial cells or postsynaptic nerve terminals due to the activation of, for example, postsynaptic NMDA-type glutamate receptors [4]. Concerning the latter,

NO acts as a retrograde messenger that diffuses into presynaptic terminals and modulates neurotransmitter release. It was shown that the release of GABA from nerve terminals can occur via the classical pathway, exocytosis [5], as well as via plasma membrane GABA transporter reversal [6]. There is also an opinion that NO, affecting the GABAergic terminals, engages both pathways: inhibiting exocytosis and stimulating the transporter-mediated GABA release [7].

Ambiguity and sometimes contradictory data on the effect of NO on the release of neurotransmitters can be a result from different redox-status of NO molecule (NO^* , NO^- or NO^+) of nitric oxide donors generally used in experiments [8]. Therefore, the effects of NO can be mediated by activation of different intracellular signaling pathways, in particular, S-nitrosylation of neuronal protein thiol groups [9] or activation of soluble guanylate cyclase [10]. Concentration of nitric oxide also plays an important role, since at its high concentration mechanisms of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and excitotoxicity are activated [11].

Given the aforementioned, the aim of this work was to study the effect of low (nanomolar) concentrations of nitric oxide on GABA release from

isolated rat brain nerve terminals (synaptosomes). As the NO donor, we used SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine), which belongs to the class of natural metabolite of nitric oxide. Biological effect of S-nitrosothiols is mediated via direct effect of NO molecules spontaneously released due to homolytic S-N bond cleavage, as well as via a transnitrosation reaction – nitrosonium ion (NO^+) transfer to thiol-containing compounds (peptides, enzymes, etc.). In the range of SNAP concentration from 0.1 to 1 mM, the concentration of free NO is found to be in the nanomolar range from 20 to 100 nM [12].

Materials and Methods

All animal experiments were performed in accordance with the rules and regulations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Male white Wistar rats weighing 150-200 g were used in the study. Animals were maintained in standard cages under natural light conditions on standard rodent diet with free access to food and water. In the experimental day, the animals were decapitated under chloroform anesthesia, after that, hippocampus and cerebral cortex were immediately isolated and homogenized in cool isolation medium consisting of: 0.32 M sucrose, 0.2 mM EGTA, 5 mM HEPES, pH 7.4 using glass Potter homogenizer (clearance 0.2 mm). Purified fraction of isolated nerve terminals (synaptosomes) were prepared using Cotman method [13], by suspending precipitate after the last centrifugation in standard cool oxygenated incubation medium composed of (mM): NaCl – 126, KCl – 5, CaCl_2 – 1, MgCl_2 – 1.4, NaH_2PO_4 – 1, HEPES – 20 (pH 7.4), d-glucose – 10. All the procedures were carried out at 0-4 °C. Protein concentration was determined by the Lowry method in Larson modifications [14].

GABA release from synaptosomes was determined using radioisotope method with tritiated GABA (5×10^{-7} M). To prevent degradation of neurotransmitter, the experiments were carried out in the presence of aminooxyacetic acid (100 μM), GABA-transaminase inhibitor. The [^3H]GABA release from synaptosomes without adding stimulating agents was taken as the basal release. SNAP-induced release was calculated as the difference between the [^3H]GABA release in the presence of SNAP and the basal release. GABA release from vesicular pool was induced by addition of 4-aminopyridine (4-AP) and determined as difference between 4-AP-induced

[^3H]GABA release from control synaptosomes and synaptosomes preincubated with SNAP. GABA release from cytoplasm pool was induced by nipecotic acid (NA). 4-AP/NA was added to synaptosomes at different time points their incubation with SNAP, and after 5 min the aliquots were centrifuged at 12 000 rpm for 15 sec and the supernatants were collected. The content of [^3H]GABA in the supernatant was measured using a liquid scintillation counter Tracor Analytic Delta 300 with ACS scintillation liquid, and was expressed as a percentage of total [^3H]GABA in synaptosomes. Results are presented as mean \pm SEM.

Relative changes of ionized calcium levels within synaptosomes were assessed using fluorescent Ca^{2+} -sensitive probe Fluo-4 AM according to standard procedure. Kinetic measurements were performed using a spectrofluorometer QuantaMaster 40 (PTI, FelixGX-4.1.0) at $\lambda_{\text{ex}} = 496$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 518$ nm. Criteria for synaptosome functionality were their responses to application of calcium ionophore A 23187 (final concentration 5 μM) and KCl (final concentration 30 mM). Statistical data processing and graphing were performed using Microsoft Origin Pro 9.0 software. Statistical significance was calculated using ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. The differences were considered significant at $P < 0.05 / n$ (where n is the number of determined parameters).

The following reagents were used in the experiments: [^3H]GABA (94 Ci/mol), ASC scintillation liquid (Amersham, UK), 4-aminopyridine (RBI, USA), SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine), dithiothreitol, nipecotic acid, Ficoll-400, aminooxyacetate, d-glucose, HEPES (Sigma, USA), Fluo-4 AM (Invitrogen, USA) and other reagents (Reachim, Ukraine).

Results and Discussion

The first step in our study of the effect of nitric oxide on GABAergic nerve terminals was time measurements of the amount of radiolabeled GABA released from synaptosomes during their incubation with SNAP. As it can be seen (Fig. 1, A), 10 min after addition of SNAP (100 μM) to [^3H]GABA-loaded synaptosome, the amount of the extrasynaptosomal neurotransmitter (minus basal release) was insignificant ($1.1 \pm 0.52\%$). This indicates that SNAP itself, which at this concentration spontaneously releases NO in a concentration of several nM [15], had little effect on the inhibitory neurotransmission. Howe-

ver, the picture drastically changed in the presence of 1 mM DTT in the incubation medium. According to the literature and our data, the biological effect of S-nitrosothiols, including SNAP, is significantly enhanced in the presence of low molecular mass thiols that is associated with the formation of the highly reactive intermediates and additional NO release due to fast SNAP cleavage [15, 16]. As it is seen in Fig. 1, the amount of [^3H]GABA released from the synaptosomes at the 5th min of the SNAP action was $5.19 \pm 0.52\%$, and at the 10th min of incubation, this value increased to $8.05 \pm 0.24\%$. However, further elevation in the extrasynaptosomal [^3H]GABA level was not observed, and, on the contrary, at the 15th min of incubation the level of [^3H]GABA sharply dropped to almost $1.19 \pm 0.78\%$ that is likely to reflect the dynamic [^3H]GABA uptake into synaptosomes. The assumption about the mechanisms for this SNAP/+DTT effect will be made later. It should be only noted that DTT itself stabilized presynaptic terminals reducing the basal release of radiolabeled neurotransmitter (Fig. 1, the second column).

SNAP/+DTT-induced release of [^3H]GABA was found to be insensitive to the absence of calcium ions in the incubation medium (Fig. 1, B), indicating that the release does not occur due to classical synchronous exocytosis. Ca^{2+} -independent neurotransmitter release under the action of NO has been described previously [10, 17], and can be a consequence of the involvement of intracellular calcium stores and activation of spontaneous GABA release. The spontaneous process, unlike synchronous, is believed to occur asynchronously and triggered by calcium ions, which are released from intracellular stores into cytosol [18]. Thus, the next step of the study was to clarify the involvement of intracellular calcium stores in SNAP/+DTT-induced [^3H]GABA release.

Relative changes in the concentration of ionized calcium inside synaptosomes $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ were assessed using a fluorescent probe Fluo-4 AM, which after cleavage by intracellular esterases and binding with calcium ions emits in the green spectral band. As it is shown in Fig. 2, A, addition of SNAP (100 μM) to a suspension of synaptosomes preincubated with DTT (1 mM) in Ca^{2+} -free medium (+0.1 mM EGTA) was not accompanied by a change in Fluo-4 fluorescence that indicated a lack of increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ upon action of nanomolar concentrations of SNAP. However, the addition to synaptosomes of Ca^{2+} -ionophore A-23187 (5 μM) led to a fluores-

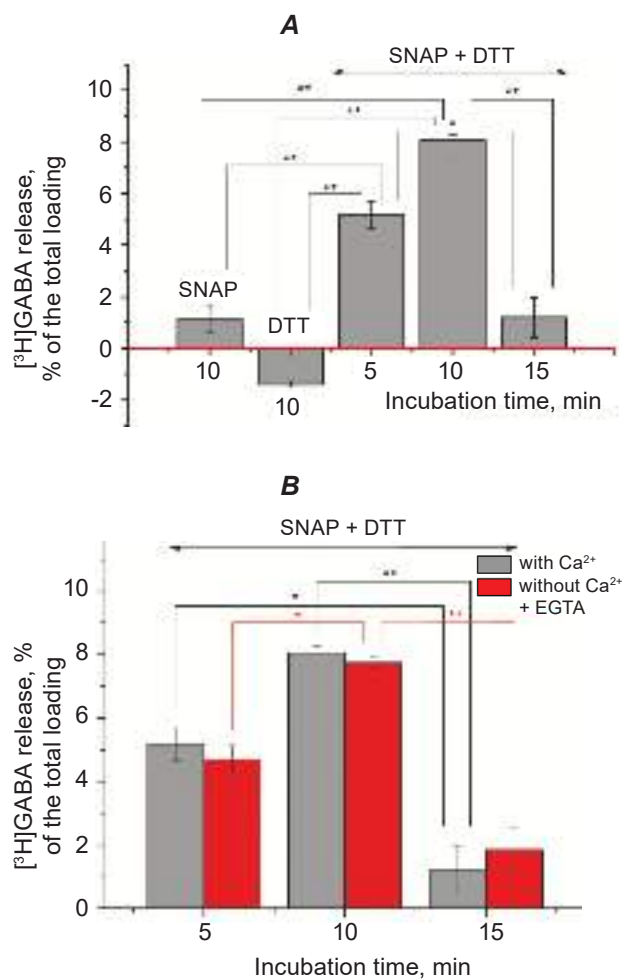


Fig. 1. [^3H]GABA release from synaptosomes under the action of SNAP (100 μM) and/or DTT (1 mM) in the Ca^{2+} -containing (A) and Ca^{2+} -free/+0.1 mM EGTA (B) incubation medium; mean \pm SEM, $n = 4$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

cence burst due to an increase in the concentration of calcium released from intracellular store – mitochondria and endoplasmic reticulum. Other criteria of synaptosome functionality was the application of KCl (30 mM), which, as expected, did not affect the fluorescence intensity of Fluo-4 in Ca^{2+} -free medium (Fig. 2, A), however caused a sharp increase in fluorescence in the presence of 1 mM Ca^{2+} (Fig. 2, B). The latter is related to the influx of extrasynaptosomal calcium into synaptosomes through potential-regulated channels due to KCl-induced plasma membrane depolarization. It should be noted that the addition of 100 μM SNAP/+DTT to synaptosomes in the Ca^{2+} -containing medium also did not affect the calcium concentration in synaptosomes (Fig. 2, B), and this allows us to hypothesize that SNAP/+DTT-

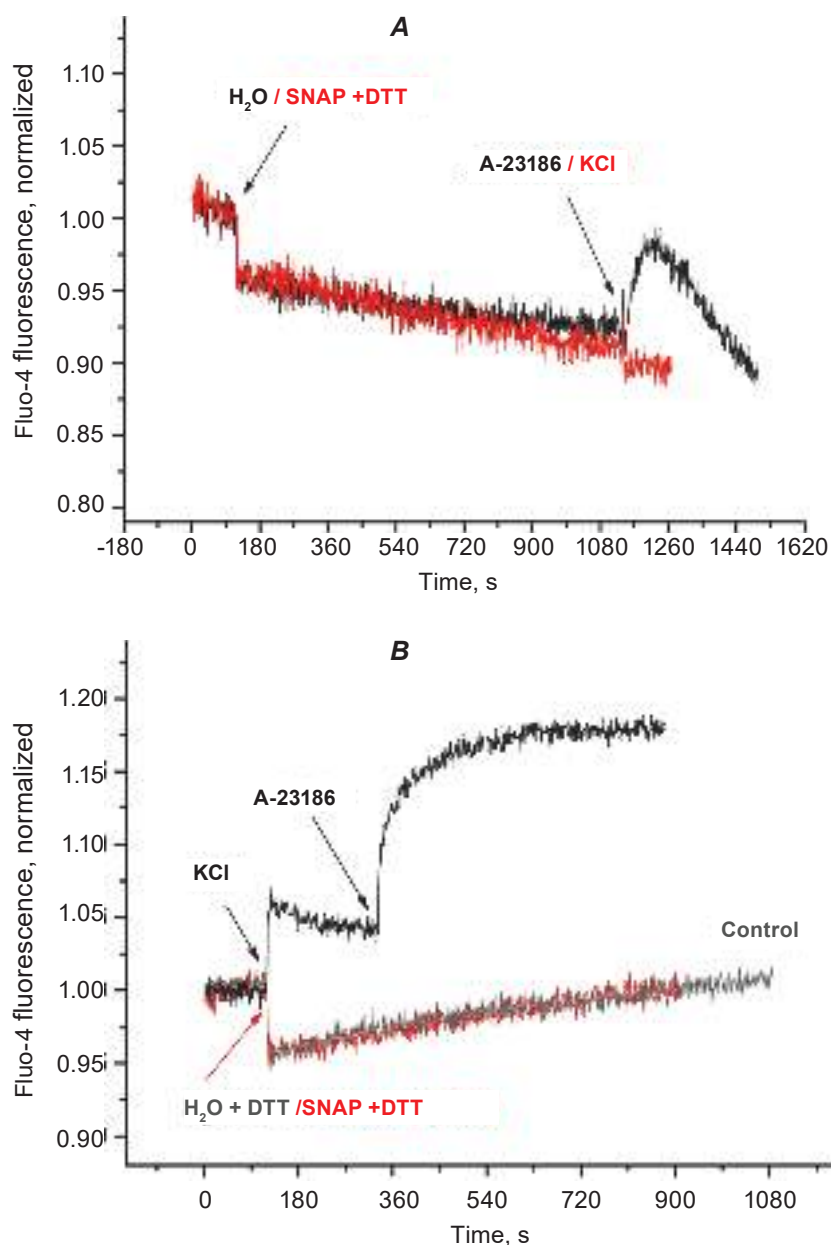


Fig. 2. Relative changes in ionized calcium level inside synaptosomes under the action of SNAP/+DTT (100 μ M/1 mM) in Ca^{2+} -free /+0.1 mM EGTA (A) and Ca^{2+} -containing (B) incubation medium. Responses to the addition of KCl (30 mM) and A 23187 (5 μ M) served as the criteria of synaptosome functionality. The typical curves are demonstrated

induced [3 H]GABA release does not occur by exocytosis (spontaneous and/or synchronous), but rather by engagement of other mechanisms as, for instance, transporter-mediated.

To check this assumption, we carried out a series of experiments aimed to find out from which pools, vesicular and/or cytoplasmic, GABA is released under the action of SNAP. To this, we used potassium channel blocker 4-AP, which induces

Ca^{2+} -dependent GABA release predominantly from vesicular pool [19], and NA, which, having the higher affinity to GABA transporters than GABA, is captured by transporters and transferred into cells in exchange for "cytoplasmic" GABA [20]. As it is seen in Fig. 3 (red columns), the addition of 4-AP (2 mM) to synaptosomes at the 5th and 10th min of their incubation with SNAP/+DTT (100 μ M/1 mM) was accompanied by a gradual decrease in the 4-AP-

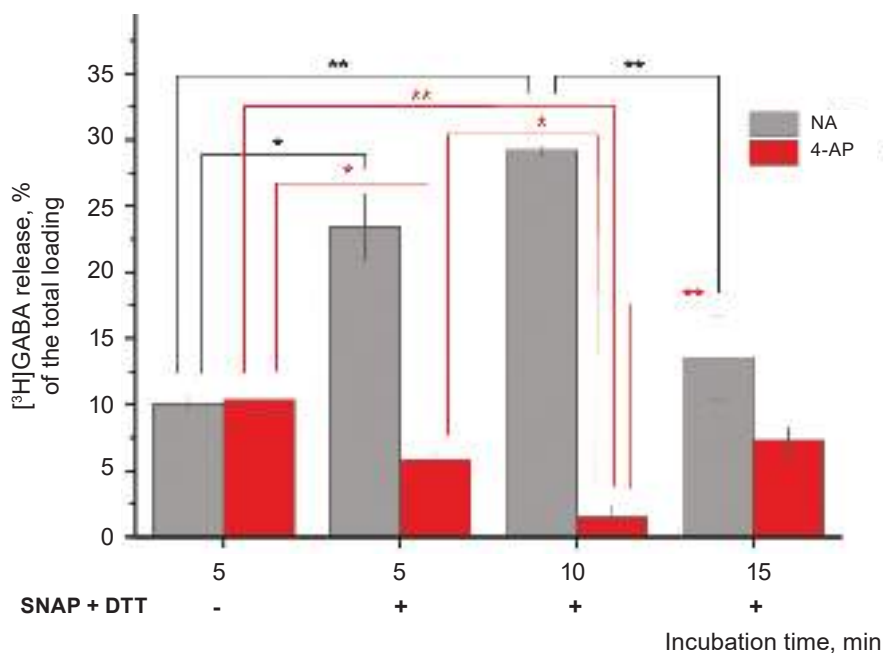


Fig. 3. NA- and 4-AP-induced $[^3\text{H}]$ GABA release from synaptosomes preincubated with SNAP/+DTT for various periods of time; mean \pm SEM, $n = 3$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

induced $[^3\text{H}]$ GABA release from vesicular pool, indicating its considerable depletion. However, at the 15th min of incubation, the vesicular GABA pool was significantly restored, as evidenced by further increase in 4-AP-induced $[^3\text{H}]$ GABA release (compared to the 10th min of incubation).

Thus, the question arises: what happens to vesicular GABA pool at the 5th and 10th min of synaptosome incubation with SNAP/+DTT? We suggest that GABA is likely to leak from vesicles into cytoplasm and then releases out of synaptosomes. This assumption is supported by our data obtained in the experiments with nipecotic acid (100 μM). We observed a gradual increase in NA-induced GABA release from cytoplasmic pool at the 5th and 10th min of SNAP/+DTT action (Fig. 3, grey columns). Analysis of NA- and 4-AP-induced $[^3\text{H}]$ GABA release from synaptosomes clearly demonstrated that these processes are opposite-directed, that is, a decrease in vesicular GABA content was accompanied by an increase in the $[^3\text{H}]$ GABA level in cytoplasm. And conversely, a decrease in cytoplasmic $[^3\text{H}]$ GABA concentration at the 15th min of incubation was correlated with the accumulation of GABA inside synaptic vesicles and, as a consequence, with an increase in the amount of $[^3\text{H}]$ GABA additionally released from vesicles under the action of 4-AP. Thus, these results allow us to assume that SNAP/+DTT

causes GABA release from vesicles into cytosol followed by its release out of synaptosomes, presumably, via reverse operation of GABA transporter.

NO-induced GABA release owing to the reversal of its transporters was previously demonstrated by G. Lonart and K. M. Johnson, who had found that hydroxylamine and S-nitroso-L-cysteine caused the release of dopamine and norepinephrine from striatal and hippocampal slices via pathway that was blocked by the inhibitors of their reverse uptake [21]. It should be noted that if the transporter-mediated neurotransmitter release was previously considered as a pathological process, which occurred, for example, upon ischemic or traumatic brain injury [22], but now there are experimental evidences of the involvement of transporters in the neurotransmitter release under physiological conditions. Thus, Falkenburger et al [23] showed that electrical stimulation of the brain subthalamic nuclei led to the transporter-mediated release of dopamine from dopamineergic dendrites in the substantia nigra, providing communication between neurons. Non-vesicular, transporter-induced GABA release, according to other authors [24], contributes to maintaining of the extracellular GABA concentration at the level sufficient to activate the high affinity GABA receptors and thus, participates in the formation of tonic inhibition.

GABA transporters can operate in the reverse direction due to the disturbance of their dynamic equilibrium. One of the reasons for this is the change in the intracellular neurotransmitter concentration. It was shown that anticonvulsants such as gabapentin and vigabatrin, which irreversibly block GABA transaminase, caused an increase in the cytosolic concentration of GABA and, consequently, its release from the nerve terminals owing to reverse operation of transporters [25]. In our work we also assumed that SNAP/+DTT-induced [³H]GABA release might be transporter-mediated, however an increase in the cytoplasmic concentration of [³H]GABA is probably caused by another reason.

It is known that the accumulation of neurotransmitters in the synaptic vesicles is coupled with proton transfer into the vesicles, so the increase in cytoplasmic GABA concentration might be due to disruption in the function of a vesicular H⁺-ATPase, which forms the H⁺-gradient. Previously, we have shown that the addition of SNAP/+DTT to synaptosomes caused a dissipation of the synaptic vesicle proton gradient that is most likely the result of cytosolic ATP depletion owing to inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide [15]. The maximum of H⁺-gradient dissipation was observed at the 10th min that is fully correlated in time with the maximum of [³H]GABA release from cytosol pool. The vesicular proton gradient was restored at the 15th min of incubation with SNAP+DTT and this process coincided with a decrease in the extrasynaptosomal concentration of [³H]GABA (Fig. 1, A) and its re-accumulation inside vesicles (Fig. 3).

Thus, considering the above results, we can conclude that in the nanomolar range of concentrations, nitric oxide in the form of S-nitrosothiols in the presence of SH-reducing compounds may cause Ca²⁺-independent GABA release from synaptic vesicles into cytosol followed by its release from nerve terminals presumably due to reverse operation of GABA transporters. This process is accompanied by a decrease in the concentration of neurotransmitter within the vesicles and, hence by a decrease in further GABA release by exocytosis. This view on the mechanism of presynaptic action of nitric oxide allows reconciling the contradictory literature data that have shown both stimulating [26] and inhibitory [27] effects of NO on the neurotransmission. A similar opinion about multidirectional action of NO has been previously expressed by other researches [3, 7], in particular, Sequeira et al. believe that NO

affecting the GABAergic terminals inhibits the exocytotic and stimulates carrier-mediated GABA release [7]. However, unlike Sequeira, we assume that the decrease in neurotransmitter release by exocytosis occur not so much due to the inhibition of the process itself, but rather to the release of partially depleted vesicles.

In summary, it should be noted that it is quite possible that the effect of nitric oxide on GABAergic neurotransmission may be realized by the involvement of other pathways, in particular in case of higher NO concentrations, since a high oxidative potential of nitric oxide provides this molecule with unique properties.

ВПЛИВ ДОНОРА ОКСИДУ АЗОТУ SNAP НА ВИВІЛЬНЕННЯ ГАМК ІЗ НЕРВОВИХ ЗАКІНЧЕНЬ МОЗКУ ЩУРІВ

A. C. Tarasenko

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: tas@biochem.kiev.ua

У роботі ми досліджували вплив наномольних концентрацій оксиду азоту на вивільнення ГАМК (гама-аміномасляної кислоти) з нервових закінчень мозку щурів. Для цього використовували радіоізотопний метод із [³H]ГАМК та спектрофлуориметричний метод із застосуванням Ca²⁺-чутливого зонда Fluo-4 АМ. Показано, що в присутності дитіотреїтолу (ДТТ) донор оксиду азоту SNAP у концентрації, що виділяє NO в наномольному діапазоні, спричинює Ca²⁺-незалежне вивільнення [³H]ГАМК із нервових закінчень. Застосування 4-амінопіридину (4-АП) та ніпекотинової кислоти (НК) як індукторів вивільнення ГАМК із везикулярного та цитоплазматичного пулів показало, що максимум SNAP/+ДТТ-індукованого вивільнення [³H]ГАМК припадає на 10-ту хв інкубації і збігається в часі з майже вдвічі збільшеним вивільненням [³H]ГАМК за дії НК. У цей час 4-АП-індуковане вивільнення [³H]ГАМК істотно знижувалося. На 15-й хв інкубації синапсом із SNAP+ДТТ спостерігалася протилежна картина: зменшення НК- і збільшення 4-АП-індукованого вивільнення [³H]ГАМК. Таким чином, у наномольному діапазоні концентрацій

оксид азоту у вигляді S-нітрозотіолів зумовлює Ca^{2+} -незалежне витікання ГАМК із синаптичних везикул у цитозоль із наступним його вивільненням із нервових терміналей. У подальшому відбувається зворотне захоплення нейромедіатора і його реаккумуляція в синаптичних везикулах.

Ключові слова: оксид азоту, вивільнення ГАМК, везикулярний та цитоплазматичний пул.

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА SNAP НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ГАМК ИЗ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ МОЗГА КРЫС

А. С. Тарасенко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: tas@biochem.kiev.ua

В работе мы исследовали влияние наномолярных концентраций оксида азота на высвобождение ГАМК (гамма-аминомасляной кислоты) из нервных окончаний мозга крыс. Для этого использовали радиоизотопный метод с ^3H ГАМК и спектрофлуориметрический метод с Ca^{2+} -чувствительным зондом Fluo-4 AM. Показано, что в присутствии дитиотреитола (ДТТ) донор оксида азота SNAP в концентрации, выделяющей NO в наномолярном диапазоне, вызывает Ca^{2+} -независимое высвобождение ^3H ГАМК из нервных окончаний. Применение 4-аминопиридина (4-АП) и никотиновой кислоты (НК) в качестве индукторов высвобождения ГАМК с везикулярного и цитоплазматического пулов показало, что максимум SNAP+ДТТ-индуцированного высвобождения ^3H ГАМК приходится на 10-ю мин инкубации и совпадает по времени с почти вдвое увеличенным высвобождением ^3H ГАМК под действием НК. В это время 4-АП-индуцированное высвобождение ^3H ГАМК существенно снижалось. На 15-й мин инкубации синапсом с SNAP+ДТТ наблюдалась противоположная картина: уменьшение НК- и увеличение 4-АП-индуцированного высвобождения ^3H ГАМК. Таким образом, в наномолярном диапазоне концентраций оксид азота в виде S-нітрозотіолів вызывает Ca^{2+} -независимое вытекание ГАМК из синаптических везикул в цитозоль с последующим его

высвобождением из нервных терминалей. В дальнейшем происходит обратный захват нейромедіатора и его реаккумуляция в синаптических везикулах.

