

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Федоров Дмитрий Андреевич

Na^+/K^+ -зависимая регуляция экспрессии гена *FOS*

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Климанова Елизавета Андреевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность работы	6
Цель и задачи работы.....	8
Основные положения, выносимые на защиту.....	8
Объект исследования.	9
Научная новизна и практическая значимость работы.....	10
Методология диссертационного исследования	11
Степень достоверности полученных результатов	11
Апробация результатов работы	12
Список работ, опубликованных автором по теме диссертации	12
Личный вклад автора	13
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1. Транспорт одновалентных катионов в клетках млекопитающих	14
1.1. Na,K-АТРаза	15
1.2. Na,Cl-, K,Cl- и Na,K,Cl-котранспортеры	18
1.3. Na/H-обменник и Na,HCO ₃ -котранспорт.....	19
1.4. Na/Ca-обменники	20
1.5. Ионные каналы	21
2. Связь внутриклеточных концентраций Na ⁺ _i и K ⁺ _i с другими параметрами клетки.....	23
2.1. Трансмембранный потенциал и Ca ²⁺ -зависимые сигнальные пути.....	23
2.2. Поддержание объема клетки.....	25
2.3. Транспорт органических веществ	27

2.4. Na^+/K^+ -градиент связан с внутриклеточной концентрацией АТФ	28
3. Изменение концентраций одновалентных катионов при разных стимулах ...	29
4. Феномен $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимой регуляции транскрипции	35
5. Ген <i>FOS</i>	37
5.1. Функции <i>FOS</i>	37
5.2. Регуляция экспрессии гена <i>FOS</i>	39
6. Возможные механизмы регуляции количества мРНК <i>FOS</i> одновалентными катионами	50
6.1. Сигнальная функция Na,K -АТФазы	50
6.2. G-квадруплексы и концепция «натрий-калиевого переключателя»	51
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
МАТЕРИАЛЫ	56
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
1. Культивирование клеток	57
2. Изменение осмолярности внеклеточной среды для манипуляции клеточным объемом HUVEC	58
3. Определение объема клеток HUVEC в «реальном времени»	60
4. Определение содержания внутриклеточной свободной воды	61
5. Определение содержания одновалентных катионов в клетках	62
6. Регистрация внутриклеточного транспорта Rb^+	63
7. Инкубация клеток в средах для манипуляции концентрациями Na^+_{i} и K^+_{i} в клетках HeLa	63
8. Инкубация клеток HeLa в присутствии стабилизатора и дестабилизатора G4	64

9. Микроскопия клеток HeLa с флуоресцентным зондом Fluo8, чувствительным к концентрации Ca^{2+}	65
10. Трансфекция и микроскопия сенсоров HyPer7 и SypHer3s.....	66
11. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	68
12. Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в «реальном времени» .	68
13. Определение концентрации белка методом Лоури	71
14. Определение уровня фосфорилирования протеинкиназ методом Вестерн блоттинга.....	71
15. Оценка структуры олигонуклеотидов, потенциально формирующих G-квадруплексы.....	73
16. Анализ и визуализация данных	74
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	75
1. Изменение объема клеток HUVEC приводит к индукции экспрессии <i>FOS</i> только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.....	75
2. Повышение внеклеточной концентрации Na^+ от 125 до 140 мМ не приводит к увеличению внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения и не изменяет количество мРНК <i>FOS</i> в клетках HUVEC	78
3. Убаин увеличивает уровень мРНК <i>FOS</i> только в условиях повышения Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa.....	82
4. Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ приводит к активации MAPK.....	85
5. Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ в отсутствие внеклеточных ионов Ca^{2+} не вызывает накопления Ca^{2+} в цитоплазме HeLa	87
6. Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ приводит к увеличению внутриклеточного pH и не стимулирует генерацию активных форм кислорода	89

7. В промоторной области гена <i>FOS</i> человека обнаруживается как минимум три G-квадруплекса, обладающих чувствительностью к Na^+/K^+ -соотношению	92
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	99
1. Повышение внеклеточной осмолярности в физиологическом диапазоне не вызывает индукцию экспрессии <i>FOS</i> в клетках эндотелия	99
2. Увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения приводит к повышению количества мРНК <i>FOS</i>	101
3. Повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения приводит к активации MAPK, что не является необходимым для индукции <i>FOS</i>	103
4. Повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения не приводит к увеличению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} и изменению редокс-статуса цитоплазмы.....	104
5. Повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения приводит к увеличению внутриклеточного pH.....	106
6. Роль G-квадруплексов в Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии гена <i>FOS</i>	108
7. Иные возможные механизмы регуляции экспрессии <i>FOS</i> Na^+/K^+ -соотношением	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	122
БЛАГОДАРНОСТИ.....	138

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Неравномерное распределение концентраций одновалентных катионов Na^+ и K^+ между вне- и внутриклеточными пространствами является фундаментальной особенностью клеток животных. Значения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ в разных тканях животных лежат в пределах 3–10 [1] и 60–140 мМ соответственно [2]. Основным ферментом, поддерживающим такое соотношение, является Na,K-АТРаза (также называемый Na-насосом). Создаваемый ею градиент одновалентных катионов используется клеткой для поддержания мембранного потенциала и объема клетки, а также обеспечения возбудимости клеток и активного транспорта веществ через цитоплазматическую мембрану [3].

В результате ряда физиологических или патофизиологических состояний внутриклеточное соотношение Na^+/K^+ может изменяться, что влияет на экспрессию ряда генов [4]. Феномен Na^+/K^+ -зависимой регуляции транскрипции генов активно изучался группой исследователей под руководством проф. С.Н. Орлова. Они установили, что Na^+/K^+ -чувствительные гены в основном являются генами раннего ответа, среди которых выделяется ген *FOS* (также известный как *c-Fos*), кодирующий субъединицу транскрипционного фактора AP-1. Исследователи не смогли установить природу сенсора внутриклеточных концентраций Na^+ или K^+ , который управляет экспрессией этого гена, что неудивительно, поскольку изучение роли внутриклеточных концентраций одновалентных катионов в жизнедеятельности клетки затрудняется связью этих параметров с множеством клеточных процессов. Кроме того, в таких работах зачастую используется ингибирование Na,K-АТРаза убаином, который гипотетически может воздействовать на клетку не только через увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения, но и через изменение конформации

Na,K-АТРазы, что влияет на взаимодействие этого фермента с белками, иницирующими сигнальные каскады, или связывание с другими мишенями. В связи с этим на протяжении последних 25 лет было выполнено не так много работ, которые, однако, обозначили несколько свойств Na^+/K^+ -зависимой регуляции генов. Во-первых, было показано, что увеличение транскрипции гена *FOS* при диссипации Na^+/K^+ -градиента не подавляется в присутствии вне- и внутриклеточных хелаторов Ca^{2+} или ингибированием сигнальных путей, связанных с кальмодулином [5–7]. Во-вторых, к увеличению экспрессии *FOS* приводит не только ингибирование Na,K-АТРазы убаином, но и инкубация в среде, не содержащей ионы K^+ (что обеспечивает ингибирование Na,K-АТРазы), а также в присутствии Na^+ -ионофора монензина [6]. Важно отметить, что не вполне установлена роль таких важных параметров, как активность каскадов митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), изменение объема клеток, внутриклеточного pH и концентрации активных форм кислорода в Na^+/K^+ -зависимом механизме регуляции экспрессии генов.

Эта работа посвящена дальнейшему изучению явления Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках человека, она разбита на две части. Первая часть посвящена регуляции *FOS* в клетках эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) при изменении осмолярности внеклеточной среды. Эта часть работы дает ответ на следующий вопрос: может ли изменение внеклеточной осмолярности влиять на ионный баланс клетки эндотелия и как следствие приводить к индукции экспрессии *FOS*, а если может, то какой вклад в этот эффект вносит изменение клеточного объема? Вторая часть диссертации посвящена непосредственному изучению механизма Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках аденокарциномы человека HeLa. Мы выбрали эту культуру по двум причинам. Во-первых, в ранее упомянутой работе было показано, что индукция экспрессии *FOS* в ответ на увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa и HUVEC имеет схожий характер [7]. Во-вторых, это более удобная и дешевая в работе культура, по сравнению с первичной культурой HUVEC.

Цель и задачи работы

Целью этой работы было исследование механизма Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках человека.

Задачи работы:

1. Оценить влияние увеличения внеклеточной концентрации Na^+ на соотношение концентраций Na^+ и K^+ внутри клеток, а также на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.
2. Определить роль изменения клеточного объема на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.
3. Оценить независимое от изменения внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения влияние убаина на экспрессию *FOS* в клетках HeLa.
4. Определить роль ERK1/2, JNK и p38 в активации транскрипции *FOS* при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa.
5. Оценить влияние Na^+/K^+ -соотношения на внутриклеточный pH и окислительный стресс в клетках HeLa.
6. Оценить возможность формирования G-квадруплексов в промоторной области гена *FOS* человека в условиях *in vitro* и их чувствительность к изменению соотношения концентраций одновалентных катионов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Индукция экспрессии *FOS* в ответ на изменение объема клеток HUVEC обусловлена увеличением внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
2. Увеличение внеклеточной концентрации Na^+ в пределах физиологической нормы приводит к увеличению потока этого иона в клетки HUVEC через ENaC каналы, что вызывает активацию Na,K-АТРазы, при этом внутриклеточное

содержание одновалентных катионов приходит в равновесие в течение 3 ч; индукции экспрессии *FOS* в таких условиях не наблюдается.

3. Увеличение экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K-АТФазы в клетках HeLa обусловлено увеличением внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения и не связано с неспецифическим действием ее ингибитора или с деполяризацией плазматической мембраны.
4. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa приводит к фосфорилированию ERK1/2, JNK и p38, при этом для Na^+/K^+ -зависимой индукции экспрессии *FOS* активация этих киназ не является обязательной.
5. Окислительный стресс не является необходимым условием для Na^+/K^+ -зависимой индукции транскрипции *FOS* в клетках HeLa.
6. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa приводит к временному росту внутриклеточного pH, который сменяется ацидозом.
7. В промоторе *FOS* существует как минимум три G-квадруплекса, формирование которых показано *in vitro*. Структура этих G-квадруплексов зависит от соотношения концентраций одновалентных катионов.

Объект исследования.

In cellulo часть исследования проведена с использованием клеток аденокарциномы HeLa и первичной культуры клеток эндотелия пупочной вены HUVEC. При выполнении *in vitro* экспериментов в качестве объекта исследования использовали олигонуклеотиды, формирующие G-квадруплексы. Работа выполнена с использованием современных биохимических, молекулярно биологических и биофизических подходов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Проведено комплексное исследование действия одновалентных катионов на транскрипцию гена *FOS* человека на разных типах клеток. Обнаружено, что увеличение внеклеточной концентрации Na^+ в рамках физиологической нормы не приводит к увеличению Na^+/K^+ -соотношения в клетках эндотелия и не влияет на экспрессию *FOS*. При более существенном повышении осмолярности внеклеточной среды именно увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ , а не уменьшение объема клеток HUVEC влияет на транскрипцию гена *FOS*. Дальнейшее изучение Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии *FOS* с использованием модели ингибирования Na,K-АТФазы клеток HeLa показало, что такая индукция экспрессии *FOS* не опосредована неспецифическим действием ингибитора Na,K-АТФазы убаина, деполяризацией плазматической мембраны, действием MAPK, увеличением концентрации активных форм кислорода и Ca^{2+} в цитоплазме. Обнаружено, что увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения приводит к временному повышению внутриклеточного pH.

Проведен биоинформатический анализ промоторной области *FOS* человека, предсказано наличие в этой области как минимум трех G-квадруплексов ($\text{FOS}_{\text{G4}1}$, $\text{FOS}_{\text{G4}2}$, $\text{FOS}_{\text{G4}3}$). Методом спектроскопии кругового дихроизма показано, что олигонуклеотиды, соответствующие предсказанным G-квадруплексам, формируют эти структуры в условиях *in vitro*. Обнаружено, что увеличение Na^+/K^+ -соотношения или присутствие ионов Li^+ приводит в разной степени к уменьшению амплитуды пиков спектров всех трех G-квадруплексов промотора *FOS*, что указывает на изменение их структуры. Показано, что увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения или наличие ионов Li^+ обеспечивает повышение уровня мРНК *FOS* в клетках HeLa.

Результаты данной работы представляют с одной стороны фундаментальный интерес, а с другой – имеют явный практический характер, поскольку дисбаланс концентраций одновалентных катионов встречается в различных тканях животных

при разнообразных патологиях, затрагивающих системы ионного транспорта. В связи с этим изучение механизма регуляции экспрессии генов при изменении внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения может способствовать разработке новых подходов к терапии подобных заболеваний. Полученные данные подтверждают наличие в клетках сенсора концентраций одновалентных катионов и расширяют представления о $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимом механизме экспрессии генов.

Методология диссертационного исследования

In cellulo часть исследования проведена с использованием коммерчески доступных клеточных культур человека: клеток аденокарциномы HeLa и первичной культуры клеток эндотелия пупочной вены HUVEC. При выполнении *in vitro* экспериментов в качестве объекта исследования использовали синтетические олигонуклеотиды, формирующие G-квадруплексы.

Работа выполнена с использованием современных биохимических, молекулярно-биологических и биофизических подходов. При обработке части результатов микроскопии использовали методы машинного обучения.

Степень достоверности полученных результатов

Экспериментальная работа построена на основании обзора данных литературы. Эксперименты проводили в нескольких независимых повторах с использованием необходимых отрицательных и положительных контролей. Для оценки степени достоверности результатов использовали современные подходы статистики. Интерпретацию экспериментальных данных проводили с учетом возможных ограничений методов исследования.

Апробация результатов работы

Результаты данной работы были представлены на заседаниях кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на международных и российских научных конференциях: 10-я международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” (Россия, Пущино, 2019), VI Съезд биохимиков России (Россия, Дагомыс, 2019), The 45th FEBS Congress (Словения, Любляна, 2021), IUBMB–FEBS–PABMB Congress (Португалия, Лиссабон, 2022), VIII Всероссийская школа-конференция по физиологии и патологии кровообращения (Россия, Москва, 2025).

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

По теме диссертации было опубликовано 8 печатных работ, включая 4 статьи в рецензируемых зарубежных и российских журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, и 4 публикации в сборниках трудов российских и международных конференций:

1. Alexandra A. Shiyan, Svetlana V. Sidorenko, **Dmitry A. Fedorov**, Elizaveta A. Klimanova, Larisa V. Smolyaninova, Leonid V. Kapilevich, Grygorczyk Ryszard, and Sergei N. Orlov. Elevation of intracellular Na^+ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2019. – Vol. 53. – №. 4. – P. 638–647
2. **D. A. Fedorov**, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, E. Y. Parshina, A. M. Tverskoi, P. A. Abramicheva, G. V. Maksimov, S. N. Orlov, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova. Na^+/K^+ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl // Heliyon. – 2021. – Vol. 7. – №. 9. – P. e08088

3. Лопина О.Д., **Федоров Д.А.**, Сидоренко С.В., Букач О.В., Климанова Е.А. Ионы натрия как регуляторы транскрипции в клетках млекопитающих // Биохимия. – 2022. – Т. 87. – №. 8. – С. 1132-1144

Olga D. Lopina, **Dmitrii A. Fedorov**, Svetlana V. Sidorenko, Olesya V. Bukach, and Elizaveta A. Klimanova. Sodium ions as regulators of transcription in mammalian cells // Biochemistry (Moscow). – 2022. – Vol. 87. – №. 8. – P. 789-799

4. Olga D. Lopina, Svetlana V. Sidorenko, **Dmitry A. Fedorov**, and Elizaveta A. Klimanova. G-quadruplexes as sensors of intracellular Na^+/K^+ ratio: Potential role in regulation of transcription and translation // Biochemistry (Moscow) – 2024. – Vol. 89. – №. (Suppl. 1) – P. S262–S277

Личный вклад автора

Все основные результаты были получены автором или при его участии. Автор лично анализировал и интерпретировал результаты и подготавливал статьи и тезисы для публикации.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Транспорт одновалентных катионов в клетках млекопитающих

Неравномерное распределение концентраций одновалентных катионов Na^+ и K^+ между вне- и внутриклеточными пространствами является фундаментальной особенностью клеток животных и лежит в основе возбудимости эндокринной, мышечной и нервной тканей. Осмолярность внутриклеточной среды составляет ~ 300 мОсм, которая в основном поддерживается за счет ионов Na^+ , K^+ и Cl^- . Значения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ в разных тканях животных лежат в пределах 3–10 [1] и 60–140 мМ соответственно [2]. Эти одновалентные катионы являются преобладающими в клетках животных. Среди катионов в контексте нашей работы также важно отметить H^+ и Ca^{2+} . В норме значение цитоплазматического рН на 0,1–0,2 единицы меньше значения рН внеклеточной среды [8]; при рН внеклеточной среды 7,4 значение рН внутри клетки будет составлять $\sim 7,2$, что соответствует концентрации H^+ ~ 60 нМ. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме в покое составляет ~ 100 нМ (против 1,2 мМ во внеклеточной среде), однако она может возрастать до 0,5–1 мкМ в результате открытия Са-каналов плазматической мембраны или мембран клеточных депо Ca^{2+} [9]. Среди анионов преобладающим является Cl^- . Концентрация Cl^- в разных клетках сильно варьирует и зависит от потенциала на плазматической мембране (что будет рассмотрено ниже). Так, в мышечных клетках при потенциале покоя -68 мВ концентрация Cl^- составляет 2–4 мМ, а в эритроцитах при потенциале покоя -15 мВ концентрация Cl^- равна 70 мМ [10].

Концентрации ионов в клетке строго поддерживаются общей работой ионных каналов и переносчиков. Далее в этом разделе будет дана характеристика основных участников транспорта Na^+ и K^+ . На рисунке Рис. 1 представлены основные ионные

каналы и переносчики, участвующие в транспорте Na^+ и K^+ , а также обозначено направление тока ионов через них в усредненной клетке животного в норме.

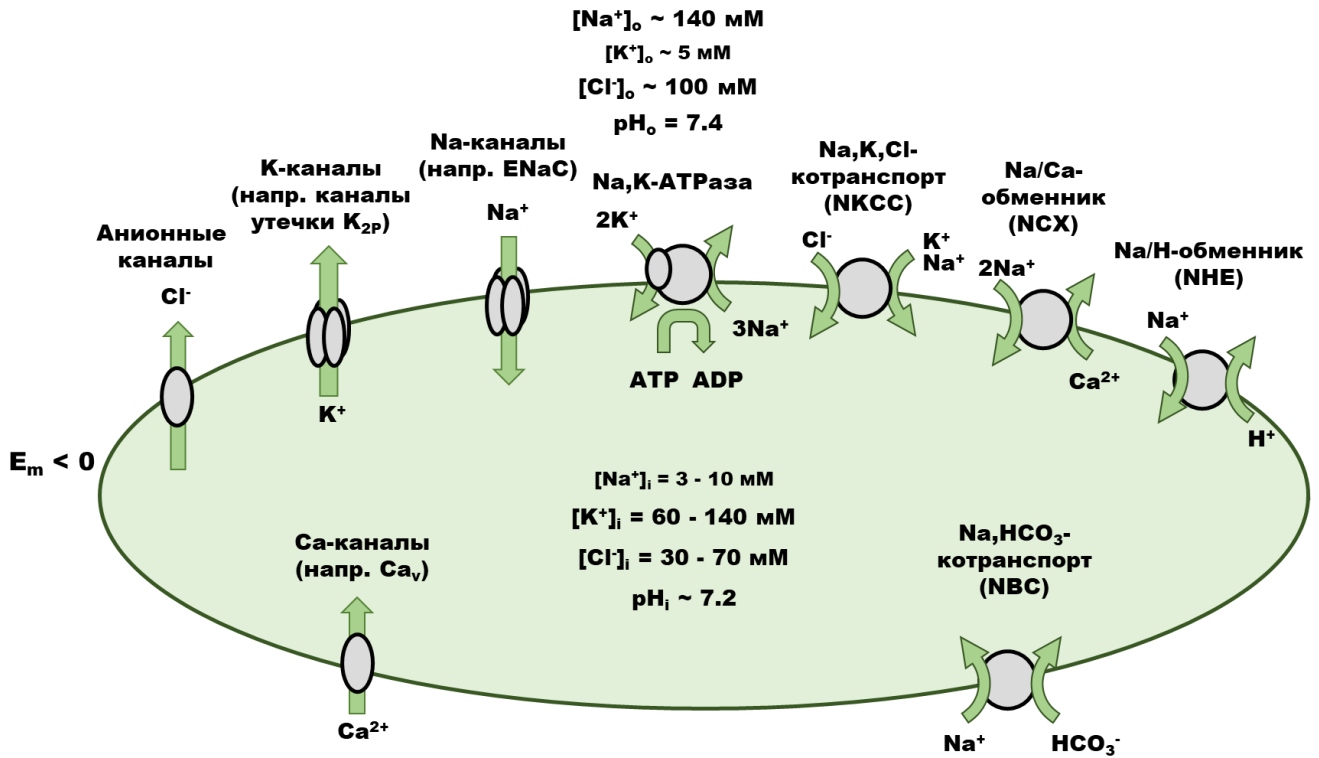


Рис. 1. Основные ионные каналы и переносчики усредненной клетки животного, участвующие в транспорте ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану. $[\]$ – концентрации ионов, i – внутри клетки, o – во внеклеточной среде, E_m – потенциал на плазматической мембране.

1.1. Na,K-АТРаза

Na,K-АТРаза обнаруживается в плазматической мембране практически у всех видов животных. Фермент обеспечивает электрогенный выход трёх ионов Na^+ из цитоплазмы и вход двух ионов K^+ в клетку. Она представляет собой гетероолигомер, состоящий как минимум из одной каталитической α -субъединицы и одной регуляторной β -субъединицы (Рис. 2 А) [11].

α -Субъединица Na,K-АТРазы содержит участки связывания АТР, Na^+ , K^+ , а также специфических ингибиторов этого фермента – кардиотонических стероидов (КТС). β -Субъединица фермента не участвует в катализе, но влияет на сродство

фермента к лигандам [12]. Данная субъединица сильно гликозилирована, степень ее гликозилирования видо- и тканеспецифична [13]. Кроме того, β -субъединица контролирует правильное сворачивание α -субъединицы и ее встраивание в плазмалемму [11]. Субъединицы Na,K-АТРазы представлены рядом тканеспецифичных изоформ, которые могут комбинироваться друг с другом в любых сочетаниях [14]: $\alpha 1 - \alpha 4$ [14] и $\beta 1 - \beta 4$ [11,15]. Образующиеся изоферменты различаются константами связывания ионов Na^+ и K^+ , АТФ и КТС [16]. В некоторых тканях в состав фермента помимо основных α - и β -субъединиц могут входить белки семейства FXYD (так называемая γ -субъединица), которые являются модуляторами активности Na,K-АТРазы [17].

Кардиотонические стероиды (КТС) являются основными ингибиторами Na,K-АТРазы. Все КТС подразделяют на два класса: карденелиды (впервые выделены из растений) и буфадиенолиды (впервые выделены из амфибий). В научной практике наибольшее распространение приобрел хорошо растворимый в воде убаин (Рис. 2 Б), который является карденелидом [18]. Сродство Na,K-АТРазы к убаину зависит от субъединичного состава фермента и обратно пропорционально концентрации K^+ во внеклеточной среде [19]

В ходе своего каталитического цикла Na,K-АТРаза совершает переход между различными конформациями, общая схема которого представлена на Рис. 2 В. Сначала Na,K-АТРаза связывает 3 иона Na^+ из цитоплазмы. Эта конформация фермента носит название E1 и характеризуется высоким сродством к АТФ и Na^+ . Затем происходит перенос фосфорильного остатка с АТФ на остаток Asp369 фосфорилируемого домена, в результате чего фермент меняет свою конформацию и переходит в состояние E1P, характеризующееся окклюзией ионов Na^+ внутри трансмембранного домена так, что они не могут выйти ни в цитоплазму, ни во внеклеточное пространство, а получившийся ADP высвобождается в цитоплазму. Затем происходит спонтанный переход конформации Na,K-АТРазы в состояние E2, которое обладает низким сродством к ионам Na^+ и высоким сродством к ионам K^+ . Состояние фермента после высвобождения ионов Na^+ называется E2P [3,11]. Именно эта конформация фермента имеет наибольшее сродство к убаину (для $\alpha 1$ -

субъединицы утки константа диссоциации равна 0,1 мкМ), другие конформации практически не связываются с убаином [18]. В дальнейшем ионы Na^+ освобождаются во внеклеточное пространство, а фермент связывает два иона K^+ , что приводит к гидролизу связи между фосфатом и остатком Asp369. Далее происходит высвобождение K^+ в цитоплазму, после чего Na,K-АТРаза медленно переходит в конформацию E1 [3,11].

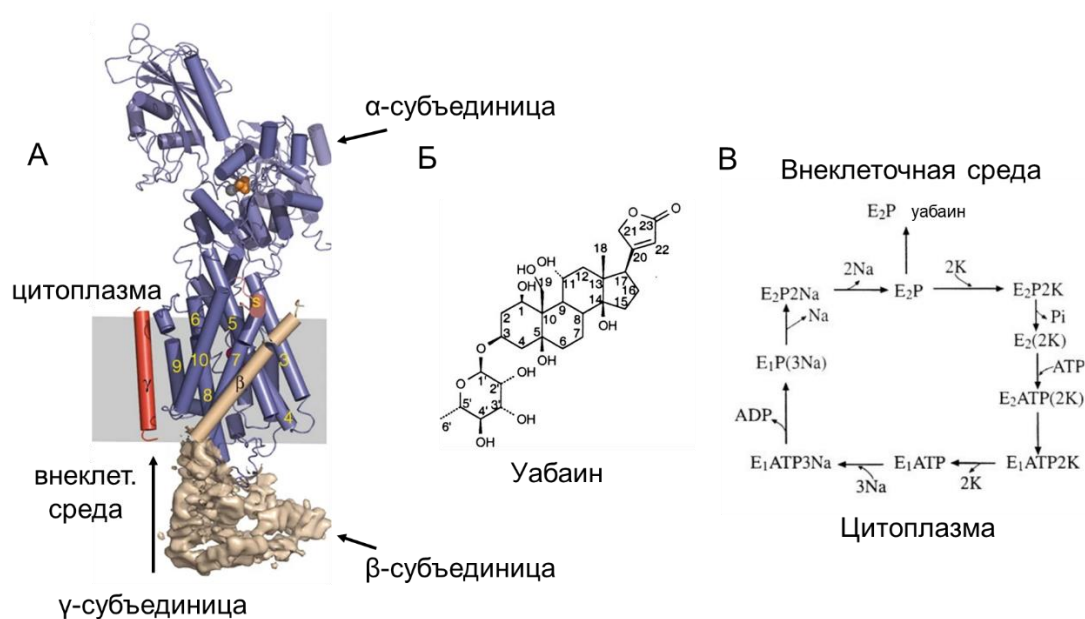


Рис. 2. Na,K-АТРаза. А – Структура Na,K-АТРаза, представлены α -, β - и γ -субъединицы, номерами обозначены трансмембранные α -спирали α -субъединицы [20]; Б – структурная формула специфического ингибитора Na,K-АТРаза убаина [21]; В – каталитический цикл Na,K-АТРаза [11].

Кроме поддержания ионного баланса клетки, Na,K-АТРаза выполняет функцию рецептора КТС, инициируя различные сигнальные каскады при связывании с лигандом [22], эта функция Na,K-АТРаза будет рассмотрена в отдельной главе. В настоящий момент эндогенные КТС рассматривают в качестве отдельного класса гормонов млекопитающих. Первым эндогенным КТС, обнаруженным в плазме крови человека, был убаин [23]. Позднее были идентифицированы и другие эндогенные КТС, в том числе маринобуфагенин, выделенный из крови и мочи [24]. Предполагается, что эти гормоны синтезируются в коре надпочечников и гипофизе [25]. Концентрация убаина и маринобуфагенина

в крови составляет 0,03-13 нМ, при этом более высокие концентрации сопряжены с наличием различных заболеваний кровеносной системы, таких как гипертоническая болезнь или преэклампсия [26].

1.2. Na,Cl-, K,Cl- и Na,K,Cl-котранспортеры

Семейство переносчиков, обеспечивающих транспорт Cl^- -иона, сопряженный с транспортом катионов (Cation-Coupled Chloride cotransport family, CCC-семейство), включает в себя Na,Cl- (NCC), K,Cl- (KCC) и Na,K,Cl-котранспортеры (NKCC). Эти транспортеры характеризуются электронейтральным переносом ионов [27]. Они обеспечивают котранспорт катионов и Cl^- по трансмембранному градиенту этих ионов, таким образом, направление их работы зависит от условий. Основными функциями этих переносчиков являются поддержание концентрации Cl^- в клетке, обеспечение адаптации клеток к осмотическому шоку (о чем подробнее будет сказано далее), участие в формировании трансмембранного потенциала на плазматической мембране, в особенности в электровозбудимых клетках, и обеспечение процессов реабсорбции и секреции соли в почках [28].

NCC экспрессируется в почках млекопитающих и в обычных условиях обеспечивает вход Cl^- и Na^+ в клетку [27]. KCC в обычных условиях обеспечивает выход K^+ и Cl^- из клетки и имеет 4 изоформы, различающиеся константами связывания с K^+ и Cl^- . KCC1 экспрессируется в большинстве тканей млекопитающих и обеспечивает поддержание объема клетки. Изоформа KCC2 экспрессируется в нейронах, где она обеспечивает уменьшение внутриклеточной концентрации Cl^- ниже уровня электрохимического равновесия, что усиливает гиперполяризацию, создаваемую активацией ГАМК- или глицин-зависимых Cl^- -каналов. KCC3 встречается в сердце, почках, головном мозге, плаценте, печени,

поджелудочной железе и эпителиальных клетках. КСС4 экспрессируется в сердце и почках [29].

НКСС в обычных условиях обеспечивает вход Na^+ , K^+ и 2 Cl^- в клетку, он в основном регулируется градиентом концентраций Cl^- и имеет 2 изоформы. НКСС1 экспрессируется во всех тканях млекопитающих и поддерживает концентрацию Cl^- в клетке, участвуя в создании мембранного потенциала клетки. НКСС2 обнаружен в почках, где участвует в реабсорбции NaCl [28].

1.3. Na/H-обменник и Na_2HCO_3 -котранспорт

Клеткам крайне важно поддерживать постоянный нейтральный pH в цитоплазме, поскольку этот параметр определяет степень протонирования ионогенных групп различных молекул (например, карбоксильных или аминокислотных групп белков), тем самым влияя на свойства этих молекул. Основным вклад в обеспечение постоянного pH вносит карбонатный буфер. Так, благодаря ряду реакций, в водном растворе CO_2 способен приводить к образованию H^+ : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Помимо этого, в качестве буфера pH в клетках могут выступать фосфатные группы и аминокислотные остатки белков. Обычно значение pH внеклеточной среды примерно равно 7,4, в то время как внутриклеточное значение этого параметра составляет 7,2. Такое легкое закисление цитоплазмы связано с тем, что в покое клетки млекопитающих имеют отрицательный электрический потенциал на плазматической мембране, который способствует входу H^+ в клетку и выходу HCO_3^- из клетки. Кроме того, метаболические процессы, такие как гликолиз или клеточное дыхание, способствуют закислению цитоплазмы. Для того, чтобы противостоять такому закислению в плазматической мембране, существуют переносчики, обеспечивающие уменьшение концентрации H^+ в цитоплазме [30].

Переносчики семейства Na/H-обменников (NHE) обеспечивают антипорт Na^+ и H^+ , направление переноса зависит от трансмембранного градиента этих ионов, в

обычных условиях происходит вход Na^+ и выход H^+ [31]. NHE представлены 9 изоформами. Среди них NHE1, NHE8 и NHE9 экспрессируются в широком спектре тканей млекопитающих, остальные изоформы обладают более специфической экспрессией и выполняют специализированные функции [32]. В обычных условиях градиент Na^+ настолько велик, что его достаточно для увеличения цитоплазматического pH с участием NHE на целую единицу. Однако NHE аллостерически регулируется внутриклеточным pH, поэтому при значении pH 7,2 и более активность этого обменника подавляется [30].

Na_2HCO_3 -котранспортеры (NBC) обеспечивают транспорт Na^+ и HCO_3^- по их совместному градиенту. У млекопитающих существует 6 изоформ этих ферментов, которые отличаются стехиометрией переноса: NBCn1, NBCn2 и SLC4A9 изоформы выполняют электронейтральный перенос 1 Na^+ :1 HCO_3^- , а NBCe1, NBCe2 выполняют перенос 1 Na^+ :2 HCO_3^- или 1 Na^+ :3 HCO_3^- и зависят от мембранного потенциала. В обычных условиях NBC обеспечивают вход Na^+ и HCO_3^- , защелачивая цитоплазму [30].

1.4. Na/Ca-обменники

Во многих тканях млекопитающих экспрессируется Na/Ca-обменник (NCX), который обеспечивает электрогенный обмен 1 Ca^{2+} на 3 Na^+ . NCX кодируется 3 разными генами (NCX1, NCX2 и NCX3) и имеет разные сплайсоформы. Экспрессия NCX1 наблюдается практически во всех тканях, в то время как NCX2 и NCX3 экспрессируются в мышечной и нервной ткани [33]. Этот обменник может работать как в прямом направлении (Na^+ входит в цитоплазму, Ca^{2+} выходит), так и в обратном. Гиперполяризация мембраны и увеличение цитоплазматической концентрации Ca^{2+}_i способствуют прямому направлению работы обменника, в то время как деполяризация мембраны и увеличение внутриклеточной концентрации Na^+_i стимулируют обратное направление. В клетках млекопитающих NCX

характеризуется константой связывания с внутриклеточными ионами Na^+ , равной 15-25 мМ. Таким образом, даже небольшое увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ ; может способствовать увеличению концентрации Ca^{2+} . Однако также было показано, что NCX может инактивироваться высокой внутриклеточной концентрацией Na^+ ; и низким внутриклеточным pH [34]. Важно отметить, что существуют сведения, указывающие на отсутствие функционального NCX в клетках HeLa [35].

В митохондриях электровозбудимых клеток обнаружены особые изоформы Na/Ca-обменника NCLX. В отличие от цитоплазматических изоформ, митохондриальный NCLX способен обеспечивать обмен $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$. В норме Ca^{2+} поступает в митохондрии через унипортер по электрическому градиенту, после чего выходит из митохондрий через NCLX благодаря градиенту концентраций Na^+ между митохондриальным матриксом и цитоплазмой. Na^+ при этом выбрасывается из матрикса митохондриальными изоформами NHE. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме вследствие электрического возбуждения клетки приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в матриксе митохондрий. Ca^{2+} является аллостерическим регулятором множества митохондриальных белков, включая ферменты цикла трикарбоновых кислот. Таким образом, изменение митохондриальной концентрации этого иона при возбуждении клеток является одним из механизмов регуляции клеточного дыхания [36].

1.5. Ионные каналы

Ионные каналы представляют собой белковые поры в мембране, обеспечивающие поток ионов по электрохимическому градиенту и которые, как правило, обладают селективностью к определенному иону. Каналы могут находиться в открытом или закрытом состоянии, причем регуляция перехода между состояниями осуществляется различными способами в зависимости от типа канала.

Хотя описано огромное разнообразие ионных каналов, в этой главе мы сфокусировались только на тех каналах, которые имеют непосредственное отношение к задачам диссертационного исследования.

Суперсемейство потенциал-чувствительных ионных каналов включает в себя потенциал-чувствительные Na-каналы (Na_v), потенциал-чувствительные K-каналы (K_v) и потенциал-чувствительные Ca-каналы (Ca_v). Классические потенциал-чувствительные ионные каналы имеют схожее строение: функциональный K_v формируется при связывании 4 отдельных субъединиц, в то время как Na_v и Ca_v представлены одной полипептидной цепью с 4-мя доменами, гомологичными субъединицам K_v . Каждые домен K_v или субъединица Na_v/Ca_v содержат 6 трансмембранных сегментов. Четвертый трансмембранный сегмент (S4) включает множество положительно заряженных аминокислотных остатков и является сенсором мембранного потенциала. При деполяризации мембраны эти каналы переходят в открытое состояние, а при реполяризации – в закрытое. Через некоторое время после открытия Na_v возникает временная инактивация этого канала [37].

Помимо классических потенциал-чувствительных Na- и K-каналов, существует множество других семейств каналов, проводящих одновалентные катионы. В контексте этой диссертации наибольший интерес для нас представляют Na-каналы ENaC и K-каналы утечки. Эпителиальные Na-каналы (ENaC) характеризуются постоянно открытым состоянием. Они обеспечивают перманентный вход Na^+ в клетку и контроль концентрации этого иона во внеклеточном пространстве. ENaC экспрессируются во многих тканях, включая эндотелий и гладкомышечную ткань кровеносных сосудов, лимфоциты и тромбоциты, астроциты, эпителиальные ткани. Наибольшая экспрессия этих каналов наблюдается в почках, легких, слюнных и потовых железах. В поляризованных эпителиальных клетках этих органов ENaC располагаются на стороне, обращенной к люмену, в то время как Na,K-АТРаза располагается на базолатеральной мембране. Таким образом обеспечивается ток ионов Na^+ из жидкостей в люмене в межклеточную жидкость, в результате чего уменьшается

концентрация Na^+ в люмене, что приводит к уменьшению осмолярности среды люмена и способствует всасыванию воды из люмена в ткань. К примеру, именно так осуществляется регуляция объема жидкости в альвеолах [38].

По современным представлениям, К-каналы утечки относятся к семейству двупоровых К-каналов ($\text{K}_{2\text{P}}$), которое, в свою очередь, входит в суперсемейство потенциал-чувствительных каналов. $\text{K}_{2\text{P}}$ обеспечивают постоянный ток K^+ , в физиологических условиях при отрицательном потенциале плазматической мембраны этот ток направлен из клетки, поэтому он называется током утечки. Ток утечки позволяет клетке поддерживать потенциал плазматической мембраны на определенном уровне (формирование потенциала будет подробнее рассмотрено далее). $\text{K}_{2\text{P}}$ регулируются крайне разнообразными факторами, включая модуляцию величиной потенциала на плазматической мембране, вне- и внутриклеточным рН, цитоплазматической концентрацией Ca^{2+} , натяжением мембраны и т.д. [39].

2. Связь внутриклеточных концентраций Na^+_i и K^+_i с другими параметрами клетки

2.1. Трансмембранный потенциал и Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути

Потенциал на плазматической мембране создается благодаря неравновесному распределению ионов между цитоплазмой и внеклеточным пространством. Основной вклад в создание мембранного потенциала вносят 3 иона: K^+ , Na^+ и Cl^- . В некоторых клетках (например, в кардиомиоцитах) ионы Ca^{2+} также вносят значительный вклад в этот процесс. Поддержание трансмембранного потенциала является АТР-зависимым. В его основе лежит активность Na,K-ATPазы , которая создает химический градиент ионов Na^+ и K^+ между цитоплазмой и внеклеточной

средой, а также суммарно выкачивает 1 положительный заряд из клетки, совершая один каталитический акт. Благодаря химическому градиенту K^+ этот ион выходит из клетки через K -каналы утечки, вызывая сильное уменьшение мембранного потенциала. Ион Cl^- также выходит из клетки через анионные каналы вслед за выходом катионов, в связи с чем концентрация Cl^-_i в клетке гораздо меньше внеклеточной концентрации Cl^-_o [40]. Трансмембранный потенциал большинства клеток описывается уравнением Гольдмана, которое представлено формулой 1.

$$V_m = -60 \text{ мВ} \lg \frac{P_K [K]_{in} + P_{Na} [Na]_{in} + P_{Cl} [Cl]_{out}}{P_K [K]_{out} + P_{Na} [Na]_{out} + P_{Cl} [Cl]_{in}}$$

Формула 1. Уравнение Гольдмана, выражающее отношение мембранного потенциала клетки к градиенту концентраций ионов между цитоплазмой и внеклеточной средой. V_m - мембранный потенциал (мВ), P - проницаемость мембраны для иона, учитывая ионные каналы и переносчики (см/См), $[]$ – концентрация иона, in – внутри клетки, out – во внеклеточной среде [40].

Цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} тесно связана с трансмембранным потенциалом, в первую очередь благодаря наличию Ca_v , которые при деполяризации мембраны пропускают Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитоплазму [41]. Вошедший в клетку Ca^{2+} может активировать ряд протеинкиназ, в том числе кальмодулин-зависимую киназу, протеинкиназу C (PKC) и опосредованно митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), что, в свою очередь, влияет на транскрипцию генов [42].

Мембранный потенциал влияет на клеточный цикл. Так, при гиперполяризации клеток наблюдается арест митоза. К примеру, клетки яичников китайского хомячка перестают делиться при мембранном потенциале -70 мВ, и только при возвращении потенциала в норму (-10 мВ) их пролиферативная активность восстанавливается. Деполяризация, напротив, коррелирует с пролиферативной активностью. Предполагается, что гиперполяризация мембраны блокирует синтез ДНК, и для перехода клеток из G_0/G_1 в S фазу клеточного цикла активируются Na_v или Ca_v , которые приводят к деполяризации [43].

Кроме того, потенциал плазматической мембраны, по-видимому, может независимо от Ca^{2+} влиять на внутриклеточные сигнальные каскады. Так,

существуют сведения, указывающие на возможность активации МАРК-киназного сигнального каскада через GTPазу K-Ras при изменении мембранного потенциала независимо от входа Ca^{2+} в цитоплазму. Предполагается, что фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат собираются в нанокластеры на мембране при ее деполяризации. K-Ras взаимодействует с фосфатидилсерином и концентрируется у образованных нанокластеров, инициируя сигнальный каскад [44].