Ключевые слова: оксид азота, высвобождение ГАМК, везикулярный и цитоплазматический пул.

References

1. Bradley SA, Steinert JR. Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 5681036.
2. Hardingham N, Dachtler J, Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 190.
3. Pan ZH, Segal MM, Lipton SA. Nitric oxide-related species inhibit evoked neurotransmission but enhance spontaneous miniature synaptic currents in central neuronal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(26): 15423-15428.
4. Cserép C, Szabadits E, Szőnyi A, Watanabe M, Freund TF, Nyiri G. NMDA receptors in GABAergic synapses during postnatal development. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37753.
5. Wang S, Teschemacher AG, Paton JF, Kasparov S. Mechanism of nitric oxide action on inhibitory GABAergic signaling within the nucleus tractus solitarii. *FASEB J*. 2006; 20(9): 1537-1539.
6. Ohkuma S, Katsura M, Chen DZ, Narihara H, Kuriyama K. Nitric oxide-evoked ^3H gamma-aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 36(1): 137-144.
7. Sequeira SM, Duarte CB, Carvalho AP, Carvalho CM. Nitric oxide differentially affects the exocytotic and the carrier-mediated release of ^3H gamma-aminobutyric acid in rat hippocampal synaptosomes. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 55(2): 337-340.
8. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364(6438): 626-632.
9. Rudkouskaya A, Sim V, Shah AA, Feustel PJ, Jourdeuil D, Mongin AA. Long-lasting inhibition of presynaptic metabolism and neurotransmitter release by protein

- S-nitrosylation. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(5): 757-769.
10. Li DP, Chen SR, Finnegan TF, Pan HL. Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. *J Physiol.* 2004; 554(Pt 1): 100-110.
 11. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(3): 541-554.
 12. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24(12): 2236-2242.
 13. Cotman CW. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.* 1974; 31: 445-452.
 14. Larson E, Howlett B, Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal Biochem.* 1986; 155(2): 243-248.
 15. Tarasenko AS. The effect of nitric oxide on synaptic vesicle proton gradient and mitochondrial potential of brain nerve terminals. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(6): 64-75.
 16. Hu TM, Chou TC. The kinetics of thiol-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *AAPS J.* 2006; 8(3): E485-E492.
 17. Meffert MK, Premack BA, Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. *Neuron.* 1994; 12(6): 1235-1244.
 18. Kaeser PS, Regehr WG. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annu Rev Physiol.* 2014; 76: 333-363.
 19. Storchak LG, Pozdnyakova NG, Himmelreich NH. Differential effect of protein kinase inhibitors on calcium-dependent and calcium-independent [¹⁴C]GABA release from rat brain synaptosomes. *Neuroscience.* 1998; 85(3): 989-997.
 20. Szerb JC. Effect of nipecotic acid, a gamma-aminobutyric acid transport inhibitor, on the turnover and release of gamma-aminobutyric acid in rat cortical slices. *J Neurochem.* 1982; 39(3): 850-858.
 21. Lonart G, Johnson KM. Characterization of nitric oxide generator-induced hippocampal [3H] norepinephrine release. II. The role of calcium, reverse norepinephrine transport and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275(1): 14-22.
 22. Raiteri L, Raiteri M. Multiple functions of neuronal plasma membrane neurotransmitter transporters. *Prog Neurobiol.* 2015 Nov;134:1-16.
 23. Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM. Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science.* 2001; 293(5539): 2465-2470.
 24. Wu Y, Wang W, Díez-Sampedro A, Richerson GB. Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron.* 2007; 56(5): 851-865.
 25. Richerson GB, Wu Y. Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J Neurophysiol.* 2003; 90(3): 1363-1374.
 26. Merino JJ, Arce C, Naddaf A, Bellver-Landete V, Oset-Gasque MJ, González MP. The nitric oxide donor SNAP-induced amino acid neurotransmitter release in cortical neurons. Effects of blockers of voltage-dependent sodium and calcium channels. *PLoS One.* 2014; 9(3): e90703.
 27. Nedvetsky PI, Konev SV, Rakovich AA, Petrenko SV, Mongin AA. Effects of nitric oxide donors on Ca²⁺-dependent [¹⁴C]GABA release from brain synaptosomes: the role of SH-groups. *Biochemistry (Mosc).* 2000; 65(9): 1027-1035.

Received 26.07.2016

PROTEIN KINASE Akt ACTIVITY IN HUMAN THYROID TUMORS

B. B. GUDA, V. V. PUSHKAREV, O. V. ZHURAVEL, A. Ye. KOVALENKO,
V. M. PUSHKAREV, Y. M. TARASCHEENKO, M. D. TRONKO

State Institution V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: pushkarev.vm@gmail.com

We studied the expression and activation of the main effector protein kinase of phosphatidylinositol-3-kinase cascade (PI3K) – Akt in conventionally normal tissues, benign and highly differentiated (with and without metastases) human thyroid tumors. There was a difference in the Akt1 amount in tumor tissue compared with normal tissue in papillary carcinomas and tissue of multinodular goiter. Akt expression both in tumor and conventionally normal tissues of follicular adenoma was significantly lower than in follicular carcinoma. The lowest level of Akt expression was observed in tissues of multinodular goiter. Total activity of all three isoforms of Akt1/2/3 was lower in tumors compared to conventionally normal tissue. Thus, Akt activity (according to Thr308 phosphorylation) is not associated with proliferative processes in the tumor tissue of the thyroid. Apoptosis level detected in these tissues was not associated with the protein kinase activity either. Possible mechanisms of signaling cascade PI3K/Akt inhibition in thyroid tumors are discussed.

Key words: thyroid gland, benign and malignant tumors, signaling cascade PI3K/Akt.

Proliferative processes in tumor cells are controlled by two main pathways: PI3K/Akt and mitogen-activated protein kinases (MAPK). The latter actually regulates cell division. PI3K/Akt prepares a cell for division.

Akt, also known as protein kinase B (PKB), belongs to a family that combines protein kinases C, cAMP-dependent and cGMP-dependent kinases. The gene encoding Akt was identified as a part of the genome of the murine leukemia transforming virus (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) in 1977 and classified as an oncogene. The man's Akt family includes three evolutionarily conserved isoforms: Akt1 (including 3 splicing variants), Akt2 and Akt3 (2 splicing variants). Akt isoforms play a key role in various cellular processes including apoptosis, growth, proliferation, polarity, migration, DNA repair, glucose transport, metabolism, skeletal muscle and cardiomyocytes contractility, angiogenesis and self-renewal of stem cells. Dysregulation of Akt activity is associated with malignant transformation of cells, cardiovascular disease, type 2 diabetes, muscular hypotrophy and neurodegenerative diseases [1].

Signaling cascade PI3K/PDK/Akt is involved in the regulation of protein synthesis and cell energy supply, i.e. in preparation of a cell for mitosis. Moreover, this signaling cascade inhibits apoptosis, promotes the survival of tumor cells and is activated in many types of cancer [2]. Furthermore, mutations and amplification of individual components of PI3K/Akt pathway causes malignant transformation of cells of different origins, including thyroid [3], while inhibiting the cascade with specific inhibitors enhances the therapeutic effect of anticancer drugs [4]. Akt activity is mainly regulated through phosphorylation of Thr308 and Ser473 amino acid residues by PDK1 and mTORC2 kinases, respectively.

A significant increase of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in thyroid tumors, especially in aggressive tumors with metastases, indicating a substantial increase of proliferative processes was demonstrated previously [5]. The aim of our work was to ascertain the expression and activation peculiarities of Akt as the phosphatidylinositol-3-kinase cascade main effector kinase, and the apoptosis level in human thyroid normal tissues, benign and malignant tumors.

Materials and Methods

The study was conducted on patient's postoperative material obtained in the surgical department of the Institute. All patients signed informed consent before surgery to the use of the postoperative material for research. As conventionally normal tissue unaltered thyroid tissue was taken, which by morphological criteria did not differ from normal. After removal thyroid tissue was immediately placed on ice and quickly frozen at -80°C .

To determine Akt1 and phospho-Akt1/2/3 (phospho-Thr308) in thyroid homogenates Abcam (UK) ELISA kits ab176658 were used. To determine cleaved PARP ELISA kits ab119690 of the same company were used. Measurements were performed on microplate reader of Bio-tek Instruments (USA) at a wavelength of 450 nm. The study was performed in 3 replications. The number of transformed tissue samples was 3 (follicular carcinoma and multinodular goiter) and 6 (follicular adenoma, encapsulated tumor papillary carcinoma and non-encapsulated tumor papillary carcinoma). Tissue was homogenized in a Retsch TissueLyser II homogenizer (Germany) in a special kit provided buffer that prevents proteins degradation and dephosphorylation. Protein concentration in the lysate was determined with a Novagen (USA) BCA protein assay kit.

The experiments results were presented as $M \pm m$; $n = 3-6$. *t*-Student test was used to compare these data groups.

Results and Discussion

Table 1 shows that there is a fairly high level of Akt expression in all studied tissues, both normal and tumoral. The content of Akt1 in conventionally normal and tumor tissue of follicular carcinoma (FTC) and follicular adenoma (FA) did not differ significantly, in contrast to papillary carcinomas (PTC) and goiter (MNG), where the level of kinase in tumor tissue exceeded the one in conventionally normal tissue almost 2 times (Table 1). It should be noted that Akt expression both in tumor and conventionally normal tissues of FA was significantly lower than in FTC tissues. The lowest level of Akt expression we observed in multinodular goiter (Table 1).

It is known that disruption of the PI3K/Akt pathway as a result of *Ras*, *PTEN*, *PIK3CA* genes mutations and amplifications is one of the reasons for thyroid papillary carcinoma genesis [3], although *RET* gene rearrangements and mutations in genes

Table 1. Akt1 expression in different types of thyroid tumors

	Conventionally normal tissue (OD)	Transformed tissue (OD)
FTC	0.360 ± 0.042	0.335 ± 0.048
FA	0.221 ± 0.032	0.182 ± 0.073
iPTC	0.198 ± 0.013	$0.327 \pm 0.072^*$
nPTC	0.228 ± 0.004	$0.416 \pm 0.146^*$
MNG	0.092 ± 0.006	$0.159 \pm 0.026^*$

Note. In the table and further figures: FTC – follicular carcinoma, FA – follicular adenoma, iPTC – papillary carcinoma (encapsulated tumors), nPTC – papillary carcinoma (non-encapsulated tumors), MNG – multinodular goiter. OD – optical density at 450 nm per mg of protein, $M \pm m$; $n = 3$ (FTC, MNG) and 6 (FA, iPTC, nPTC); * difference between conventionally normal and tumor tissues is significant, $P < 0.05$

encoding the protein kinases of MAPK cascade are more typical of this type of cancer. It is harder to explain the lack of difference in the Akt1 expression in follicular carcinomas compared to the normal tissue, since PI3K catalytic subunit – *PIK3CA* – gene activating amplification and mutations are found more often in the FTC – 10-15 and 24% of cases, respectively [3].

A different picture was observed regarding Akt1/2/3 activation (Fig. 1). The level of phospho-Akt in conventionally normal tissue of all tumors was considerably higher (almost 8.5 times for the FTC and more than 18 times for nPTC) than in tumor tissue, and was practically absent in encapsulated papillary carcinomas (Fig. 1). Thus, contrary to expectations, the Akt activity in papillary and follicular carcinomas and follicular adenomas was either absent or substantially suppressed, indicating a lack of link between the protein kinase activation by the PI3K/PDK-1 pathway (phosphorylation of Thr308 residue) and enhanced proliferative processes in thyroid tumors, which we observed in the same samples previously [5].

It was established that in tumor tissues Akt suppresses apoptosis by inhibiting caspase-9, proapoptotic protein Bad, FKHR and FOHO transcription factors; affects the activity of cell cycle inhibitors p21, p27, Gsk-3 β protein kinase and the state of Mdm2 – a tumor suppressor p53 regulator – that generally causes cell cycle dysregulation and un-

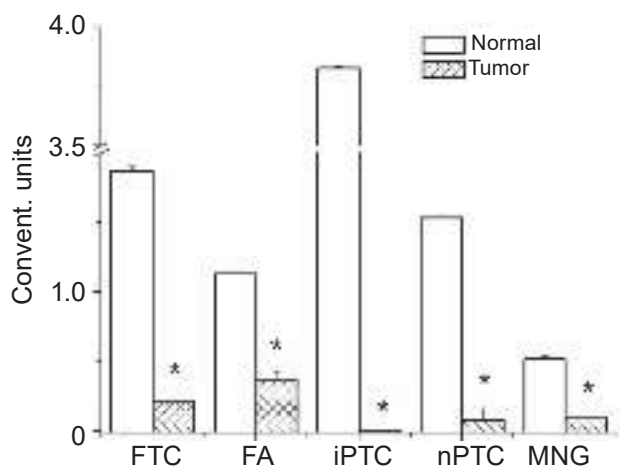


Fig. 1. Akt1/2/3 activity in different types of thyroid tumors in conventional units. Data normalized with regard to total Akt amount. *Difference between conventionally normal and tumor tissues is significant, $P < 0.05$

controlled proliferation; activates IKK and NF- κ B-dependent signaling pathway, promoting tumor cell survival, angiogenesis and metastasis formation; increases tumor growth through mTOR activation [2, 6]. Furthermore, excessive Akt activation leads to tumor resistance to radiation and chemotherapy [7, 8]. Therefore, we determined the apoptosis level by cleaved PARP larger fragment (89 kDa) amount, which is characteristic for apoptotic responses. Fig. 2 shows that the PARP fragment amount in papillary carcinomas and goiter doesn't differ significantly from conventionally normal tissue. In follicular carcinoma samples cleaved PARP amount is higher, and in follicular adenoma samples it is lower compared to conventionally normal thyroid tissue.

It was expected that increased Akt activity/content would lead to apoptosis intensity reduction and vice versa. However, increased amount of cleaved PARP against reduced kinase activity was observed only in follicular adenoma tissue (Fig. 2). Thus, Akt content and activity are not related to the apoptosis level in the studied tissues.

The fact of considerable kinase activity inhibition in thyroid carcinomas deserves special attention. A possible explanation for this are data indicating that Akt might participate in the replicative senescence of normal and tumor cells [9-12], a phenomenon, that along with apoptosis inhibits tumor growth. In addition, Akt can stimulate apoptosis [13] and inhibit the breast cancer cells migration [14].

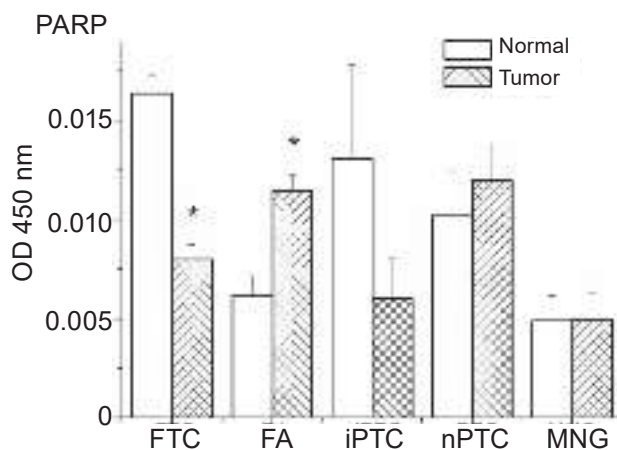


Fig. 2. Cleaved PARP (89 kDa) amount in different types of thyroid tumors. *Difference between conventionally normal and tumor tissues is significant, $P < 0.05$

Cell cycle regulator (inhibitor of cyclin-dependent kinases) p21^{WAF1} is phosphorylated only by Akt1, that negatively regulates the cell cycle and proliferation [14]. Thus, under certain conditions Akt may show anti-proliferative and cancerostatic properties. This phenomenon was first demonstrated regarding MAPK and was named oncogene toxicity. It was shown that although Ras and Raf oncogenes are often involved in malignant transformation of thyroid cells, constitutive activation of this cascade in tumor tissues leads to growth arrest and senescence in many cases [15-18]. For example activated Ras or c-Raf-1 cause cell growth arrest by producing and secreting autocrine/paracrine factor LIF (leukemia inhibiting factor) in human medullary thyroid carcinoma cells [15]. Sustained activation of Raf/MEK/ERK signaling pathway causes growth arrest, accompanied by corresponding cell cycle regulators states changes (pRB dephosphorylation, E2F1 down-regulation and p21^{WAF1} up-regulation), specific changes in cells morphology and c-Myc or RET expression in LNCaP, U251, and TT human tumor lines (the latter - medullary thyroid carcinoma) [17].

Cancer cells induce special protective mechanisms, such as the heat shock protein mortalin synthesis [19], which inhibits MAPK expression and activation and thus protects cells from aging, growth arrest and apoptosis. Therefore, it is possible that, as is the case with MAPK [5, 16, 17, 19], thyroid tumor cells initiate special defense mechanisms that inhibit Akt activation and thus protect themselves against oncogene toxicity – senescence and cell cycle arrest.

Another question that arises in the analysis of the obtained data is how a tumor cell replaces inactive Akt – one of the major protein kinases that control growth, energetics and cell division. The likely answer is contained in the works that suggest Akt replacement by other protein kinases in PI3K signaling pathway, including Sgk3 (serum/glucocorticoid regulated kinase) [20].

There is also the possibility of alternative Akt activation through Ser473 residue phosphorylation of mTORC2 and DNA-PK protein kinases complexes. However, it is known that such phosphorylation stimulates full Akt activity and, consequently, suppresses apoptosis by inhibiting FOXO proapoptotic protein family [21], which we have not observed in most thyroid tumors (Fig. 2). In addition, a number of protein kinases that are involved in oncogenesis, activate Akt, phosphorylating other amino acid residues of the kinase. Thus, Ack1 (TNK2) phosphorylates Tyr176 residue; Src and RTK6 – Tyr215, Tyr315 and Tyr326; TBK1 (TANK-binding kinase 1) – Thr195, Ser378, Ser473 [22].

Thus, our findings indicate that Akt activity (by Thr308 phosphorylation) is not associated with thyroid tumor tissue proliferative processes. Apoptosis level, which was determined in the same tissues, does not correlate with the protein kinase activity either.

АКТИВНІСТЬ ПРОТЕЇНКИНАЗИ АКТ У ПУХЛИНАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

*Б. Б. Гуда, В. В. Пушкарєв, О. В. Журавель,
В. М. Пушкарєв, А. Є. Коваленко,
Ю. М. Таращенко, М. Д. Тронько*

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ;
e-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Вивчали експресію та активацію головної ефекторної протеїнкінази фосфатидилінозитол-3-кіназного каскаду (PI3K) – Акт в нормальних тканинах, доброякісних та високодиференційованих злоякісних (із метастазами та без) пухлинах щитоподібної залози людини. Спостерігали відмінності щодо вмісту Akt1 у пухлинній тканині порівняно з нормальними тканинами в папілярних карциномах та у тканині багатозлового зобу. Експресія Акт як у пухлинах, так і в умовно нормальній тканині фолікулярної

аденоми була вірогідно нижче, ніж у тканинах фолікулярної карциноми. Найнижчий рівень експресії Акт спостерігали в тканинах багатозлового зобу. Сумарна активність всіх трьох ізоформ Akt1/2/3 була нижчою в пухлинах порівняно з нормальною тканиною. Таким чином, активність Акт (за фосфорилуванням Thr308) не пов'язана із проліферативними процесами в пухлинній тканині щитоподібної залози. Рівень апоптозу, який визначався в цих самих тканинах, також не корелює з активністю протеїнкінази. Обговорюються можливі механізми пригнічення активності сигнального каскаду PI3K/Акт у пухлинах щитоподібної залози.

Ключові слова: щитоподібна залоза, доброякісні та злоякісні пухлини, сигнальний каскад PI3K/Акт.

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ АКТ В ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

*Б. Б. Гуда, В. В. Пушкарєв, Е. В. Журавель,
В. М. Пушкарєв, А. Е. Коваленко,
Ю. Н. Таращенко, Н. Д. Тронько*

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев;
e-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Изучали экспрессию и активацию главной эффекторной протеинкиназы фосфатидилинозитол-3-киназного каскада (PI3K) – Акт в нормальных тканях, доброкачественных и высококодифференцированных злокачественных (с метастазами и без) опухолях щитовидной железы человека. Наблюдали различия в количестве Akt1 в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями в папиллярных карциномах и в ткани многоузлового зоба. Экспрессия Акт как в опухоли, так и в условно нормальной ткани фолликулярной аденомы была достоверно ниже, чем в тканях фолликулярной карциномы. Самый низкий уровень экспрессии Акт наблюдали в тканях многоузлового зоба. Суммарная активность всех трех изоформ Akt1/2/3 была ниже в опухолях по сравнению с нормальной тканью. Таким образом, активность Акт (по фосфорилированию Thr308) не связана с пролиферативными процессами в опухолевой ткани щитовидной железы. Уровень апоптоза,

который определялся в этих же тканях, также не коррелирует с активностью протеинкиназы. Обсуждаются возможные механизмы подавления активности сигнального каскада PI3K/Akt в опухолях щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, доброкачественные и злокачественные опухоли, сигнальный каскад PI3K/Akt.

Reference

- Liu Q, Turner KM, Alfred Yung WK, Chen K, Zhang W. Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy. *Neuro Oncol.* 2014; 16(10): 1313-1323.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R. AKT kinase pathway: a leading target in cancer research. *Sci World J.* 2013; 2013: 756134.
- Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid.* 2010; 20(7): 697-706.
- Pushkarev VV, Kovzun OI, Popadiuk ID, Pushkarev VM, Tronko MD. The role of the signal cascade Ras/PI3K/Akt in the formation of the resistance of thyroid anaplastic cancer cells to paclitaxel. *Rep Nat Acad Sci Ukraine.* 2011; (3): 169-171.
- Guda BB, Pushkarev VM, Pushkarev VV, Kovalenko AYe, Taraschenko YM, Kovzun OI, Tronko MD. The expression and activation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and proliferating cell nuclear antigen content in normal tissue and human thyroid tumors. *SM J Endocrinol Metab.* 2015; 1(1): 1002.
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(11): 1978-1986.
- Shimura T. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3 β /cyclin D1 overexpression cycle. *J Radiat Res.* 2011; 52(5): 539-544.
- Wilks ST. Potential of overcoming resistance to HER2-targeted therapies through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Breast.* 2015; 24(5): 548-555.
- Xu Y, Li N, Xiang R, Sun P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39(6): 268-276.
- Sin S, Kim SY, Kim SS. Chronic treatment with ginsenoside Rg3 induces Akt-dependent senescence in human glioma cells. *Int J Oncol.* 2012; 41(5): 1669-1674.
- Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, Sawada N, Salomone S, Benjamin LE, Walsh K, Moskowitz MA, Liao JK. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Sci Signal.* 2009; 2(62): ra11.
- Taylor JR, Lehmann BD, Chappell WH, Abrams SL, Steelman LS, McCubrey JA. Cooperative effects of Akt-1 and Raf-1 on the induction of cellular senescence in doxorubicin or tamoxifen treated breast cancer cells. *Oncotarget.* 2011; 2(8): 610-626.
- Ying Y, Zhu H, Liang Z, Ma X, Li S. GLP1 protects cardiomyocytes from palmitate-induced apoptosis via Akt/GSK3b/b-catenin pathway. *J Mol Endocrinol.* 2015; 55(3): 245-262.
- Toker A. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul.* 2012; 52(1): 78-87. Review.
- Park JI, Strock CJ, Ball DW, Nelkin BD. The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(2): 543-554.
- Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence-halting on the road to cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355(10): 1037-1046.
- Hong SK, Yoon S, Moelling C, Arthan D, Park JI. Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling. *J Biol Chem.* 2009; 284(48): 33006-33018.
- Park JI. Growth arrest signaling of the Raf/MEK/ERK pathway in cancer. *Front Biol (Beijing).* 2014; 9(2): 95-103.
- Wu PK, Hong SK, Veeranki S, Karkhanis M, Starenki D, Plaza JA, Park JI. A mortalin/HSPA9-mediated switch in tumor-suppressive signaling of Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(20): 4051-4067.

20. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Shepard KE. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag Res.* 2013; 5: 281-292.
21. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(9): a011189.
22. Mahajan K, Mahajan NP. PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 2012; 227(9): 3178-3184.