2.2. Поддержание объема клетки

Клетке очень важно поддерживать постоянный объем, поскольку даже небольшое изменение ионной силы и концентрации веществ может повлиять на молекулярный краудинг, который, в свою очередь, влияет на взаимодействие макромолекул [45]. Большинство клеток млекопитающих характеризуются относительно высокой проницаемостью плазматической мембраны для молекул воды по сравнению с ее проницаемостью для ионов Na^+ , K^+ и Cl^- . При гипер- или гипоосмотических условиях происходит быстрый выход или вход воды в клетку соответственно, что сопровождается изменением клеточного объема. В изоосмотических условиях Na,K-АТРаза обменивает Na^+ на K^+ , создавая химический градиент K^+ , направленный из клетки, и градиент Na^+ , направленный внутрь клетки. Проницаемость мембраны для K^+ выше, чем для Na^+ , поэтому выход K^+ из клетки обеспечивает отрицательный мембранный потенциал, который способствует выходу иона Cl^- из клетки. При потенциале -18 мВ внутриклеточная концентрация Cl^- составляет 55 мМ, в то время как внеклеточная обычно равна 110 мМ. В гиперосмотических условиях клетка сжимается, после чего адаптируется и стремится увеличить свой объем за счет процесса так называемого регуляторного увеличения объема (RVI), в основе которого лежит активация NKCC и/или NHE вместе с Cl/HCO_3 -обменником. Так, благодаря их совместной работе происходит

выброс H^+ и HCO_3^- из клетки и вход в клетку Na^+ и Cl^- . Вошедший Na^+ обменивается на K^+ за счет работы Na,K-ATPазы , таким образом, суммарный эффект RVI заключается в накоплении KCl в клетке. Кроме того, при длительном гиперосмотическом стрессе благодаря увеличению экспрессии ряда обменников и активации некоторых ферментов, к примеру, фосфолипазы A_2 , клетка накапливает органические осмолиты, такие как сорбитол, инозитол, бетаин, таурин и др. В гипоосмотических условиях наблюдается набухание клетки, которому противостоит процесс регуляторного уменьшения объема (RVD), в основе которого лежит выведение KCl из клетки. Это происходит благодаря совместной работе калиевых и анионных каналов, а также K/H- и Cl/HCO_3^- -обменников. Помимо этого, происходит активация неспецифических катионных каналов, которые ведут ко входу Ca^{2+} в клетку и активируют Ca^{2+} -зависимые K- и Cl-каналы. В процессе RVD органические осмолиты выходят из клетки [46]. Основные каналы и переносчики, обеспечивающие RVD и RVI, изображены на рисунке Рис. 3.

Изменение экспрессии генов в клетке при изменении осмолярности обусловлено в первую очередь работой транскрипционного фактора NFAT5. Увеличение осмолярности приводит к увеличению времени жизни мРНК *NFAT5* через не совсем понятные механизмы, что обуславливает накопление этого белка в клетке. Кроме того, происходит фосфорилирование белка NFAT5 и его транслокация в ядро, где он связывается с элементами ответа на осмолярность в ряде генов. В основном его целевые гены кодируют мембранные переносчики органических осмолитов. Фосфорилирование NFAT5 увеличивается через 30 мин после начала осмотического шока и обусловлено активацией ряда протеинкиназ: протеинкиназы A, p38, Fyn, ATM и PI3K-IA [47].

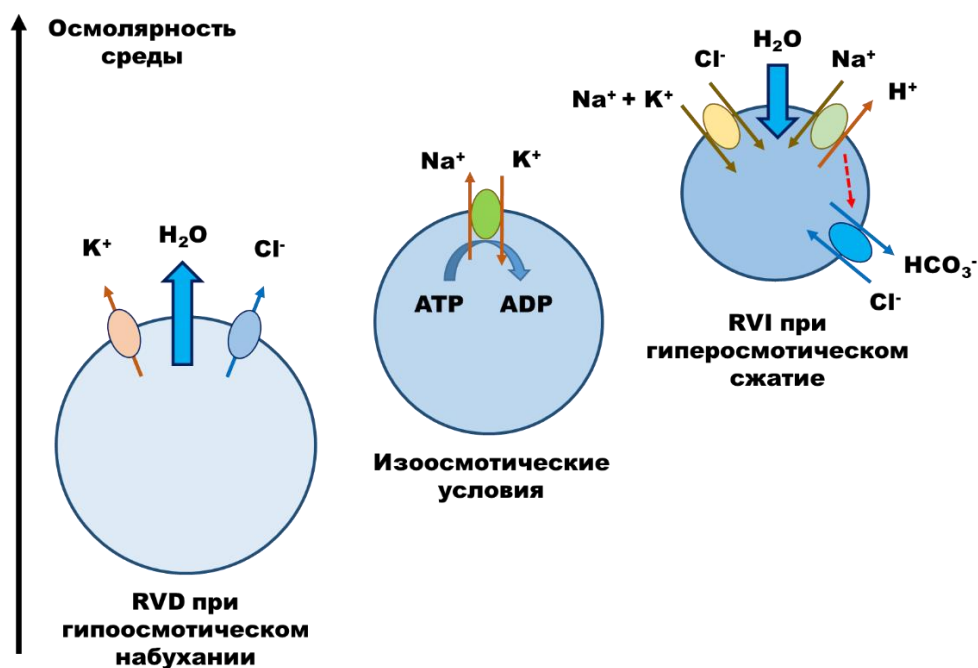


Рис. 3. Системы, регулирующие объем усредненной клетки животного. При гипоосмотическом набухании происходит регуляторное уменьшение объема (RVD) в результате выхода ионов через K^+ - и Cl^- -каналы, тогда как гиперосмотическое сжатие вызывает регуляторное увеличение объема (RVI) благодаря входу воды в клетки в результате накопления ионов за счет работы $NKCC$ и NHE . Активация NHE при гиперосмотическом сжатии защелачивает цитоплазму и активирует Cl^-/HCO_3^- -обменник, который, выбрасывая HCO_3^- , закисляет цитоплазму.

2.3. Транспорт органических веществ

Создаваемый Na,K -АТФазой градиент Na^+ используется клеткой для транспорта ионов и органических веществ. Так, транспорт углеводов в клетках млекопитающих выполняется с помощью 3 классов транспортеров: Na^+ -зависимых SGLT, а также Na^+ -независимых GLUT и SWEET [48]. SGLT выполняют котранспорт ионов Na^+ и таких углеводов, как глюкоза, манноза и галактоза в клетку. SGLT экспрессируются в эпителии тонкого кишечника и почек, где обеспечивают всасывание углеводов из пищи в просвете кишечника или из первичной мочи соответственно, однако их экспрессия также наблюдается в головном мозге, печени, мышцах, сердце и в других тканях [49]. Некоторые

переносчики аминокислот также сопрягают перенос аминокислот со входом Na^+ в клетку. В основном эти переносчики экспрессируются в почках и кишечнике, однако существуют транспортеры, экспрессирующиеся в широком диапазоне тканей. Одним из транспортеров, обнаруженных во многих тканях, является SLC38A2, который обеспечивает котранспорт таких аминокислот, как аланин, серин, глицин вместе с ионами Na^+ в клетку. [50].

2.4. Na^+/K^+ -градиент связан с внутриклеточной концентрацией АТФ

Na,K -АТРаза является одним из главных потребителей АТФ в клетке. В усредненной человеческой клетке этот фермент потребляет 19-28% АТФ, при этом в почках и в головном мозге этот показатель может увеличиваться примерно до 50% [51]. По этой причине внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение тесно связано с уровнем АТФ. Так, состояния, при которых концентрация АТФ в клетке падает, могут приводить к диссипации Na^+/K^+ -градиента вследствие ингибирования Na,K -АТРАЗы. В то же время повышение внутриклеточной концентрации Na^+ приводит к увеличению активности Na,K -АТРАЗы и, соответственно, к увеличению потребления АТФ. Следует отметить, что в условиях гипоксии происходит глутатионилирование Na,K -АТРАЗы, которое приводит к ее ингибированию и, соответственно, к уменьшению потребления АТФ. По-видимому, этот процесс служит механизмом, обеспечивающим выживание клеток в таких условиях благодаря сохранению достаточного для жизнеобеспечения уровня АТФ [52].

Поскольку в головном мозге Na,K -АТРаза потребляет особенно много АТФ, нейрональная активность, приводящая к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ , может сопровождаться изменением уровня АТФ. Так, было показано, что в пирамидных нейронах зоны CA1 гиппокампа мыши нейрональная активность, вызванная посредством электрической стимуляции аксональных входов, приводит к значительному увеличению внутриклеточной концентрации

Na^+_i как локально в дендритах, так и в соматической области, что сопровождается снижением концентрации АТФ на 0,1–0,6 мМ [53].

Таким образом, соотношение внутриклеточных концентраций Na^+_i и K^+_i тесно связано с большим количеством параметров клетки. Однако возникает вопрос: насколько стабильно это соотношение в тканях и может ли оно изменяться существенно? Ответу на этот вопрос посвящен следующий раздел обзора литературы.

3. Изменение концентраций одновалентных катионов при разных стимулах

В основе явления электровозбудимости клеток лежит поддержание отрицательного потенциала покоя на плазматической мембране. При деполяризации мембраны в результате открытия лиганд-управляемых ионных каналов или при воздействии электрического поля происходит массовое открытие потенциал-чувствительных Na-каналов, что ведет к току Na^+ в клетку. Для быстрого возвращения значения потенциала в отрицательную область активируется выход K^+ из клетки через K-каналы. В связи с этим повторяющаяся электрическая активность клеток может сопровождаться изменением вне- и внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ . Например, показано, что активная физическая нагрузка способна изменять концентрации этих катионов в мышечных клетках. Так, при беге в течение 10-60 мин в камбаловидной мышце крысы (преимущественно содержит медленные волокна) наблюдалось увеличение внутриклеточной концентрации Na^+_i (на ~25-90% от контроля) и уменьшение внутриклеточной концентрации K^+_i (на ~7-12% от контроля), после окончания физической нагрузки концентрация ионов в мышце возвращалась в норму в течение 90 мин, что сопровождалось активацией Na,K-АТФазы [54]. Схожие результаты были показаны с использованием мышей. Так, при плавании мышей с грузом в течение 10-60 мин, а также при висе животных на сетке внутриклеточная концентрация Na^+_i в камбаловидной мышце и двуглавой

мышце увеличивалась вплоть до 200% от контроля, внутриклеточная концентрация K^+_i при этом уменьшалась вплоть до 50% от контроля [55]. Изменение градиента одновалентных катионов при работе мышц было также показано на культуре мышечных миобластов C2C12. Исследователи дифференцировали их в миотубы и подвергали электростимуляции частотой 1 Гц стимулами 40 В в течение 10 мс. Применение этого режима стимуляции в течение 2 ч не оказывало влияния на жизнеспособность клеток, при этом внутриклеточное содержание Na^+_i повышалось до 254%, а внутриклеточное содержание K^+_i уменьшалось до уровня 80% в сравнении с контрольными образцами [56].

Нейроны также являются электровозбудимыми клетками. При проведении потенциалов действия, а также при возникновении постсинаптического потенциала в результате синаптической передачи наблюдается ток ионов через мембрану. Считается, что изменение вне- и внутриклеточных концентраций Na^+_i и K^+_i при этом незначительное, однако ряд работ опровергают это. Так, при индукции долговременной потенциации внутриклеточная концентрация Na^+_i увеличивается на 45 мМ в дендритах и вплоть до значений более 100 мМ в некоторых дендритных шипиках [57]. В других экспериментах на гранулярных клетках мозжечка при аппликации 30 мкМ возбуждающего нейромедиатора глутамата в присутствии 10 мкМ глицина в течение 2 мин наблюдалось увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ в соме нейрона до 65 мМ [58]. Кроме того, было показано, что при стимуляции аксональных входов пирамидных нейронов гиппокампа внутриклеточная концентрация Na^+ увеличивалась как в дендритах (до пиковой концентрации 34 мМ), так и в телах нейронов (до 24 мМ) [59].

С помощью генетически кодируемого сенсора *lc-LysM* *GEPII* было впервые показано, что интенсивная нейрональная активность в головном мозге мышей *in vivo* приводит к небольшому уменьшению внутриклеточной концентрации K^+ . При этом исследователям не удалось перевести данные сенсора в абсолютные значения концентрации ввиду низкой константы диссоциации комплекса *lc-LysM* *GEPII* и иона K^+ (27-60 мМ) [60]. Внеклеточная концентрация K^+ при нейрональной активности, по-видимому, изменяется сильнее внутриклеточной. Например,

измерение внеклеточной концентрации K^+ в коре мозжечка кошки с помощью ион-селективных микроэлектродов показало увеличение этого параметра при повторяющейся стимуляции вплоть до 12 мМ [61]. Кроме того, с использованием наносенсора на основе красителя Potassium Green-2 было показано, что в зоне СА3 гиппокампа мыши при эпилептическом припадке внеклеточная концентрация K^+ может повышаться с 2 до 9,2 мМ [62]. Таким образом, по-видимому, в норме в нейронах электрическая активность приводит к относительно сильному увеличению локальной концентрации Na^+ в отростках нейронов, менее выраженному изменению внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ в теле нейрона и значительному увеличению внеклеточной концентрации K^+ .

Изменение концентрации Na^+ в нейронах также может происходить при патофизиологических состояниях. Так, при ишемическом инсульте возникает гипоксия нервной ткани, которая ассоциирована с увеличением входа Na^+ и Ca^{2+} в клетку. Кроме того, высвобождение глутамата в результате ионного и энергетического дисбаланса клетки ведет к активации AMPA- и NMDA-рецепторов, что также способствует накоплению Na^+ в клетках [63]. К сожалению, мы не смогли найти в литературе точные значения внутриклеточных концентрации ионов в нейронах при ишемии, однако существует ряд исследований, показывающих, что при окклюзии разных артерий головного мозга наблюдается увеличение концентрации Na^+ в ткани (этот параметр включает концентрации Na^+ внутри и вне клетки, а также в интерстициальной жидкости) [64]. Кроме ишемии существует еще одно состояние, возможно связанное с увеличением концентрации Na^+ , – эпилепсия. Это заболевание ассоциировано с мутациями Na-каналов и характеризуется повышенным входом Na^+ в клетку [65].

В невозбудимых тканях также возможны нарушения ионного транспорта. Самым известным примером патологического состояния, при котором происходит такое нарушение, является гипоксия. Гипоксия широко распространена в солидных опухолях. Из-за высокой пролиферативной активности, тесного расположения клеток, а также большой дистанции между клетками и кровеносными сосудами во многих типах опухолей концентрация O_2 уменьшается с 3,9-9,5 до 0,3-2,2%.

Гипоксия ведет к стимуляции множества сигнальных каскадов, которые затрагивают MAPK, NF- κ B, PI3K и HIF, что вносит вклад в васкуляризацию и метастазирование опухоли, а также обеспечивает ее химиорезистентность [66]. Кроме того, гипоксия возникает в результате инсульта или ишемии сердца [67], а также в жировой ткани при ожирении [68]. Влиянию гипоксии на внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение посвящено крайне небольшое количество работ. В одной из них было показано, что длительная аноксия приводила к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ от ~ 20 до ~ 70 мМ и к уменьшению внутриклеточной концентрации K^+ от ~ 150 до ~ 70 мМ. Интересно, что при этом происходило масштабное изменение транскриптома клеток, а значительная часть этих изменений зависела именно от изменения Na^+/K^+ -соотношения, но не от транскрипционного фактора HIF1 α [69]. Еще одна работа указывает на связь внутримитохондриальной концентрации Na^+ с генерацией активных форм кислорода. Исследователи показали, что в клетках эндотелия аорты быка при кратковременной гипоксии (до 30 мин, 1% O_2) наблюдается увеличение внутримитохондриальной концентрации Na^+ . Авторы связывают это с обменом Ca^{2+} на Na^+ через NCLX, при этом источником Ca^{2+} являются кристаллы фосфата кальция в митохондриях, которые растворяются при закислении, вызванном гипоксией. В результате чего повышенная митохондриальная концентрация Na^+ способствует уменьшению текучести внутренней мембраны митохондрий вследствие связывания Na^+ с фосфолипидами мембраны, что замедляет обмен убихинонами между II и III комплексами дыхательной цепи и приводит, таким образом, к генерации АФК [70]. Также имеются сведения, указывающие на то, что ишемия сердца сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации Na^+ до 30-35 мМ [71].

Следует упомянуть, что даже в условиях физиологической нормы в разных невозбудимых тканях может происходить локальное изменение внеклеточных концентраций одновалентных катионов, которое может влиять на их внутриклеточные концентрации. Наиболее экстремальным примером является почка. Так, во внутреннем мозговом веществе почки наблюдается значительное

изменение осмолярности как фильтрующейся, так и межклеточной жидкости – от 300 до ~1000 мОсм, основной вклад в которую вносит концентрация NaCl. Находящиеся там клетки, в первую очередь эпителиальные и эндотелиальные, способны адаптироваться к таким изменениям за счет действия механизмов RVD и RVI, приводящих к изменению внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ [72].

Другим примером является кровь. Хотя концентрация Na^+ в крови в норме изменяется не более чем на 10% и поддерживается на уровне примерно 135–145 мМ [73], при состоянии гипернатриемии этот показатель может увеличиваться вплоть до 170 мМ [74]. Скачки концентрации Na^+ в крови могут быть связаны с избыточным потреблением поваренной соли: так, на сегодняшний день человек в среднем потребляет 3-4,5 г/день против необходимых 0,5 г/день [75]. Множество эпидемиологических исследований доказывает существование корреляции между потреблением поваренной соли и повышением артериального давления (АД) [76]. Кроме того, хорошо известно, что влияние повышенного потребления поваренной соли на АД различается у разных индивидуумов [77].

Одним из механизмов, объясняющих этот феномен, является изменение в работе почек. В норме при повышении АД выделение воды и Na^+ усиливается, пока АД не опускается до нормального уровня. Однако при генетических нарушениях Na^+ -транспортирующих систем (например, синдроме Лидлла, который приводит к увеличению активности ENaC и, соответственно, к усилению реабсорбции Na^+), почки не могут обеспечивать достаточную экскрецию Na^+ и нормализовать АД [78].

Кроме того, осмотически неактивный Na^+ может депонироваться на отрицательно заряженных гликозаминогликанах кожи [79]. Чрезмерное накопление этого катиона при повышенном потреблении соли может вызвать активацию NFAT5 моноядерных клеток, находящихся в коже, что приводит к выделению стимулирующего рост лимфатических сосудов фактора VEGF-C. Разрастающаяся лимфатическая сеть способствует выведению Na^+ из кожи и экскреции его почками. Предполагается, что нарушение механизма активации NFAT5/VEGF-C в моноядерных клетках может способствовать развитию артериальной гипертензии [80].

Эндотелий кровеносных сосудов также играет важную роль в явлении соль-чувствительности. Эндотелиальные клетки обладают развитым слоем гликокаликса толщиной от 0,5 до 4,5 мкм на апикальной стороне (Рис. 4). Основным компонентом гликокаликса являются протеогликаны, состоящие из основного (корового) белка, ковалентно соединенного с множеством цепей гликозаминогликанов (GAG-цепь). Эти цепи сильно сульфатированы, что обуславливает их отрицательный заряд [81].

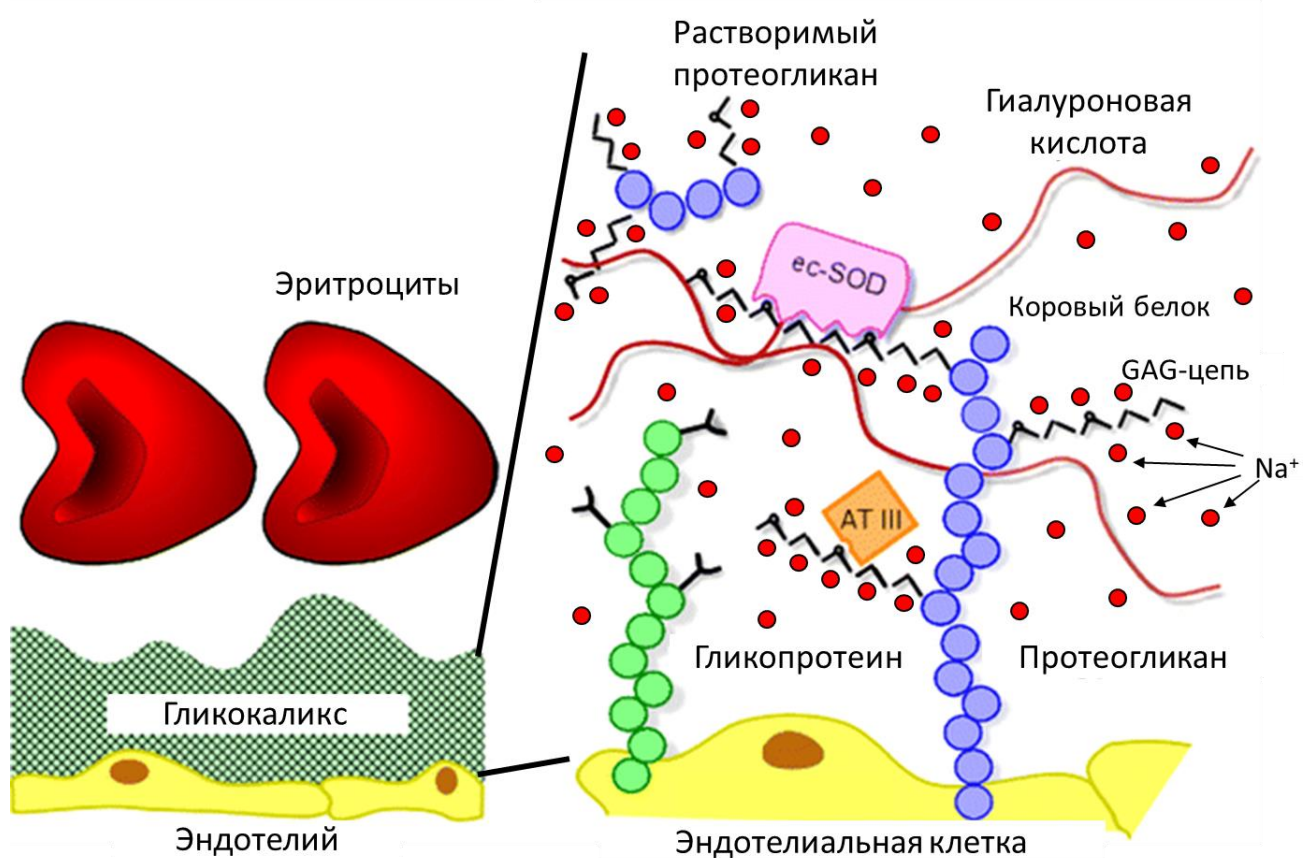


Рис. 4. Эндотелий кровеносных сосудов обладает хорошо развитым гликокаликсом (слева). Схематическое изображение эндотелиального гликокаликса (справа). Он состоит из гликопротеинов и протеогликанов, связанных с мембраной. Протеогликаны состоят из основного (корового) белка и множества цепей гликозаминогликанов (GAG-цепей), которые способны связывать ионы Na^+ . Кроме того, гликокаликс включает растворимые компоненты, такие как гиалуроновая кислота, растворимые протеогликаны (например, тромбомодулин) и различные белки (например, внеклеточная супероксиддисмутаза (ec-SOD) и антитромбин III (AT III)). Из [81] с изменениями.