Received 14.07.2016

DETERMINATION OF FREQUENCIES OF ALLELES, ASSOCIATED WITH THE PSEUDODEFICIENCY OF LYSOSOMAL HYDROLASES, IN POPULATION OF UKRAINE

N. V. OLKHOVYCH, N. G. GOROVENKO

State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: nolhovich@gmail.com

The pseudodeficiency of lysosomal hydrolases described as a significant reduction in enzyme activity *in vitro* in clinically healthy individuals, can lead to diagnostic errors in the process of biochemical analysis of lysosomal storage disease in case of its combination with pathology of another origin. Pseudodeficiency is mostly caused by some non-pathogenic changes in the corresponding gene. These changes lead to the *in vitro* lability of the enzyme molecule, whereas *in vivo* the enzyme retains its functional activity. To assess the prevalence of the most common lysosomal hydrolases pseudodeficiency alleles in Ukraine, we have determined the frequency of alleles *c.1055A>G* and *c.*96A>G* in the *ARSA* gene, substitutions *c.739C>T* (R247W) and *c.745C>T* (R249W) in the *HEXA* gene, *c.1726G>A* (G576S) and *c.2065G>A* (E689K) in the *GAA* gene, *c.937G>T* (D313Y) in the *GLA1* gene and *c.898G>A* (A300T) in the *IDUA* gene in a group of 117 healthy individuals from different regions of the country and 14 heterozygous carriers of pathogenic mutations in the *HEXA* gene (parents of children with confirmed diagnosis of Tay-Sachs disease). The total frequency of haplotypes, associated with arylsulfatase A pseudodeficiency, in healthy people in Ukraine (*c.1055G/c.*96G* and *c.1055G/c.*96A* haplotypes) was 10.3%. The frequency of *c.739C>T* (R247W) allele, associated with hexosaminidase A pseudodeficiency, among Tay-Sachs carriers from Ukraine was 7.1%. The total frequency of α -glucosidase pseudodeficiency haplotypes in healthy individuals in Ukraine (*c.1726A/c.2065A* and *c.1726G/c.2065A* haplotypes) was 2.6%. No person among examined individuals with the substitution *c.937G>T* (D313Y) in the *GLA1* gene and *c.898G>A* (A300T) in the *IDUA* gene was found. The differential diagnostics of lysosomal storage diseases requires obligatory determination of the presence of the pseudodeficiency alleles, particularly the ones with high incidence in the total population. Ignoring phenomenon of pseudodeficiency may lead to serious diagnostic errors.

Key words: lysosomal hydrolases, pseudodeficiency of the enzyme, allele frequency.

In most cases, the hereditary deficiency of lysosomal hydrolases is associated with the development of severe neurodegenerative diseases – lysosomal storage disorders [1]. However, some individuals remain clinically healthy despite a significant decrease in the activity of a certain enzyme, determined by standard techniques. This phenomenon is called “pseudodeficiency” of the enzyme [2]. In practice, this situation usually refers not to the absolute deficiency of the enzyme activity but, rather, to a decrease to the level which is lower than that for heterozygous carriers, thus resulting in impossibility of distinguishing between such individuals and patients with lysosomal storage disorders. The pseudodeficiency phenomenon is described not solely for lysosomal hydrolases, however, it is more common for this group of enzymes.

It was established that in most cases, the pseudodeficiency of lysosomal hydrolases is caused by some polymorphic changes in the corresponding gene [2]. Usually, these changes are non-pathogenic and lead to *in vitro* lability of the enzyme molecule, whereas *in vivo* the enzyme retains functional activity. Such changes may be inherited either independently, i.e. in the absence of any other changes in the corresponding gene, or in the combination with pathogenic mutations. In the first case, any person in the entire population, regardless of the aggravation with pathogenic mutations of the corresponding gene, may carry the pseudodeficiency allele and express the decreased enzyme activity at biochemical examination [3]. As for the other case, related to the combination of inheritance and pathogenic mutations, pseudodeficiency of enzyme activity is mostly

manifested in heterozygous carriers of pathogenic mutations [4]. Both situations can lead to serious errors during biochemical diagnostics of lysosomal storage disorders when the enzyme pseudodeficiency and pathology of some other genes are combined. Therefore, to avoid false diagnosis, if a decreased activity of the corresponding enzyme was determined in a patient, the biochemical test of lysosomal enzymes, for which pseudodeficiency had been established, should include the determination of pseudodeficiency alleles. It is also essential to assess the pathogenicity of the identified genetic changes at the interpretation of the proband's genetic analysis.

The most striking feature of the phenomenon of lysosomal enzymes pseudodeficiency is rather high incidence in the total population. For instance, population-based studies in different countries showed that 5 to 17% of the *ARSA* gene variants in the population are represented by the variant associated with arylsulfatase A pseudodeficiency [5-11]. At the same time, other pseudodeficiencies, such as hexosaminidase A and B, β -mannosidase or β -galactosidase pseudodeficiency, occur quite rarely; at present only single cases of such changes have been described [12-14]. Therefore, to elaborate the most efficient algorithms for laboratory analysis for differential diagnostics of lysosomal storage disorders in a specific population, the frequency of alleles of pseudodeficiency of lysosomal hydrolases in this population should be taken into consideration.

Our work was aimed at determining the incidences of the most widespread alleles in genes *ARSA*, *HEXA*, *GAA*, *GLAI* and *IDUA*, which cause the arylsulfatase A, β -hexosaminidase A, α -galactosidase, α -L-iduronidase and α -glucosidase pseudodeficiency in the Ukrainian population.

Materials and Methods

The studies were conducted using blood samples from 117 unrelated volunteers with no signs of lysosomal storage disorders in their clinical history from all the regions of Ukraine and 14 heterozygous carriers of pathogenic mutations in the *HEXA* gene (parents of children with confirmed diagnosis of Tay-Sachs disease).

All participants gave informed consent for the study prior to the procedure of obtaining their blood samples.

Genomic DNA was isolated from whole peripheral blood with EDTA using Neogene commercial sets (Ukraine). The determination of c.1049A>G and c.*96 A>G variants of *ARSA* gene was performed by PCR method with subsequent RFLP-analysis [8]. The design of primers and the conditions of RFLP-analysis are presented in Table 1.

Analysis of the products was performed by electrophoresis in 8% PAAG followed by staining with ethidium bromide solution.

Determination of substitutions c.739C>T (R247W) and c.745C>T (R249W) in *HEXA* gene, c.1726G>A (G576S) and c.2065G>A (E689K) in *GAA* gene, c.937G>T (D313Y) in *GLAI* gene and c.898G>A (A300T) in *IDUA* gene was performed by the allele-specific amplification method. The design of primers for allele-specific amplification was developed by Neogene (Ukraine) (Table 2).

Analysis of the products was performed by electrophoresis in 2% agarose gel followed by staining with ethidium bromide solution.

Arlequin 3.5 software was used to assess allele frequencies, their correspondence to the Hardy-Weinberg equilibrium, value of linkage disequilibrium.

Table 1. Design of primers and conditions of RFLP-analysis of c.1049A>G and c.*96 A>G of *ARSA* gene variants

Allele	Primers	Annealing temperature	Fragment size	Restriction endonuclease	Presence of a restriction site in case of genetic replacement
c.1049A>G	5'-TTGATGGCGAACTGAGTGAC-3'	58 °C	277 bp	BsrI	+
	5'-CAGTGCAGGAGGCACTGAGG-3'				
c.*96 A>G	5'-GGTTTGTGCCTGATAACTTA-3'	61 °C	114 bp	DdeI	+
	5'-TTCCTCATTCGTACCACAGG-3'				

Table 2. Design of primers for allele-specific amplification

Gene	Allele	Primers	Fragment size	
<i>HEXA</i>	c.739C	5'-TTCCCAGGTGGAAGAAGTCG-3'	228 bp	
		5'-GAAGGAGGTCATTGAATACGCAC <u>C</u> -3'		
	c.739T	5'-TTCCCAGGTGGAAGAAGTCG-3'		
		5'-GAAGGAGGTCATTGAATACGCAT <u>T</u> -3'		
	c.745C	5'-TTCCCAGGTGGAAGAAGTCG-3'		224 bp
		5'-GAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC <u>C</u> -3'		
c.745T	5'-TTCCCAGGTGGAAGAAGTCG-3'			
	5'-GAGGTCATTGAATACGCACGGCTCT <u>T</u> -3'			
<i>GAA</i>	c.1726G	5'-GCAGTGGAGATGATTACCCAGGTTC-3'	306 bp	
		5'-GCG ATG GCT TCG GTC AGG CC <u>C</u> -3'		
	c.1726A	5'-GCAGTGGAGATGATTACCCAGGTTC-3'		
		5'-GCG ATG GCT TCG GTC AGG CT-3'		
	c.2065G	5'-TGG CCT CCA CAG CTT GAT TT-3'		521 bp
		5'-CA GGA GCC GTA CAG CTT CAG CG <u>G</u> -3'		
c.2065A	5'-TGG CCT CCA CAG CTT GAT TT-3'			
	5'-CA GGA GCC GTA CAG CTT CAG CA <u>A</u> -3'			
<i>GLAI</i>	c.937G	5'-ACCTGTCTAAGCTGGTACCCCTT-3'	88 bp	
		5'-CTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGG <u>G</u> -3'		
	c.937T	5'-ACCTGTCTAAGCTGGTACCCCTT-3'		
		5'-CTCAAGCCAAAGCTCTCCTTCAGT <u>T</u> -3'		
<i>IDUA</i>	c.898G	5'-TCCATCTCCATCCTGGAGCAG-3'	113 bp	
		5'-CAGCCCACCAGCGGGTCCGC <u>C</u> -3'		
	c.898A	5'-TCCATCTCCATCCTGGAGCAG-3'		
		5'-CAGCCCACCAGCGGGTCCGT <u>T</u> -3'		

The allele-specific nucleotides are underlined.

rium, and incidences of haplotypes. The significance level $p = 0.05$ was used to assess the statistical significance of the differences.

Results and Discussion

To date, the pseudodeficiency of at least eight lysosomal hydrolases: arylsulfatase A, β -hexosaminidase A and B, β -hexosaminidase A, α -galactosidase, β -galactosidase, α -L-iduronidase, α -glucosidase, and β -mannosidase has been established (Table 3).

We studied the incidence of polymorphic alleles of genes, associated with the pseudodeficiency of five lysosomal enzymes, namely alleles c.1055A>G and c.*96A>G in *ARSA* gene and alleles c.739C>T and c.745C>T in *HEXA* gene, as alleles with the highest incidence rate in many populations, as well as alleles

c.1726G>A and c.2065G>A in *GAA* gene, c.937G>T in *GLAI* gene and c.898G>A in *IDUA* gene. The latter three have been chosen due to their relevance to early and accurate diagnostics of the corresponding diseases, related to specific enzyme replacement therapy.

The alleles of the pseudodeficiency of other lysosomal enzymes, such as β -galactosidase, β -mannosidase and β -hexosaminidase A and B, were not studied in this work.

Arylsulfatase A pseudodeficiency. It is known that alleles c.1055A>G and c.*96A>G in *ARSA* gene are the most common cause of the arylsulfatase A pseudodeficiency in most populations [8]. They have been discovered in individuals both with and without pathogenic mutations in this gene. Therefore, our assessment of the frequency of these alleles in

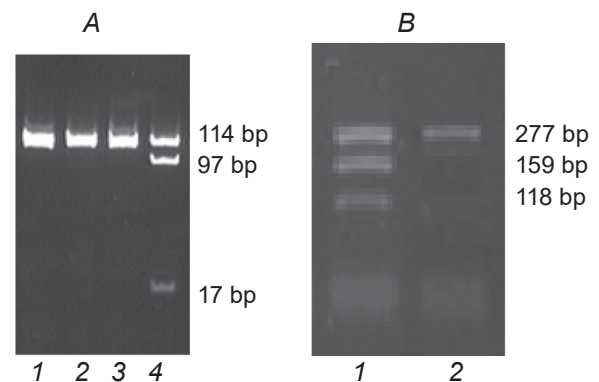
Table 3. Alleles, which are associated with the lysosomal hydrolases pseudodeficiency

Lysosomal enzyme	Disease, caused by the enzymatic deficiency	Gene	Alleles, associated with enzyme pseudodeficiency	Ref.
Arylsulfatase A (EC 3.1.6.1)	Metachromatic leukodystrophy	<i>ARSA</i>	c.1055A>G (N350S) c.*96A>G (polyA loss) c.1462C>T (Q488X)* c.1150G>A (E384K)* c.1136C>T (P379L)* c.511G>A (D171N)*	[3] [15] [16] [17] [15]
β -hexosaminidase A (EC 3.2.1.52)	Tay-Sachs disease	<i>HEXA</i>	c.739C>T (R247W) c.745C>T (R249W)	[4]
α -glucosidase (EC 3.2.1.20)	Pompe disease	<i>GAA</i>	c.1726G>A (G576S) c.2065G>A (E689K)	[18]
α -galactosidase (EC 3.2.1.22)	Fabry disease	<i>GLA1</i>	c.937G>T (D313Y)	[19]
β -galactosidase (EC 3.2.1.23)	GM1-gangliosidosis	<i>GLB1</i>	c.1561T>C (C521R)* c.1594A>G (S532G) c.1783A>T (R595W)	[14]
α -L-iduronidase (EC 3.2.1.76)	Type I mucopolysaccharidosis (Hurler's syndrome)	<i>IDUA</i>	c.898G>A (A300T)	[20]
β -mannosidase (EC 3.2.1.25)	β -mannosidosis	<i>MANBA</i>	c.1922G>A (R641H)*	[13]
β -hexosaminidase A and B (EC 3.2.1.52)	Sandhoff disease	<i>HEXB</i>	18 bp INS (HEX PARIS)*	[12]

*Described single cases

the Ukrainian population included determination of the frequency of alleles c.1055A>G and c.*96A>G in *ARSA* gene in 117 healthy individuals from different regions of the country.

The total incidence of alleles was found to be 5.56% for the substitution of c.1055A>G and 4.7% for the substitution of c.*96 A>G. The genotype distribution among the investigated individuals corresponded to Hardy-Weinberg equilibrium for both substitutions ($P > 0.05$). It is known that in the vast majority of cases these two alleles are inherited together. A significantly linkage disequilibrium of alleles c.1055A>G and c.*96 A>G ($r^2 = 0.84$, $P < 0.05$) was observed in the investigated individuals. The total incidence of the haplotype with two substitutions (c.1055G/c.*96G haplotype) was found to be 9.4%. One person was homozygous for these two alleles, and nine patients were heterozygous. The isolated substitution c.1055A>G was revealed in two heterozygous individuals. No isolated substitution



A – allele c.*96A>G of *ARSA* gene (1 – PCR fragment before restriction; 2-4 – PCR fragments after treatment with restriction endonuclease *Ddel*: 2,3 – wild type allele, 4 – * allele 96A>G heterozygous); B – allele c.1055A>G of *ARSA* gene (PCR fragments after treatment with restriction endonuclease *BsrI*: 1 – allele c.1055A>G heterozygous; 2 – wild type allele)

c.*96 A>G was found in any of the cases. Thus, the total incidence of haplotypes, associated with the arylsulfatase A pseudodeficiency among the patients from Ukraine (c.1055G/c.*96G and c.1055G/c.*96A haplotypes) was 10.3%.

Hexosaminidase A pseudodeficiency. Two substitutions, associated with hexosaminidase A pseudodeficiency, namely c.739C>T (R247W) and c.745C>T (R249W), were described for the *HEXA* gene [4]. These substitutions were found in heterozygous carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene in all to date published cases. Therefore, to estimate the frequency of these alleles in Ukraine we examined 117 healthy donors and 14 heterozygous carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene (parents of children with the confirmed Tay-Sachs disease) for the presence of substitutions c.739C>T (R247W) and c.745C>T (R249W) in *HEXA* gene. No individual with at least one of the mentioned substitutions was found among the healthy volunteers. Among the carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene, there was one person (the father of a sick child) who had substitution c.739C>T (R247W). Thus, the frequency of allele c.739C>T (R247W), associated with the hexosaminidase A pseudodeficiency, among the carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene in Ukraine was determined to be 7.1%.

Acid α -glucosidase pseudodeficiency. At present, the acid α -glucosidase pseudodeficiency is associated with the substitutions c.1726G>A (G576S) and c.2065G>A (E689K) in *GAA* gene [18]. Similar to arylsulfatase A pseudodeficiency alleles, these alleles occur regardless of pathogenic mutations in the mentioned gene. Therefore, a group of 117 healthy volunteers was examined for the presence of these substitutions. The total incidence of alleles, associated with the α -glucosidase pseudodeficiency, in our population was 0.43% for the substitution of c.1726G>A and 1.28% for the substitution of c.2065G>A. The distribution of genotypes among the investigated individuals corresponded to Hardy-Weinberg equilibrium for both substitutions ($P > 0.05$). Linkage disequilibrium of alleles c.1726G>A and c.2065G>A was less pronounced than that for the arylsulfatase A pseudodeficiency alleles ($r^2 = 0.33$, $p = 0$). The total frequency of the haplotype with two substitutions (1726A/2065A haplotype) was 0.9% (Table 3). One person was heterozygous for these two alleles. No isolated substitution c.1726G>A was observed in any of the individuals, and isolated substitution c.2065G>A was

found in two individuals, which is consistent with published data [21]. Thus, the total frequency of haplotypes, which cause the α -glucosidase pseudodeficiency, among the individuals from Ukraine (1726A/2065A and 1726G/2065A haplotypes) was determined to be 2.6%.

α -Galactosidase and α -iduronidase pseudodeficiency. The samples from 117 volunteers were investigated for the presence of the substitution c.937G>T (D313Y) in *GLAI* gene (α -galactosidase pseudodeficiency) and the substitution c.898G>A (A300T) in *IDUA* gene (α -iduronidase pseudodeficiency). No person with the mentioned substitutions was found among the examined individuals.

Arylsulfatase A is a lysosomal enzyme, a deficiency of which results in development of metachromatic leukodystrophy (MLD), a severe neurodegenerative disorder [1]. It was shown that the functionally active enzyme is produced in the cells of individuals with the arylsulfatase A pseudodeficiency, but it differs somewhat structurally from the normal one due to the loss of one of three oligosaccharide residues [3]. In most cases, the arylsulfatase A pseudodeficiency allele is a complex of two mutations in *ARSA* gene – c.1055A>G and c.*96A>G. The first one corresponds to the substitution N350S and substitutes asparagine for serine, impairing the glycosylation site. The second substitution A>G in the position *96 impairs the work of polyadenylation signal.

Analyzing the obtained results on the distribution of the incidence of alleles c.1055A>G and c.*96A>G in *ARSA* gene, it should be noted that the isolated substitution c.*96A>G does not practically occur in Ukraine, as in other European populations (Table 4) [8]. The total incidence of haplotypes associated with the arylsulfatase A pseudodeficiency in Ukraine is close to incidences, obtained by Middle European researchers.

The lowest incidence is observed in Finland, which is known for its peculiarities of gene incidences due to the demographic specificity of this country – a sparseness of first “settlers”, the isolation due to low settlement density and geographic location. The highest incidence is in Portugal and Great Britain, which is close to the incidence of the arylsulfatase A pseudodeficiency allele in America (total incidence of haplotypes is about 0.2) and on the African continents (total incidence of haplotypes is 0.26–0.33) [8, 22]. This may be related to the great navigation history of these countries and the con-

Table 4. The incidence of alleles of the arylsulfatase A pseudodeficiency in Ukrainian and other European populations

Population	Number of examined individuals	Incidence of alleles				Incidence of haplotypes				Total incidence of haplotypes, associated with ASA pseudo-deficiency	Reference
		1055A	1055G	*96A	*96G	1055A/*96A	1055A/*96G	1055G/*96A	1055G/*96G		
Ukraine	116	0.944	0.056	0.953	0.047	0.897	0.026	0.077	0.103	Our study	
Great Britain	154	0.825	0.175	0.877	0.123	0.825	0.052	0.123	0.175	[16]	
Finland	100	0.94	0.06	0.965	0.035	0.940	0.025	0.035	0.06	[22]	
Poland	50	0.91	0.09	0.94	0.06	0.910	0.03	0.06	0.09	[23]	
Croatia	125	0.932	0.068	0.972	0.028	0.932	0.028	0.04	0.068	[24]	
Portugal	161	0.82	0.18	0.904	0.096	0.817	0.087	0.093	0.180	[25]	
Turkey	52	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	0.12	[6]	
Spain	182	0.956	0.044	0.951	0.049	0.901	0	0.088	0.098	[26]	
Italy	89	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	0.101	[27]	

N.d. – the individual incidence of alleles and haplotypes was not determined

sequent migration of the population. The similarity between the incidences of the arylsulfatase A pseudodeficiency alleles in Ukraine, and those in Polish and Turkish populations may also be explained by the common centuries-long history and the population migration.

The deficiency in hexosaminidase A activity, which occurs due to the mutations in *HEXA* gene, usually results in Tay-Sachs disease [1]. However, there were described healthy individuals with pronounced deficiency of hexosaminidase A activity in vitro [4]. The vast majority of individuals with the pseudodeficiency of the mentioned enzyme had one of the polymorphic substitutions c.739C>T (R247W) or c.745C>T (R249W) in the compound with pathogenic mutation in *HEXA* gene. This combination led to a considerable decrease in the hexosaminidase A activity regarding the 4-methylumbelliferyl-derived synthetic substrate (0–25% of the control value), whereas the ability of this enzyme to hydrolyze the natural substrate was not impaired. The studies of the incidence of hexosaminidase A pseudodeficiency alleles demonstrated that about 2% of carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene among Ashkenazi Jews and 35% carriers of non-Jewish ethnicity had one of the polymorphic substitutions in the compound with the pathogenic mutation [4]. The incidence of the hexosaminidase A deficiency allele among the carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene from Ukraine was found to be 7.1%. It should be noted that all the families with Tay-Sachs disease, examined by us, were of Ukrainian ethnicity. Thus, the determined incidence of the hexosaminidase A pseudodeficiency allele is related to the data for non-Jewish populations. Such high incidence of hexosaminidase A deficiency alleles among the carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene of non-Jewish ethnicity may lead to false-positive diagnosis of this disease.

The deficiency of lysosomal acid α -glucosidase causes intralysosomal accumulation of glycogen, primarily in muscle tissues, that results in a severe progressive neuromuscular pathology – Pompe disease or type II glycogenesis [1].

In view of the introduction of enzyme replacement therapy of the disease into clinical practice, there is now urgency for early diagnostics for achievement maximized treatment efficiency. One of the approaches to early diagnostics of Pompe disease is the conducting of neonatal screening with the assessment of the acid α -glucosidase activity in dry

blood spot [21]. One of the difficulties in interpreting results of such a study is the described phenomenon of acid α -glucosidase pseudodeficiency associated with two polymorphic substitutions in the *GAA* gene – c.1726G>A (G576S) and c.2065G>A (E689K) [18]. It was demonstrated that the substitution c.1726 G>A often occurs in the cis-position with the substitution c.2065 G>A, and leads to a considerable decrease in the acid α -glucosidase activity, to practically pathological levels, in healthy individuals. In Asian population, the incidence of the acid α -glucosidase pseudodeficiency allele is rather high – 3.3–3.9% of the total population [18]. The isolated substitution c.2065G>A occurs with approximately the same incidence, whereas the isolated substitution c.1726G>A was not found in any person. The information about the incidence of substitution, associated with acid α -glucosidase pseudodeficiency in European populations is very limited (Table 5). There are only published data on the incidence of acid α -glucosidase pseudodeficiency alleles in the Netherlands, which is very close to our results, in contrast to the very high incidence of these alleles among the population of Japan and China.

No substitution c.937G>T (D313Y) in *GLAI* gene (α -galactosidase pseudodeficiency) or substitution c.898G>A (A300T) in *IDUA* gene (α -iduronidase pseudodeficiency) were found in any of the tested individuals. This indicates that the frequency of such mutations in Ukraine is smaller than 0.004, however, they may still be found. Therefore, in the process of diagnostics of Fabry disease and type I mucopolysaccharidosis, it is worth remembering that the presence of the mentioned mutations in patients requires obligatory further study to detect other disease-causing mutations.

Thus, taking into consideration the significant clinical polymorphism and genetic heterogeneity of lysosomal storage disorders, the differential diagnostics of this large group of hereditary diseases requires a wide application of different biochemical and molecular-genetic methods. At present, the assessment of the specific enzyme activity is a method of choice not only at the stage of confirming nosological diagnostics but also for examination of family members of the sick person with the purpose of medical and genetic consultation. Therefore, the results of the enzyme activity assessment should obligatorily be interpreted with consideration of the data about the presence or absence of the pseudodeficiency allele in the proband. According to our study,

Table 5. The incidence of acid α -glucosidase pseudodeficiency alleles in Ukraine (our study) and other populations [18]

Population	Number of examined individuals	Incidence of alleles				Incidence of haplotypes				Total incidence of haplotypes, associated with acid α -glucosidase pseudodeficiency
		1726G	1726A	2065G	2065A	1726G /2065G	1726A/2065G	1726G /2065A	1726A/2065A	
Ukraine	117	0.996	0.004	0.987	0.013	0.96	0	0.017	0.009	0.026
Netherlands	176	1.0	0	0.989	0.011	0.98	0	0.02	0	0.02
Africa	178	1.0	0	1.0	0	100	0	0	0	0
Japan	88	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	0.56	0	N.d.	N.d.	0.44
China	90	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	0.59	0	N.d.	N.d.	0.41

N.d. – the individual incidence of alleles and haplotypes was not determined

10.3% of the Ukrainian population is carrier of the gene *ARSA* haplotypes associated with the arylsulfatase A pseudodeficiency, 2.6% of the population is carrier of acid α -glucosidase pseudodeficiency alleles, and 7.1% of the carriers of pathogenic mutations in *HEXA* gene from Ukraine are carriers of the hexosaminidase A pseudodeficiency allele. Given a sufficiently high frequency of certain alleles in the total population of Ukraine, ignoring this phenomenon at biochemical analysis can lead to significant diagnostic errors.

ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСТОТИ АЛЕЛІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ ПСЕВДОДЕФІЦИТОМ ЛІЗОСОМНИХ ГІДРОЛАЗ, СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ

Н. В. Ольхович, Н. Г. Горovenko

ДУ Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ;
e-mail: e-mail: nolhovich@gmail.com

Псевдодефіцит активності лізосомних гідролаз, описаний як істотне зниження ензиматичної активності *in vitro* у клінічно здорових осіб, загрожує діагностичними помилками за біохімічної діагностики лізосомних хвороб накопичення в разі його поєднання з патологією іншого генезу. У більшості випадків псевдодефіцит обумовлений певними непатогенними змінами у відповідному гені, які призводять до лабільності ензиматичної молекули *in vitro*, тоді як *in vivo* ензим зберігає функціональну активність. Для оцінки поширеності найрозповсюдженіших алелів псевдодефіциту лізосомних гідролаз в Україні нами було визначено частоту алелів с.1055A>G і с.*96A>G в гені *ARSA*, а також замін с.739C>T (R247W) та с.745C>T (R249W) в гені *HEXA*, с.1726G>A (G576S) та с.2065G>A (E689K) в гені *GAA*, с.937G>T (D313Y) в гені *GLA1* та с.898G>A (A300T) у гені *IDUA* серед 117 здорових осіб із різних регіонів країни та 14 гетерозиготних носіїв патогенних мутацій в гені *HEXA* (батьки дітей з підтвердженим діагнозом хвороби Тея-Сакса). Сумарна частота гаплотипів, які обумовлюють псевдодефіцит арилсульфатази А у здорових осіб (с.1055G/с.*96G та с.1055G/с.*96A гаплотипи), дорівнювала 10,3%. Частота алеля с.739C>T (R247W), асоційованого з псевдодефіцитом

гексозамінідази А, серед носіїв патогенних мутацій в гені *HEXA* з України становила 7,1%. Сумарна частота гаплотипів, які обумовлюють псевдодефіцит α -глюкозидази в здорових осіб (1726A/2065A та 1726G/2065A гаплотипи), становила 2,6%. Серед обстежених волонтерів, які б мали заміни с.937G>Т (D313Y) у гені *GLAI* та с.898G>А (A300T) у гені *IDUA* жодної особи не виявлено.

Зроблено висновок, що інтерпретацію результатів визначення ензиматичної активності у разі біохімічної діагностики лізосомних хвороб накопичення необхідно проводити з урахуванням даних про наявність або відсутність у пробанда алеля псевдодефіциту. Якщо враховувати досить велику частоту деяких алелів у загальній популяції, то ігнорування цього явища може призвести до значних діагностичних помилок.

Ключові слова: лізосомні гідролази, псевдодефіцит ензиматичної активності, частота алелів.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ, СВЯЗАННЫХ С ПСЕВДОДЕФИЦИТОМ ЛИЗОСОМНЫХ ГИДРОЛАЗ, СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ

Н. В. Ольхович, Н. Г. Горовенко

ГУ Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев;
e-mail: e-mail: nolhovich@gmail.com

Псевдодефіцит активності лізосомних гідролаз, описаний як суттєве зниження ензиматичної активності *in vitro* у клінічно здорових осіб, грозить діагностичними помилками в ході біохімічної діагностики лізосомних захворювань накопичення при його сочетанні з патологією іншого генеза. В більшості випадків псевдодефіцит обумовлений визначеними непатогенними змінами в відповідному гені, які призводять до лабільності ензиматичної молекули *in vitro*, тоді як *in vivo* ензим зберігає функціональну активність. Для оцінки поширеності найбільш частих алелів псевдодефіциту лізосомних гідролаз в Україні визначали частоту алелів с.1055A> G і с.*96A> G в гені *ARSA*, а також заміни с.739C>

Т (R247W) і с.745C> Т (R249W) в гені *HEXA*, с.1726G> А (G576S) і с.2065G> А (E689K) в гені *GAA*, с.937G> Т (D313Y) в гені *GLAI* і с.898G> А (A300T) в гені *IDUA* серед 117 здорових осіб з різних регіонів і 14 гетерозиготних носіїв патогенних мутацій в гені *HEXA* (родители детей с подтвержденным диагнозом болезни Тея-Сакса). Суммарная частота гаплотипов, которые обуславливают псевдодефицит арилсульфатазы А у здоровых лиц (с.1055G/с.*96G и с.1055G/с.*96А гаплотипы), составила 10,3%. Частота аллеля с.739C>Т (R247W), ассоциированного с псевдодефицитом гексозаминидазы А, среди носителей патогенных мутаций в гені *HEXA* из Украины составила 7,1%. Суммарная частота гаплотипов, которые обуславливают псевдодефицит α -глюкозидазы у здоровых лиц (1726A/2065A и 1726G/2065A гаплотипы), равнялась 2,6%. Среди обследованных волонтеров, которые имели бы замены с.937G>Т (D313Y) в гені *GLAI* и замены с.898G>А (A300T) в гені *IDUA* не найдено ни одного человека.

Сделан вывод, что интерпретацию результатов определения энзиматической активности при проведении биохимической диагностики лизосомных заболеваний накопления необходимо проводить с учетом данных о наличии или отсутствии у пробанда аллеля псевдодефицита. Если учитывать достаточно большую частоту некоторых аллелей в общей популяции, то игнорирование этого явления может привести к значительным диагностическим ошибкам.

Ключевые слова: лизосомные гидролазы, псевдодефицит ензиматичної активності, частота алелів.

References

1. Mehta A., Winchester B. Lysosomal storage disorders: a practical guide. London: Wiley-Blackwell, 2012. P. 38-46.
2. Thomas GH. "Pseudodeficiencies" of lysosomal hydrolases. *Am J Hum Genet.* 1994; 54(6): 934-940.
3. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K. Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(23): 9436-9440.
4. Park NJ, Morgan C, Sharma R, Li Y, Lobo RM, Redman JB, Salazar D, Sun W, Neidich JA, Strom CM. Improving accuracy of Tay Sachs

- carrier screening of the non-Jewish population: analysis of 34 carriers and six late-onset patients with HEXA enzyme and DNA sequence analysis. *Pediatr Res.* 2010; 67(2): 217-220.
5. Lugowska A, Czartoryska B, Tylki-Szymańska A, Bisko M, Zimowski JG, Berger J, Molzer B. Prevalence of arylsulfatase A pseudodeficiency allele in metachromatic leukodystrophy patients from Poland. *Eur Neurol.* 2000; 44(2): 104-107.
 6. Emre S, Topçu M, Terzioğlu M, Renda Y. Arylsulfatase A pseudodeficiency incidence in Turkey. *Turk J Pediatr.* 2000; 42(2): 115-117.
 7. Gorovenko NG, Olkhovich NV. Differentiation between arylsulfatase A deficiency and pseudodeficiency. *Ukr Biokhim Zhurn.* 2003; 75(5): 106-111. (In Ukrainian).
 8. Ben Halim N, Dorboz I, Kefi R, Kharrat N5, Eymard-Pierre E, Nagara M, Romdhane L, Ben Alaya-Bouafif N, Rebai A, Miladi N, Boespflug-Tanguy O, Abdelhak S. Determination of arylsulfatase A pseudodeficiency allele and haplotype frequency in the Tunisian population. *Neurol Sci.* 2016; 37(3): 403-409.
 9. Shukla P, Vasisht S, Srivastava R, Gupta N, Ghosh M, Kumar M, Sharma R, Gupta AK, Kaur P, Kamate M, Gulati S, Kalra V, Phadke S, Singhi P, Dherai AJ, Kabra M. Molecular and structural analysis of metachromatic leukodystrophy patients in Indian population. *J Neurol Sci.* 2011; 301(1-2): 38-45.
 10. Virgens MY, Siebert M, Bock H, Burin M, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML. Genotypic characterization of Brazilian patients with infantile and juvenile forms of metachromatic leukodystrophy. *Gene.* 2015; 568(1): 69-75.
 11. Han M, Jun SH, Lee YJ, Eun BL, Lee SJ, Seong MW, Park SS, Song SH, Park HD, Song J. Biochemical and Genetic Analysis of Seven Korean Individuals With Suspected Metachromatic Leukodystrophy. *Ann Lab Med.* 2015; 35(4): 458-462.
 12. Dlott B, d'Azzo A, Quon DV, Neufeld EF. Two mutations produce intron insertion in mRNA and elongated beta-subunit of human beta-hexosaminidase. *J Biol Chem.* 1990; 265(29): 17921-17927.
 13. Sabourdy F, Labauge P, Stensland HM, Nieto M, Garcés VL, Renard D, Castelnovo G, de Champfleury N, Levade T. A MANBA mutation resulting in residual beta-mannosidase activity associated with severe leukoencephalopathy: a possible pseudodeficiency variant. *BMC Med Genet.* 2009; 10: 84.
 14. Gort L, Santamaria R, Grinberg D, Vilageliu L, Chabás A. Identification of a novel pseudodeficiency allele in the GLB1 gene in a carrier of GM1 gangliosidosis. *Clin Genet.* 2007; 72(2): 109-111.
 15. Gieselmann V, Zlotogora J, Harris A, Wenger DA, Morris CP. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat.* 1994; 4(4): 233-242.
 16. Barth ML, Ward C, Harris A, Saad A, Fensom A. Frequency of arylsulphatase A pseudodeficiency associated mutations in a healthy population. *J Med Genet.* 1994; 31(9): 667-671.
 17. Zlotogora J, Gieselmann V, von Figura K, Zeigler M, Bach G. Late infantile metachromatic leukodystrophy in Israel. *Biomed Pharmacother.* 1994; 48(8-9): 347-350.
 18. Kroos MA, Mullaart RA, Van Vliet L, Pomponio RJ, Amartino H, Kolodny EH, Pastores GM, Wevers RA, Van der Ploeg AT, Halley DJ, Reuser AJ. p.[G576S; E689K]: pathogenic combination or polymorphism in Pompe disease? *Eur J Hum Genet.* 2008; 16(8): 875-879.
 19. Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, Maire I, Burnett RM, Desnick RJ. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat.* 2003; 22(6): 486-492.
 20. Aronovich EL, Pan D, Whitley CB. Molecular genetic defect underlying alpha-L-iduronidase pseudodeficiency. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(1): 75-85.
 21. Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, Scholl T, Hwu WL. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab.* 2010; 99(4): 379-383.
 22. Ricketts MH, Goldman D, Long JC, Manowitz P. Arylsulfatase A pseudodeficiency-associated mutations: population studies and identification of a novel haplotype. *Am J Med Genet.* 1996; 67(4): 387-392.
 23. Czartoryska B, Zimowski JG, Bisko M, Górska D. Arylsulfatase A pseudodeficiency-incidence in Poland. *Eur J Hum Genet.* 1996; 4(5): 301-303.

24. Bognar SK, Furac I, Kubat M, Cosović C, Demarin V. Croatian population data for arylsulfatase a pseudodeficiency-associated mutations in healthy subjects, and in patients with Alzheimer-type dementia and Down syndrome. *Arch Med Res.* 2002; 33(5): 473-477.
25. Marcão A, Pinto E, Rocha S, Sá Miranda MC, Ferreira L, Amaral O. ARSA-PD associated alleles in the Portuguese population: frequency determination and haplotype analysis. *Mol Genet Metab.* 2003; 79(4): 305-307.
26. Gort L, Coll MJ, Chabás A. Identification of 12 novel mutations and two new polymorphisms in the arylsulfatase A gene: haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish metachromatic leukodystrophy patients. *Hum Mutat.* 1999; 14(3): 240-248.
27. Regis S, Filocamo M, Stroppiano M, Corsolini F, Gatti R. Molecular analysis of the arylsulphatase A gene in late infantile metachromatic leucodystrophy patients and healthy subjects from Italy. *J Med Genet.* 1996; 33(3): 251-252.

Received 20.05.2016

METHODS

UDC 577.1:112.386+543.42+616.895.8

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj88.05.107>

MEASUREMENT OF METHIONINE LEVEL WITH THE LC-ESI-MS/MS METHOD IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS

S. KULAKSIZOGLU¹, B. KULAKSIZOGLU², H. Y. ELLIDAG¹,
E. EREN¹, N. YILMAZ¹, A. BAYKAL³

¹Central Laboratories of Antalya Education and Research Hospital,
Department of Biochemistry, Antalya, Turkey;
e-mail: sblclnrgl@yahoo.co.uk;

²Antalya Education and Research Hospital, Department of Psychiatry, Antalya, Turkey;

³Akdeniz University School of Medicine, Department of Biochemistry, Antalya, Turkey

The purpose of this study was to evaluate plasma methionine levels by using liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectroscopy (LC-ESI-MS/MS) in schizophrenic patients. A twelve-point standard graph was drawn, and the recovery rate, the intra-day and inter-day coefficients of variation (CV), the limit of detection (LOD), and the limit of quantification (LOQ) were evaluated. The y and R^2 values of the standard graph equation were determined as $0.011x + 0.0179$ and 0.9989 , respectively, and the graph remained linear until the $200 \mu\text{mol/l}$ level. The intra-day coefficients of variation of the samples ($n = 10$) containing 8, 28, and $58 \mu\text{mol/l}$ methionine were determined as 2.68, 3.10, and 3.79%, respectively; while their inter-day coefficients of variation were determined as 2.98, 3.19, and 3.84%. The LOD and LOQ values were determined as 0.04 and $0.1 \mu\text{mol/l}$, respectively, while the mean recovery rates were determined as 101.7 and 99.3%. Plasma methionine values were measured as 21.5 (19.5 - 24.6) $\mu\text{mol/l}$ for the patient group, 17.8 (16.3 - 20.1) $\mu\text{mol/l}$ for the control group, and the difference between the two groups was statistically significant ($p = 0.03$). LC-ESI-MS/MS method represents a fairly sensitive, economic, and rapid analysis that requires very little sample and is suitable for measuring methionine levels in schizophrenic patients.

Key words: Methionine, LC-ESI-MS/MS, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), schizophrenic patients.

Methionine is a sulfur-containing amino acid that plays a very important role in methylation reactions. As protein, lipid, and DNA metabolisms, neurotransmitter synthesis and detoxification processes all involve methylation reactions, methionine is of vital importance for normal cellular functions [1, 2]. Methionine has been demonstrated to be involved in many disorders such as schizophrenia, depression, cardiovascular diseases, and obesity. As any impairment of the homocysteine-methionine cycle will affect serum methionine levels, assessing plasma methionine levels is fairly important for understanding their relationships with diseases [3]. Nowadays, the correlation of methionine with diseases is being investigated, especially within the frame of methylation reactions.

Routine measurements of methionine are generally performed by using high-performance liquid chromatography (HPLC), fluorescence polarization immunoassay (FPIA), enzyme immunoassay (EIA) and gas chromatography (GC). However, for reasons such as its ease of preparation and its ability to provide results rapidly, the liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS) represents a more suitable method for routine assessments. Owing to its high sensitivity and reliability, the use of LC-MS/MS is gradually increasing in the field of medicine [4]. Although the most common area of its use is currently the diagnosis of metabolic diseases, the LC-MS/MS method is increasingly being used for the analysis and assessment of many different compounds such as proteins,

lipids, carbohydrates, and DNA. Mass spectrometers are devices whose operating principle is based on analyzing charged particles moving through a magnetic or electrical field, and by distinguishing them from other charged particles according to their mass/charge (m/z) ratios. In addition, mass spectrometers are named according to their source of ionization. In this study, we made use of the electrospray ionization (ESI) method [5, 6].

Quantitative accuracy in LC-ESI-MS/MS is ensured through the addition of a suitable internal standard (IS) at the beginning of the analytical procedure. The addition of a known quantity of IS eliminates – both during extraction and analysis – all errors associated with substance losses, which might occur at any stage. Thus, the use of an IS in this method remedies systematic and random errors. Deuterium-labelled compounds are commonly used as an IS. Owing to their structural similarity, deuterium-labelled IS have the same chromatographic retention time (RT) as the compound being analyzed. In quantitative measurements, the density or area of the sample will be proportioned with the density or area of IS, and the sample's concentration will be, accordingly, determined from calibration curve [7,8].

There is only the limited number of published studies in which the LC-ESI-MS/MS method is used for the measurement of plasma methionine levels. In addition, these studies generally provide different results due to the differences in their sources of ionization, columns, mobile phases, mobile phase speeds, and deproteinization solutions [3, 9, 10]. The aim of the current study is to evaluate the possibilities of HPLC-ESI-MS/MS method usage for measuring plasma methionine levels.

Materials and Methods

Materials and solutions. The materials and solutions used in this study included the methionine standard (Fluka FL-64340), the internal standard L-methionine-D3 (Cambridge Isotope Laboratory/DLM-431), LC-MS grade water (Merck/1.15333.2500), DL-1,4 dithiothreitol (Merck/

D9779), LC grade acetonitrile (Merck/M1.00030), LC grade formic acid (Merck/1.00264.1000), TFAA (trifluoroacetic acid) (Merck/8.08260.0100), LC grade methanol (Merck/1.06008.2500), a Waters Alliance HPLC unit, and Waters Symmetry C8 reverse phase column (2.1 x 100 mm, 3.5 μ m) (Muskegon, Michigan, USA).

Case selection. Schizophrenia patients and healthy controls were included in this study, with the aim of evaluating the LC-ESI-MS/MS method with regard to the measurement of plasma methionine levels. In this context 62 patients aged 18-65 (26 females and 36 males with a mean age of 33.79 ± 8.23 years), diagnosed with schizophrenia and schizoaffective disorder according to the DSM-IV diagnosis criteria (American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IV. Edition 1994), and who gave their voluntary consent regarding participation, were included in this study, along with 57 healthy controls (23 females and 34 males with a mean age of 33.66 ± 8.67 years). The plasma methionine levels of both the schizophrenia patients and the healthy controls were then measured. The blood samples were collected into 6 ml K2 EDTA tubes, taken to a centrifuge within 15 min, while being kept in an ice-filled container, and then centrifuged at 4000 rpm for 5 min. Following centrifugation, the plasma of these samples were separated, transferred into four Eppendorf tubes, and then stored at -80 °C for further evaluation.

LC-ESI-MS/MS analysis. Plasma methionine levels were measured with an LC-MS/MS device – in other words, a liquid chromatography tandem mass spectrometry device (Waters Alliance HPLC; Quattro Micro Triple Quadrupole Tandem Mass spectrometer Waters, Milford, MA, USA).

The positive electrospray ionization was used as the ionization method. Each analysis/test was evaluated under the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The ions formed following decomposition, as well as their retention time in the column, their primary ion, secondary ion, and collision energy (CE) are provided in Table 1.

Table 1. The retention time, m/z value, and collision energy of the methionine measurements

Analytes	Retention time (min)	Primary ion [m/z]	Secondary ion [m/z]	Collision energy CE [eV]
Methionine	1.35	150	103.8	15 eV
Methionine-D3	1.35	153	107.1	15 eV

The Waters Alliance HPLC unit and the Waters Symmetry C8 reverse phase column (2.1×100 mm, 3.5 µm) (Muskegon, Michigan, USA) were used for the separation process. The mobile phase consisted of 30% methanol and 0.1% formic acid, and was evaluated at a speed of 250 µl/min. The conditions used for mass spectrometry are provided in Table 2.

The first procedure for the determination of plasma methionine levels involves reducing methionine molecules bonded to proteins and to each other through disulfide bonds by using dithiothreitol (DTT). Following this, protein precipitating reagents such as methanol and trifluoroacetic acid (TFAA) will be used to remove proteins from the medium/environment (11). In this study, we used acetonitrile, formic acid, and TFAA as precipitants.

Procedure for preparing solutions. The study solutions were prepared in the following concentrations: internal standard L-methionine-D₃ at 100 µmol/l; methionine standard at 200 µmol/l; the reducing agent DTT at 250 mM; and the precipitating solution of acetonitrile, formic acid, TFAA (trifluoroacetic acid) at a ratio of 99.875:0.1:0.025 respectively. The mobile phase was prepared by using 300 ml of methanol, 699 ml of LC-MS grade water, and 1 ml of formic acid. The flow rate was adjusted as 250 µl/min.

For the preparation of the blind solution, twice the volume of acetonitrile was added to a plasma pool consisting of 20 plasma samples, and the mixture was centrifuged at 16,000 g for 3 min. The supernatant was separated and diluted three times with water, and then used as a blind solution. Control solutions were prepared by diluting the standard stock solutions prepared with water with the blind solution, such that final concentrations of 25 µmol/l

Table 2. Mass spectrometry conditions for the measurement of methionine

Conditions	Specifications
Injection volume	4 µl
Ionization mode	ESI positive
Nebulizing gas pressure	55 psi
Capillary voltage	40 v
Type and pressure of decomposing gas	Ar, 5.0×10 ⁻³ mbar
Detector voltage	1600 v

and 50 µmol/l of methionine would be obtained. The control samples were stored at -40 °C.

Study procedure. Twenty µl of plasma (control or standard) and 20 µl of 25 µmol/l internal standard (L-methionine-D₃) were mixed by vortexing for 10 s. Following this, 40 µl of 250 mM DTT was also added, and the mixture was vortexed for 30 s and then kept at room temperature for 5 min. Finally, 200 µl of precipitating solution was added, after that the mixture was vortexed for 10 s, and then centrifuged at 13,000 g for 5 min. To perform readings, the obtained supernatant was transferred in aliquots of 20 µl into a culture plate with 96 wells, and then placed into the device. The plasma, control, and standard samples were read and measured using the same procedure.

To test the applicability of the method, the serum methionine levels of 62 patients diagnosed with schizophrenia and of 57 healthy controls were measured using the LC-MS/MS method.

Statistical analysis was performed by using the Mann-Whitney U test on the SPSS 18 program. $P < 0.05$ (95% significance level) were considered statistically significant.

Results and Discussion

Methionine standard graph. To plot the standard graph, the 200 µmol/l methionine standard solution was first diluted with the blind solution to obtain standard samples with concentrations of 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 120, 160, and 200 µmol/l. For the evaluation of the matrix effect, all standards, except for the blind solution, were prepared by using water. Measurements were performed by applying the procedure described above. Each standard was read twice. The methionine content of the samples and control solutions were calculated by using this standard graph. The standard graph of methionine was drawn by plotting the methionine concentration versus the peak area ratio of the methionine standard to the L-methionine-D₃ internal standard. It was observed that the graph was linear ($R^2 = 0.9989$) (Fig. 1). The linearity of the standard graph prepared with water was calculated as $y = 0.0123x + 0.038$ ($R^2 = 0.9998$). After the standard graph was plotted, the blind solutions were read and evaluated.

No peak was identified during the evaluation of the blind solutions for methionine. After the standard graph was plotted, the blind solutions were read and evaluated (Fig. 2).

An example of a plasma methionine chromatogram for a patient is shown in Fig. 3.

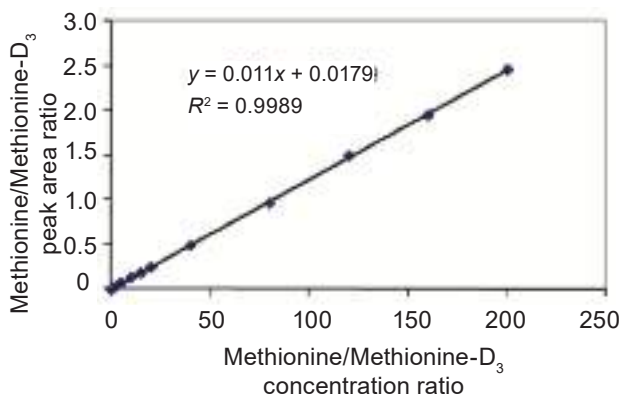


Fig. 1. Methionine standard graph

Following this, the control solutions prepared at two different doses were measured twice, and the mean value of these two measurements was determined for each one of the control solutions. The mean values for the 25 and 50 µmol/l controls were determined as 25.05 and 49.66 µmol/l, respectively. After the controls were evaluated, measurements were performed on the samples. The intra-day reproducibility, inter-day reproducibility and recovery for methionine were evaluated.

A plasma pool was prepared using 20 plasma samples. In this approximately 10 ml plasma pool,

the methionine level was measured as 16.15 µmol/l. The plasma pool sample was transferred to 30 Eppendorf tubes in equal aliquots of 10 µl. Solutions with methionine concentrations of 0, 40, and 100 µmol/l were prepared.

The 30 samples were divided into three sets of ten. Following this, 10 µl of water and 10 µl of the plasma pool solution were added to the first of the three sets; 10 µl of 40 µmol/l solution and 10 µl of the plasma pool solution were added to the second of the three sets; and 10 µl of 100 µmol/l solution and 10 µl of the plasma pool solution were added to the third of the three sets. The mixtures were all vortexed for ten seconds, and then stored at -20 °C.