Отрицательно заряженные GAG-цепи могут связывать ионы Na^+ . Даже при незначительном повышении концентрации Na^+ в крови в присутствии альдостерона

гликокаликс насыщается ионами Na^+ , что облегчает проникновение этого катиона в клетку эндотелия. Тот же эффект наблюдается при обработке клеток гепариназой, которая отщепляет остатки гепаринсульфата, разрушая гликокаликс [82].

Таким образом, Na^+/K^+ -соотношение в клетках далеко не всегда является константой: его изменение происходит не только при патологических состояниях, но и в рамках физиологической нормы. Учитывая важность этого параметра для многих клеточных процессов, можно предположить наличие у клетки способности «чувствовать» внутриклеточные концентрации одновалентных катионов и адаптироваться к ним.

4. Феномен Na^+/K^+ -зависимой регуляции транскрипции

В 1999 г. Orlov et al. показали, что ингибирование Na,K-ATPазы 1 мМ убаином предотвращало апоптоз гладкомышечных клеток сосудов крысы RVSMC, вызванный отсутствием сыворотки в среде или обработкой клеток стауроспорином (ингибитор протеинкиназ A, C и других), либо оадаиковой кислотой (ингибитор протеинфосфатаз PP1 и PP2A). Для реализации этого эффекта необходимым условием было повышение содержания Na^+ в клетках. Следует отметить, что подобное явление характерно не для всех типов клеток: так, убаин не влиял на апоптоз иммортализованных клеток Т-лимфоцитов человека Jurkat, индуцированный стауроспорином [83]. В дальнейшем было показано, что инкубация клеток эндотелия аорты свиньи в среде, не содержащей ионы K^+ (что обеспечивает ингибирование Na,K-ATPазы), предотвращала апоптоз, вызванный отсутствием сыворотки. Кроме того, было показано, что увеличение внутриклеточного содержания Na^+ снижает активацию каспазы-3, вызванную отсутствием сыворотки. При этом сама каспаза-3 не чувствительна к изменению концентраций Na^+ и K^+ в физиологическом диапазоне, что указывает на

присутствие в клетке неизвестного сенсора Na^+ , способного модулировать активность каспазы-3 [84].

В дальнейшем с использованием культуры RVSMC было показано, что подавление апоптоза при увеличении внутриклеточного содержания Na^+_i связано с изменением транскрипции генов и трансляции белка. При этом увеличение внутриклеточного содержания Na^+_i повышает количество синтезированной *de novo* РНК и вместе с тем уменьшает синтез белка в этих клетках [85]. С помощью двумерного электрофореза и тандемной масс-спектрометрии были идентифицированы белки, представленность которых изменяется при инкубации клеток в присутствии 1 мМ убаина в течение 3 ч. Среди этих белков были обнаружены белки семейства HSP70, в том числе морталин. Морталин инактивирует белок p53, таким образом защищая клетки от апоптоза. Оверэкспрессия морталина в этих клетках подавляла работу каспазы-3, однако ее антиапоптотический эффект был значительно менее выражен, чем эффект убаина, что говорит о наличии других механизмов влияния внутриклеточного $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -соотношения на подавление апоптоза [86].

Поскольку антиапоптотический эффект был связан с увеличением синтеза РНК, возникающим уже на первых часах инкубации клеток с убаином, было предположено, что эти эффекты, по крайней мере частично, обусловлены изменением экспрессии генов раннего ответа. Так, было обнаружено, что при ингибировании Na,K-ATPазы (посредством инкубации клеток в среде с убаином или в среде, не содержащей ионы K^+ , в течение 3 ч) наблюдается значительное изменение транскриптома клеток RVSMC, HeLa и HUVEC. Интересно отметить, что аналогичные воздействия в отсутствие вне- и внутриклеточных ионов Ca^{2+} обеспечивали не снижение, а даже увеличение количества дифференциально экспрессирующихся $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -чувствительных генов в этих клетках. Среди таких генов, общих для клеток RVSMC, HeLa и HUVEC, оказались гены раннего ответа, в частности *FOS*, *JUN*, *ZFP36*, *ATF3*, *EGR1* [7]. Среди них наибольший интерес в контексте настоящей диссертации представляет ген *FOS*.

5. Ген *FOS*

FOS относится к генам раннего ответа – классу генов, которые быстро (в течение минут) активируются в результате действия различных стимулов. Индукция транскрипции таких генов не зависит от синтеза транскрипционных факторов *de novo* и не может быть заблокирована ингибиторами синтеза белка [87].

5.1. Функции *FOS*

Ген *FOS* кодирует белок c-Fos, который является субъединицей транскрипционного фактора активирующего белка 1 (AP-1). Фактор AP-1 образуется при димеризации двух белков, принадлежащих подсемействам Fos/FRA (c-fos, v-fos, FosB, Fra1, Fra2), Jun (c-jun (ген – *JUN*), v-jun, junB, junD), JDP (JDP1/2), Maf (v-Maf, c-Maf, Nrl, MafB, MafF, MafG, MafK) и ATF (ATF1-ATF7, B-ATF; ATFa0). Все эти белки содержат высококонсервативный домен лейциновой молнии и ДНК-связывающий домен, которые позволяют им димеризоваться и связываться с ДНК [88]. Долгое время считалось, что белки семейства Fos не способны к гомодимеризации, и Fos функционирует только в составе гетеродимеров, образующихся с белками других подсемейств AP-1. Однако недавнее исследование показало наличие в клетках HeLa гомодимеров c-Fos с K_d $6,7 \pm 1,7$ мкМ (против 10-370 нМ для гетеродимеров c-Fos/c-Jun), причем гомодимеры c-Fos связывались с хроматином, что может указывать на наличие у них активности транскрипционного фактора. Исследователи предполагают, что при гиперэкспрессии c-Fos в клетках в ответ на определенные стимулы возможно образование гомодимеров c-Fos/c-Fos [89]. Фактор AP-1 связывается с последовательностью 5'-TGA(G/C)TCA-3', которая располагается в промоторах и энхансерах генов-мишеней и является элементом ответа на

12-О-тетрадеканоилфорбол 13-ацетат, или сокращенно TRE [88]. Кроме того, некоторые димеры белков семейства AP-1 связываются с элементом ответа на cAMP (CRE) 5'-TGACGTCA-3'. Димеры c-Fos/c-Jun способны к связыванию с CRE в условиях *in vitro*, но с меньшим сродством, чем с TRE. Интересно, что димер c-Fos/c-Jun может связываться с TRE в двух ориентациях, что определяется последовательностями ДНК, которые фланкируют TRE. Разные ориентации димера c-Fos/c-Jun оказывают различное влияние на соседние белки, что влияет на транскрипционную активность контролируемого гена. Показано взаимодействие димера c-Fos/c-Jun с транскрипционными факторами семейств NFAT, Ets и Smad [90].

c-Fos является важным объектом в онкологии. Этот белок играет двойственную роль, оказывая как ингибирующее, так и активирующее действие на рост опухоли. Например, в злокачественных глиомах гиперэкспрессия c-Fos является негативным маркером, в то время как в гепатоцитах он подавляет образование опухоли. Возможно, негативный эффект c-Fos на прогноз течения онкологических заболеваний обусловлен формированием устойчивости к химиотерапии. Известно, что индукция экспрессии c-Fos может увеличивать резистентность опухолевых клеток к действию цисплатина [91]. Кроме того, c-Fos участвует в ответе клетки на повреждение ДНК, обеспечивая повышение транскрипции генов, кодирующих белки репарации, таких как xeroderma pigmentosum group F и G, ДНКазы III, PCNA, ATR [91].

Помимо ДНК-связывающей активности, c-Fos обладает иными функциями. Так, этот белок способен активировать ферменты синтеза глико- и фосфолипидов, увеличивая показатели числа оборотов этих ферментов. Активация происходит при связывании части белка c-Fos, находящейся между 1-179 аминокислотными остатками, с регулируемым ферментом [92].

Несмотря на множество функций, c-Fos не является белком, который строго необходим для выживаемости организма. Так, исследователи получали мутантов мышей с полностью отсутствующей экспрессией этого белка. Мутантные мыши характеризовались повышенной смертностью при рождении, однако по внешним

признакам они не отличались от нормальных мышат. При взрослении ярко проявлялись уменьшение массы тела и аномалии в развитии. У мутантных мышей наблюдались нарушения остеогенеза, гаметогенеза, а также лимфопения. Мутантные мыши были гиперактивны и проявляли ослабленную реакцию на различный стресс. Исследователи предполагают, что отсутствие экспрессии *c-Fos* компенсируется другими факторами семейства *Fos/Fra*, такими как *FosB*, *Fra-1* и *Fra-2*, позволяя мышам выживать [93]. В другом исследовании получали двойных мутантов мышей с полным отсутствием экспрессии *c-Fos* и/или *FosB*. Мутанты в возрасте 19-23 дней характеризовались сниженной массой тела: *FosB*^{-/-} на 8%, *c-Fos*^{-/-} на 40%, *c-Fos*^{-/-} *FosB*^{-/-} на 60% по сравнению с диким типом. Фибробласты, выделенные из эмбрионов мышей *c-Fos*^{-/-} *FosB*^{-/-}, характеризовались медленным ростом. У мутантных фибробластов была сильно снижена активность циклин-зависимой киназы, а также индукция синтеза мРНК циклина D1 под действием сыворотки. Все это свидетельствует о нарушении процесса входа клетки в S-фазу клеточного цикла при одновременном отсутствии экспрессии *c-Fos* и *FosB* [94].

5.2. Регуляция экспрессии гена *FOS*

5.2.1. Регуляция транскрипции *FOS*

Ген *FOS* человека располагается в 14 хромосоме, содержит 4 экзона и 3 интрона, общая длина продукта составляет 380 аминокислот. *FOS* обладает очень сложной системой регуляции на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях. В таблице Таблица 1 приведены основные стимулы, которые приводят к повышению экспрессии этого гена.

Центральное место в регуляции транскрипции *FOS* занимает элемент SRE [95]. Этот элемент связывается с фактором третичного комплекса (TCF) и фактором ответа на сыворотку (SRF) (Рис. 5). Описано три белка, относящихся к подсемейству TCF: Elk1, SAP1 (или Elk4) и SAP2 (или Elk3). Эти белки содержат консервативный Ets домен, который связывается с последовательностью 5'-GGA(A/T)-3' [96]. В условиях *in vitro*, а также в экспериментах с использованием репортерного гена под управлением элемента SRE из гена *FOS* было показано, что среди TCF белков с элементом SRE в составе гена *FOS* связываются Elk1 и в меньшей степени SAP1 [97].

Таблица 1. Основные стимулы, приводящие к изменению количества мРНК *FOS*.

Стимул	Источник
Сыворотка, ростовые факторы EGF, FGF, NGF, PDGF, TNF α , TGF β , IL-1	[98,99]
Активаторы PKC – форболовые эфиры	[98]
Увеличение внутриклеточной концентрации cAMP	[98]
Ультрафиолетовое и γ -излучение	[91,98]
Агонисты Ca $_v$ и Na $_v$	[99]
Гиперосмотический шок	[72,100]
Эмоциональный стресс животного	[101]
Cd $^{2+}$, Zn $^{2+}$	[102,103]
Липополисахариды	[87]
Увеличение внутриклеточного Na $^+$ /K $^+$ -соотношения	[5]
Окислительный стресс	[104]
Факторы, повреждающие ДНК или белки	[105]
Уменьшение внутри- и внеклеточного pH	[106]

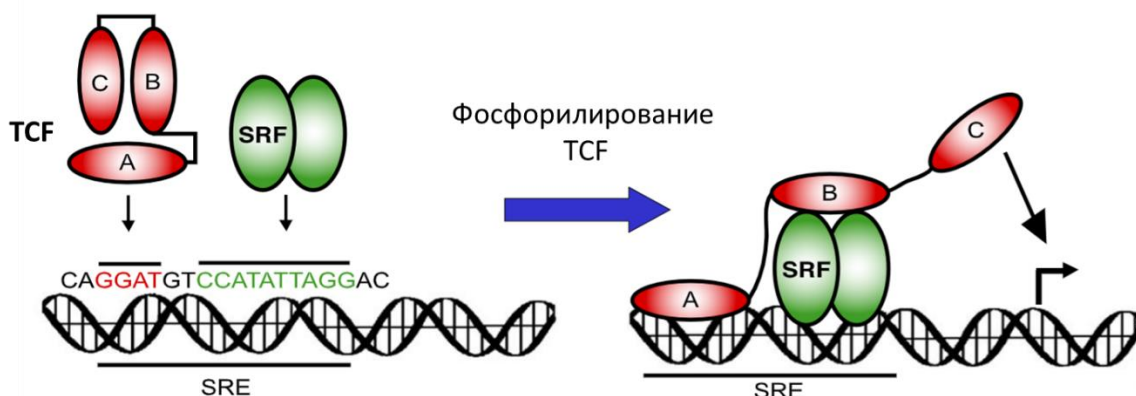


Рис. 5. Элемент SRE в промоторе *FOS* связывается с белком из подсемейства TCF и димером белка SRF. Белок TCF (представлен красным) имеет три домена: A – Ets домен, связывающийся с ДНК; B – домен, связывающийся с SRF; и C – домен, содержащий сайты фосфорилирования MAPK и отвечающий за активацию транскрипции гена *FOS* [96].

По-видимому, в регуляции транскрипции *FOS* немаловажную роль играет состояние хроматина в его промоторной области. В отсутствие ростовых факторов Elk1 сумоилируется, что приводит к привлечению гистондеацетилазы и репрессии транскрипции *FOS* [87]. При активации MAPK-каскада фосфорилирование Elk1 приводит к привлечению ацетилтрансферазы p300, которая ацетилирует гистоны нуклеосомы, формирующейся в участке между -258 – -252 и -97 – -76 п.о. (относительно старта транскрипции) промотора *FOS* (Рис. 6). Это сопровождается увеличением доступности хроматина в участке связывания данной нуклеосомы. В связи с этим авторы полагают, что в результате эта нуклеосома реорганизуется и открывает доступ ядерному фактору I (NF-I) для связывания с промотором *FOS*, что, в свою очередь, приводит к активации транскрипции данного гена [107,108]. Механизм активации при этом неизвестен, однако по сведениям O'Donnell и Sharrocks фактор NF-I привлекает поли(ADP-рибоза)-полимеразу 1 (PARP1) [109]. Важно отметить, что PARP1 может активироваться фосфорилированной формой ERK2, что в свою очередь активирует фосфорилирование фактора Elk1 киназой ERK2 и активирует таким образом транскрипцию *FOS* [110]. Интересно, что сайт связывания NF-I входит в состав области, которая по некоторым данным

обеспечивает чувствительность транскрипции *FOS* к убаину [111], о чем подробнее написано далее.

Гены раннего ответа, в том числе *FOS*, регулируются фосфорилированием H3 гистона, связанного с промотором. Так, индукция экспрессии генов раннего ответа стимуляцией клеток фибробластным эфиром или EGF сопровождалась увеличением уровня фосфорилирования H3 гистона в промоторных областях *FOS* и *JUN*. С использованием нокаутов киназ MSK1/2 и RSK1/2 (киназы, которые способны фосфорилировать гистоны в условиях *in vivo*) было показано, что фосфорилирование H3 в промоторах этих генов обусловлено активностью именно киназ MSK1/2, но не RSK1/2 [112]. Следует отметить, что это не исключает активацию транскрипции *FOS* киназой RSK1/2 через другие механизмы; экспериментальные свидетельства такой активации описаны в литературе [113]. В условиях *in vitro* было показано, что для фосфорилирования гистона H3 в промоторе *FOS* киназой MSK1 необходимо присутствие таких активаторов транскрипции *FOS*, как Elk1, SRF, CREB и ATF1. Причем ATF1 оказывал наименее выраженный эффект, а CREB был наиболее значимым активатором киназы MSK1. При этом фосфорилирование CREB по остатку Ser133 являлось необходимым условием для фосфорилирования H3 промотора *FOS* [114].

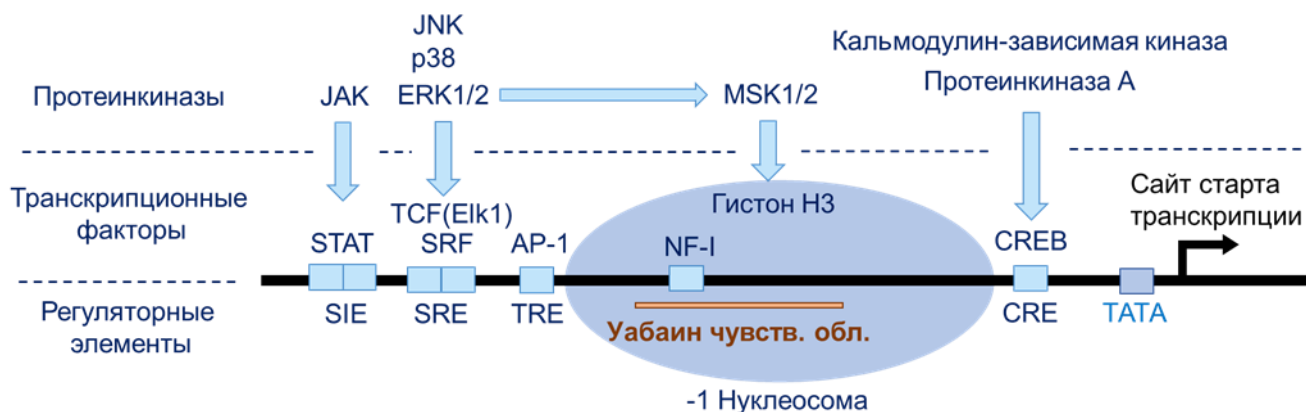


Рис. 6. Основные регуляторные элементы промотора гена *FOS* человека. Представлены элементы, связывающиеся с ними транскрипционные факторы и фосфорилирующие эти факторы протеинкиназы (фосфорилирование показано стрелками). Также показана предполагаемая «убаин-чувствительная область» [111] и относительное расположение регулируемой нуклеосомы промотора [108].

Последовательность SRE (-319 п.о.) в составе промотора *FOS* граничит с *sis*-индуцируемым элементом (SIE) с 5'-стороны (-348 п.о.) и с TRE с 3'-стороны (-303 п.о.). SIE связывается с димерами транскрипционного фактора STAT. Их димеризация происходит при фосфорилировании JAK-киназами в ответ на действие специфических лигандов, таких как колониестимулирующий фактор 1 или PDGF [115]. TRE элемент связывается с фактором AP-1 и, по-видимому, обеспечивает аутоподавление транскрипции гена *FOS* [116].

Кроме того, на -63 п.о. располагается элемент CRE, который связывает димер транскрипционных факторов семейства CREB. Этот белок может фосфорилироваться по остатку Ser133 протеинкиназой A в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации cAMP или кальмодулин-зависимыми киназами при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Фосфорилированный CREB связывается с CRE элементом и активирует транскрипцию *FOS* [115].

Эти четыре элемента – не единственные в промоторе *FOS*, однако сведений по другим регуляторным элементам в его составе гораздо меньше. Так, в промоторе *FOS* также располагаются DRE элемент, связывающийся с транскрипционным репрессором DREAM при низкой внутриядерной концентрации Ca^{2+} и диссоциирующий при ее повышении [117], и *cis*-элемент RCE, который неким образом обеспечивает подавление транскрипции *FOS* при гиперэкспрессии продукта гена ретинобластомы *RB-1* [118].

Транскрипция *FOS* происходит во время так называемых «транскрипционных всплесков». При повышении концентрации активирующего транскрипцию *FOS* фактора происходит увеличение частоты возникновения этих всплесков. С использованием клеток остеосаркомы человека U2OS при активации транскрипции *FOS* с помощью сыворотки, воздействия Zn^{2+} или флорболового эфира было показано, что 1 мРНК *FOS* синтезируется примерно 1 мин, при этом на каждой аллели гена «транскрипционный всплеск» длится в среднем 3-4 мин, а пауза между «всплесками» продолжается около 9-11 мин. За один «всплеск» синтезируется несколько десятков транскриптов. Крайне интересным фактом является неоднородность клеток в популяции одной клеточной линии в отношении

ответа *FOS* на стимуляцию. Так, низкие концентрации Zn^{2+} активировали существенный ответ *FOS* в единичных клетках, в то время как большинство других клеток не отвечало на данный стимул, при этом оценка количества мРНК с помощью количественной ПЦР во всей популяции клеток не показала отличий от контрольных образцов [103].

Помимо регуляции инициации транскрипции, *FOS*, как и многие другие гены раннего ответа, обладает регуляцией на уровне элонгации транскрипции. Так, комплекс РНК-полимеразы II с рядом белков, среди которых NELF и DSIF, останавливается на уровне промотора гена, в результате чего дальнейшая элонгация транскрипции без стимуляции затруднена. Стабильный нокдаун белка NELF в клетках гипофиза крысы приводил к изменению ответа *FOS* на различные стимулы, причем направление такой модуляции было специфичным к стимулу. Исследователи предполагают, что это связано с наложением прямого негативного эффекта NELF на элонгацию транскрипции *FOS* и непрямого эффекта этого белка, заключающегося в его действии на компоненты сигнальных каскадов [119].

Основными регуляторами экспрессии гена *FOS* являются MAPK. Они представляют собой цитоплазматические серин/треониновые протеинкиназы, которые контролируют все уровни регуляции экспрессии этого гена. Эти киназы включают в себя несколько семейств, среди которых выделяется три наиболее изученных: активируемые внеклеточными стимулами киназы ERK (ERK1–ERK8), p38 киназы ($p38\alpha/\beta/\gamma/\delta$) и киназы N-конца белка c-JUN JNK (JNK1–3). Активность этих киназ в основном регулируется их фосфорилированием вышестоящими киназами. Так, для каждого семейства MAPK характерны свои многоступенчатые сигнальные каскады, состоящие как минимум из трех компонентов (Рис. 7). В результате проведения сигнала MAPK фосфорилируются MAP2K (киназа MAPK), которые фосфорилируются MAP3K (киназа киназы MAPK) и так далее. Сами MAPK могут фосфорилировать транскрипционные факторы, ионные каналы и переносчики, протеинкиназы, которые называются MAPKAPK (протеинкиназы, активируемые MAPK), а также другие белки клетки [120]. Транскрипция гена *FOS* регулируется MAP-киназами ERK1/2 [109], p38 и JNK [121], что, скорее всего,

связано с возможностью фосфорилирования транскрипционного фактора Elk1 этими киназами. Показано, что MAPKAPK семейства RSK регулируют транскрипцию *FOS* и фосфорилируют белок c-Fos и c-Jun [113].

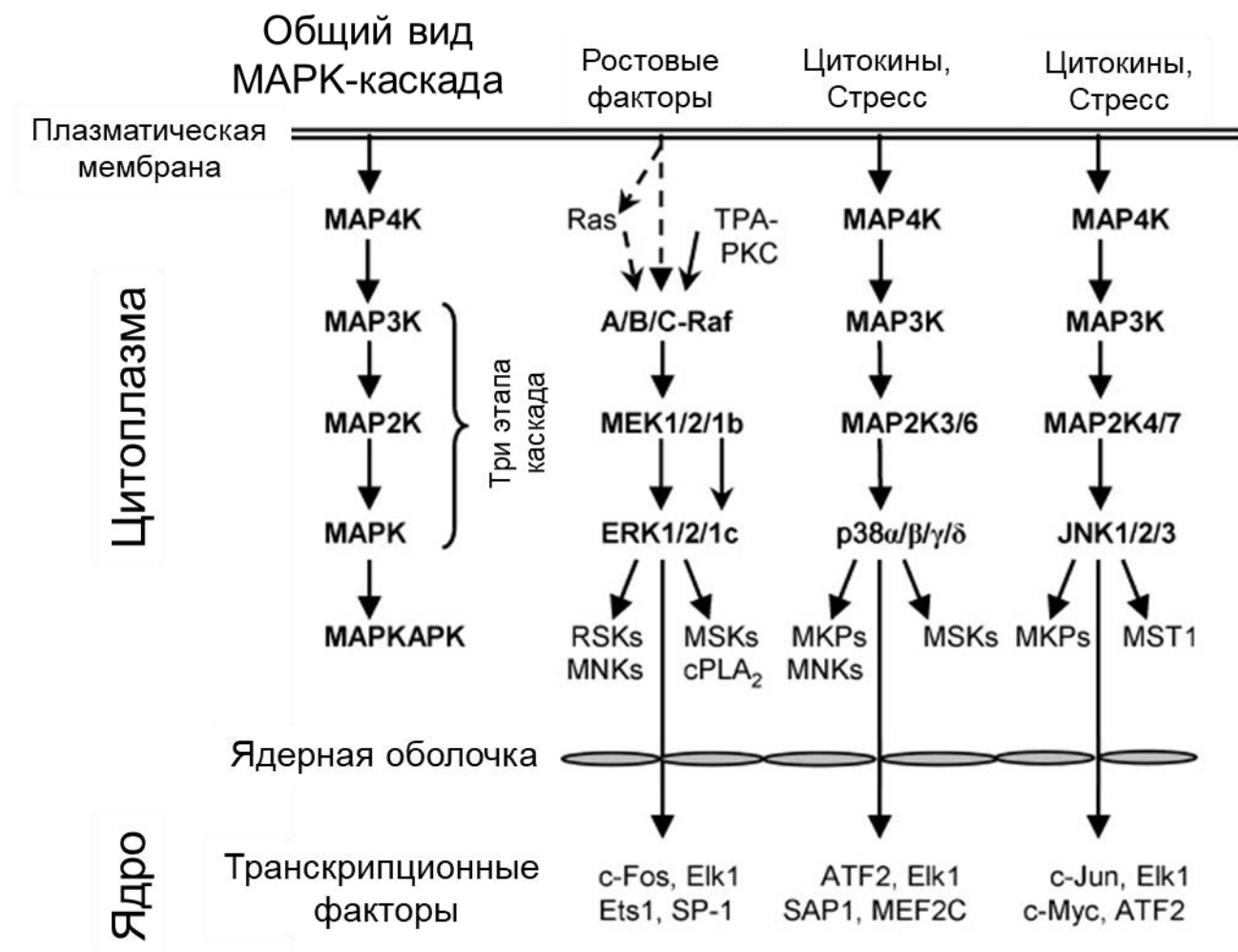


Рис. 7. Классические MAPK-каскады. Внеклеточные факторы вызывают фосфорилирование MAPK по каскаду MAP4K, MAP3K, MAP2K, MAPK. MAPK могут фосфорилировать MAPKAPK и входить в ядро и фосфорилировать различные транскрипционные факторы. TPA-PKC – протеинкиназа C, активированная фторболовым эфиром. Из [120] с изменениями.

5.2.2. Регуляция гена *FOS* на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях

Количество мРНК *FOS* регулируется ее 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО). Исследователи получали генетические конструкции, содержащие разные части генов *FOS* человека и β -глобина, сшитые между собой. Конструкции, содержащие промотор, 5'-НТО и кодирующую часть *FOS*, а также 3'-НТО β -глобина отличались повышенным базовым уровнем мРНК, при этом стимуляция сывороткой приводила к слабой индукции экспрессии гена *FOS* в составе такой конструкции, в отличие от *FOS* дикого типа [122]. Быстрая деградация мРНК *FOS* (время полужизни <30 мин) обусловлена двумя факторами.

Первый – наличие в 3'-НТО нескольких повторов AUUUA, эта последовательность называется AU-богатым элементом (ARE). Элемент ARE связывается со специализированными белками, каждый из которых опосредует либо стабилизацию, либо деградацию мРНК [123]. Интересно, что среди этих белков выделяется тристетрапролин – продукт гена раннего ответа *ZFP36*, экспрессия которого значительно увеличивается при повышении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения [7]. Связывание этих белков с ARE регулируется MAPK. Так, было показано, что при обработке клеток ростовыми факторами p38 обеспечивает фосфорилирование белка HuR, что приводит к диссоциации его комплекса с мРНК *FOS*. С освобожденным ARE связывается белок KSRP, который стимулирует деградацию мРНК и обеспечивает быстрое падение ее концентрации в клетке [123].

Второй фактор – последовательность mCRD, которая в мРНК *FOS* располагается в позиции от +391 до +709 п.о. относительно старт-кодона. Эта последовательность опосредует деградацию РНК в процессе трансляции. Предполагается, что она образует мостик с 3'-НТО через комплекс белков, который стабилизирует РНК и разрывается во время прохождения РНК через рибосому, что привлекает нуклеазы к 3'-концу РНК [124].

В клетке белок c-Fos в основном аккумулируется в ядре. Этому способствует наличие в 3'-НТО мРНК последовательности длиной 145 оснований, которая позволяет ей транслироваться в перинуклеарной зоне цитоплазмы [125]. Также локализация белка c-Fos может контролироваться клеткой на посттрансляционном уровне. Так, в условиях депривации сыворотки в фибробластах мыши и человека наблюдается выход белка c-Fos в цитоплазму [126]. Белок c-Fos обычно имеет очень небольшое время полужизни – меньше часа. Удивительно, что деградация c-Fos в протеасоме не зависит от наличия убиквитиновой метки на нем (хотя часть белка и может убиквитинилироваться). Время полужизни c-Fos зависит как от С-, так и от N-концов белка. Например, оно может модулироваться фосфорилированием остатков Ser на С-конце киназами ERK1/2 и RSK1/2 [127].

5.2.3. Na^+/K^+ -зависимая регуляция экспрессии гена *FOS*

Изучение регуляции экспрессии *FOS* внутриклеточным Na^+/K^+ -соотношением проводилось ранее. Так, было показано, что увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ в гладкомышечных клетках аорты крысы путем ингибирования Na,K-АТФазы приводит к сильному увеличению экспрессии *FOS* как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Была определена кинетика накопления и деградации продуктов этого гена (Рис. 8). В этой работе также показано, что увеличение внутриклеточного содержания Na^+ влияет на экспрессию *FOS* даже в отсутствие вне- и внутриклеточных ионов Ca^{2+} [5]. В другой работе с использованием клеток аденокарциномы человека HeLa наблюдались те же эффекты. В то же время было показано, что убаин не активирует киназы ERK1/2, а специфический ингибитор киназ MEK1/2, которые фосфорилируют ERK1/2 и являются MAP2K, не подавляет индукцию экспрессии *FOS* при действии убаина [6]. Еще в одном исследовании было продемонстрировано, что электростимуляция миотуб мыши C2C12 приводит к увеличению внутриклеточного

$\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -соотношения. В клетках, подвергнутых электростимуляции или действию убаина, наблюдалось увеличение экспрессии *FOS*. При этом убаин не приводил к фосфорилированию ERK1/2, JNK1/2, Akt, CREB и ATF1 [128].

В другой работе с использованием кардиомиоцитов крысы было показано, что индукция транскрипции *FOS* посредством ингибирования Na,K-АТФазы (в присутствии 100 мкМ убаина) полностью подавляется ингибитором кальмодулина и частично подавляется ингибиторами PKC и киназы MEK [129]. Таким образом, $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -зависимая регуляция экспрессии гена *FOS* носит тканеспецифичный характер. Среди ряда клеточных линий наибольшая активация *FOS* при инкубации клеток в присутствии убаина наблюдалась в случае клеток аденокарциномы человека HeLa и эпителия почки собаки C11-MDCK, в то время как другой клон эпителия почки собаки C7-MDCK и фибробласты мыши NIH 3T3 отвечали на убаин значительно слабее, при этом активации экспрессии *FOS* в миоблестах сердца крысы H9C2 не происходило вовсе [6]. Следует отметить, что в этой работе использовали лишь одно время инкубации (5 ч), в связи с чем нельзя исключать активацию *FOS* в изученных клеточных линиях при другом времени воздействия убаина.

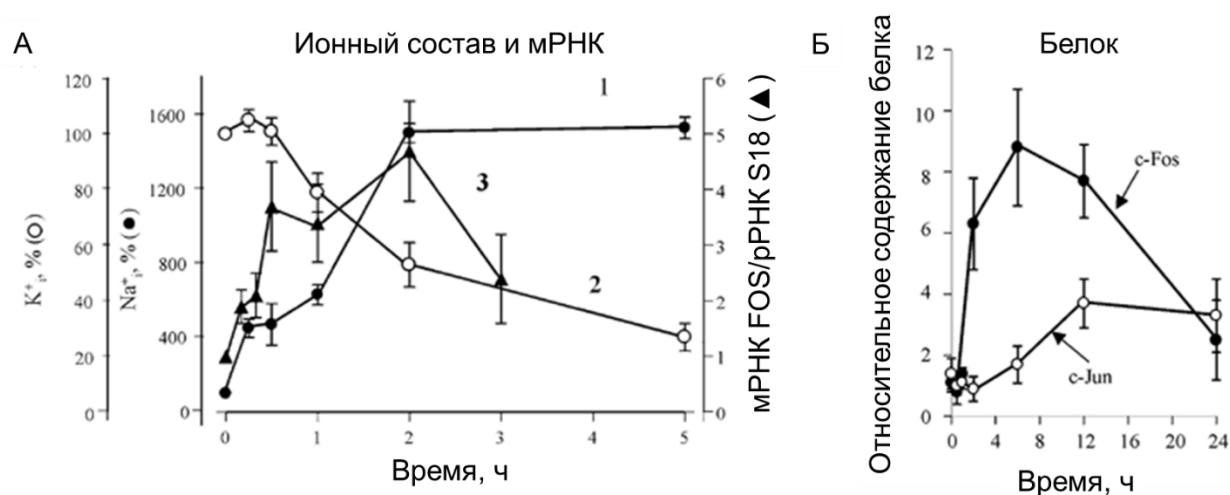


Рис. 8. Кинетика изменения внутриклеточных концентраций Na^+_i (1), K^+_i (2) отношения мРНК *FOS* к *S18* рРНК (3) (А), а также содержания белков *c-Fos* и *c-Jun* (Б) в гладкомышечных клетках аорты крысы при ингибировании Na,K-АТФазы в присутствии 1 мМ убаина [5].

Было предпринято несколько попыток определения регуляторных участков гена *FOS*, которые необходимы для индукции его экспрессии в ответ на увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения. Так, клетки RVSMC трансфицировали коммерчески доступной системой плазмид, кодирующих репортерные гены под управлением промоторов, содержащих участки связывания транскрипционных факторов Elk1, SRF, CREB и AP-1. Инкубация этих клеток в присутствии 1 мМ убаина в течение 6 ч не приводила к активации экспрессии репортерного белка во всех вариантах используемых плазмид. Напротив, было показано даже уменьшение транскрипционной активности плазмид, содержащих сайты SRF и AP-1 [5]. Здесь следует отметить, что данный подход имеет ряд ограничений. Во-первых, был использован синтетический промотор, лишенный кодирующей части *FOS* и сложной системы регуляции этого гена, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Во-вторых, измерение количества репортерного белка проводили только спустя 6 ч после начала инкубации, что в случае гена раннего ответа не дает полной картины: исследователи могли не попасть во временное окно действия транскрипционных факторов на *FOS*.

В другой работе авторы использовали стабильно трансфицированные фибробласты мыши, содержащие ген *FOS* человека с его 5'-фланкирующей областью до -700 п.о. (относительно старта транскрипции), при этом 3'-конец гена в работе не указан явно. Путем внесения делеций в 5'-фланкирующую область этого гена было показано, что убаин активировал экспрессию *FOS* человека только при наличии либо SRE-элемента, либо области между -123 и -222 п.о. относительно старта транскрипции (указана на рисунке Рис. 6 как «убаин-чувствительная область»). В этой области находится сайт связывания фактора NF-I, и, кроме того, эта область является частью регулируемой нуклеосомы промотора *FOS*. Следует отметить, что в этой работе также было показано, что ингибирование РКА и РКС не приводит к подавлению эффекта убаина на транскрипцию *FOS* [111].

В следующем разделе мы обсудим возможные механизмы, лежащие в основе Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии *FOS*, которые подвергались верификации в ходе выполнения этой диссертационной работы.

6. Возможные механизмы регуляции количества мРНК *FOS* одновалентными катионами

6.1. Сигнальная функция Na,K-АТРазы

Известно, что Na,K-АТРаза является партнером для множества внутриклеточных белков. Наиболее изученным возможным партнером Na,K-АТРазы является Src-киназа. Считается, что связывание убаина с Na,K-АТразой приводит к активации Src-киназы, что в конечном итоге ведет к фосфорилированию ERK1/2 через EGFR-Src-Ras-Raf-MEK-ERK1/2 путь. Активация Ras, помимо всего прочего, приводит к генерации активных форм кислорода в митохондриях [130]. Следует однако отметить, что прямое взаимодействие Src-киназы и Na,K-АТРазы в клетках подвергается сомнению [131]. Также существуют данные об активации PI3K-Akt-mTOR пути в кардиомиоцитах и фибробластах при связывании низких концентраций КТС с Na,K-АТразой. При этом данный эффект был независим от активации Src-киназы [131].

Можно предположить, что изменение соотношения внутриклеточной концентрации Na^+_i к внеклеточной концентрации K^+_i изменяет соотношение конформаций Na,K-АТРазы E1/E2 в мембране, что влияет на Src-киназу. Было показано *in vitro*, что Na,K-АТРаза, стабилизированная в E2P-конформации, стимулирует аутофосфорилирование Src-киназы, в то время как E1P-конформация фермента не оказывала такого воздействия. Также уменьшение внеклеточной концентрации K^+ приводило к аутофосфорилированию Src в клетках, в то время как уменьшение внеклеточной концентрации Na^+ до 15 мМ (ионная сила компенсировалась хлоридом холина) приводило к уменьшению уровня аутофосфорилирования Src, что, как полагают исследователи, связано с уменьшением внутриклеточной концентрации Na^+_i . Исследователи связывают такой эффект именно с изменением соотношения E1/E2 конформаций Na,K-АТРазы

[132], гипотетический механизм этого явления изображен на рисунке Рис. 9. Этот феномен подтверждается другой работой, в которой методом флуориметрии при постоянном потенциале с помощью тетраметилродамин-6-малеимида было показано, что уменьшение внеклеточной концентрации K^+ или увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ ведет к накоплению E2 конформации Na,K-АТРаза в клетке [133]. Таким образом, работа Na,K-АТРаза может быть сопряжена с передачей сигнала в клетку.

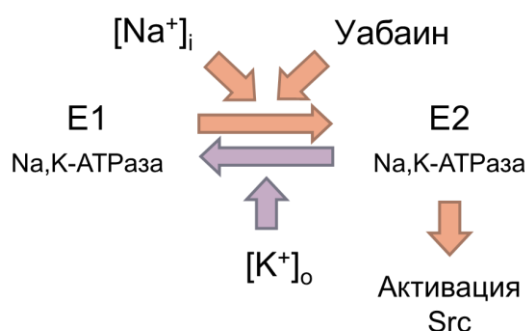


Рис. 9. Гипотетический механизм регуляции Src-киназы внутриклеточной концентрацией Na^+ и внеклеточной концентрацией K^+ . Предполагается, что стабилизация Na,K-АТРаза в E2 конформации приводит к аутофосфорилированию Src-киназы и ее активации. Na,K-АТРаза в ходе своего каталитического цикла переходит из E1 в E2 и обратно. E1 конформация чувствительна к внутриклеточной концентрации $[Na^+]_i$, увеличение которой приводит к сдвигу равновесия в сторону E2. Конформация E2, в свою очередь обладает чувствительностью к внеклеточной концентрации $[K^+]_o$, увеличение которой приводит к сдвигу равновесия в сторону E1. Убаин обладает наибольшим сродством к E2P конформации (частному случаю E2) и стабилизирует Na,K-АТРаза в этой конформации [132].

6.2. G-квадруплексы и концепция «натрий-калиевого переключателя»

Известно, что нуклеиновые кислоты могут образовывать различные вторичные структуры в зависимости от последовательности нуклеотидов и условий. Так, при взаимодействии четырех гуаниновых остатков из 4 участков нуклеиновой кислоты посредством образования Хугстиновских водородных связей

образуется плоская G-тетрада. Эти структуры могут наслаиваться друг на друга благодаря π - π стэкинг-взаимодействию, образуя стопку. Три и более наложенных друг на друга G-тетрады образуют структуру, называемую G-квадруплексом (G4), которая показана на Рис. 10 [134].