To evaluate yield (recovery), the samples prepared at three different concentrations were consecutively measured ten times. Calculated yields varied between 94.4-106.9%. The mean yield was calculated as 101.7% and 99.3%. In the evaluation of intra-day reproducibility, the mean concentrations of the samples measured ten times within the same day were 8.07, 28.53, and 57.49 µmol/l. The coefficient of variation (CV) was calculated as 2.68, 3.1, and 3.79%, respectively. To evaluate inter-day reproducibility, the samples prepared at three different concentrations were measured on ten different

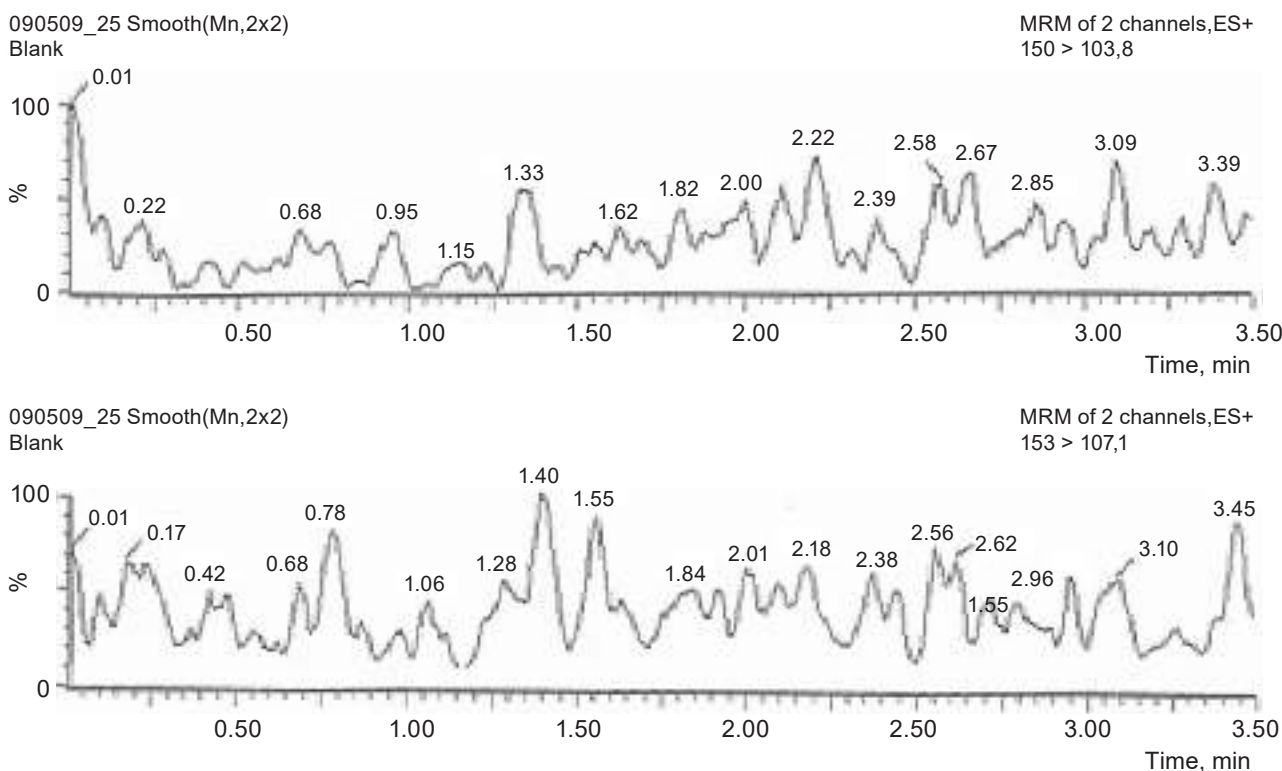


Fig. 2. Chromatogram of blind solution for methionine

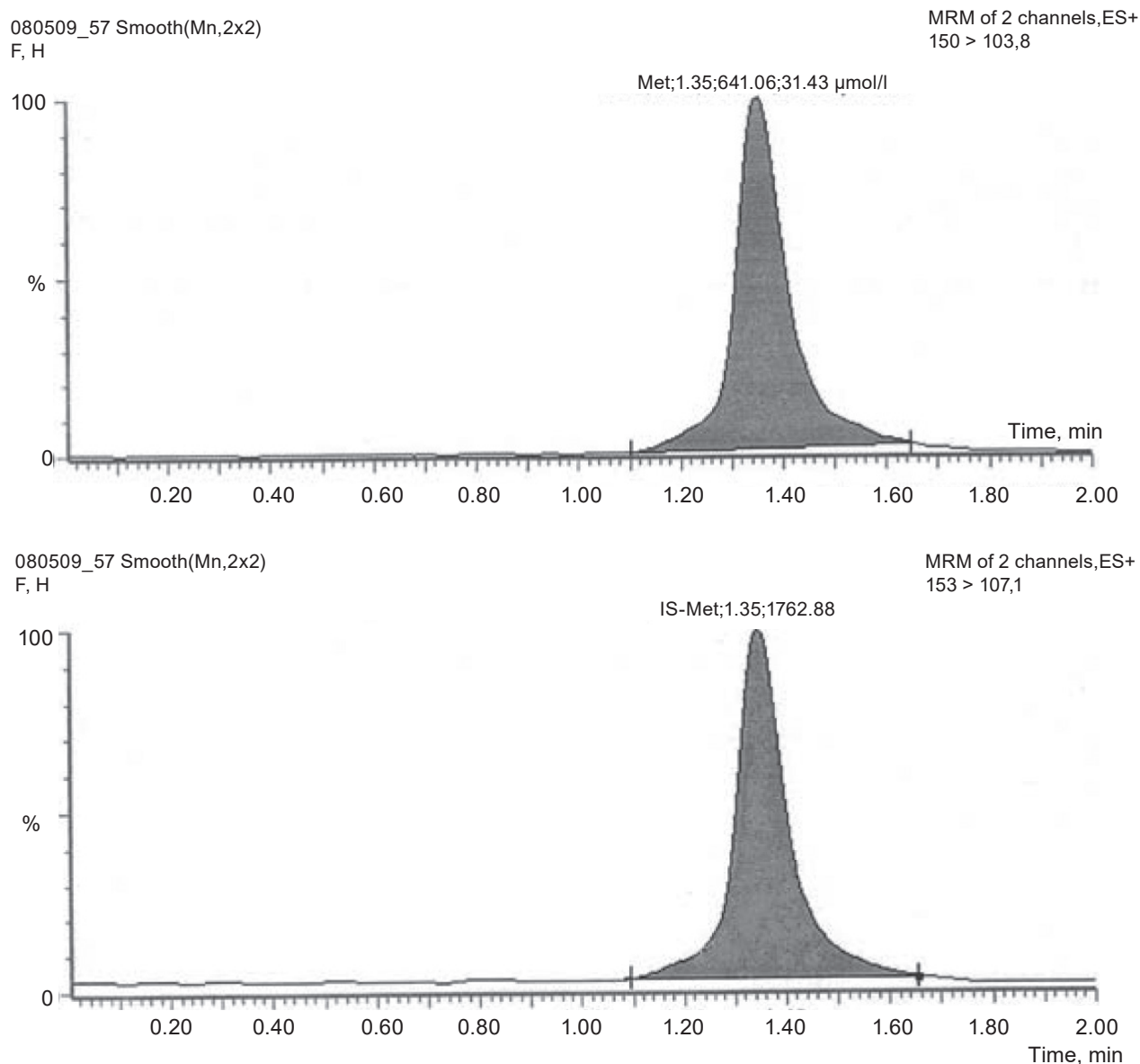


Fig. 3. Methionine chromatogram of a patient

Table 3. Evaluation of intra-day reproducibility, inter-day reproducibility, and recovery for methionine

Number of Tests	Methionine, $\mu\text{mol/l}$	Measured, $\mu\text{mol/l}$	Recovery	Intra-day	Inter-day
N = 10	0	8.01 ± 0.21		CV%: 2.68	CV%: 2.95
N = 10	20	28.36 ± 0.88	101.7%	CV%: 3.10	CV%: 3.19
N = 10	50	57.68 ± 2.18	99.3%	CV%: 3.79	CV%: 3.84

days, and their means and standard deviations were calculated. The mean concentrations of the samples were determined as 8.01 ± 0.21 , 28.36 ± 0.88 , and 57.68 ± 2.18 $\mu\text{mol/l}$, respectively, while their CV% was determined as 2.95, 3.19, and 3.84%, respective-

ly. The CV% values obtained in the evaluations of reproducibility and yield are presented in Table 3.

Limit of detection (LOD), defined as the minimum concentration of methionine giving a peak area three-fold the noise. Limit of quantification (LOQ),

defined as the lowest concentration of methionine, which can be measured in triplicate with a precision higher than 20% (11). Methionine content was measured ten times in the 0.5 $\mu\text{mol/l}$ sample, and, based on the formula $\text{LOD} = 3 \times \text{standard deviation}$, the LOD was calculated as 0.04. Based on the formula $\text{LOQ} = 10 \times \text{standard deviation}$, the LOQ was calculated as 0.1 μmol (9).

The mean plasma methionine level of the 62 schizophrenia patients and 57 controls were determined as 21.5 (19.5-24.6) $\mu\text{mol/l}$ and 17.8 (16.3-20.1) $\mu\text{mol/l}$, respectively. The difference between the two groups was statistically significant ($p = 0.03$).

The amino acid methionine is known to be involved in many diseases such as schizophrenia, depression, cardiovascular diseases, and obesity. It is an important mediator in the single-carbon metabolism and methylation reactions [2, 3]. The measurement of methionine levels is of considerable importance for studies attempting to gain an understanding of the relationship between methylation reactions and diseases. The liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectroscopy (LC-ESI-MS/MS) is a fairly sensitive, low-cost and reliable measurement method [6]. However, the LC-MS-MS method is also associated with disadvantages such as the requirement for preparation, and experienced/specialized personnel.

In studies, standards must be prepared in conditions similar to those of the matrix [11]. To investigate the matrix effect, we compared the calibration curves prepared using water and plasma. The equations of the both curves were very close to one another. The graph equation of the standards prepared with water was $y = 0.0123x + 0.038$ ($R^2 = 0.9998$), while the the graph equation of the standards diluted with blind solution was $y = 0.011x + 0.0179$ ($R^2 = 0.9989$).

Total homocysteine levels were previously evaluated with the LC-ESI-MS/MS method by Persichilli et al. [11] in 2008, and by Li et al. [12] in 2008; they described no significant differences between the calibration curves of samples prepared with water and plasma. These observations suggest that the LC-MS/MS is a fairly sensitive method that is minimally affected by environmental artefacts, owing to its ability to separate/distinguish the molecules being evaluated as primary and secondary molecules, and to perform measurements in the presence of an internal standard. In measurements where the matrix

effect is not taken into consideration, the method of adding standards to the plasma is employed instead. The obtained data indicates recovery. The recovery minimizes the errors that might stem from the matrix effect or the standard added to the samples [11, 13]. The mean recovery values in our study were of 101.7 and 99.3% that was better compared to other studies. Weaving et al. (2006) reported recovery values of 94.7 and 93.4%, while Gardner et al. (2013) reported a recovery value of 97% [9, 10].

The first necessary procedure for the determination of plasma methionine levels is the reduction of plasma-bound methionine molecules to free methionine. To achieve this, tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and dithiothreitol (DTT) are commonly used [14]. It has been previously demonstrated that, compared to DTT, TCEP provides certain advantages such as higher peaks, less noise (unnecessary signals), and greater stability in acidic and basic environments. However, DTT is associated with better reproducibility of results compared to TCEP [14].

Hempen et al. (2008) and Raifi et al. (2007) used TCEP in their studies assessing homocysteine levels [15, 16]. In the current study, we observed irregularities in the chromatograms of samples prepared with DTT and kept at -20°C for more than 24 hours. We believe that this was due to the early vaporization and oxidation property of DTT. We always prepared a fresh DTT solution for each test, in order to eliminate any problems that might stem from vaporization and oxidation during storage. This might have contributed to the better intra- and inter-day reproducibility values obtained in this study. In the current study, the intra-day reproducibilities of samples with 8, 28, and 58 $\mu\text{mol/l}$ methionine were between 2.6 and 3.7%, while the inter-day reproducibilities of these samples were between 2.9 and 3.8%. Weaving et al., on the other hand, determined that the intra-day reproducibilities of samples with 20 and 50 $\mu\text{mol/l}$ methionine were between 2.96 and 3.7%, while the intra-day reproducibilities of these samples were between 11.1 and 12.7% [9]. As mentioned above, the recovery data of our study were also comparatively better. These findings indicate that our method was more sensitive than those used in other studies. In addition, within the context of this study, we used 30% methanol and 0.1% formic acid in our mobile phase. On the other hand, Weaving et al. used 50% acetonitrile and 0.1% formic acid, while Gardner et al. used acetonitrile and 0.1% acetic acid in their studies [9, 10]. Furthermore,

our study also differed in that we used acetonitrile, formic acid and TFAA for deproteinization, while Gardner et al. used methanol for deproteinization. Based on these data, it is possible to state that the use of methanol in the mobile phase and the use of acetonitrile, formic acid, and TFAA for deproteinization represent preferable choices for obtaining better CV% and recovery values.

The retention time refers to the time that passes between the sample's first entry into the column and the highest detector response following its exit from the column. While every substance has a different retention time, the measured substance and its internal standard retention times' are similar [14]. The retention time is affected by many factors such as the mobile phase content, the mobile phase speed, the column length, and the diameter of pores covering the column. In our study, the retention time was determined as 1.35 min. On the other hand, Gardner et al. determined the retention time of four minutes in their study [10], while Calderon-Santiago et al. determined the retention time as 9.2 minutes [3]. The retention time of our study was considerably shorter than the times observed in these studies. The shorter retention times we observed could have been associated with the use of methanol in the mobile phase, and the use of acetonitrile, formic acid, and TFAA at a ratio of 99.875:0.1:0.025 for deproteinization. Gardner et al. and Calderon-Santiago et al. describe using acetonitrile as the mobile phase, and methanol for deproteinization. Shorter retention times are important in that they allow a greater number of samples to be evaluated within a shorter period of time. Shorter analysis periods represent an important criterion for measurement methods; in this context, our study method permitted the evaluation of 33 samples in one hour (including the ten minute pre-preparations), while Gardner et al.'s and Calderon-Santiago et al.'s methods permitted the evaluation of eleven and five samples an hour, respectively [10, 3].

To increase selectivity and the limits of detection, samples are normally subjected to extraction and chromatographic dissociation prior to MS procedures. Columns used for liquid chromatography are important for the pre-preparation procedures of LC-MS/MS. These columns are divided into two groups as normal phase and reverse phase columns. In this study, we made use of an HPLC unit and a C8 reverse phase column. Reverse phase columns present several advantages, such as a slower elution rate, the associated slowing of peaks, and the fact

that smaller changes in the mobile phase result in significant changes on the chromatograms [17]. For these reasons, the reverse phase column was preferred for our study.

Other important parameters of application studies include the LOD and the LOQ, with lower values for these parameters indicating higher sensitivity [10, 11]. In the current study, the LOD and LOQ were determined as 0.04 and 0.1 $\mu\text{mol/l}$, respectively. In their study investigating plasma methionine levels with the LC-MS/MS method, Gardner et al. identified an LOD value of 5 $\mu\text{mol/l}$ [10]. Weaving et al., on the other hand, determined LOD and LOQ values of 0.2 and 0.4 $\mu\text{mol/l}$, respectively, in a similar study [9]. The considerably lower LOD and LOQ values we obtained in comparison to other studies indicated that our method had good sensitivity. We believe that these differences might have also stemmed from the different substances we used in the mobile phase and for deproteinization

In this study, where we evaluated plasma methionine levels using the LC-ESI-MS/MS method, the mean plasma methionine levels of 62 schizophrenia patients was identified as 21.5 (19.5-24.6), while the mean plasma methionine levels of the 57 healthy control was identified as 17.8 (16.3-20.1) $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0.03$). The increased methionine levels in schizophrenia patients suggest an association between schizophrenia and methylation reactions [1]. Studies have demonstrated a relationship between the methylating amino acid methionine and the positive symptoms of schizophrenia [18]. Further studies could also be performed on the correlation between plasma methionine levels and other parameters of the methylation cycle in schizophrenia patients.

Studies on the plasma levels of methionine and amino acid, closely associated with methylation reactions, are of considerable importance. The LC-ESI-MS/MS method presents various advantages over other methods, such as its ability to complete analyses within a period as short as two minutes; its ability to analyze samples containing mixtures, without any derivation stages being necessary; its ability to provide highly sensitive and reliable results when an internal standard is used; its suitability for automation; its ability to perform numerous tests within a very short period of time; its ability to perform tests with very small amounts of sample, as little as 20 μl ; and its low ratio of false positive and false negative results.

Owing to factors such as the use of freshly prepared DTT solutions in our study, and the use

of methanol and formic acid to prepare the mobile phase, the LC-ESI-MS/MS method we employed to measure plasma methionine levels was superior compared to the methods of other studies in terms of better inter-day reproducibility, LOD and LOQ values, shorter retention times, and better mean recovery. Therefore, our study can serve as a reference for the more accurate and exact determination of methionine levels by LC-ESI-MS/MS.

Acknowledgements

We have no financial interest or conflict of interest in association with this work. This manuscript has not been published previously and is not being considered for publication by another journal. All authors have read and approved the final manuscript.

ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ МЕТИОНІНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ШИЗОФРЕНІЄЮ МЕТОДОМ LC-ESI-MS/MS

*S. Kulaksizoglu¹, B. Kulaksizoglu²,
H. Y. Ellidag¹, E. Eren¹, N. Yilmaz¹, A. Baykal³*

¹Central Laboratories of Antalya Education and Research Hospital, Department of Biochemistry, Antalya, Turkey; e-mail: sblclnrgl@yahoo.co.uk;

²Antalya Education and Research Hospital, Department of Psychiatry, Antalya, Turkey;

³Akdeniz University School of Medicine, Department of Biochemistry, Antalya, Turkey

Метою нашого дослідження була оцінка рівня метіоніну в плазмі крові пацієнтів із шизофренією з використанням методу тандемною мас-спектрометрії і рідинної хроматографії з електроспрей-іонізацією (LC-ESI-MS/MS). Розраховано швидкість відновлення, коефіцієнти варіації (CV), межу виявлення (LOD) і межу кількісного визначення (LOQ). Значення y і R^2 стандартного графічного рівняння становили $0,011x + 0,0179$ і $0,9989$ відповідно. Графік залишався лінійним до 200 мкмоль/л. Протягом дня CV для зразків ($n = 10$) із рівнем метіоніну $8, 28$ і 58 мкмоль/л становили $2,68, 3,10$ і $3,79\%$, відповідно; а міжденні CV – $2,98, 3,19$ і $3,84\%$. Значення LOD і LOQ становили $0,04$ і $0,1$ мкмоль/л, відповідно; середня швидкість відновлення – $101,7$ і $99,3\%$. Рівень метіоніну в плазмі крові хворих був $21,5$ ($19,5-24,6$) мкмоль/л, у плазмі крові контрольної групи – $17,8$ ($16,3-20,1$) мкмоль/л. Різниця значень між двома групами була статистично значущою

($p = 0,03$). Проведені дослідження показали, що аналіз із використанням LC-ESI-MS/MS є досить чутливим, економічним, зручним та швидким методом для визначення рівня метіоніну в пацієнтів з шизофренією.

Ключові слова: метіонін, метод LC-ESI-MS/MS, межа виявлення (LOD), межа кількісного визначення (LOQ), пацієнти із шизофренією.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ МЕТИОНИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ МЕТОДОМ LC-ESI-MS/MS

*S. Kulaksizoglu¹, B. Kulaksizoglu²,
H. Y. Ellidag¹, E. Eren¹, N. Yilmaz¹, A. Baykal³*

¹Central Laboratories of Antalya Education and Research Hospital, Department of Biochemistry, Antalya, Turkey; e-mail: sblclnrgl@yahoo.co.uk;

²Antalya Education and Research Hospital, Department of Psychiatry, Antalya, Turkey;

³Akdeniz University School of Medicine, Department of Biochemistry, Antalya, Turkey

Цель нашего исследования – оценить уровень метионина в плазме крови пациентов с шизофренией с применением метода тандемной масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии с электроспрей-ионизацией (LC-ESI-MS/MS). Рассчитаны скорость восстановления, коэффициенты вариации (CV), предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ). Значения y и R^2 стандартного графического уравнения составляли $0,011x + 0,0179$ и $0,9989$ соответственно. График оставался линейным до значения 200 мкмоль/л. В течение дня CV для образцов ($n = 10$) с содержанием метионина $8, 28$ и 58 мкмоль/л составляли $2,68, 3,10$ и $3,79\%$, соответственно; а междневные CV – $2,98, 3,19$ и $3,84\%$. Значения LOD и LOQ составляли $0,04$ и $0,1$ мкмоль/л, соответственно; средняя скорость восстановления – $101,7$ и $99,3\%$. Содержание метионина в плазме крови больных было $21,5$ ($19,5-24,6$) мкмоль/л, в плазме крови контрольной группы – $17,8$ ($16,3-20,1$) мкмоль/л. Разница значений между двумя группами была статистически значимой ($p = 0,03$). Проведенные исследования показали, что анализ с использованием LC-ESI-MS/MS является достаточно чувствительным, экономичным, удобным и бы-

стрым методом определения уровня метионина у пациентов с шизофренией.

Ключевые слова: метионин, метод LC-ESI-MS/MS, предел обнаружения (LOD), предел количественного определения (LOQ), пациенты с шизофренией.

References

1. Regland B. Schizophrenia and single-carbon metabolism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29(7): 1124-1132.
2. Singh SM, Murphy B, O'Reilly RL. Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex diseases: from cancer to schizophrenia. *Clin Genet*. 2003; 64(6): 451-460.
3. Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Galache-Osuna JG, Luque de Castro MD. Determination of essential amino acids in human serum by a targeting method based on automated SPE-LC-MS/MS: discrimination between arterosclerotic patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2012; 70: 476-484.
4. Hellmuth C, Koletzko B, Peissner W. Aqueous normal phase chromatography improves quantification and qualification of homocysteine, cysteine and methionine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2011; 879(1): 83-89.
5. Mosharrafa M, Stauffer WM, Reed JH Jr. Recent developments in clinical mass spectrometry. *Biomed Sci Instrum*. 1971; 8: 71.
6. Cooks RG, Busch KL, Glish GL. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. *Science*. 1983; 222(4621): 273-291.
7. Clayton PT. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2001; 24(2): 139-150.
8. Lehrer M. In Kaplan LA. Mass spectrometry. St.Louis: Mosby Company. 1996; 167-184.
9. Weaving G, Rocks BF, Iversen SA, Tithera-dge MA. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*. 2006; 43(Pt 6): 474-480.
10. Gardner LA, Desiderio DM, Groover CJ, Hartzes A, Yates CR, Zucker-Levin AR, Bloom L, Levin MC. LC-MS/MS identification of the one-carbon cycle metabolites in human plasma. *Electrophoresis*. 2013; 34(11):1710-1716.
11. Persichilli S, Gervasoni J, Iavarone F, Zuppi C, Zappacosta B. A simplified method for the determination of total homocysteine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2010; 33(20): 3119-3124.
12. Li S, Jia J, Liu G, Wang W, Cai Y, Wang Y, Yu C. Improved and simplified LC-ESI-MS/MS method for homocysteine determination in human plasma: application to the study of cardiovascular diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008; 870(1): 63-67.
13. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009; 30(1): 19-34.
14. Rafii M, Elango R, House JD, Courtney-Martin G, Darling P, Fisher L, Pencharz PB. Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877(28): 3282-3291.
15. Hempen C, Wanschers H, van der Sluijs Veer G. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 391(1): 263-270.
16. Rafii M, Elango R, Courtney-Martin G, House JD, Fisher L, Pencharz PB. High-throughput and simultaneous measurement of homocysteine and cysteine in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2007; 371(1): 71-81.
17. Zhang WQ, Hu CQ. Theory of selectivity of RP-LC C18 column and its application. *Yao Xue Xue Bao*. 2010; 45(5): 555-559.
18. Grayson DR, Chen Y, Dong E, Kundakovic M, Guidotti A. From trans-methylation to cytosine methylation: evolution of the methylation hypothesis of schizophrenia. *Epigenetics*. 2009; 4(3): 144-149.

Received 31.05.2016

THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.352

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj88.05.116>

ВИНАХІДНИЦЬКА ДІЯЛЬНІСТЬ ВІДДІЛУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ ІНСТИТУТУ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ

*50-річчю наукової і науково-організаційної діяльності
С. В. Комісаренка присвячується*

В. М. ДАНИЛОВА, Р. П. ВІНОГРАДОВА, С. Г. ТОРХОВА

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: valdan@biochem.kiev.ua*

Молекулярна імунологія – один із найважливіших напрямів сучасної біології і прямий «нащадок» традиційної імунології – виникла, сформувалась і зробила найважливіші відкриття за останні 50 років. Це наука інтегральна, оскільки використовує досягнення і методи біохімії, біофізики, молекулярної біології, генетики, інших наук і спрямована на вивчення однієї з головних систем організму – імунної, основним призначенням якої є підтримка антигенної стабільності внутрішнього середовища організму. Імунна система бореться з численними захворюваннями в організмі людини і тварин, як з інфекційними, так і з новоутвореннями, і ще частіше попереджає чи перешкоджає їх виникненню. Водночас порушення імунних реакцій є причиною багатьох захворювань, і практично кожна хвороба впливає на стан імунітету організму, який, у свою чергу, визначає перебіг захворювання.

Імунологія в певному сенсі є унікальною медико-біологічною наукою, тому що має власні високочутливі і високоспецифічні методи та власні об'єкти дослідження різного рівня організації (органи, тканини, клітини та молекули, що беруть участь у реалізації функцій імунної системи) [1].

Поза тим, дослідження в галузі фундаментальної імунології є також конче важливими і для інших біологічних наук, оскільки

дають унікальну можливість ученим моделювати і вивчати на різних рівнях організації (молекулярному, субклітинному, клітинному і міжклітинному, а також органному) загальні біологічні процеси, пов'язані з диференціацією, проліферацією та смертю клітин, з механізмами між- і внутрішньоклітинної сигналізації, організацією геному в клітині, зрештою вивчати структурну організацію та функціонування макромолекул. Недарма колишні аксіоми – один протеїн кодується одним геном, а потім – один поліпептидний ланцюг кодується одним геном – були спростовані саме завдяки молекулярній імунології, коли було показано, що молекула імуноглобулінів (а також окремо важкий і легкий ланцюг молекули імуноглобулінів) кодуються декількома генами.