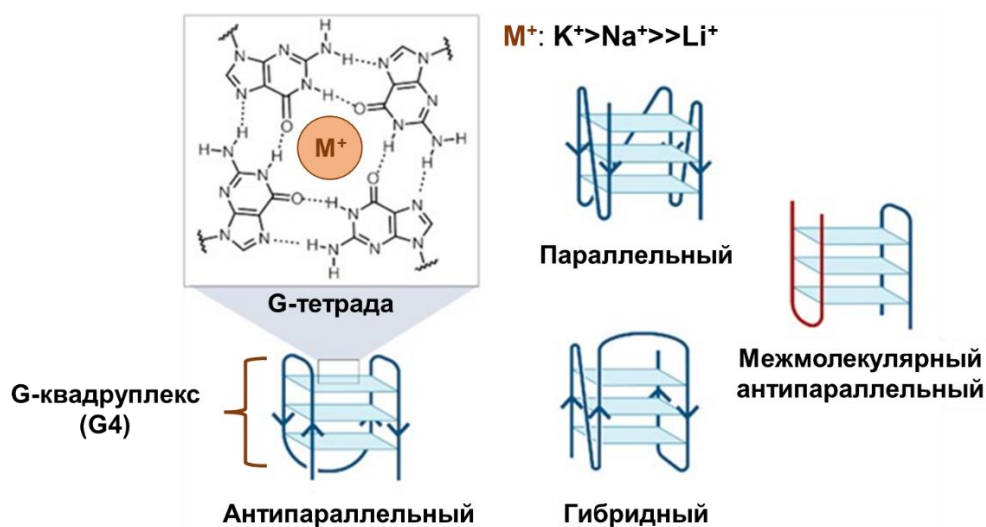


Рис. 10. Схематическое строение G-квадруплексов (G4). Эти структуры образуются при наложении трех и более G-тетрад друг на друга. G-тетрады формируются при взаимодействии четырех остатков гуанина, которые координируются катионами металлов. Термостабильность G4 уменьшается в ряду K⁺, Na⁺, Li⁺. G4 имеют различную топологию в зависимости от направления нуклеиновой кислоты, формирующей их. G4 могут образовываться как внутри одной молекулы нуклеиновой кислоты, так и при взаимодействии нескольких молекул нуклеиновой кислоты. Из [135] с изменениями.

G4 могут иметь различную топологию в зависимости от последовательности и внешних факторов (Рис. 10). Их классифицируют как минимум по двум признакам. Во-первых, G4 подразделяют на внутримолекулярные, которые образованы одной молекулой нуклеиновой кислоты, и на межмолекулярные, в состав которых входят цепи из разных молекул нуклеиновых кислот, причем такие G4 могут содержать цепи ДНК и РНК одновременно. Во-вторых, тип G4 определяется направлением цепей, образующих его. Когда все 4 цепи направлены в одну сторону, G4 относят к параллельному типу. В антипараллельном G4 одна пара цепей направлена в одну сторону, а другая в противоположную. Гибридный G4 характеризуется направлением 1 цепи в противоположную от других сторону [134].

Потенциальные участки, которые могут формировать G4 (PQS, Putative Quadruplex Sequences), находят в широком спектре живых организмов от прокариот до высших эукариот. PQS обнаружены как в составе геномной ДНК, в особенности в теломерной ДНК, так и в составе РНК [134]. Интересно, что теломеры содержат повторы, богатые остатками гуанина, к примеру, теломерная ДНК млекопитающих представлена повторами TTAGGG. Это позволяет им формировать G4. Также этими структурами богаты промоторы протоонкогенов, в связи с чем G4 из промоторов протоонкогенов *MYC* и *KIT* стали классическими моделями для изучения этих структур. Судя по всему, такие G4 связываются с белками, которые обеспечивают подавление транскрипции этих протоонкогенов [136].

G4 стабилизируются катионами, в основном одновалентных металлов. Считается, что наиболее стабильные структуры образуются при связывании ионов K^+ , менее стабильные – при связывании Na^+ , а самые нестабильные – при связывании Li^+ (Рис. 10). Катионы входят в центральный канал G4 и образуют координационные связи с атомами кислорода в 6-м положении гуанинов. При этом Na^+ располагается в плоскости G-тетрады и образует 4 координационные связи, в то время как K^+ находится между двумя G-тетрадами и образует по 4 координационных связи с обеими тетрадами [137].

Конформация G4 чувствительна именно к соотношению катионов, в частности Na^+/K^+ . Так, в 90-х годах прошлого века методом электрофореза было показано, что для формирования G4 теломерных ДНК инфузорий родов *Oxytricha* и *Tetrahymena* необходимо определенное соотношение Na^+/K^+ : в средах с очень низким содержанием одного из этих ионов G4 не формируются. Авторы назвали это явление «натрий-калиевым переключателем» (sodium-potassium switch) [138]. В дальнейшем этот удивительный феномен изучался с существенными ограничениями. Практически все работы, посвященные изучению металл-зависимым свойствам G4, выполнены в системах *in vitro* с использованием коротких синтезированных олигонуклеотидов. При этом в большинстве работ изучается влияние либо полной замены одного катиона в экспериментальном

растворе на другой, либо градуальное изменение концентрации одного катиона (чаще всего K^+) в отсутствие других катионов.

В одном из исследований с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма было показано, что G4 теломерной ДНК человека образуется как в присутствии K^+ , так и в присутствии Na^+ , однако спектральные свойства этой структуры зависят от Na^+/K^+ -соотношения. Значение $EC_{50} (K^+)$ для такого перехода в растворе, содержащем постоянную суммарную концентрацию одновалентных катионов $[Na^+] + [K^+] = 150 \text{ mM}$, составляет 15-20 mM. Исследователи также изучили кинетические свойства перехода этого G4 из Na^+ - в K^+ -форму. Они обнаружили, что этот переход происходит в две стадии и не требует полного разворачивания структуры G4, при этом обмен связанного с G4 Na^+ на K^+ занимает десятки секунд [139].

Формирование G4 может регулировать транскрипцию генов как в сторону активации, так в сторону ее подавления. С одной стороны, G4 выступают стерическими препятствиями на пути таких ферментов, как РНК-полимераза. С другой стороны, они могут взаимодействовать с белками или с РНК, осуществляя более тонкую регуляцию. Так, G4 могут связывать некоторые факторы ремоделирования хроматина с большим сродством, чем двойная спираль ДНК [136].

Подытоживая всю информацию, рассмотренную в разделе «Обзор литературы», мы можем сделать следующий вывод: механизм, обеспечивающий индукцию экспрессии гена *FOS* при увеличении внутриклеточного Na^+_i/K^+_i -соотношения неизвестен. Эта работа посвящена дальнейшему изучению явления Na^+_i/K^+_i -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках человека и разбита на две части. Первая часть посвящена регуляции *FOS* в клетках эндотелия при изменении осмолярности внеклеточной среды. Данная часть отвечает на два вопроса: какова роль изменения объема клетки в Na^+_i/K^+_i -зависимой регуляции экспрессии *FOS*, а также может ли изменение внеклеточной концентрации Na^+_o в физиологическом диапазоне влиять на ионный баланс клетки эндотелия и приводит ли это к индукции экспрессии *FOS*? Вторая часть диссертации посвящена непосредственному

изучению механизма $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках HeLa. Эта культура выбрана по двум причинам. Во-первых, было показано, что индукция экспрессии *FOS* в ответ на увеличение внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения в клетках HeLa и HUVEC схожа [7]. Во-вторых, это более удобная и дешевая в работе культура, по сравнению с первичной культурой HUVEC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МАТЕРИАЛЫ

Клетки HUVEC были приобретены у Cell Applications (#200-05n, США). Клетки HeLa любезно предоставлены кандидатом биологических наук Сидоренко Светланой Вадимовной. Для культивирования эндотелиальных клеток использовали ростовую среду Endothelial growth medium (#213-500, Cell Applications, США), а для культивирования клеток HeLa среду DMEM (ПанЭко, Россия) в присутствии эмбриональной бычьей сыворотки (Cytiva, США). RbCl был приобретен у фирмы Chem-Impex (США), NaCl у MP Biomedicals (США), маннитол у AppliChem (Германия). Ингибирование Na,K-АТФазы и ENaC обеспечивали убаином и амилоридом фирмы Sigma (США). Определение объема внутриклеточной воды проводили с использованием [^{14}C]-мочевины (PerkinElmer, США). Остальные реактивы для работы с клетками были приобретены в фирме ПанЭко, Россия. Пластиковые планшеты, матрасы и пипетки покупали у фирмы Corning (США).

Для ингибирования MAP-киназ использовали BVD-523 (Cayman Chemical, США), любезно предоставленный Моисеевой Натальей Ивановной, а также SP600125 (Calbiochem, США) и SKF-86002 (Calbiochem, США), любезно предоставленные Воротниковым Александром Вячеславовичем.

Для выделения РНК, обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени использовали наборы Quick-RNA (Zymo Research, США), ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, США) и набор реагентов R-402 с Taq ДНК-полимеразой в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, Россия) соответственно.

Для проведения вестерн-блоттинга использовали буфер для анализа радиоиммунопреципитации RIPA PierceTM (ThermoFisher Scientific, США), коктейль

ингибиторов протеаз (P8340, Sigma, США), коктейль ингибиторов фосфатаз (78426, Thermofisher Scientific, США), PMSF (Sigma, США), тиорфан (Cayman Chemical Company, США), моноклональные антитела кролика (Cell Signaling, США), специфичные к ERK1/2 (4695), фосфо-ERK1/2 (4377S), JNK (9252), фосфо-JNK (46689), p38 (9212) и фосфо-p38 (9211S); антитела козы, специфичные к иммуноглобулину G кролика и конъюгированные с пероксидазой хрена (sc-2004, Santa Cruz, США), и набор для проведения усиленной хемолюминисценции SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermofisher Scientific, США). Измерение концентрации белка проводили с использованием набора Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermofisher Scientific, США).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Культивирование клеток

Клетки культивировали в инкубаторе SANYO (Япония) при 37 °C и 5% CO₂, заменяя ростовую среду каждые 3 дня. В качестве ростовой среды для клеток HUVEC использовали Endothelial growth medium (Cell Applications, США), а для клеток HeLa использовали DMEM, содержащий 10% FBS. Для открепления клеток от подложки использовали 0,05% раствор трипсин-ЭДТА. Ингибирование трипсина проводили средой DMEM, содержащей 10% FBS. Подсчет клеток производили в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Клетки HUVEC культивировали до 3 пассажа. Поскольку ген *FOS* обладает SRE элементом, обеспечивающим транскрипцию этого гена в присутствии сыворотки [95], перед экспериментом мы проводили депривацию сыворотки. Для этого, за 24 ч до начала экспериментальных воздействий клетки помещали в среду Endothelial basal medium

(в случае HUVEC), либо в среду DMEM (в случае HeLa), содержащую 0,1% FBS, если не сказано иное.

Для криоконсервации клетки выращивали в культуральном матрасе с площадью 75 см² до 80-90% конфлюентности. Клетки открепляли, определяли концентрацию клеток в полученной суспензии, центрифугировали 3 мин при 300 g и ресуспендировали в среде для заморозки, состоящей из 50% FBS, 40% DMEM и 10% ДМСО. Полученную суспензию распределяли по криопробиркам по 1 мл с концентрацией клеток 2 млн/мл. Клетки замораживали в пенопластовом контейнере при -80°C в течение суток, после чего перекладывали в криохранилище с жидким азотом и хранили вплоть до 3 лет.

Для разморозки клеток криопробирку помещали в водяную баню при 37 °C на 2-3 мин, после чего вносили все содержимое пробирки в 10 мл ростовой среды. Полученную суспензию центрифугировали 3 мин при 300 g, супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 15 мл ростовой среды и помещали в матрас для культивирования на 75 см².

2. Изменение осмолярности внеклеточной среды для манипуляции клеточным объемом HUVEC

Для манипуляции объемом клеток HUVEC мы использовали два типа воздействия: гиперосмотическое сжатие, которое происходит при увеличении осмолярности внеклеточной среды и так называемое изоосмотическое сжатие, которое происходит в изоосмотической среде после предварительной инкубации клеток в гипоосмотической среде. Так, в гипоосмотических условиях объем клетки увеличивается, однако после этого клетка возвращает свой объем в норму за счет действия RVD, после чего повышение осмолярности среды до обычного уровня приводит к сжатию клетки. Инкубацию клеток проводили в 6-луночных планшетах. По достижении 80-90% конфлюентности клетки промывали дважды 2 мл ростовой

среды, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ HEPES-Трис, pH 7,4. Затем клетки инкубировали 30 мин в 0,5 мл изоосмотической (293 мОсм) среды А (135 мМ NaCl, 3,8 мМ KCl, 1,2 мМ MgSO₄, 1,3 мМ CaCl₂, 1,2 мМ KH₂PO₄, 10 мМ D-глюкозы, 10 мМ HEPES/NaOH, pH 7,4), изоосмотической (302 мОсм) среды Б, не содержащей ионы Na⁺ (изоосмотическая среда А, где NaCl был заменен на хлорид N-метил-D-глюкамина (NMDG)) или гипоосмотической (197 мОсм) среды В (изоосмотическая среда А, где концентрация NaCl снижена до 85 мМ). Гиперосмотическое сжатие проводили добавлением в изоосмотическую среду А или Б равного объема той же среды, дополнительно содержащей 300 мМ маннитола (конечная осмолярность 435 мОсм), с последующей инкубацией в течение 30 мин. Для выполнения изоосмотического сжатия клетки инкубировали 30 мин в гипоосмотической среде В, после чего в лунки вносили ту же среду, содержащую 185 мМ NaCl, до конечной концентрации NaCl 135 мМ и инкубировали 30 мин. Осмолярность сред измеряли осмометром Knauer (Берлин, Германия). Кроме того, клетки инкубировали в изоосмотической среде А с добавлением 0,1 мкМ убаина в течение 60 мин для ингибирования Na,K-АТРазы.

Также мы проводили эксперименты по изучению влияния увеличения внеклеточной концентрации Na⁺_o в пределах физиологической нормы этого параметра в крови на экспрессию гена *FOS* в клетках HUVEC. Инкубацию клеток проводили в 6-луночных планшетах. По достижении 80-90% конfluence среды заменяли на экспериментальную (с добавлением 15 мМ NaCl до конечной концентрации Na⁺_o 140 мМ) и инкубировали при 37 °С, 5% CO₂ в течение 1-24 ч. В части опытов в экспериментальные среды добавляли 1 мкМ амилорид (ингибитор ENaC [140]) и/или 3 мкМ убаин.

3. Определение объема клеток HUVEC в «реальном времени»

Объем клеток HUVEC определяли методом реконструкции поверхности с помощью 2-х изображений (DISUR). Данный метод основан на получении изображения клетки в двух перпендикулярных плоскостях (вид сверху и вид сбоку, примеры изображены на рис. Рис. 11 А). На основе этих изображений строится модель поверхности клетки (Рис. 11 Б) и рассчитывается ее объем в программном обеспечении MATLAB. Метод подробно описан в [141,142].

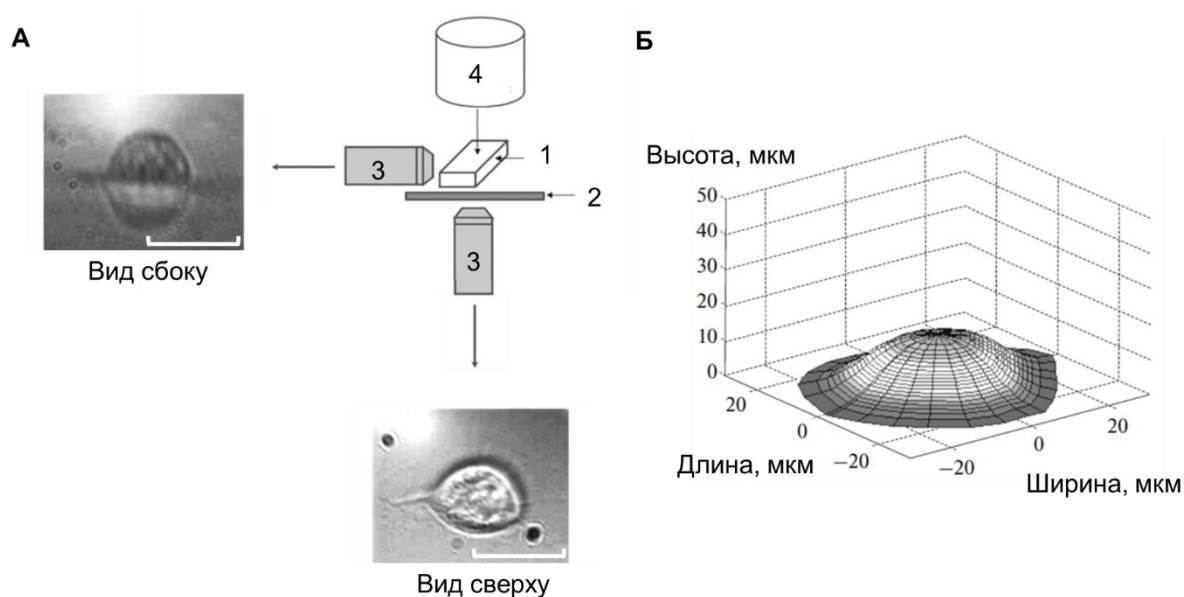


Рис. 11. Схема эксперимента по измерению объема клеток методом DISUR. А – схема установки для получения изображений в двух перпендикулярных плоскостях, 1 – проточная камера с клетками, прикрепленными к покровному стеклу; 2 – столик микроскопа; 3 – объективы, расположенные в перпендикулярных областях; 4 – источник света. В качестве примера показаны изображения клетки аденокарциномы легкого человека A549 с видом сбоку и с видом сверху (длина линейки равна 50 мкм). Б – модель клеточной поверхности, полученная с помощью двух изображений клетки A549 в перпендикулярных плоскостях, которые представлены на панели А. По полученной модели рассчитывается объем клетки. Из [142] с изменениями.

Клетки высаживали в низкой плотности на покровные стекла и инкубировали 24 часа в ростовой среде. Затем стекла помещали в проточную камеру со скоростью течения 1-2 мл/мин при температуре +37 °С. Далее их подвергали изо-/гиперосмотическому сжатию, как описано выше, и получали серию их

изображений в двух перпендикулярных плоскостях в «реальном времени». Изображения клеток в фазовом контрасте с разрешением 512×512 получали с помощью инвертированного микроскопа Nikon TE300 (Nikon Canada Inc., Канада) с использованием двух $20\times$ объективов и двух камер Moticam 350 (Motic Instruments, Канада), расположенных в двух перпендикулярных плоскостях (Рис. 11А).

4. Определение содержания внутриклеточной свободной воды

Для определения внутриклеточных концентраций одновалентных катионов оценивали внутриклеточное содержание воды с использованием равновесного распределения свободно проникающего в клетки осмолита [^{14}C]-мочевины.

Клетки выращивали в 12-луночных планшетах до 80-90% конфлюэнтности и инкубировали в течение 30 мин в 0,5 мл изоосмотической среды А, Б или гипоосмотической среды В. Затем клетки подвергали изо-/гиперосмотическому сжатию, как описано выше, но с добавлением [^{14}C]-мочевины до конечной концентрации в лунке 2 мКи/мл. После окончания инкубации лунки промывали 5 раз 3 мл раствора 100 мМ MgCl_2 , содержащего 10 мМ HEPES-Tris pH 7,4, и лизировали клетки добавлением 1 мл 1% додецилсульфата натрия (SDS), содержащего 4 мМ ЭДТА. Радиоактивность полученного лизата определяли на жидкостном сцинтилляторе TR-1600 (Canberra-Packard Canada, Канада). Объем внутриклеточной воды рассчитывали по формуле 2 и использовали для дальнейшего расчёта внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ .

$$V = \frac{A_c \times V_m}{A_m \times t}$$

Формула 2. V – удельный объем внутриклеточной воды (мкл/мг), A_c – радиоактивность лизата клеток (распадов в минуту), V_m – объем среды, использовавшейся для оценки радиоактивности (мкл), A_m – радиоактивность среды инкубации (распадов в минуту), t – содержание белка в лизате (мг).

5. Определение содержания одновалентных катионов в клетках

После окончания инкубации планшеты помещали в лед, среду отбрасывали, а клетки промывали трижды 3 мл ледяного раствора 0,1 М MgCl_2 , для отмывки поверхностей клеток и стенок лунки от одновалентных катионов. Затем в каждую лунку вносили по 1,5 мл 5% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и инкубировали в течение нескольких часов при +4 °С, после чего содержимое лунок соскабливали и переносили под ламинарным воздушным потоком в пробирки типа эппендорф. Полученные образцы центрифугировали в течение 20 мин при 18000 g при комнатной температуре, супернатант отбирали в отдельные пробирки под ламинарным потоком воздуха, остатки ТХУ аспирировали вакуумным насосом, после чего осадок растворяли в 0,1 М NaOH и определяли концентрацию белка в нем методом Лоури [143].

Отобранный супернатант использовали для определения содержания ионов Na^+ , K^+ , Rb^+ и Li^+ в образцах методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Определение концентрации Na^+ , K^+ , Rb^+ и Li^+ проводили с помощью спектрометра Квант-2м1 (Кортэк, Россия), используя стандартные растворы NaCl (с концентрациями Na^+ от 0,5 до 2 мг/л), KCl (с концентрациями K^+ от 0,5 до 2 мг/л), RbCl (с концентрациями Rb^+ от 0,2 до 4 мг/л), LiCl (с концентрациями Li^+ от 0,5 до 2 мг/л) содержащие 5% ТХУ. Оптическое поглощение Na^+ измеряли при длине волны 589,6 нм, K^+ – при длине волны 766,5 нм, Rb^+ – при длине волны 780 нм, Li^+ – при длине волны 670,8 нм. Для атомизации анализируемых элементов использовали воздушно-пропановую смесь. Полученные значения концентрации ионов нормировали на содержание белка в образце.

6. Регистрация внутриклеточного транспорта Rb^+

В части экспериментов мы оценивали внутриклеточный вход Rb^+ , который является аналогом K^+ . В отличие от K^+ , внутриклеточная концентрация Rb^+_i крайне низка, в связи с чем зафиксировать незначительные изменения его входа в клетку легче. Кроме того, основная часть транспорта Rb^+ обеспечивается Na,K-АТразой (которая связывает и активируется ионами Rb^+ так же, как и ионами K^+), а дополнительный транспорт производится NKCC и K-каналами [144]. Таким образом, вход Rb^+ в клетку по большей мере отражает активность Na,K-АТразы.

Клетки HUVEC инкубировали в 1 мл среды при условиях, указанных выше, после чего вносили в каждую лунку 50 мкл 50 mM RbCl (конечная концентрация Rb^+ 2,4 mM) и инкубировали в течение 10 мин, поскольку область линейной зависимости входа Rb^+ внутрь клетки от времени составляет около 10 мин [144]. После окончания инкубации содержание Rb^+ в клетках определяли как описано в предыдущем разделе.

7. Инкубация клеток в средах для манипуляции концентрациями Na^+_i и K^+_i в клетках HeLa

Для оценки неспецифического влияния убаина на клеточную сигнализацию, а также для изучения роли деполяризации плазматической мембраны в индукции экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K-АТразы клетки инкубировали в среде с соотношением внеклеточных концентраций Na^+/K^+ , близким к нормальному (92 mM Na^+ и 8 mM K^+), или в среде с инверсией Na^+_o/K^+_o -соотношения (8 mM Na^+ и 92 mM K^+) в течение 3 ч в присутствии или в отсутствие 3 мкМ убаина и/или ингибиторов протеинкиназ. Перед началом инкубации клетки промывали этими средами 1 раз. Чтобы исключить влияние входа Ca^{2+} через Ca_v на клеточный ответ

при деполяризации мембраны, мы проводили эксперименты в отсутствие Ca^{2+} и в присутствии 50 мкМ ЭГТА. Полный состав сред представлен в таблице Таблица 2.

Таблица 2. Состав сред для манипуляции внутриклеточными концентрациями Na^+ и K^+ в клетках HeLa.

Компонент	Соотношение внеклеточных концентраций Na^+ и K^+ в среде	
	92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+	8 мМ Na^+ и 92 мМ K^+
HEPES-NaOH pH 7,4	10 мМ	10 мМ
NaCl	88 мМ	4 мМ
KCl	8 мМ	92 мМ
MgCl_2	0,6 мМ	0,6 мМ
Глюкоза	5 мМ	5 мМ
Маннитол	80 мМ	80 мМ
ЭГТА	50 мкМ	50 мкМ

8. Инкубация клеток HeLa в присутствии стабилизатора и дестабилизатора

G4

Для оценки вовлеченности G4 в регуляцию транскрипции FOS клетки инкубировали в присутствии стабилизатора G4 – пиридостатина или дестабилизатора G4 – ионов Li^+ . В первом случае клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 0,1% FBS, в присутствии или в отсутствие 20 мкМ пиридостатина в течение 24 ч, за 3 ч до конца инкубации в среду вносили 3 мкМ уабаина. Во втором случае клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 0,1% FBS, в течение 24 ч, после чего среду заменяли на среды собственного дизайна с преобладающим катионом Na^+ или Li^+ и инкубировали в течение 4 ч. Состав сред представлен в таблице Таблица 3.

Таблица 3. Состав сред для замены внутриклеточных одновалентных катионов на ионы Li^+ в клетках HeLa.

Компонент	Преобладающий катион	
	Na^+	Li^+
Буфер	10 мМ HEPES-NaOH pH 7,4	10 мМ HEPES-LiOH pH 7,4
NaCl	130 мМ	0 мМ
LiCl	0 мМ	130 мМ
KCl	5 мМ	5 мМ
$CaCl_2$	1 мМ	1 мМ
$MgCl_2$	0,5 мМ	0,5 мМ
$MgSO_4$	0,4 мМ	0,4 мМ
KH_2PO_4	0,3 мМ	0,3 мМ
Глюкоза	6 мМ	6 мМ

9. Микроскопия клеток HeLa с флуоресцентным зондом Fluo8, чувствительным к концентрации Ca^{2+}

Для оценки выхода Ca^{2+} из внутриклеточного депо в клетках при повышении внутриклеточного Na^+_i/K^+_i -соотношения мы использовали флуоресцентный зонд Fluo8, интенсивность флуоресценции которого увеличивается при связывании с ионами Ca^{2+} . Клетки HeLa высевали на 48-луночные планшеты с низкой адгезией по 4 тыс. клеток на лунку и выращивали в течение 16 ч в среде DMEM, содержащей 10% FBS. Клетки промывали раствором солей Хэнкса 4 раза, после этого инкубировали в растворе солей Хэнкса, содержащем 20 мМ HEPES, pH 7,4 и 4 мкМ эфира Fluo8-AM, свободно проникающего в клетку, в течение 1 ч. Съемку

проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного камерой Andor iXon 897 (Andor Technology, Великобритания) в средах, содержащих 92 мМ Na⁺ и 8 мМ K⁺ или 8 мМ Na⁺ и 92 мМ K⁺ (Таблица 2) в присутствии или в отсутствие 3 мкМ убаина при 37 °С. Перед началом съемки клетки промывали 4 раза соответствующей средой. Съемку начинали в пределах 10-15 мин после внесения сред в лунки и проводили в течение 3 ч с интервалом 5 мин. Визуализацию флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 475-495 нм, эмиссию регистрировали при длинах волн 510-534 нм. Микроскопию проводили при увеличении 10× с усилением сигнала 16× (gain) и пиксельной бинаризацией 2×2, разрешение изображений составляло 640×488, сигнал с одного поля накапливали в течение 300 мс. Снимали по 9 полей на одну лунку, по 3 лунки на одно воздействие.

После окончания съемки проверяли способность клеток к Ca²⁺-зависимому ответу. Для этого записывали базовую линию флуоресценции клеток в течение 100-150 с, после чего в среду вносили 20 мкМ гистамин и снимали клетки с интервалом 15 с в течение 600 с.

Обработку полученных результатов проводили в программном обеспечении ImageJ 1.54р. Изображения импортировали в программу, вычитали фон функцией Subtract background, вручную выделяли отдельные клетки, рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции внутри каждой полученной маски. Дальнейшую обработку данных и построение диаграмм проводили с использованием языка R 4.5.1 в программном обеспечении RStudio 2025.05.1 Build 513.

10. Трансфекция и микроскопия сенсоров HyPer7 и SypHer3s

Для оценки редокс статуса цитоплазмы и внутриклеточного pH в клетках HeLa при повышении внутриклеточного Na⁺_i/K⁺_i-соотношения мы использовали генетически кодируемые сенсоры HyPer7 и SypHer3s, чувствительные к

концентрации H_2O_2 [145] (согласно личному сообщению Виктории Валерьевны Чебаненко, HyPer7 чувствителен и к другим окислителям) и pH [146] соответственно. Плазмиды на основе вектора pCS2+ (Addgene plasmid # 136466), кодирующие HyPer7 и SypHer3s, были любезно предоставлены Вероникой Алексеевной Катрухой.

Для получения препаратов плазмид производили химическую трансформацию клеток *E. coli* штамма JM109. Аликвоту компетентных клеток смешивали с 1 нг плазмидной ДНК, инкубировали 30 мин на льду, после чего проводили тепловой шок при 42 °C в течение 40 с и охлаждали клетки на льду. К клеткам добавляли 1 мл среды LB и инкубировали суспензию на твердотельном термостате 1 ч с регулярным перемешиванием. Клетки высевали на чашки Петри, заполненные LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали в течение ночи при 37 °C. Отбирали колонию с каждой чашки, высаживали клетки в 15 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при 37 °C при перемешивании в течение ночи. Полученную культуру лизировали и очищали плазмидную ДНК с помощью набора Qiagen Midi Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Выделенную плазмидную ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (см. раздел ниже), концентрацию определяли спектрофотометрически с использованием NanoVue Plus (Cytiva, США).

Для трансфекции клеток HeLa, их высевали на 12-луночные планшеты по 200 тыс. клеток на лунку и выращивали в течение суток в среде DMEM, содержащей 10% FBS и не содержащей антибиотиков. Трансфекцию проводили с использованием реагента Lipofectamine 2000 при соотношении 1 мкл реагента к 0,8 мкг ДНК на лунку согласно инструкции производителя. Спустя сутки заменяли среду на DMEM, содержащую 0,1% FBS и не содержащую антибиотики. Через 48 ч после трансфекции клетки помещали в среды, содержащие 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ или 8 мМ Na^+ и 92 мМ K^+ (Таблица 2), перед этим промыв их этими же средами. Далее клетки визуализировали в двух каналах с использованием светодиодов при длинах волн возбуждения 395 и 470 нм и при длине волны эмиссии 510 нм на

флуоресцентном микроскопе Olympus FV3000 (Olympus, Япония). Время экспозиции составляло 200 мс, увеличение 10×, разрешение 1024×1024. Интервал съемки составил 2 мин.

Полученные изображения обрабатывали в ImageJ 1.54p. Изображения импортировали в программу, вычитали фон функцией Subtract background, экспортировали первые снимки каждого поля съемки. Полученные изображения использовали для автоматического построения масок в программе Cellpose-SAM 3.1 [147,148] с помощью модели Cyto. Маски импортировали в ImageJ 1.54p с использованием плагина MorphoJ и использовали для записи изменения интенсивности флуоресценции во времени. Полученные результаты обрабатывали с помощью языка R 4.5.1 в программном обеспечении RStudio 2025.05.1 Build 513.

11. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1× трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфере. Использовали 1% агарозный гель, содержащий бромистый этидий, конечная концентрация которого составляла 0,3 мг/мл. В качестве маркеров молекулярных масс ДНК использовали коммерческий набор 1 kb (каталожный номер #NL001, Евроген, Россия). Электрофорез проводили при напряжении 3,5 В/см в течение 1,5 ч. Гель визуализировали, возбуждая флуоресценцию светом длиной волны 302 нм. При необходимости выделения нуклеиновой кислоты из геля с помощью стерильного скальпеля вырезали флуоресцирующую часть геля.

12. Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в «реальном времени»

После окончания инкубации клетки один раз промывали ледяным раствором фосфатно-солевого буфера PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM

KH_2PO_4 , pH 7,4) и вносили в лунку 400 мкл реагента Trizol (Invitrogen, США). Содержимое лунок переносили в индивидуальные пробирки и хранили при -80°C .

Для выделения РНК пробы размораживали на льду, вносили в них 80 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе, инкубировали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали в режиме 14000 g, 15 мин при $+4^\circ\text{C}$. Затем отбирали полученную водную фазу в чистую пробирку и добавляли равный объем 96% этанола. Полученную смесь перемешивали на вортексе, наносили на колонку Zymo Research Quick-RNA MicroPrep и выделяли тотальную РНК согласно инструкции производителя.

В связи с отсутствием возможности приобретения реагента Trizol и колонок Zymo Research Quick-RNA MicroPrep, мы использовали другой протокол выделения РНК в экспериментах по оценке количества мРНК *FOS* в клетках HeLa после инкубации в присутствии ингибиторов MAPK. Клетки один раз промывали ледяным раствором PBS и вносили в лунку 300 мкл лизирующего раствора (4 М гуанидин изотиоционат, 60 мМ цитрат натрия pH $< 5,0$). Содержимое лунок переносили в индивидуальные пробирки и хранили при -80°C . Для выделения РНК пробы размораживали на льду, вносили в них 360 мкл смеси кислого фенола (соотношение объемов: 125 фенола, 24 хлороформа, 1 изоамилового спирта, pH 4,5, Invitrogen, США), перемешивали, инкубировали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали в режиме 14000 g, 15 мин при $+4^\circ\text{C}$. Затем отбирали полученную водную фазу в чистую пробирку и добавляли 300 мкл изопропанола. Полученную смесь перемешивали, центрифугировали в режиме 14000 g, 15 мин при $+4^\circ\text{C}$, супернатант отбрасывали, а осадок промывали 2 раза в 400 мкл 70% этанола. После окончания промывки осадок высушивали на воздухе до стекловидного состояния и растворяли в 20 мкл воды, свободной от нуклеаз. Количество РНК в полученных растворах определяли на спектрофотометре SmartSpec (Bio-Rad, США) при свете с длиной волны 260 нм, ее чистоту оценивали по соотношению A_{260}/A_{280} , а также с помощью электрофореза в агарозном геле.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Promega ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, США) с использованием

случайных гексапраймеров согласно инструкции производителя. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «реальном времени» на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве отрицательного контроля использовали выделенную тотальную РНК, не подвергавшуюся обратной транскрипции. Реакцию проводили с использованием набора для РТ-ПЦР в присутствии SYBR-Green и Taq-полимеразы (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя. Концентрация каждого праймера в образцах составляла 160 нМ (

Таблица 4), а количество внесенной кДНК – 38 нг. Образцы вносили в 96-луночный планшет, после чего заклеивали его ПЦР-пленкой (Axygen, США) и центрифугировали при 500 g 15 с на центрифуге для ПЦР-планшетов CVP-2 (BioSan, Латвия).

Для проведения ПЦР использовали следующий протокол амплификации:

1. Общая денатурация ДНК при 95 °С 5 мин.
2. Денатурация ДНК при 95 °С 10 с.
3. Отжиг праймеров при 58 °С 17 с.
4. Элонгация матрицы при 72 °С 20 с.
5. Плавление ДНК 72 → 95 °С с инкрементом 0,5 °С каждые 5 с.

Шаги № 2-4 объединены в цикл, который повторяли 40 раз. На 5 шаге происходит построение кривых плавления ДНК, что позволяет оценить количество продуктов ПЦР. Уровень экспрессии выбранных генов оценивали с использованием референсных генов *GAPDH* в случае клеток HUVEC или *RPLP0* в случае клеток HeLa по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [149].

Для подтверждения соответствия ПЦР-ампликонов выбранным нами генам их разделяли с помощью агарозного электрофореза с последующим выделением из геля с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Секвенирование выделенных ампликонов проводилось компанией Генотек (Россия, Москва).

Таблица 4. Список праймеров, использовавшихся для ПЦР в «реальном времени» (П – прямой праймер, О – обратный праймер).

Ген	Номер последовательности мРНК в GenBank	Последовательность праймеров
<i>FOS</i>	NM_005252	П: 5'-GCAAGGTGGAACAGTTATCTC-3' О: 5'-GCAGACTTCTCATCTTCTAGTTG-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046.7	П: 5'-CCTGGTATGACAACGAATTTG-3' О: 5'-CAGTGAGGGTCTCTCTCTTCC-3'
<i>RPLP0</i>	NM_001002.4	П: 5'-TGTGGGAGCAGACAATGTGG-3' О: 5'-CATCCCCCGGATATGAGGC-3'
<i>KIT</i>	NM_000222.3	П: 5'-AACACGCACCTGCTGAAATG-3' О: 5'-GTCTACCACGGGCTTCTGTC-3'
<i>MYC</i>	NM_002467.6	П: 5'-GATTCTCTGCTCTCCTCGACG-3' О: 5'-GTTGTGCTGATGTGTGGAGAC-3'

13. Определение концентрации белка методом Лоури

Концентрацию полученных белковых фракций определяли по методу Лоури [143], используя Modified Lowry Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Оптическую плотность исследуемых растворов измеряли при длине волны 750 нм. В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией 2 мг/мл, входящий в состав набора.

14. Определение уровня фосфорилирования протеинкиназ методом Вестерн блоттинга

После окончания инкубации клетки трижды промывали 2 мл ледяного раствора PBS. Затем в лунку вносили 500 мкл буфера RIPA, содержащего 0,2 мМ фенилметилсульфонил фторида (PMSF) и 5 мкМ тиорфана (Cayman Chemical,

США), а также коктейль ингибиторов протеаз (P8340, Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (78462, Thermo Scientific, США) в разведении 1:100 каждого, переносили суспензию в пробирку типа эппендорф и подвергали ее обработке ультразвуковым для разрушения геномной ДНК в течение 30 с при 20% амплитуды на ультразвуковом дезинтеграторе VCX 750 (Sonics and Materials, США). Концентрацию белка в образцах определяли по методу Лоури, как описано выше. Во всех пробах концентрацию доводили до 1 мг/мл путем добавления RIPA буфера.

Разделение белков проводили методом денатурирующего электрофореза по Лэммли [150] в 6% концентрирующем и 10% разделяющем гелях. Наносили по 10 мкг белка в лунку. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) методом мокрого электропереноса в трис-глициновом буфере (25 mM Трис, 192 mM глицин, 10% этанол, pH 8,3) при силе тока 400 мА в течение 50 мин на льду. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в солевом трис-буфере TBST (20 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6), содержащем 1% поливинилпиролон 40000, в течение 1 ч для блокирования участков неспецифического связывания на мембране, после чего проводили инкубацию с перемешиванием в TBST, содержащем 1% поливинилпиролон 40000 и моноклональные антитела кролика, специфичные к определенной фосфорилированной протеинкиназе, в разведении 1:500, при +4 °C в течение ночи. Для нормирования результатов также оценивали общее количество протеинкиназ ERK1/2, JNK и p38, путем окрашивания соответствующими антителами. Далее мембрану трижды промывали TBST и инкубировали с перемешиванием в TBST, содержащем 1% поливинилпиролон 40000 и конъюгированные с пероксидазой антитела козы, специфичные к иммуноглобулину G кролика, в разведении 1:5000, при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого мембрану 4 раза промывали TBST, окрашивали с использованием набора SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate и визуализировали с помощью Endolab ChemiDoc XRSplus instrument (Bio-Rad, США). Количество белка на дорожках оценивали с помощью программы ImageJ 1.54p.

15. Оценка структуры олигонуклеотидов, потенциально формирующих G-квадруплексы

Биоинформатический поиск PQS в промоторе гена *FOS* проводили с использованием алгоритма G4catchall [151]. Для изучения PQS в *in vitro* системе синтезировали олигонуклеотиды, формирующие G4 промоторов генов *FOS*, *MYC* и *KIT*, теломерные G4 (22AG) (Таблица 5). Структуру G4 оценивали методом спектроскопии кругового дихроизма. Олигонуклеотиды (2 μ M) плавили при 95°C в течение 5 мин в присутствии 10 mM HEPES-Трис, pH 7,4, а также NaCl и KCl с суммарной концентрацией одновалентных катионов, равной 100 mM, либо 2 mM NaCl, 40 mM KCl и 80 mM LiCl, после чего охлаждали во льду 5 мин. Спектр кругового дихроизма регистрировали с помощью спектрометра Chirascan (Applied Photophysics, Соединенное Королевство) в стандартной кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре. Для каждого олигонуклеотида усредняли значения 3-х измерений после вычитания фона.

Таблица 5. Последовательности синтетических олигонуклеотидов.

Название	Последовательность (5'→3')
FOS _{G4} 1	CTGTGTAAGGGGGGAGGGATTGACGGGAA
FOS _{G4} 2	GCGGGGGCAGGGAGCTGCGAGCGCTGGGGAC
FOS _{G4} 3	GAGGGGTGGCGCGCGGGCCTGGGCG
MYC _{G4}	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA
22AG	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
KIT _{G4}	GGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG

16. Анализ и визуализация данных

Для обработки результатов использовали программное обеспечение Graph Pad Prism 9.0, Origin 2021, R 4.5.1 и Microsoft Excel 2016. При статистической обработке проверяли нормальность распределения данных с помощью теста Шапиро-Уилка. Для нормально распределенных данных использовали t-тест Стьюдента или ANOVA с последующим тестом Тьюки. Для данных с ненормальным распределением проводили тест Манна-Уитни или тест Краскела-Уоллис.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изменение объема клеток HUVEC приводит к индукции экспрессии *FOS* только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения

Цель и задачи нашего исследования было направлены на изучение механизма Na^+/K^+ -зависимой экспрессии гена *FOS*. Для выполнения части задач мы использовали первичную культуру клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. Выбор этих клеток обусловлен тем, что эндотелий непосредственно контактирует с кровью, осмолярность которой может изменяться. В связи с этим мы предположили, что временное или постоянное увеличение концентрации Na^+ в крови может влиять на ионный состав клеток эндотелия и на экспрессию гена *FOS*. Поэтому первые два раздела главы «РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ» посвящены ответам на следующие вопросы. Во-первых, каким образом изменение осмолярности влияет на внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение и может ли ее изменение влиять на экспрессию гена *FOS* в клетках эндотелия? Во-вторых, какую роль в регуляции экспрессии *FOS* при этом играет изменение клеточного объема?