Саме цією найскладнішою, найцікавішою та вкрай важливою наукою й зацікавився **Сергій Васильович Комісаренко**, який першим в Україні започаткував науковий напрям досліджень – *молекулярну імунологію*, створивши в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України спочатку лабораторію імунохімії, а потім – відділ з однойменною назвою.

Восени цього року виповнюється **50 років** з того часу, коли молодий Сергій Комісаренко переступив поріг Інституту біохімії АН України, пройшов всі щаблі наукової кар'єри від аспіранта до директора Інституту і разом із започаткованим ним науковим напрямом досліджень ство-



Зав. відділу молекулярної імунології, академік НАН і НАМН України С. В. Комісаренко в лабораторії. Київ, 2016 р.

рив потужну наукову школу, представники якої, в свою чергу, стали відомими вченими як у нашій країні, так і за її межами.

Про наукові і науково-практичні здобутки співробітників цього відділу, але трохи ширше ніж заявлено у назві, йдеться у представленій статті.

Відділ молекулярної імунології бере свій початок із вересня 1975 р., коли за ініціативою акад. М. Ф. Гулого з відділу біосинтезу та біологічних властивостей білка на чолі з канд. біол. наук. С. В. Комісаренком (тепер – акад. НАН та НАМН України, д-р біол. наук, проф.) було виділено групу з восьми науковців і допоміжного персоналу, яка набула статусу **лабораторії імунохімії**. У 1982 р. лабораторію було перетворено у **відділ молекулярної імунології**, керівником якого з того часу і дотепер є Сергій Васильович.

Лабораторія була створена після повернення С. В. Комісаренка із наукового відрядження до Франції, де він працював у 1974-1975 роках в лабораторії імуноцитохімії Відділення молекулярної біології Інституту Пастера у Парижі під керівництвом професора С. Аврамеаса. Слід згадати, що саме Стратіс Аврамеас та Жозе Уріель першими в світі у 1966 році використали ензим *пероксидазу* для імунохімічного (імуоензимного) аналізу. Напевне, імуопероксидазний метод

визначення антигенів для діагностики є зараз найпоширенішим у світі.

Як розповідав Сергій Васильович, він звернув увагу на роботи С. Аврамеаса з використання пероксидази та синтезу імуносорбентів за допомогою глутарового альдегіду, які стали класичними, ще у 1970 році, коли, після закінчення аспірантури, він за порадою свого вчителя – академіка М. Ф. Гулого – зацікавився імунологією, зокрема механізмами синтезу антитіл. Для цього потрібно було володіти сучасними на той час методами імунохімічного аналізу. Спроби самостійно зв'язувати комерційну пероксидазу угорської фірми «Реанал» з антигенами чи антитілами за опублікованими методами були невдалими. Як потім з'ясувалося, ця пероксидаза була дуже низької якості і не могла бути використана без додаткової хроматографічної очистки. Саме в цей час до Києва, на запрошення АН УРСР, приїхав один з найвідоміших імунологів у світі, винахідник імуоелектрофорезу, академік Французької медичної академії П'єр (Петро Миколайович) Грабар. Петро Миколайович був добре знайомий з академіками АН УРСР Р. Є. Кавецьким та В. П. Комісаренком і був вчителем С. Аврамеаса. У розмові із Сергієм Комісаренком він зацікавився його планами з вивчення синтезу імуоглобулінів і сприяв згоді С. Аврамеаса прийняти С. Комісаренка на стажування в його



Колектив відділу молекулярної імунології. Київ, 1982 р. Зліва направо: 1-й ряд: О. М. Буханевич, Н. В. Доценко, Н. П. Карлова, М. П. Дмитренко; 2-й ряд: Г. М. Фомовська, М. В. Скок; 3-й ряд: С. В. Василенко, Н. В. Канівець, М. Г. Журавський, Д. І. Лукінов, С. В. Комісаренко, О. Б. Ткачук, Т. В. Горошнікова, Г. Г. Гайворонська

лабораторію. За рік стажування С. В. Комісаренко повністю опанував імунопероксидазні методи виявлення синтезу неспецифічних і антипероксидазних антитіл лімфоцитами та/або плазматичними клітинами, синтезував різноманітні імуносорбенти, зокрема на основі кон'югованого із сефарозою конканаваліну А, а також прослухав поглиблений курс імунології Пастерівського інституту, який викладали найкращі французькі та іноземні лектори. Знання згаданого курсу та лекції з молекулярної біології в Колеж де Франс дозволили йому оволодіти найсучаснішими знаннями з молекулярної та клітинної імунології. Наприкінці свого перебування в Інституті Пастера він запропонував своєму вчителю – С. Аврамеасу, а потім і директору Інституту – лауреату Нобелівської премії Жаку Моно виконати проект із вивчення зв'язку між генами, які кодують синтез імуноглобулінів, та структурою імуноглобулінів, що мало вказати на походження специфічності антитіл. Ж. Моно виявив неабиякий інтерес і запропонував С. Комісаренку грант на два роки (з продовженням) для виконання проекту спільно з професором П'єром Вассалі із Женевського університету. На жаль, із сімейних обставин

Сергій Васильович мав повернутися додому і проект не був виконаний. Але методи, які було опановано ним в лабораторії імуноцитохімії в Парижі, надалі було успішно використано в Інституті біохімії в Києві. Тільки угорську пероксидазу фірми «Реанал» довелося додатково очистити іонобмінною хроматографією до RZ не менше 3,0. Така високоочищена пероксидаза дозволила у співробітництві з лабораторією проф. К. П. Зака з Інституту ендокринології і обміну речовин МОЗ УРСР проводити маркування різних популяцій лімфоцитів та передбачувано стовбурових клітин [2], а також разом із групою д-ра біол. наук В. О. Майського (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР) вивчати ретроградний аксонний транспорт пероксидази в нервовій системі [3].

Але повернемося до початку створення лабораторії імунохімії. З огляду на те, що вивчення структурних генів, які кодують структуру імуноглобулінів, у Києві було неможливим (хоча невдалі спроби були), кілька років поспіль головними науковими напрямками досліджень лабораторії були: *вивчення механізмів імунотропної і протитухлинної дії фосфорорганічних похідних неорганічного*

пірофосфату та розроблення і використання методів імунохімічного аналізу протеїнів для подальшого визначення механізмів молекулярного розпізнавання антигенів імунною системою організму.

Дослідження імуотропної дії бісфосфонатів, що проводилися вченими відділу під керівництвом Сергія Комісаренка, були чи не найпершими в світі. Відділ був також серед тих, хто першим у СРСР застосував імуноензимний аналіз, протокову цитофлуориметрію, гібридну технологію одержання моноклональних антитіл та імунохімічний аналіз протеїнів. Згодом імунохімічні методи дослідження стали основою для створення у відділі високочутливих та високоспецифічних імунодіагностикумів, які конче необхідні для медицини, ветеринарії, для розвитку імунобіотехнології та моніторингу стану довкілля тощо.

У полі зору науковців відділу було також дослідження молекулярних механізмів активації лімфоцитів: було встановлено, що активація лімфоцитів, яка пов'язана з їх проліферацією, залежить від іонів кальцію і супроводжується зміною активності ензимів перетворення аденозину та його похідних у клітині.

У відділі було створено низку протипухлинних імунотоксинів, виявлено негативний вплив низьких доз радіації на систему природного імунітету в ліквідаторів аварії на Чорнобильській АЕС, досліджено імунохімічну структуру нейротоксину апаміну, цитохрому с, молекул фібриногену та фібрину на різних стадіях його полімеризації, дифтерійного токсину і його рецептора, мікобактерій, що спричиняють туберкульоз людини і тварин; досліджено також роль протеїназоактивованих рецепторів (ПАР) та нікотинових ацетилхолінових рецепторів лімфоцитів, природу поліреактивних імуноглобулінів (ПРИГ) та багато іншого.

Але про все по порядку. Спочатку зупинимось на дослідженні механізмів імуотропної та протипухлинної дії фосфорорганічних похідних неорганічного пірофосфату.

Вивчення механізму біологічної дії фосфатних аналогів неорганічного пірофосфату. Похідні неорганічного пірофосфату (PP_i) – фосфонати і бісфосфонати – було вибрано для вивчення, виходячи з того, що PP_i бере участь у великій кількості найважливіших ен-

зиматичних реакцій як продукт або субстрат реакції, а також входить до структури багатьох метаболітів. Зв'язки, що не гідролізуються (P-C у фосфонатів або P-C-P у бісфосфонатів), та потужні комплексоутворювальні властивості фосфонатів дозволяли сподіватись на можливість пертурбації метаболічних шляхів у клітинах за їх допомогою. Хоча в літературі були дані, що бісфосфонати не впливають на активність низки ензимів, зокрема на активність пірофосфатази, співробітниками відділу було показано, що бісфосфонати – ефективні інгібітори неорганічної пірофосфатази і деяких інших ензимів, де учасником реакції є неорганічний пірофосфат [4].

Ученими відділу було досліджено біологічну активність, механізм дії та залежність активності від структури бісфосфонатів – на той час нового класу лікарських препаратів, встановлено імуномодуляторну активність метиленбісфосфонової кислоти (МБФК). Отже, введення МБФК тваринам спричинювало в них гальмування як біосинтезу антитіл до Т-залежних антигенів, так і реакцій клітинної імунної відповіді. Гальмувався біосинтез антитіл IgM-, IgE- та, особливо, IgG-класу. Вплив МБФК, що не призводив до змін у субпопуляційному складі лімфоцитів, очевидно, був зв'язаний з її ефектом на функціональну активність Т-клітин. Інші бісфосфонати, що вивчалися (окси- та амінопохідні МБФК), не виявляли імуномодуляторної дії, хоча й були потужними комплексоутворювальними речовинами. МБФК та її структурні аналоги – оксіетиліденбісфосфонова (ОБФК), аміно-МБФК та фосфоноцтова кислоти не були цитотоксичними й не гальмували проліферацію лімфоцитів у культурі у відповідь на стимуляцію мітогенами. МБФК істотно не впливала на синтез лімфоцитами певних інтерлейкінів. Вона не проходила крізь плацентарний бар'єр та не справляла ембріотоксичної дії. Використовуючи ^{14}C -МБФК було виявлено тропізм МБФК до лімфоїдних клітин і визначено кінетичні та термодинамічні параметри транспортування МБФК у клітини. Це дозволило вважати, що МБФК потрапляє в лімфоцити кооперативно, завдяки градієнту концентрації, за механізмом полегшеної дифузії із транспортером. Транспортування гальмується PP_i та ОБФК, але не неорганічним фосфатом (P_i), і не залежить

від інтенсивності синтезу АТР у клітині. Було розраховано та визначено типи структурних комплексів, у складі яких бісфосфонати містяться в клітині, та проаналізовано ті види комплексів з біологічно важливими металами, які можуть взаємодіяти з ензиматичними системами клітини.

Використовуючи сполуки, які відрізняються кількістю фосфорильних груп, типом зв'язку (Р-С, Р-О чи Р-N) або зарядом та розміром молекули, було досліджено механізм впливу бісфосфонатів та фосфонатів на активність низки ключових ензимів перетворення PP_i або тих молекул, до складу яких входить PP_i . Дійшли висновку, що основою імуномодуляторної дії фосфонатів, передусім МБФК, є її тропізм до лімфоцитів. Перенесення до лімфоцитів та накопичення в них МБФК призводить до гальмування неорганічної пірофосфатази та підвищення локальної концентрації PP_i , а згодом – до появи різнолігандних комплексів бісфосфонатів з іонами двовалентних металів і з PP_i та до зміни активності деяких ензимів, зокрема, наприклад, ДНК-залежної РНК-полімерази II, ензимів метаболізму пуринів тощо.

Результати цих наукових досліджень стали основою докторської дисертації Сергія Васильовича Комісаренка «Биологическое действие бисфосфонатов и регуляция иммунного ответа».

Слід зазначити, що С. В. Комісаренко ніколи не уникав (і не уникає й нині) можливості скористатися результатами своїх фундаментальних досліджень з практичною метою. Так, на прохання Інституту м'ясо-молочної промисловості він провів імунохімічне дослідження протеїнів молока, що було використано під час створення сучасних молочних сумішей для годування немовлят. У складі колективу авторів цього винаходу С. Комісаренко у 1979 році був відзначений Державною премією УРСР.

На основі бісфосфонатів у відділі було створено декілька прототипів медичних препаратів: синтезовано *поліуретанову композицію*, яка правила за імобілізований імуномодулятор із місцевим протизапальним та імуносупресивним ефектом; запропоновано новий протипухлинний препарат «*Мєбіфон*», який успішно пройшов клінічні випробування, і зараз його випускає фірма ВАТ «Фармак» у Києві [5–7].



Клінічні дослідження показали, що застосування оригінального вітчизняного бісфосфонату значно покращує якість життя хворих онкологічного профілю з метастазами в кістках пухлин різної локалізації, зменшує інтенсивність болю і підвищує фізичну активність пацієнтів. Встановлено лікувальний ефект препарату за метастазів у кістках хворих на рак молочної та передміхурової залоз. Доведено, що препарат сприяє нормалізації вмісту кальцію в сироватці крові хворих із метастазами в кістках і зменшенню проявів гемотоксичності у разі його включення в схеми хіміотерапії [8]. На спосіб лікування хворих із злоякісними пухлинами молочної залози у 2001 р. одержано патент [9].

Із використанням імуноглобулінів (антитіл) та фосфорорганічних комплексонів (амінобісфосфонатів) було синтезовано *імуновекторні молекули*, які зберігали комплексоутворювальні властивості бісфосфонатів та активність антитіл. Такі конструкції пропонуються для радіоімунолокалізації антигенів, що було перевірено за зв'язування імуновекторних молекул із радіоактивними Са та Тс [10, 11]. У наведених дослідженнях брали участь д-р біол. наук Н. М. Гула, канд. біол. наук Г. Г. Гайворонська, М. Г. Журавський, Н. П. Карлова, І. М. Колеснікова, О. П. Пенезіна, Г. М. Фомовська та інші. Препарати фосфонатів було синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України за участю канд. хім. наук А. М. Борисевича, професорів П. С. Пелькіса і М. О. Лозинського та в Інституті молекулярної біології ім. В. О. Енгельгардта АН СРСР за участю канд. хім. наук Н. Б. Тарусової та чл.-кор. АН СРСР Р. М. Хомутова. Синтез поліуретанової

композиції проводили у співпраці з групою науковців Інституту хімії високомолекулярних сполук НАНУ під керівництвом д-ра біол. наук Г. О. Пхакадзе [12, 13].

У відділі було також створено імуновекторні молекули – *імунотоксини* для вибіркового руйнування клітин-мішеней. З метою їх створення проводили кон'югацію антитіл проти поверхневих антигенів пухлинних клітин (або вторинних антиімуноглобулінових антитіл) із цитотоксичними антибіотиками – *блеоміцетином та стрептонегрином*, які було синтезовано проф. М. Н. Преображенською в Науково-дослідному інституті з дослідження нових антибіотиків АМН СРСР (нині – РАМН). *Ефективність специфічних імунотоксинів у культурі виявилась у 25 разів вищою за «чистий» токсин.*

Дослідження імунохімічної структури протеїнів і пептидів. Водночас у відділі проводили дослідження імунохімічної структури протеїнів і пептидів, які були першими в СРСР і які почалися з аналізу *нейротоксину апаміну* – одного з компонентів бджолиної отрути, який було отримано від А.І. Мірошникова з Інституту біоорганічної хімії АН СРСР (нині – академік РАН, а інститут має назву Інститут біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна та Ю. А. Овчинникова РАН). *Апамін* – це пептид із 18 амінокислот із двома дисульфідними зв'язками, молекулярною масою 2 038 Да, з амідованою С-кінцевою карбоксильною групою гістидину, який безпосередньо діє на центральну нервову систему.

Використовуючи радіоактивний *апамін* та його модифіковані похідні в радіоімуноному аналізі, С. В. Комісаренко та С. В. Василенко встановили, що імунодомінантний епітоп локалізовано навколо 13- та 14-го аргінінів апаміну, і він практично збігається з нейротоксичним сайтом молекули. Тому антиапамінові антитіла можуть бути протекторними у разі отруєння апаміном. *Електронно-імуноцитозиматичним методом було з'ясовано, що апамін зв'язується із сарколемою гладеньких м'язів, а використання радіоактивного апаміну показало, що зв'язування із синапсами головного мозку є специфічним і оборотним.*

Імунохімічний аналіз *цитохрому с* коня було проведено М. В. Скок та Е. М. Кавуном з використанням пептидів та синтетичного *цитохрому с*, одержаних в Московському інституті

тонких хімічних технологій під керівництвом чл.-кор. АН СРСР Р. П. Євстигнєєвої. Було ідентифіковано антигенні детермінанти цитохрому *с*, що розпізнаються антитілами кроля, та ті, що розпізнаються мишачими антитілами різних класів у динаміці імунної відповіді. Також було показано, що IgG-антитіла до цитохрому *с* розпізнають конформаційні антигенні детермінанти на всій молекулі та на її довгих фрагментах 1–65 і 1–80, тоді як Т-клітини розпізнають тільки короткі синтетичні пептиди: 1–13, 14–22, 46–56, 57–77 і 92–104. Пептиди ефективніше за нативний протеїн стимулювали проліферацію клітин, що свідчило про необхідність процесингу цитохрому *с* для його імунного розпізнавання [14].

Вкрай цікавим, на думку С. В. Комісаренка, було дослідити чи відбувається зміна специфічності антитіл проти *цитохрому с* у динаміці імунної відповіді на цей протеїн, тобто чи не починають утворюватися антитіла проти інших антигенних детермінант на цитохромі. Якщо зміна відбувається, то вона могла бути або за рахунок іншого розпізнавання антигену, або комплексів антиген–антитіла проти *цитохрому с* антигенпрезентуючими клітинами. На жаль, за браком пептидів *цитохрому с* в ті роки цю гіпотезу перевірити не вдалося.

З огляду на те, що *цитохром с* виходить із мітохондрій за ішемії, логічним було припустити, що він з'являється в кровотоці, зокрема за інфаркту міокарда, і може стимулювати утворення специфічних антитіл, які, в свою чергу, впливатимуть на його перебіг. *У зв'язку з цим у відділі молекулярної імунології було розроблено метод визначення цитохрому с і специфічних до нього антитіл в крові людей. Метод було успішно апробовано в Інституті кардіології ім. М. Д. Стражеска для діагностики ускладненого перебігу інфаркту міокарда. На цей метод одержано авторське свідоцтво [15].*

Роботи з аналізу *апаміну* та *цитохрому с* були першими в СРСР роботами з імунохімічного дослідження протеїнів і пептидів.

Молекулярні механізми активації лімфоцитів. Ще із середини 1970-х років С. В. Комісаренко вважав, що з'ясування молекулярних механізмів активації лімфоцитів (*сигналіngu в лімфоцитах*) є одним із найважливіших у молекулярній імунології. У зв'язку з цим виникли такі важливі пи-

тання: якої природи сигнали, що передаються з поверхні імункомпетентних клітин від антигенрозпізнавальних рецепторів або коштимуляторних рецепторів у клітину? які механізми і які молекули беруть участь у подальшій передачі сигналу (чи сигналів) усередині клітини до її ядра? як активується експресія відповідних генів під час активації лімфоцитів, і яким чином запускаються альтернативні шляхи проліферації або диференціації лімфоцитів?

Справді, на початку 1980-х років природа і механізм передачі сигналів від плазматичної мембрани імункомпетентної клітини до її ядра були невідомі. Самостійно в Києві вирішити це було неможливо. Але в той час, в 1981 р., канд. біол. наук С. В. Комісаренку трапилась нагода стажування у протираковому центрі імені Слоан-Кеттерінга в Нью-Йорку в лабораторії Дж. Хеддена, який разом з Р. Коффі відомий своїми роботами з вивчення ролі cGMP в активації лімфоцитів. В цій лабораторії Сергій Васильович швидко опанував методи кількісного аналізу cGMP і cAMP та складну методіку визначення активності cGMP-залежної протеїнкінази в лімфоцитах, а також ознайомився із гібридною технологією, яка вперше була запропонована в 1975 році. Крім того, в лабораторії Збігнева Дарзінкевича він розпочав дослідження активації лімфоцитів новим на той час методом – протоковою цитофлуориметрією. Опановані С. В. Комісаренком під час стажування у США методи пізніше було впроваджено у відділі молекулярної імунології в Києві.

Продовження робіт з урахуванням наявних методичних можливостей, в тому числі протокової цитофлуориметрії (з 1984 р. у відділі був єдиний в СРСР активно функціонуючий протоковий цитофлуориметр), відбулося у відділі молекулярної імунології в Києві у 1980-ті роки.

Так, із застосуванням протокової цитофлуориметрії було досліджено параметри клітинного циклу в синхронізованих клітинах (на моделі мишачої плазматоми МОРС-21), а радіоімунним методом виміряно вміст cAMP і cGMP за різних фаз клітинного циклу. Доведено, що додавання екзогенних дибутирильних похідних cAMP і cGMP та модуляторів обміну cAMP (інгібітора фосфодіестерази cAMP й активатора аденілатциклази) в середовище культивування не спричинює перерозподіл лімфоцитів за фазами циклу. Тобто зміна рівня

циклічних нуклеотидів не є основною регуляторною системою клітинного циклу в лімфоцитах. Ці дослідження було проведено в межах кандидатської дисертації Д. І. Лукінова та за участю канд. біол. наук С. М. Тихонової.

Дуже важливі дослідження імунної системи було проведено у військових – ліквідаторів аварії на Чорнобильській АЕС (1986 р.). Використовуючи найсучасніші методи дослідження, вже наприкінці 1986 р., всупереч офіційній в ті роки концепції, Сергій Васильович із колегами вперше довів, що невеликі дози сумарної радіації (25 бер) істотно пригнічують систему природного імунітету, зокрема знижують кількість та активність природних клітинкілерів, які відповідають за протипухлинний та противірусний імунітет. З використанням протокового цитофлуориметру та моноклональних антитіл проти антигенів диференціації лімфоцитів людини було проаналізовано кількісний склад популяції лімфоцитів у ліквідаторів, а потім – за допомогою сортувального пристрою – цитофлуориметра – певні лімфоцити було виділено в очищеному вигляді для подальшої електронної мікроскопії в лабораторії професора К. П. Зака в Інституті ендокринології і обміну речовин МОЗ УРСР. Було знайдено суттєві морфологічні зміни у природних клітинах-кілерах.

Додатково, щоб відкинути можливий вплив стресу, співробітниками відділу на базі Інституту експериментальної терапії в Сухумі було проведено дослідження на мавпах. Опромінення мавп дозами, розрахованими відповідно до аналогічних доз для людей (25 бер, або 250 мілізівертів), підтвердили результати щодо існування радіаційного імунодефіциту, який С. В. Комісаренко дуже влучно назвав тоді «чорнобильським СНІДом».

Життя підтвердило правомірність та своєчасність проведеної роботи, яка стала першим і об'єктивним дослідженням імунної системи людей, опромінених під час аварії на ЧАЕС. Результати цих досліджень було враховано під час роботи ліквідаторів та відселення мешканців із забруднених територій у безпечні райони країни.

З огляду на існування тяжких імунодефіцитних станів в умовах недостатності ензимів обміну пуринів (в першу чергу – аденозиндезамінази) та пуриннуклеотидів у

лімфоцитах і на те, що ці ензими відіграють важливу роль у клітинному метаболізмі взагалі, Сергій Васильович створив у відділі спеціальну групу і запросив до її керівництва досвідченого біохіміка з відділу біохімії м'язів – канд. біол. наук **Миколу Петровича Дмитренка**. Цією групою (М. П. Дмитренко, О. М. Буханевич, Т. В. Горошнікова), а також аспірантом В. Ю. Уманським було досліджено різні властивості *аденілатциклази*, *аденозіндезамінази*, *5'-нуклеотидази*, *АМР-аміногідролази*, *аденілаткінази* в лімфоцитах тимуса і селезінки без стимуляції та за впливу поліклональних активаторів. Внаслідок цієї роботи у 1988 р. М. П. Дмитренко захистив дисертацію «Обмен аденозина и адениннуклеотидов и его регуляция в лимфоцитах» на здобуття наукового ступеня д-ра біол. наук.

Впровадження гібридної техніки одержання моноклональних антитіл. Використання сучасних методів молекулярної і клітинної імунології, протокової цитофлуориметрії дало можливість не тільки проводити кількісний аналіз антигенів, локалізувати антигени й антитіла на поверхні клітин та у внутрішньоклітинних структурах, але й виділяти окремі клітини для подальшого їх аналізу та клонування. Водночас стало зрозумілим, що проведення високоспецифічного і точного імунохімічного аналізу є практично неможливим без культури клітин і використання моноклональних антитіл (мкАТ).

С. В. Комісаренко, один із перших в СРСР, увів у дослідження гібридну технологію для одержання *моноклональних антитіл*.

Для цього у відділі під керівництвом старшого наукового співробітника, канд. біол. наук **Ірини Миколаївни Колеснікової** було створено «гібридну» групу, яка одержала велику кількість клонів гібридом – продуцентів мкАТ. Зокрема, було виділено та проаналізовано декілька *антитіл* з унікальними властивостями: *проти окремих ланцюгів інсуліну людини*, *пероксидази з хрому*, *цитохрому с коня*, *нейроспецифічних протеїнів*, *проти унікальної антигенної детермінанти очищеного протеїнового деривату туберкуліну мікобактерій великої рогатої худоби*, *проти різних епітопів молекул плазмінотену*, *фібриногену і/або фібрину та їхніх фрагментів* тощо.

Наведені вище дослідження заклали основу для імунобіотехнологічних методів зі створення імунодіагностичних та імунобіологічних препаратів.

Вже в середині 80-х років ХХ ст. у відділі сформувалося декілька груп, які працювали над різними об'єктами.

Імунохімічний аналіз протеїнів системи з'єднання крові. Після повернення із відрядження до Франції у 1975 р. С. В. Комісаренко запропонував акад. В. О. Беліцеру, який тоді очолював відділ структури і функції білка, разом провести імунохімічне дослідження системи фібриноген – фібрин. Ідея Сергія Васильовича полягала у застосуванні спочатку моноспецифічних, а потім і мкАТ як молекулярних зондів для дослідження структури *фібрин(огену)*, пошуку неоантигенних детермінант, що експонуються в процесі перетворення *фібриногену* на *фібрин*, виявлення *невідомих центрів полімеризації фібрину* та вивчення молекулярних механізмів цього процесу. Володимир Олександрович дуже зацікавився цією роботою, але з організаційних причин вона не розпочиналась аж до того часу, коли у 1985 р. до відділу молекулярної імунології з відділу структури і функції білка не перейшов канд. біол. наук, ст. наук. співр. **Едуард Віталійович Луговської** (нині – чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.) разом зі своєю групою (інж. Г. К. Гоголінська та С. Г. Дерзська), і до виконання цієї теми не долучилася «гібридна» група на чолі з І. М. Колесніковою (К. Д. Ляшко, Л. М. Литвинова, О. П. Костюченко, Р. В. Ставнійчук).

Об'єднаною групою дослідників було одержано низку мкАТ до «самостійно» виділених фібриногену, фібрину на різних стадіях полімеризації та їхніх фрагментів. Ці антитіла дозволили виявити нові, раніше невідомі, сайти на молекулі фібрину, що беруть участь у його полімеризації, та запропонувати певні механізми полімеризації фібрину [16–18]. Результати цих досліджень захищено патентами [19–22]. Синтез і використання мкАТ для теоретичних досліджень молекулярних механізмів тромботворення, одночасно дозволило знайти і використати ті мкАТ, що з високою специфічністю та афінністю реагували із фібриногеном, розчинним фібрином або димером D фрагмента фібриногену (D-димером), завдяки чому ці



Тест-система імуноензимна «DIA^R-Гемостаз» для одночасного кількісного визначення фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові людини

антитіла було використано з метою розробки імуноензимних тест-систем для визначення зазначених молекулярних маркерів у плазмі крові людини (захищено патентами [23–25].

Роботу в цьому напрямі надалі було продовжено спільно з відділом структури і функції білка, який у 2008 р. очолив Е. В. Луговської і куди з відділу молекулярної імунології було переведено «гібридомну» групу І. М. Колеснікової. Детальніше про цей аспект роботи і його практичну значущість йшлося в статті [26].

Слід зазначити, що за дослідження системи гемостазу людини та створення вітчизняних діагностиків, зокрема за допомогою власно одержаних мкАТ під керівництвом С. В. Комісаренка і Е. В. Луговського, в 2015 р. **групу науковців інституту було відзначено Державною премією України в галузі науки і техніки.**

Дослідження молекулярних механізмів активації лімфоцитів було продовжено у відділі молекулярної імунології групою



Співробітники лабораторії імунології клітинних рецепторів. Київ, 2016 р. Зліва направо: наук. співр. О. Ю. Лихмус, ст. наук. співр. Л. М. Коваль, асп. К. Р. Успенська, зав. лаб. член-кор. НАН України, проф. М. В. Скок

науковців під керівництвом канд. біол. наук **Марини Володимирівни Скок** (нині – член-кор. НАН України, проф.). Слід зазначити, що на базі цієї групи у 2012 р. було створено *лабораторію імунології клітинних рецепторів*, до складу якої в різні часи входили: канд. біол. наук Л. М. Коваль, О. М. Калашник, О. Ю. Лихмус, Г. Л. Гергалова, Ю. І. Петрова, асп. К. Р. Успенська.

Головний об'єкт досліджень групи (далі – лабораторії) – *нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR)*, експресовані в центральній нервовій системі, в імунних клітинах та на внутрішньоклітинних органелах – мітохондріях, а також *антитіла проти nAChR*, як чинники впливу на nAChR за фізіологічних умов і як інструмент для дослідження.

Вперше в В-лімфоцитах виявлено наявність nAChR. Встановлено, що В-лімфоцити експресують $\alpha 7$ -, $\alpha 4$ - та $\alpha 9$ -вмісні субтипи nAChR, які фізично зв'язані з імунними рецепторами В-лімфоцитів. *Відповідно сигнальні механізми nAChR впливають на виживаність попередників В-лімфоцитів у процесі диференціювання і на їх активацію в процесі розвитку імунної відповіді.* При цьому $\alpha 4$ -вмісні nAChR підтримують активаційні процеси, опосередковані антигенспецифічним рецептором, а $\alpha 7$ -вмісні nAChR, навпаки, пригнічують активацію, опосередковану костимуляторною молекулою CD40. $\alpha 9$ -Вмісні nAChR виконують «резервну» функцію, частково заміщуючи $\alpha 7$ nAChR за відсутності останнього. $\alpha 7$ -Вмісні nAChR входять до складу імунного синапсу, що утворюється між Т- і В-лімфоцитами в процесі активації. Блокування $\alpha 7$ nAChR антагоністом метиллікаконітином (МЛА) або десенситизація за постійної присутності агоніста призводить до посилення активації В-лімфоцитів та імунної відповіді. **Цю роботу було відзначено премією ім. І. І. Мечникова НАН України в 2012 році.**

Найвища кількість $\alpha 7$ і $\alpha 9$ nAChR спостерігається в В1-лімфоцитах перитонеальної порожнини та В2-лімфоцитах крайової зони селезінки миші, що свідчить про еволюційно древнє походження холінергічної регуляції гуморальної ланки імунітету. Крім того, було показано, що $\alpha 7$ nAChR відіграють важливу роль у діяльності регуляторних В-лімфоцитів (Breg), які складають супресорну гілку гуморальної імунної відповіді, продукуючи протизапальний інтерлейкін-10 (ІЛ-10).

Виявлено, що механізм функціонування $\alpha 7$ nAChR у В-лімфоцитах, на відміну від такого в збудливих клітинах, не потребує відкриття іонного каналу самого nAChR, а опосередкований конформаційними змінами в молекулі рецептора, які відбуваються за зв'язування специфічних лігандів. Зв'язування як агоністів, так і антагоністів $\alpha 7$ nAChR запускає низку внутрішньоклітинних подій, які опосередковано впливають на відкриття депокерованих Ca^{2+} -каналів CRAC, що призводить до підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Антитіла проти $\alpha 7$ nAChR стимулюють проліферацію В-лімфоцитів миші незалежно від зв'язування CD40, що також свідчить про наявність сигнальних механізмів nAChR, не опосередкованих його іонним каналом. *Таким чином, у В-лімфоцитах $\alpha 7$ nAChR функціонують як метаболічні рецептори, впливаючи на активацію інших рецепторів і каналів [27].*

Дані, одержані в лабораторії, також відкрили новий холінергічний механізм регуляції мітохондріального шляху індукції апоптозу. Функцією nAChR мітохондрій є контроль за утворенням мітохондріальної пори перехідної провідності, яка є джерелом проапоптичних факторів і активних форм кисню, що вивільнюються в цитозоль. Показано, що активація nAChR мітохондрій запобігає відкриттю пори і вивільненню *цитохрому с*.

Подібно до nAChR В-лімфоцитів, механізм впливу nAChR на відкриття мітохондріальної пори не потребує участі його іонного каналу і може бути індукований зв'язуванням специфічних агоністів, антагоністів, алостеричних модуляторів і антитіл.

Останнім часом дослідження співробітників лабораторії спрямовано на визначення походження мітохондріальних nAChR та сигналів для їх доставки в мембрану мітохондрій. Попередні результати дозволяють припустити, що $\alpha 7$ nAChR мітохондрій є продуктом того самого гена, що і nAChR, експресований на плазматичній мембрані. Мітохондріальний $\alpha 7$ nAChR, подібно до відповідного рецептора плазматичної мембрани, містить залишки сілової кислоти, тобто проходить традиційний шлях посттрансляційного глікозилювання в комплексі Гольджі, однак відрізняється від мембранного nAChR за вмістом сілових кислот, фукози і галактози. *Таким чином, сигналом, що спрямовує рецептор на мем-*

брану або в мітохондрії, можуть бути глікани, приєднані до поліпептидного ланцюга [28].

В лабораторії досліджується також роль антитіл проти $\alpha 7$ -субтипу *nAHR* у розвитку нейрозапалення та нейродегенеративних патологій, подібних до хвороби Альцгеймера.

Відомо, що $\alpha 7$ *nAHR* опосередковують протизапальний ефект ацетилхоліну в клітинах моноцитарно-макрофагального походження. В лабораторії імунології клітинних рецепторів виявлено, що хронічне запалення, спричинене регулярними ін'єкціями бактерійного ліпополісахариду (ЛПС) впродовж 5 місяців, призводило до зниження щільності $\alpha 7$ *nAHR* в мозку, накопичення патологічної форми β -амілоїду(1-42) та погіршення епізодичної пам'яті мишей – симптомів, характерних для ранньої форми хвороби Альцгеймера. Подібні симптоми спостерігались внаслідок імунізації мишей позаклітинним доменом $\alpha 7(1-208)$ *nAHR*, що призводило до присутності в крові антитіл проти $\alpha 7$ *nAHR*. Мітохондрії мозку обох груп мишей також містили знижену порівняно з контрольними мишами кількість $\alpha 7$ *nAHR*, накопичували β -амілоїд (1-42) і були чутливішими до апоптогенної дії Ca^{2+} і менш чутливими до нормалізуючої дії агоніста $\alpha 7$ *nAHR*. В обох випадках у мозку мишей спостерігали астроцитоз і підвищений рівень прозапального ІЛ-6. Дійшли висновку про те, що антитіла проти позаклітинних епітопів $\alpha 7$ *nAHR* спричинюють в мозку запалення, яке є достатнім для розвитку нейродегенеративних симптомів хвороби Альцгеймера. У людей із хворобою Альцгеймера (рання форма) було виявлено підвищений рівень автоантитіл проти $\alpha 7$ *nAHR* [29].

У подальшому було показано, що навіть короткостроковий вплив ЛПС протягом трьох днів призводив до зниження експресії $\alpha 7$ *nAHR* на рівні РНК і протеїну в усіх досліджених відділах мозку (фронтальній корі, гіпокампі, стріатумі та мозочку). При цьому в мозку знижувалась експресія та активність ацетилхолінестерази (АХЕ) і підвищувався вміст мікроРНК 132 і 212. Таким чином, протизапальний ефект ацетилхоліну (якому сприяло зниження активності АХЕ) нівелювався зниженням експресії $\alpha 7$ *nAHR*. Антитіла проти позаклітинної частини $\alpha 7$ *nAHR*, введені внутрішньовенно на фоні попередньої ін'єкції ЛПС, проникали до паренхіми мозку, вже почи-

наючи з 15 хв після введення, і накопичувались в усіх його відділах, зв'язуючись з $\alpha 7$ -вмісними клітинами та нервовими волокнами. Введення антитіл не призводило до подальших змін $\alpha 7$ *nAHR* та АХЕ на фоні ЛПС, але запобігало підвищенню вмісту мікроРНК 132 і, особливо 212, які також є частиною протизапальних механізмів. Отже, $\alpha 7$ *nAHR*-специфічні антитіла сприяли розвитку запалення на епігенетичному рівні.

*Одержані в лабораторії результати свідчать про ключову роль запалення та про важливу патогенетичну роль антитіл проти $\alpha 7$ *nAHR* в розвитку хвороби Альцгеймера.*

Від початку 1999 р. у відділі молекулярної імунології активно працює група молодих учених під керівництвом канд. біол. наук **Дениса Володимировича Колиби** (тепер – д-р біол. наук), на основі якої у 2012 р. створено лабораторію імунології, до складу якої входили або входять тепер зав. лаб., д-р біол. наук Д. В. Колибо, канд. біол. наук: С. І. Романюк, А. А. Кабернюк, А. Ю. Лабинцев, Н. В. Короткевич, О. С. Олійник, Т.А. Редчук, К. О. Паливода, аспіранти: К. Ю. Манойлов, О. І. Криніна, Т. О. Чудіна, А. А. Сіромолот.

Наукові дослідження цього колективу від початку було спрямовано, по-перше, на клонування в клітинах *Escherichia coli* генів діагностично значущих протеїнів збудників інфекційних хвороб (насамперед, туберкульозу і дифтерії), а, по-друге, – на одержання рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (*ScFv-антитіл*) методом фагового дисплея та на вивчення їхніх властивостей і можливостей використання як компонентів діагностикумів.

У подальшому дослідження лабораторії було спрямовано на з'ясування молекулярних механізмів функціонування *дифтерійного токсину* та його рецептора *HB-EGF*, а також на розробку нових імунобіотехнологічних продуктів.

Дифтерійний токсин (ДТ) є основним фактором патогенності збудника дифтерії *Corynebacterium diphtheriae*. Він є унікальним бактеріальним протеїном, який вибірково знищує певні клітинні популяції завдяки чіткій функціональній спеціалізації доменів, що дозволяє використовувати цей токсин в протеїновій інженерії для конструювання рекомбінантних похідних з певними заданими властивостями. Завдяки невеликим розмірам ця молекула становить значний інтерес для ство-



Співробітники лабораторії імунобіології. Київ, 2015 р. Зліва направо: мол. наук. співр. А. Ю. Лабинцев, зав. лаб., д-р біол. наук Д. В. Колибо, пров. інж. К. Ю. Манойлов, мол. наук. співр. Н. В. Короткевич

рення штучних протеїнових молекул із транспортною функцією, наприклад, імунотоксинів.

У лабораторії імунобіології розроблено низку нетоксичних рекомбінантних флуоресцентних похідних ДТ, які можуть бути застосовані: для дослідження рецепторопосередкованого зв'язування і транспортування токсину в клітинах; для визначення рівня експресії на клітинах рецептора ДТ – ргоНВ-EGF; для імунізації та одержання антитіл проти різних частин токсину, а також для розробки діагностичних тест-систем з метою виявлення дифтерійного токсину та антитоксичних антитіл.

ДТ складається із двох субодиниць – А і В. Субодиниця В забезпечує взаємодію з рецептором на поверхні клітини і транслокацію субодиниці А токсину з ендосоми в цитозоль чутливих клітин. *Функціональні аналоги субодиниці В із флуоресцентною міткою є перспективними інструментами для вивчення згаданих вище процесів.* У лабораторії було одержано флуоресцентні аналоги субодиниці В та підтверджено специфіку їх взаємодії з чутливими до дії ДТ клітинами мавпи лінії Vero.

Було запропоновано використовувати флуоресцентні похідні субодиниці В як інструмент для ідентифікації рецептора ргоНВ-EGF на поверхні клітин, а також для вивчення взаємодії і проникнення ДТ в клітину [30].

Субодиниця В не виявляє каталітичної активності. Саме тому вона є нетоксичною

по відношенню до нормальних клітин. Проте, оскільки субодиниця В може блокувати мітогенну активність розчинної форми фактора росту – sНВ-EGF, вона може розглядатися як *потенційний протипухлинний препарат.*

Одним із важливих завдань співробітників лабораторії є розробка нових методів *in vitro* для оцінки кількості токсиннейтралізуючих поліклональних і мкАТ, що дозволило б уникнути використання активного ДТ і токсинчутливих лабораторних тварин. Так, було запропоновано новий метод для виявлення протективних антитіл у сироватці крові, який є різновидом тесту ToBI (*Toxin Binding Inhibition Test* – гальмування зв'язування токсину), який заснований на здатності антитоксичних антитіл інгібувати зв'язування флуоресцентної В-субодиниці токсину із клітинами лінії Vero. *Новий, запропонований в лабораторії, підхід для оцінки антитоксичних антитіл є більш етичним та безпечнішим, і може успішно замінити традиційні методи тестування на тваринах.*

Активна імунізація людей анатоксином широко використовується для профілактики дифтерії, а пасивна імунізація гіперімунною антитоксичною кінською сироваткою – для лікування дифтерії. Проте *дифтерійний анатоксин і кінська антитоксична сироватка* мають низку серйозних недоліків. Тому пошук нових антигенів й антитіл, які можуть ефективно захистити від ДТ, є актуальним за-

вданням імунобіології в боротьбі з дифтерією. Порівнюючи токсиннейтралізуючі властивості антитіл, що з'являються після імунізації лабораторних тварин рекомбінантними субодинамиціями А і В ДТ, співробітники лабораторії продемонстрували здатність субодинамиці В виробляти токсиннейтралізуючі антитіла в лабораторних тварин (кролів і мурчаків), що було підтверджено з використанням внутрішньошкірного і ToBI-тестів, розроблених для цієї мети.

Одержані результати свідчать, що рекомбінантна В-субодинамиця ДТ здатна замінити використання анатоксину для профілактики дифтерії і може бути успішно використана для індукції захисної імунної відповіді проти дифтерії [31].

Дослідження різних штампів *E. coli* – продуцентів рекомбінантних субодинамиць ДТ *Corynebacterium diphtheriae* завершилися одержанням патентів [32–35], які використано під час розробки **імуноензимної тест-системи для контролю протидифтерійного імунітету в популяції**.

Ця система може бути застосована для оцінки рівня антитоксичного імунітету у хворих під час перебігу інфекції, а також для вдосконалення диференційної діагностики дифтерії та моніторингу стану захищеності населення від дифтерії. Розроблена тест-система дає можливість визначити вміст антитіл до кожної із субодинамиць ДТ окремо, що має більш діагностичне значення, аніж дані про вміст антитіл до усєї молекули токсину. Рівень антитіл до В-субодинамиці токсину характеризує протективний імунітет, а наявність антитіл до субодинамиці А свідчить про можливий контакт зі збудником (носійство або хвороба). Одержані штами *E. coli* K 12 "inv" sbA і sbB – продуценти неактивних субодинамиць А і В ДТ – дають можливість одержати діагностично важливі антигенні субстанції з мінімальними втратами часу, ресурсів і високим виходом цільового продукту.

Адаптування імуноензимних тест-систем для виявлення ДТ і антитоксичних антитіл із протективними властивостями до умов масштабного виробництва проводили разом зі співробітниками акціонерного товариства «Науково-виробнича компанія «Діапроф – Мед» (Київ) шляхом реалізації покращення основних якісних характеристик тест-систем, а саме:

чутливості (здатності виявляти перевищення концентрації досліджуваного маркера в зразках плазми крові) і специфічності (здатності уникати хибнопозитивних результатів під час дослідження зразків плазми крові).

В лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології для розробки імунобіотехнологічних реагентів нового покоління останні 12 років широко використовуються технології фагового дисплея. Так, наївну мишачу бібліотеку одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (ScFv) було використано для виділення ScFv антитіл, що розпізнають ДТ. Співробітниками лабораторії (канд. біол. наук О. С. Олійник) було створено імунну бібліотеку мишачих генів імуноглобулінів та після одного циклу відбору методом фагового дисплея з неї виділено декілька клонів ScFv антитіл, що розпізнають ДТ. Крім того, було створено наївну бібліотеку генів імуноглобуліну людини, яка дозволила одержати людські ScFv антитіла до ДТ. Також одержано ScFv антитіла до HB-EGF, які у подальшому було застосовано для створення імуноліпосом спрямованої доставки лікарських речовин в пухлини, що надекспресують онкомаркер proHB-EGF.

Гепаринзв'язувальний фактор росту – HB-EGF – належить до родини епідермальних ростових факторів, який синтезується як мембрано-заякорений посередник proHB-EGF, а завдяки дії позаклітинних протеїназ може переходити в розчинну форму фактора – sHB-EGF. Важливою особливістю HB-EGF є його здатність виступати в ролі високоспецифічного рецептора до ДТ, який забезпечує проникнення токсину всередину клітини та реалізацію його цитотоксичної дії. Тому рекомбінантні аналоги цього фактора росту можуть бути перспективним біотехнологічним продуктом під час створення новітніх **імуноензимних тест-систем** для виявлення вмісту протективних протидифтерійних антитіл та/або наявності молекул активного ДТ в біологічних рідинах.

Тому останнім часом співробітниками лабораторії (Д. В. Колибо, С. І. Романюк, Н. В. Короткевич, А. Ю. Лабинцев) було розроблено прототипи імуноензимних тест-систем для визначення вмісту протективних протидифтерійних антитіл і молекул токсину в біологічних рідинах на основі рекомбінантного аналога sHB-EGF людини [36–38].



Імуноензимна тест-система для контролю протидифтерійного імунітету в популяції

З метою оцінки імуногенних властивостей частинок полі(лактид-ко-гліколіду) (PLGA), покритих целобіозою як носіїв антигену для пероральної імунізації, синтезовано два типи частинок, які містили нетоксичну рекомбінантну субодиницю В ДТ. Збільшення концентрації антиоксичних антитіл у крові було виявлено вже після першої імунізації. Результати досліджень показали, що PLGA можна розглядати як потужні компоненти пероральних вакцин [39].

Кожному зрозуміла загроза захворювання на туберкульоз людей і тварин. З огляду на те, що збудник туберкульозу людини *Mycobacterium tuberculosis* може заражати велику рогату худобу, а збудник туберкульозу великої рогатої худоби – *M. bovis* може передаватися від тварин людям і спричинювати в них туберкульоз (особливо за імунодефіцитного стану), у 1988 році керівництво ветеринарної служби УРСР звернулося до С. В. Комісаренка з проханням розробити сучасний, чутливий і специфічний метод виявлення носійства мікобактерій у великої рогатої худоби. З цією метою С. В. Комісаренко запросив до відділу кандидатів біол. наук С. П. Бобровника та К. П. Лященка. Цій групі вдалося очистити певні антигени мікобактерій і порівняти їх у *M. bovis* та *M. tuberculosis*, а також у співпраці з гібридною групою відділу одержати низку відповідних моноклональних антитіл. На жаль, на початку 1990-х ця робота зупинилась – С. В. Комісаренко поїхав до Лондона Послом України у Великобританії, С. П. Бобровник поїхав до Португалії, а К. П. Лященко – до США продовжувати наукову роботу за іншою тематикою [40].

Робота над вивченням збудника туберкульозу продовжилася вже наприкінці 1990-х. Особливо важливими ці дослідження стали у світлі загрозливої епідеміологічної ситуації в Україні на туберкульоз людини і тварин. Тому вивчення імунобіологічних властивостей діагностично важливих антигенів *M. tuberculosis* та *M. bovis* з метою використання їх для діагностики туберкульозу було вкрай актуальним. Вивчення продовжилось вже під керівництвом Д. В. Колиби. Так, в лабораторії імунобіології було вперше одержано рекомбінантні аналоги антигенів цієї бактерії МРТ63, МРТ83, химерного протеїну МРТ63-МРТ83 і розроблено підходи до діагностики туберкульозу з їх використанням.

Виявилось, що протеїни МРТ63 і МРТ83, які є спільними для *M. tuberculosis* та *M. bovis*, є перспективними в розвитку імунодіагностикумів і вакцин через їхню високу імуногенність. Вміст антитіл до туберкуліну РРД і до антигенів МРТ63 і МРТ83 було визначено в експериментальному стаді корів (94 дорослі тварини). Одержані результати підтверджують, що непрямий імуноензимний аналіз із рекомбінантними протеїнами МРТ63 і МРТ83 може бути використаний під час розробки тест-систем для виявлення інфікування туберкульозом корів одночасно із вже звичним туберкуліном РРД. Для підвищення антигенних та імуногенних властивостей цих протеїнів, фрагменти генів МРТ63 і МРТ83 були злиті, при цьому антигенні властивості одержаного рекомбінантного протеїну були співставні з вихідними аналогами. Анти-МРТ83 і анти-МРТ63 сироватки розпізнавали злитий протеїн МРТ63-МРТ83, а, отже, він зберігає антигенні властивості батьківських протеїнів [41, 42]. За цими матеріалами Т. А. Редчук у 2011 р. захистив кандидатську дисертацію.

На основі одержаних даних в лабораторії розроблено **діагностичну тест-систему проти туберкульозу великої рогатої худоби**, яку вже зареєстровано в Україні. Запропонована тест-система для виявлення антитіл до збудження туберкульозу, спричиненого *M. bovis* у великої рогатої худоби необхідна для своєчасного виявлення інфікованих тварин на рівні стада тварин, тварин із латентним перебігом туберкульозу, а також тварин, алергічних до туберкуліну, який є прихованим джерелом збудника хвороби, що важливо під час проведення оздоровчих заходів та для контролю епізоотичної ситуації. Розробка захищена патентом України [43].



Тест-система для виявлення антитіл до *Mycobacterium bovis*

Тест-систему для виявлення антитіл до *M. bovis* «IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» зареєстровано в Державній ветеринарній і фітосанітарній службі України (ТУ У 21.2-05417288-001: 2014). Потенційний виробник – ТОВ «Науково-дослідне підприємство «Ветеринарна медицина», Україна, м. Харків.

Врешті-решт, слід наголосити на тому, що одержані співробітниками лабораторії імунобіології результати є **важливим етапом впровадження сучасних методів молекулярної біології в розроблення діагностичних тест-систем нового покоління на основі рекомбінантних протеїнів.**

Співробітники групи під керівництвом д-ра біол. наук **Сергія Панасовича Бобровника** вивчають так звані *поліреактивні імуноглобуліни* (ПРИГ), які здатні неспецифічно зв'язуватись із різноманітними антигенами, зокрема з *автоантигенами*. Дослідження імунохімічних і біологічних властивостей ПРИГ показало, що вони принципово відрізняються від відомих раніше природних антитіл. *Встановлено механізм взаємодії ПРИГ з антигенами, показано, що їхня реактивність може підвищуватись in vivo, що вони можуть опсонізувати бактерії, але сприяють розвитку злоякісних пухлин і, можливо, сприяють розвитку атеросклерозу з причини їхньої здатності зв'язуватись з ендотелієм кровоносних судин.* Показано також, що реактивність сироваткових ПРИГ зростає в кілька разів за збільшення віку людей (від 20 до 70 років), що може бути наслідком вікових змін імунної системи організму.

Від січня 2000 р. – до листопада 2010 р. у відділі молекулярної імунології на посаді старшого

наукового співробітника працювала **Наталія Юріївна Євдокимова** (д-р біол. наук з 2009 р.). Її наукові інтереси було зосереджено на з'ясуванні зв'язку фенотипових змін клітин із метаболізмом позаклітинного матриксу (ПКМ). Особливе місце займало вивчення цих питань у контексті розвитку ускладнень *цукрового діабету*. Результати проведених досліджень показали, що підвищений рівень глюкози стимулює збагачення матриксу мезангіальних і ендотеліальних клітин високомолекулярною *гіалуроновою кислотою* (ГК), але механізм цього явища різний для різних типів клітин. У мезангіальних клітинах відбувається активація трансформувального фактора росту $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) тромбоспондином-1, що збільшує експресію ГК-синтази 2 і відповідно стимулює синтез гіалуронової кислоти. В ендотеліальних клітинах TGF $\beta 1$ стимулює зв'язування ГК її рецепторами CD44. Дослідження Н. Ю. Євдокимової також було спрямовано на *висвітлення механізмів розвитку ускладнень цукрового діабету*. Так, було показано, що передумовою утворення діабетичних виразок можуть бути природжені зміни системи ГК-CD44 фібробластів, а збільшення рівня глюкози провокує утворення виразок унаслідок акумуляції високомолекулярної гіалуронової кислоти. Ускладнення цукрового діабету можуть також розвиватися через дисбаланс системи коагуляція/фібриноліз і підвищення рівня D-димеру фібрину (DD). Встановлено, що DD знижує вміст антикоагуляційного гепаран сульфату в матриксі ендотеліальних клітин і водночас стимулює активацію TGF $\beta 1$, що призводить до додаткових патологічних змін матриксу. *Було встановлено, що розроблений у відділі протипухлинний препарат «Мєбіфон», про який йшла мова вище, зменшує молекулярну масу гіалуронової кислоти у матриксі фібробластів і ендотеліальних клітин, яка за цукрового діабету збільшена, і тому «Мєбіфон» може бути корисним у лікуванні діабетичних виразок.*

У відділі працює ст. наук. співр., канд. біол. наук **В. А. Галицький**, який проводить самостійну наукову роботу з біоінформатики та епігенетики, пов'язану з проблемами імунології та онкології. *Його теоретичні дослідження мають важливе значення для розуміння молекулярних механізмів канцерогенезу.*

Під керівництвом **Сергія Васильовича Комісаренка** у відділі працює також група з

проблем біобезпеки, біозахисту та біоетики, до складу якої входять кандидати наук Г. Л. Гергалова і Я. С. Максимович.

Куратор групи академік НАН України С. В. Комісаренко очолює Комісію з біобезпеки і біозахисту при РНБО України. Він також щорічно, починаючи з 2005 р., очолює (чи є заступником глави) делегації України на зустрічах в Женеві країн-учасниць Конвенції із заборони біологічної і токсинної зброї (КБТЗ) та делегацію України на зустрічах країн-учасниць Австралійської групи (експортний контроль). Метою роботи з біобезпеки є, в першу чергу, розповсюдження міжнародних і національних інформаційних матеріалів із проблем біобезпеки; проведення міжнародних конференцій, семінарів із біобезпеки і КБТЗ для країн Східної і Південної Європи, а також регіональних семінарів для підвищення обізнаності та освіти з біобезпеки і біозахисту в Україні.

Підсумовуючи наведений матеріал, слід зазначити, що співробітники відділу молекулярної

імунології на чолі з акад. С. В. Комісаренком із самого початку працювали і продовжують плідно працювати над виконанням актуальних і надважливих фундаментальних досліджень, які одночасно спрямовано на розповсюдження добутих знань і на вирішення практичних завдань медицини, харчової, легкої промисловості, а також сільського господарства, тобто *Pro bono hominis* («лат. на благо Людини») – девіз, який сповідує Сергій Васильович впродовж 50 років своєї творчої діяльності. На сьогодні він разом із співробітниками має досить вагомий доробок у вигляді авторських свідоцтв і патентів України та СРСР (понад 80 найменувань). *На жаль, далеко не всі вони впроваджені через низку причин, серед яких головною, на нашу думку, є несприятливий інвестиційний клімат в державі та неготовність бізнесу до розвитку наукоємного сектору економіки.*

У відділі виконано 6 докторських та 28 кандидатських дисертаційних робіт. Відділ має широкі міжнародні наукові зв'язки, зокрема з



Колектив співробітників відділу молекулярної імунології. Київ, 2015 р. Зліва направо: I ряд – ст. наук. співр. Г. Л. Гергалова, мол. наук. співр. Т. В. Горошнікова, наук. співр. О. Ю. Лихмус, інж. I кат. М. О. Декалюк, інж. I кат. О. І. Криніна, ст. наук. співр. О. С. Олійник, інж. I кат. Т. О. Чудіна, зав. лаб. Д. В. Колибо; II ряд – ст. наук. співр. Л. М. Коваль, ст. наук. співр. Я. С. Максимович, ст. наук. співр. М. І. Канюк, зав. відділу С. В. Комісаренко, зав. лаб. О. П. Демченко, інж. I кат. А. А. Сіромолот, пров. інж. К. Ю. Манойлов, інж. I кат. І. Д. Панас; III ряд – зав. лаб. М. В. Скок, мол. наук. співр. К. О. Пиршев

Інститутом Пастера в Парижі та Еллінським Інститутом Пастера в Афінах, з Університетом штату Нью-Йорк Стоун-Брук, з Національним аграрним інститутом INRA в Нанті (Франція), з Пекінським інститутом геноміки Академії наук КНР, з Інститутом біології Академії наук провінції Шандунь КНР та багатьма іншими. За кордоном працюють близько 20 колишніх співробітників відділу.

Робота у відділі молекулярної імунології, де завжди панувала і панує дружня робоча атмосфера, тепер, як і раніше, залишається привабливою для талановитої наукової молоді. Тож найважливіші винаходи і впровадження у Вас, дорогий Сергію Васильовичу, і Ваших учнів ще попереду. Від щирого серця бажаємо вам усім успіхів!

References

1. Komisarenko SV. One hundred years of immunology – science of the future. *Ukr Biokhim Zhurn.* 1982; 54(5): 483-496.
2. Butenko ZA, Zak KP, Komissarenko SV, Gruzov MA, Khomenko BM. Immunoelectron microscopy of the bone marrow mononuclears labelling with rabbit anti-mouse brain serum using peroxidase-anti-peroxidase method. *Blut.* 1983; 47(6): 343-349.
3. Komisarenko SV, Horseradish peroxidase: properties and application in neuro-enzyme assay. / Axonal transport of substances in brain systems. K.: Nauk. Dumka, 1981, 153-161.
4. Gula NM, Komisarenko SV. Inorganic pyrophosphate, its structural analogs and inorganic pyrophosphatase. *Uspechi Biol. Khimii.* 1982; 22: 195-213.
5. A.C. 1512099 SU 4 C01F 9/38, A61K 31/66. Dihydrate disodium salt of methylene bisphosphonic acid exhibits antitumor activity. Komisarenko SV, Karlova NP, Sharykina NI, Kudryavtseva IG, Iezerska LI, Lozynskiy MO, Borisevich AN, appl. 02.02.87.
6. Pat. 12053 UA 4IPC C07F 9/38, A61K 31/66. Dihydrate disodium salt of methylene bisphosphonic acid exhibits antitumor activity. Komisarenko SV, Karlova NP, Sharykina NI, Kudryavtseva IG, Iezerska LI, Lozynskiy MO, Borisevich AN, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine; Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine, No 4239930 SU; appl. 23.03.87; publ. 25.12.96. Bul. No 4.
7. Pat. 40714 A UA 7 C01B15/16, A61K 31/327. Antitumor therapeutic drug (MEBIFON). Komisarenko SV, Sharykina NI, Lozynskiy MO, Karlova NP, Kudryavtseva IG, Kuzmenko IY, Borisevich AN, Iezerska LI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, No 2001074659; appl. 04.07.01; publ. 15.08.01, Bul. No 7.
8. Pivniuk VM, Kasianenko IV, Dehtiar TV, Komisarenko SV, Karlova NP, Oliinichenko IP, Chekhun VF. Domestic medicine from bisphosphonate group in treatment of cancer patients with bone metastases. *Oncology.* 2004; 6(3): 199-202.
9. Pat. 36756 A UA 7 IPC A61K 31/66, A61K 45/05, C07 F 9/38. Method for treatment of patients with breast cancer. Sharykina NI, Kudryavtseva IG, Kasianenko IV, Komisarenko SV, Karlova NP, Lozynskiy MO. Borisevich AM., Chuiko OL, applicant and patent owner: Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine, No 2000020602; appl. 03.02.00; publ. 16.04.01, Bul. No 9.
10. A.C. 1588137 SU 5 G01N 33/53. Method for obtaining labeled antibodies. Komisarenko SV, Fomovska GN, Levchuk OP, Borisevich AN, Lozynskiy MO, Mirian NI, appl. 09.02.88.
11. Pat. 12056 A UA. Method for obtaining labeled antibodies. Komisarenko SV, Fomovska GN, Levchuk OP, Borisevich AN, Lozynskiy MO, Mirian NI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, No 4395425 SU, appl. 09.02.88; publ. 25.12.96, Bul. No 4.
12. A.C. 1307814 SU 4 C08K 5/53, C08G 18/06. Polyurethane composition. Komisarenko SV, Karlova NP, Fomovska GN, Borisevich AN, Lozynskiy MO, Pkhakadze GA. appl. 25.12.84.
13. Pat. 12055 UA 4 C08K 5/53, C08G 18/06. Polyurethane composition. Komisarenko SV., Karlova NP., Fomovska GN., Borisevich AN., Lozynskiy MO., Pkhakadze GA., appl. 25.12.84, publ. 25.12.96, Bul. No 4.
14. Komisarenko SV, Vasilieva GA, Evstigneeva RP. Immunochemical analysis of

- equine cytochrome C. Stoichiometry of the interaction and cytochrome C affinity for specific Fab fragments. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1982;264(3):752-755. (In Russian).
15. A.C. 1379739 SU, 4 IPC G01 No 33/49. Method for prognosis of complicated course of myocardial infarction. Komisarenko SV, Skok MV, Gvatua NA, Solonenko IN, Piven VI, (SU) appl. 27.01.86; publ. 07.03.88, Bul. No 9.
 16. Lugovskoy EV, Makogonenko EM, Chudnovets VS, Derzskaya SG, Gogolinskaya GK, Kolesnikova IN, Bukhanevich AM, Sitak IN, Lyashko ED, Komissarenko SV. The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies. *Biomed Sci*. 1991; 2(3): 249-256.
 17. Lugovskoy EV, Chudnovets VS, Makogonenko EM, Derzskaya SG, Gogolinskaya GK, Kolesnikova IN, Mikhailovskaia LI, Komissarenko SV. Study of the polymerization of fibrin using monoclonal antibodies 2D-2A and their Fab-fragments. *Ukr Biokhim Zhurn*. 1995; 67(1): 64-70. (In Russian).
 18. Lugovskoy EV, Komisarenko SV. Monoclonal antibodies as an instrument to study fibrin polymerization. *Bioorg Khim*. 2000; 26(12): 883-891. (In Russian).
 19. Pat. 73232 UA 7IPC C12N5/18, C12P21/08. Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. – producing monoclonal antibodies that specifically react with N-terminal epitope of γ -chain of human fibrin D-dimer and fibrinogen D-fragment. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Gogolinska GK, Gritsenko PG, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No 2003077105; appl. 28.07.03; publ.15.06.05, Bul. No 6.
 20. Pat. 73233 UA 7IPC C12N5/18, C12P21/08. Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. – producing specific monoclonal antibodies to N-terminal epitope of human fibrinogen B β -chain. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Gogolinska GK, Gritsenko PG, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No 2003077106; appl. 15.06.05; publ. 15.06.05, Bul. No 6.
 21. Pat. 73823 UA 7IPC C12N5/12, C12N5/18, C12N5/20. Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. which are cultivated and produce specific monoclonal antibodies to human fibrin D-dimer. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Gogolinska GK, Gritsenko PG, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No 2003076213; appl. 04.07.03; publ. 15.09.05, Bul. No 9.
 22. Pat. 87375 UA IPC (2009) C12N 5/20, C07K 16/36 (2009.01). Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. which are cultivated and produce specific monoclonal antibodies to human fibrin. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Gritsenko PG, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Lugovska NE, Gogolinska GK, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a200712284; appl. 06.11.2007; publ. 10.07.2009, Bul. No 13.
 23. Pat. 69283 U UA, IPC A 61K 39/44 (2006.01). Immunoenzyme test-system for quantitative determination of soluble fibrin in human blood plasma. Komisarenko SV, Lugovskoy EV, Kolesnikova IM, Spivak MY, Gritsenko PG, Ganova LO, Lugovska NE, Litvinova LM, Liashko KD, Kostiuhenko OP, Pozniak TA, Gogolinska GK, Kovtoniuk GV, Tereschenko MI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, No u201111736; appl. 05.10.2011; publ. 25.04.2012, Bul. No 8.
 24. Pat. 69284 U UA IPC A 61K 39/44 (2006.01). Immunoenzyme test-system for quantitative determination of D-dimer in human blood plasma. Komisarenko SV, Lugovskoy EV, Kolesnikova IM, Spivak MY, Gritsenko PG, Ganova LO, Lugovska NE, Litvinova LM, Liashko KD, Kostiuhenko OP, Pozniak TA, Gogolinska GK, Kovtoniuk GV, Tereschenko MI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, No u201111736; appl. 05.10.2011; publ. 25.04.2012, Bul. No 8.
 25. Pat. 70456 U UA, IPC A 61K 39/44 (2006.01). Immunoenzyme test-system for quantitative determination of fibrinogen in human blood plasma. Komisarenko SV, Lugovskoy EV, Kolesnikova IM, Spivak MY, Gritsenko PG,

- Ganova LO, Lugovska NE, Litvinova LM, Liashko KD, Kostiuhenko OP, Pozniak TA, Gogolinska GK, Kovtoniuk GV, Tereschenko MI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, No u201114516; appl. 07.12.2011; publ. 11.06.2012, Bul. No 11.
26. Lugovska NE. Inventive activity of the Departments of protein structure and Function, and molecular immunology of the Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine. Part II. National breakthrough in the study and diagnostics of human hemostasis system. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(3): 106-118.
 27. Skok MV, Koval LM, Lykhmus OYu., Kalashnyk JM, Gergalova GL, Komisarenko SV. Nicotinic acetylcholine receptors: specific antibodies and function in humoral immunity. *Ukr Biochem J.* 2013; 85(6):134-143.
 28. Lykhmus O, Gergalova G, Koval L, Zhmak M, Komisarenko S, Skok M. Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathway of apoptosis induction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 53: 246-252.
 29. Lykhmus O, Voytenko L, Koval L, Mykhalskiy S, Knolin V, Peschana R, Zouridakis M, Tzartor S, Komisarenko S, Skok M. 27 Nicotinic Acetylcholine Receptor – Specific Antibody Induces Inflammation And Amiloid β 42 Accumulation In The Mouse Brain To Impair Memory. *PLoS ONE.* 2015; 10(3): e 0122706.
 30. Labyntsev AIu, Korotkevych NV, Manoilov KJ, Kaberniuk AA, Kolibo DV, Komisarenko SV. Recombinant fluorescent models for studying the diphtheria toxin. *Bioorg Khim.* 2014; 40(4): 433-442.
 31. Kolibo DV, Labyntsev AIu, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk ES, Korotkevych NV, Komisarenko SV. Immunobiology of diphtheria / Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of the disease. *Biotechnology.* 2013; 6(4): 43-62.
 32. Pat. 22160 U UA. IPC (2006) A61K 39/44, A61K 47/48, C07K 7/08 (2007.01), C12N 15/11. *Esherichia coli* “INV” sbB strain – producing recombinant non-active B subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheriae*. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Burkalieva DO, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a200604378; appl. 19.04.2006; publ. 25.04.2007, Bul. No 5.
 33. Pat. 23009 U UA IPC (2006) A61K 39/44, A61K 47/48, C07K 7/08 (2007.01), C12N 15/11. *Esherichia coli* “INV” sbB strain – producing recombinant non-active A subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheriae*. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Burkalieva DO, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No u200604337; appl. 19.04.2006; publ. 25.04.2007, Bul. No 5.
 34. Pat. 84356 UA IPC (2006) A61K 39/44, A61K47/48, C07K 7/08 (2006.01); C12N 15/11. *Esherichia coli* K12 “INV” sbA strain – producing recombinant non-active A subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheria* hybridized with polyhistidine tag. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a200701085; appl. 02.02.2007; publ. 10.10.2007, Bul. No 19.
 35. Pat. 84357 UA IPC (2006) A61K 39/44, A61K47/48, C07K 7/08 (2006.01); C12N 15/11. *Esherichia coli* K12 “IINV” sbB strain - producing recombinant non-active B subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheria* hybridized with polyhistidine tag. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a20070108; appl. 02.02.2007; publ. 10.10.2008, Bul. No 19.
 36. Korotkevich NV, Kolibo DV, Labyntsev AJ, Romaniuk SI, Komisarenko SV. Obtaining of recombinant human heparin binding EGF-like growth factor and perspectives of its application in biotechnology. *Biotechnologia Acta.* 2010; 3(4): 44-54.
 37. Korotkevich NV, Labyntsev AJu, Kolibo DV, Komisarenko SV. Obtaining and characterization of recombinant fluorescent derivatives of soluble human HB-EGF. *Biotechnologia Acta.* 2014; 7(2): 46-53.
 38. Korotkevych NV, Labyntsev AJu, Manoilov KYu, Krynina OI, Dyachenko LV, Kolibo DV, Komisarenko SV. Cell model for the study of receptor and regulatory functions

- of human proHB-EGF. *Ukr Biochem J.* 2014; 86 (4): 69-78.
39. Chudina T, Labyntsev A, Manoilov K, Kolibo D, Komisarenko S. Cellobiose – coated poly (laetide – co – glycolide) particles toaded with diphtheria toxoid for per os immunization. *Groat Med J.* 2015; 56(2): 85-93.
40. Wiker HG, Lyashchenko KP, Aksoy AM, Lightbody KA, Pollock JM, Komissarenko SV, Bobrovnik SO, Kolesnikova IN, Mykhalsky LO, Gennaro ML, Harboe M. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun.* 1998; 66(4): 1445-1452.
41. Redchuk TA, Oliinyk OS, Kaberniuk AA, Burkalieva DO, Romaniuk SI, Kolibo DV, Komisarenko SV, Cloning and expression of proteins *Mycobacterium bovis* MPB63 and MPB83 in *Escherichia coli* cells. *Rep Nat Acad Sci Ukraine.* 2007; (9): 161-166.
42. Redchuk TA, Korotkevich NV, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Labyntsev AJ, Romaniuk SI, Kolibo DV, Komisarenko SV. Recombinant chimera protein MPB63–MPB83 as perspective antigen for diagnostics of tuberculosis. *Biotechnology.* 2010;3(5):50-56.
43. Pat. 100065 U UA, IPC G01N 33/49 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). Immunoenzyme test-system for detection of antibodies to *Mycobacterium bovis*. Komisarenko SV, Kolibo DV, Oliinyk OS, Redchuk TA, Lugovska NE, Siromolot AA, Stegnii BT, Gerilovych AP, Zavgorodnii AI, Nikolaenko IV, Raievska GE, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No u201413675; appl. 19.12.2014; publ. 10.07.2015, Bul. No 13.

Received 20.09.2016

NEWS ITEMS

БОРИС ФЕДОРОВИЧ СУХОМЛИНОВ

До 100-річчя від дня народження



18.07.1916 – 13.01.2004

З ім'ям Бориса Федоровича пов'язано відродження у 1963 р. кафедри біохімії у складі Львівського державного університету імені Івана Франка, якою він керував упродовж 25 років, а з 1988 до 1993 року – працював професором цієї кафедри. Серед наукових інтересів Бориса Федоровича переважали питання дослідження в галузі радіобіології і молекулярної біології. Він та його послідовники зробили вагомий внесок у розвиток структурно-метаболическої теорії дії іонізуючого випромінювання, дослідження первинної структури гемопротеїнів тварин за різних патологій. Так, під його керівництвом було виявлено основні закономірності дії сублетальних та летальних доз іонізуючого випромінювання на структурно-функціональні властивості киснево-транспортних протеїнів,

а також молекулярні принципи протекторної дії гіпоксичних газових сумішей і дослідження первинної структури міоглобінів тварин різних видів.

Він залишив нам у спадок понад 350 наукових праць, потужну наукову школу (49 кандидатів біологічних наук), яка добре знама як у нашій країні, так і за її межами, адже Борис Федорович був прекрасним викладачем і вихователем наукової молоді.

Члени Українського біохімічного товариства, науковці Інституту біохімії НАН України добре знали та поважали професора Бориса Федоровича Сухомлинова – талановитого вченого і прекрасну людину.

Таким він був і таким залишається в нашій пам'яті!



NEWS

THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2016



Yoshinori Ohsumi

(Born in 1945, Fukuoka, Japan)

*Tokyo Institute of Technology,
Japan*

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016 was awarded to **Yoshinori Ohsumi** "for his discoveries of mechanisms for autophagy".

This year's Nobel Laureate discovered and elucidated mechanisms underlying autophagy, a fundamental process for degrading and recycling cellular components.

The word *autophagy* originates from the Greek words *auto-*, meaning "self", and *phagein*, meaning "to eat". Thus, autophagy denotes "self eating". This concept emerged during the 1960's, when researchers first observed that the cell could destroy its own contents by enclosing it in membranes, forming sack-like vesicles that were transported to a recycling compartment, called the *lysosome*, for degrada-

tion. Difficulties in studying the phenomenon meant that little was known until, in a series of brilliant experiments in the early 1990's, Yoshinori Ohsumi used baker's yeast to identify genes essential for autophagy. He then went on to elucidate the underlying mechanisms for autophagy in yeast and showed that similar sophisticated machinery is used in our cells.

Ohsumi's discoveries led to a new paradigm in our understanding of how the cell recycles its content. His discoveries opened the path to understanding the fundamental importance of autophagy in many physiological processes, such as in the adaptation to starvation or response to infection. Mutations in autophagy genes can cause disease, and the autophagic process is involved in several conditions including cancer and neurological disease.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2016/

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2016



Jean-Pierre Sauvage
(Born in 1944, Paris, France)
University of Strasbourg,
France



Sir J. Fraser Stoddart
(Born in 1942, Edinburgh,
United Kingdom)
Northwestern University,
Evanston, IL, USA



Bernard L. Feringa
(Born in 1951, Barger-Com-
pascuum, the Netherlands)
University of Groningen,
the Netherlands

The Nobel Prize in Chemistry 2016 was awarded jointly to **Jean-Pierre Sauvage**, **Sir J. Fraser Stoddart** and **Bernard L. Feringa** "for the design and synthesis of molecular machines".

A tiny lift, artificial muscles and miniscule motors. The Nobel Prize in Chemistry 2016 is awarded to **Jean-Pierre Sauvage**, **Sir J. Fraser Stoddart** and **Bernard L. Feringa** for their design and production of molecular machines. They have developed molecules with controllable movements, which can perform a task when energy is added.

The development of computing demonstrates how the miniaturisation of technology can lead to a revolution. The 2016 Nobel Laureates in Chemistry have miniaturised machines and taken chemistry to a new dimension.

The first step towards a molecular machine was taken by Jean-Pierre Sauvage in 1983, when he succeeded in linking two ring-shaped molecules together to form a chain, called a *catenane*. Normally, molecules are joined by strong covalent bonds in which the atoms share electrons, but in the chain they were instead linked by a freer *mechanical bond*. For a machine to be able to perform a task it must consist of parts that can move relative to each other. The two interlocked rings fulfilled exactly this requirement.

The second step was taken by Fraser Stoddart in 1991, when he developed a *rotaxane*. He threaded a molecular ring onto a thin molecular axle and demonstrated that the ring was able to move along the axle. Among his developments based on rotaxanes are a molecular lift, a molecular muscle and a molecule-based computer chip.

Bernard Feringa was the first person to develop a molecular motor; in 1999 he got a molecular rotor blade to spin continually in the same direction. Using molecular motors, he has rotated a glass cylinder that is 10,000 times bigger than the motor and also designed a nanocar.

2016's Nobel Laureates in Chemistry have taken molecular systems out of equilibrium's stalemate and into energy-filled states in which their movements can be controlled. In terms of development, the molecular motor is at the same stage as the electric motor was in the 1830s, when scientists displayed various spinning cranks and wheels, unaware that they would lead to electric trains, washing machines, fans and food processors. Molecular machines will most likely be used in the development of things such as new materials, sensors and energy storage systems.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2016/