Поскольку внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение и объем клеток взаимосвязаны, была разработана модель, которая позволяет манипулировать объемом клеток HUVEC и их внутриклеточным ионным составом независимо друг от друга. Схема экспериментов представлена на Рис. 12 А. Во-первых, мы проводили ингибирование Na,K-АТФазы клеток HUVEC 0,1 мкМ убаина в течение 1 ч. Важно отметить, что при этом объем клеток не изменялся (Рис. 12 Б), внутриклеточная концентрация Na^+ увеличивалась примерно в 2 раза, а уровень мРНК *FOS* возрастал в 3 раза (Рис. 12 В). Во-вторых, мы проводили изоосмотическое сжатие клеток. При этом клетки сначала переводили в гипоосмотическую среду (197 мОсм), что сопровождалось их быстрым набуханием вплоть до 175% от исходного объема (Рис. 12 Б). Далее объем клеток

восстанавливался в результате регуляторных клеточных процессов в течение 30 мин инкубации. После этого в среду вносили NaCl до изоосмотического состояния (302 мОсм), что приводило к сжатию клеток примерно в 2 раза по отношению к исходному объему (Рис. 12 Б). Стоит отметить, что при таком типе сжатия внутриклеточная концентрация Na^+ и K^+ не изменялась по сравнению с контрольными образцами, а также не наблюдалась индукция экспрессии *FOS* (Рис. 12 В). В-третьих, мы подвергали клетки HUVEC гиперосмотическому сжатию двумя способами: путем инкубации в течение 30 мин в среде, содержащей 135 мМ Na^+ , а также в среде с полной заменой ионов Na^+ на ионы аминокислоты NMDG⁺. Затем с целью увеличения осмолярности в эти среды добавляли 100 мМ маннитола, что приводило к быстрому уменьшению объема клеток примерно в 2 раза (Рис. 12 Б). При этом инкубация клеток в среде, содержащей ионы Na^+ , приводила к увеличению внутриклеточной концентрации этого иона в 2 раза, что также сопровождалось увеличением уровня мРНК *FOS*. В случае гиперосмотического сжатия клеток в отсутствие ионов Na^+ во внеклеточной среде наблюдалось уменьшение внутриклеточной концентрации этого иона, а экспрессия *FOS* при этом не изменялась (Рис. 12 В). Внутриклеточная концентрация K^+ не изменялась статистически значимо при всех вариантах воздействий (Рис. 12 Б). Важно отметить, что гиперосмотическое сжатие в присутствии ионов Na^+ во внеклеточной среде и ингибирование Na,K-АТФазы приводило к одинаковому увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ и количества мРНК *FOS* в клетках HUVEC по сравнению с контролем (Рис. 12 В).

Таким образом, увеличение осмолярности внеклеточной среды приводит к увеличению внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения и индукции экспрессии *FOS* в клетках HUVEC, однако эти эффекты наблюдаются лишь при наличии Na^+ во внеклеточной среде. Поскольку в данной части работы мы использовали модельную систему существенного изменения осмолярности внеклеточной среды, то следующим этапом нашего исследования была оценка влияния умеренного увеличения внеклеточной концентрации Na^+ (в физиологическом диапазоне) на внутриклеточный ионный баланс и экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.

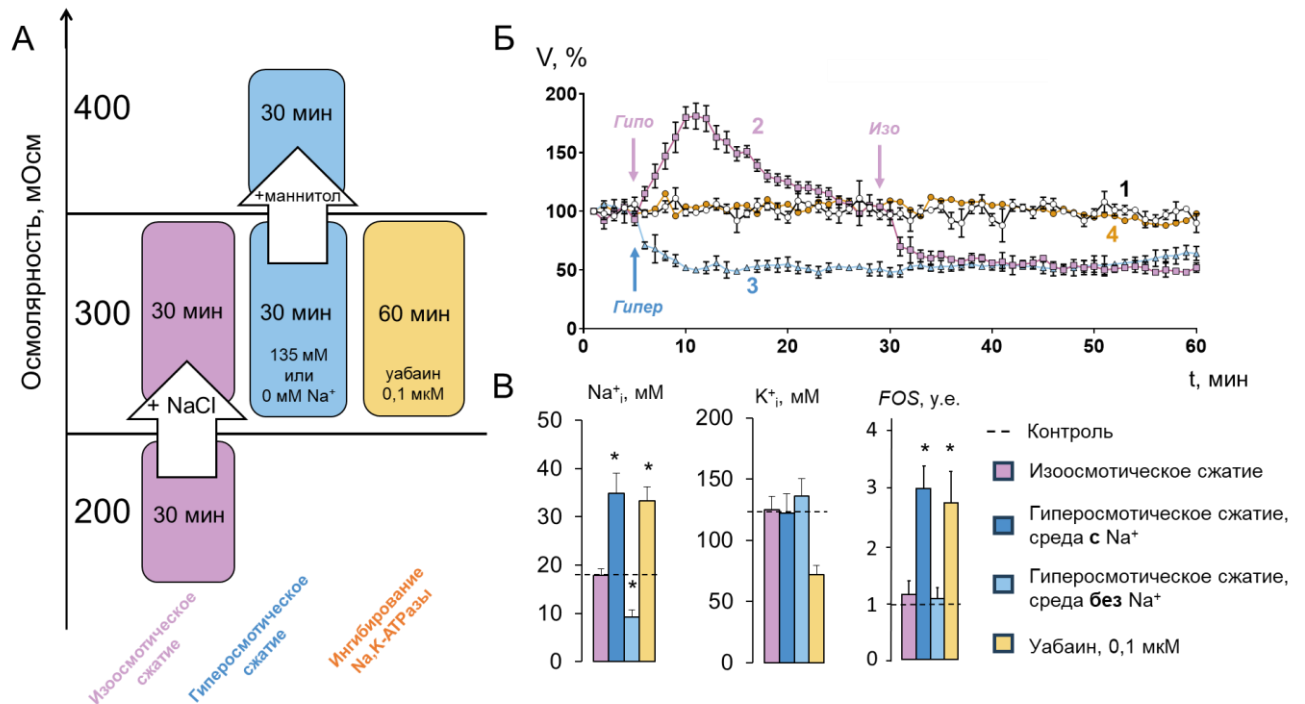


Рис. 12. Влияние изменения объема клеток HUVEC на содержание ионов Na⁺ и K⁺ и уровень мРНК Fos в этих клетках. А – схема экспериментов по манипуляции объемом клеток HUVEC; представлена ось, указывающая на осмолярность среды. Описание в тексте. Б – изменение объема клеток HUVEC, определенного методом DISUR, при разных вариантах сжатия: 1 – контроль, 2 – изоосмотическое сжатие, 3 – гиперосмотическое сжатие, 4 – уабаин, 0,1 мкМ. Время перевода клеток в среды с определенной осмолярностью указано стрелками. В – влияние сжатия клеток HUVEC и ингибирования Na,K-АТФазы на внутриклеточные концентрации Na⁺ и K⁺ (Среднее ± стандартная ошибка среднего), а также на уровень мРНК FOS. Количество независимых экспериментов составляло 3-4. Статистически значимые отличия опытных образцов от контроля выявляли с помощью ANOVA с последующим тестом Тьюки, * - p-value < 0,05

2. Повышение внеклеточной концентрации Na^+ от 125 до 140 мМ не приводит к увеличению внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения и не изменяет количество мРНК *FOS* в клетках HUVEC

Клетки HUVEC инкубировали в базальной среде, содержащей 125 мМ Na^+ , с внесением в среду дополнительного NaCl до конечной внеклеточной концентрации Na^+ 140 мМ, что соответствует физиологической норме этого параметра в крови человека.

Мы обнаружили, что при инкубации клеток в присутствии 140 мМ Na^+ в течение 1 ч наблюдается небольшое, но статистически значимое уменьшение внутриклеточного содержания Na^+_{i} на ~10%, после чего его содержание стабилизируется на уровне контроля (Рис. 13 А), что, скорее всего, связано с изменением активности Na,K-АТФазы. Для подтверждения роли Na,K-АТФазы в восстановлении ионного баланса мы оценивали внутриклеточный вход Rb^+ в условиях увеличения концентрации Na^+ во внеклеточной среде. Нам удалось зарегистрировать статистически значимое увеличение входа Rb^+ в клетку на 10-25% при 1 и 3 ч инкубации, что свидетельствует об активации Rb^+ -транспортирующих систем, таких как Na,K-АТФаза, KCC/NKCC или K-каналы [144]. Дальнейшая инкубация HUVEC в присутствии 140 мМ Na^+ во внеклеточной среде не отражалась на транспорте Rb^+ по сравнению с контрольными образцами. При этом изменения количества мРНК *FOS* в данных условиях мы не наблюдали (Рис. 13 Б).

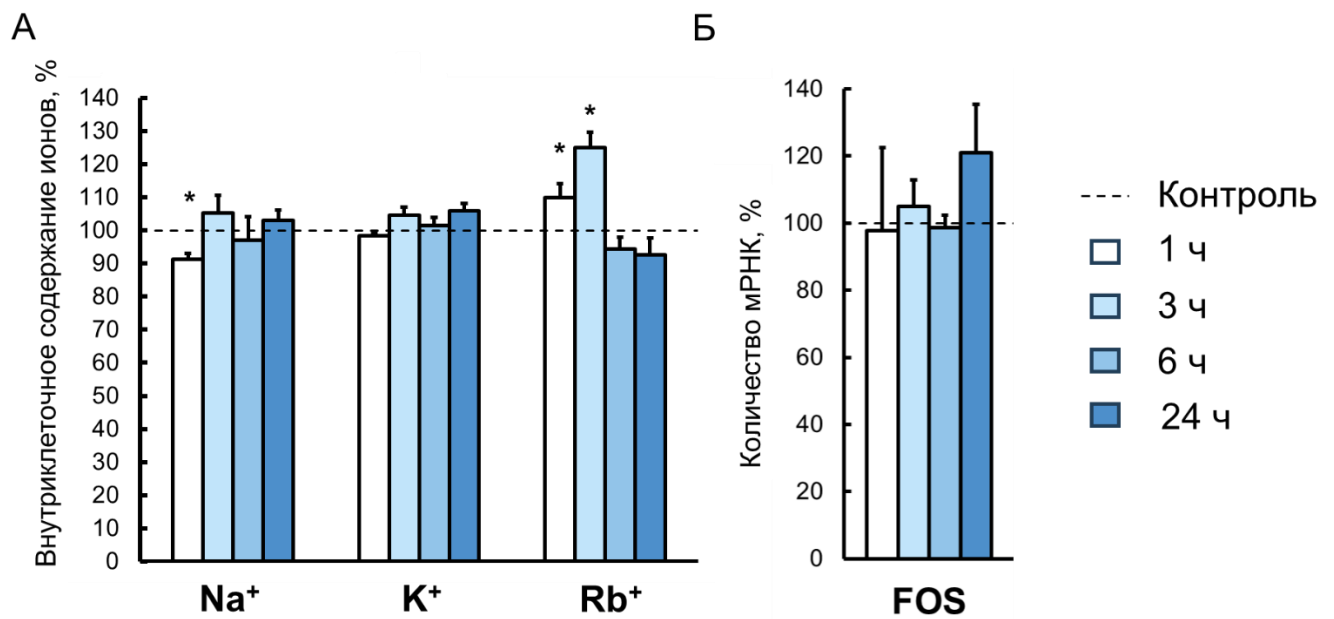


Рис. 13. Влияние увеличения внеклеточной концентрации NaCl на 15 мМ (до 140 мМ) в течение 1-24 часов на внутриклеточное содержание Na⁺, K⁺ и вход Rb⁺ в клетку (А), а также на количество мРНК FOS (Б). На графике представлены средние значения ± стандартная ошибка в % от контрольного значения, которое принято за 100% и представлено пунктирной линией. Количество независимых экспериментов составило 6-12 для А и 3 для Б. Статистически значимые отличия выявляли критерием Краскела-Уоллеса, * – p -value < 0,05 по сравнению с контрольными образцами.

Таким образом, отсутствие видимого эффекта увеличения внутриклеточного содержания Na^+_i при повышении внеклеточной концентрации этого иона может быть связано с активацией Na,K-ATPазы в ответ на повышенный ток этого иона в клетку. Имеются сведения о том, что повышение внеклеточной концентрации NaCl способствует входу Na^+ в клетку через ENaC [152]. Чтобы изучить роль Na,K-ATPазы и ENaC в изменении ионного транспорта в условиях наших экспериментов, мы провели ингибиторный анализ с использованием амилорида (ингибитора ENaC) и убаина (ингибитора Na,K-ATPазы). Внесение 1 мкМ амилорида в среду не влияло на внутриклеточное содержание одновалентных катионов в течение 3 ч инкубации как в условиях увеличенного внеклеточного содержания Na^+ , так и в контрольных образцах. Кроме того, в присутствии 1 мкМ амилорида не наблюдалось усиления внутриклеточного транспорта Rb^+ (Рис. 14), зарегистрированного в эксперименте ранее (Рис. 13 А). Это свидетельствует о том, что изменение ионного транспорта в ответ на повышение внеклеточной концентрации NaCl может быть действительно связано с ENaC , поскольку 1 мкМ амилорид ингибирует только этот канал, так как значения констант ингибирования остальных переносчиков и каналов на порядки выше [140]. Инкубация HUVEC в условиях увеличенной внеклеточной концентрации NaCl в присутствии убаина сопровождалась статистически значимым повышением внутриклеточного содержания Na^+_i (Рис. 14). Данный эффект подтверждает наше предположение об активации Na,K-ATPазы в ответ на усиление входа Na^+ в клетку через ENaC . Примечательно, что при инкубации клеток одновременно с амилоридом и убаином этого эффекта не наблюдалось, что, скорее всего, объясняется отсутствием входа Na^+ через ENaC .

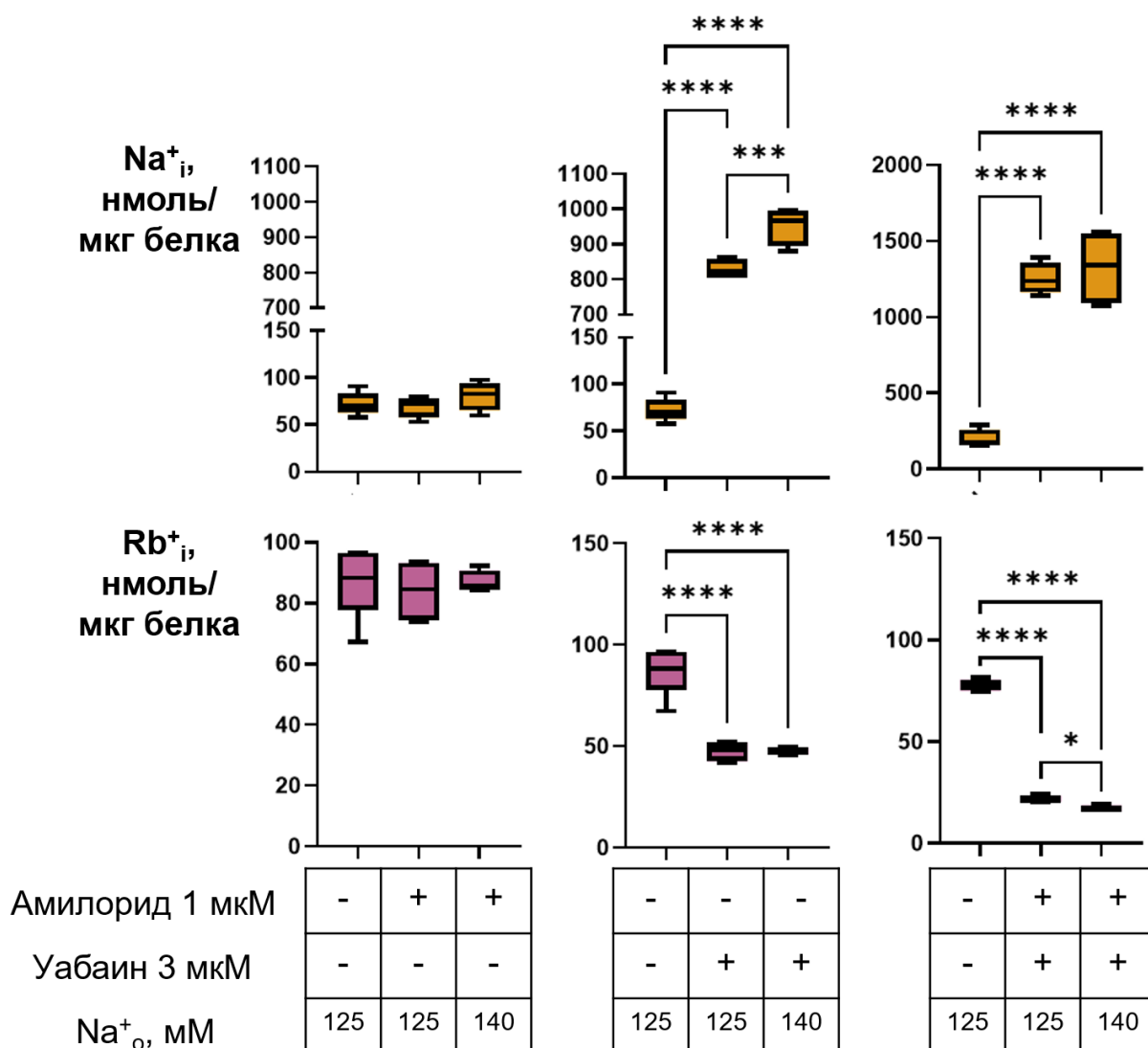


Рис. 14. Ингибиторный анализ Na^+ - и Rb^+ -транспортирующих систем клеток HUVEC. Клетки инкубировали в течение 3 ч в среде, содержащей 125 или 140 мМ Na^+ , в присутствии или в отсутствие 1 мкМ амилорида и/или 3 мкМ уабаина. За 10 мин до конца инкубации в среду вносили RbCl до конечной концентрации 2,5 мМ. Количество независимых экспериментов – 4-6, представлены «ящики с усами», изображающие медиану $\pm$ интерквартильный размах («ящики») и 1,5 межквартильных размаха («усы»). Статистически значимые отличия выявляли методом ANOVA с последующим тестом Тьюки, * - $p\text{-value} < 0,05$; **** - $p\text{-value} < 0,0001$.

Таким образом, увеличение внеклеточной концентрации Na^+ от 125 до 140 мМ не приводит к росту его содержания в клетках эндотелия и не индуцирует транскрипцию гена *FOS* в клетках HUVEC. По-видимому, избыток Na^+ , который поступает в клетку через ENaC, транспортируется Na,K-АТразой во внеклеточную среду, что позволяет клетке строго поддерживать баланс одновалентных катионов, с чем связано отсутствие активации гена *FOS*.

Следующая часть работы посвящена изучению механизма регуляции экспрессии этого гена за счет изменения Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa.

3. Убаин увеличивает уровень мРНК *FOS* только в условиях повышения Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa

Для последующих экспериментов мы разработали модель, позволяющую оценить неспецифическое влияние убаина на клеточную сигнализацию, что обусловлено рядом причин. Во-первых, существуют сомнения касательно того, что убаин и другие кардиотонические стероиды связываются только с Na,K-АТразой. Так, предполагается, что эти соединения также способны связываться с рецепторами стероидных гормонов [153]. Во-вторых, ингибирование Na,K-АТразы и диссипация Na^+/K^+ -градиента приводит к деполяризации мембраны, что гипотетически способно оказывать некое влияние на внутриклеточные сигнальные каскады. В этой связи мы инкубировали клетки HeLa в среде с соотношением внеклеточных концентраций Na^+/K^+ , близким к нормальному (92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+), или в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения (8 мМ Na^+ и 92 мМ K^+), которая приводит к деполяризации плазматической мембраны, согласно уравнению Гольдмана (Формула 1), в течение 3 ч (полный состав сред см. в таблице Таблица 2). Чтобы исключить влияние входа Ca^{2+} через Ca_v на клеточный ответ при деполяризации мембраны, все экспериментальные воздействия мы проводили в отсутствие Ca^{2+} , добавляя 50 мкМ ЭГТА в среду. Соотношение Na^+/K^+ в клетках

после инкубации в обеих средах составляло $\sim 0,1$ (Рис. 15 А). Обработка клеток 3 мкМ убаина в течение 3 ч приводила к увеличению внутриклеточного содержания Na^+_i (с 74 ± 6 до 592 ± 66 нмоль/мг белка) и к уменьшению внутриклеточного содержания K^+_i (с 727 ± 81 до 166 ± 19 нмоль/мг белка) в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ . В то же время инкубация клеток в среде с инверсией Na^+/K^+ в присутствии убаина обеспечивала небольшое увеличение внутриклеточного содержания Na^+_i (с 90 ± 6 до 133 ± 6 нмоль/мг белка) и не оказывала достоверного влияния на внутриклеточное содержание K^+_i . Уровень мРНК *FOS* увеличивался в 42 раза при ингибировании Na,K-АТФазы в клетках, которые инкубировали в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ ; в среде с инверсией Na^+/K^+ убаин не вызывал индукцию транскрипции *FOS* (Рис. 15 Б).

Эти результаты указывают на то, что индукция экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K-АТФазы скорее всего не связана с деполяризацией мембраны и не обусловлена неспецифическим влиянием убаина на сигнальные системы клетки.

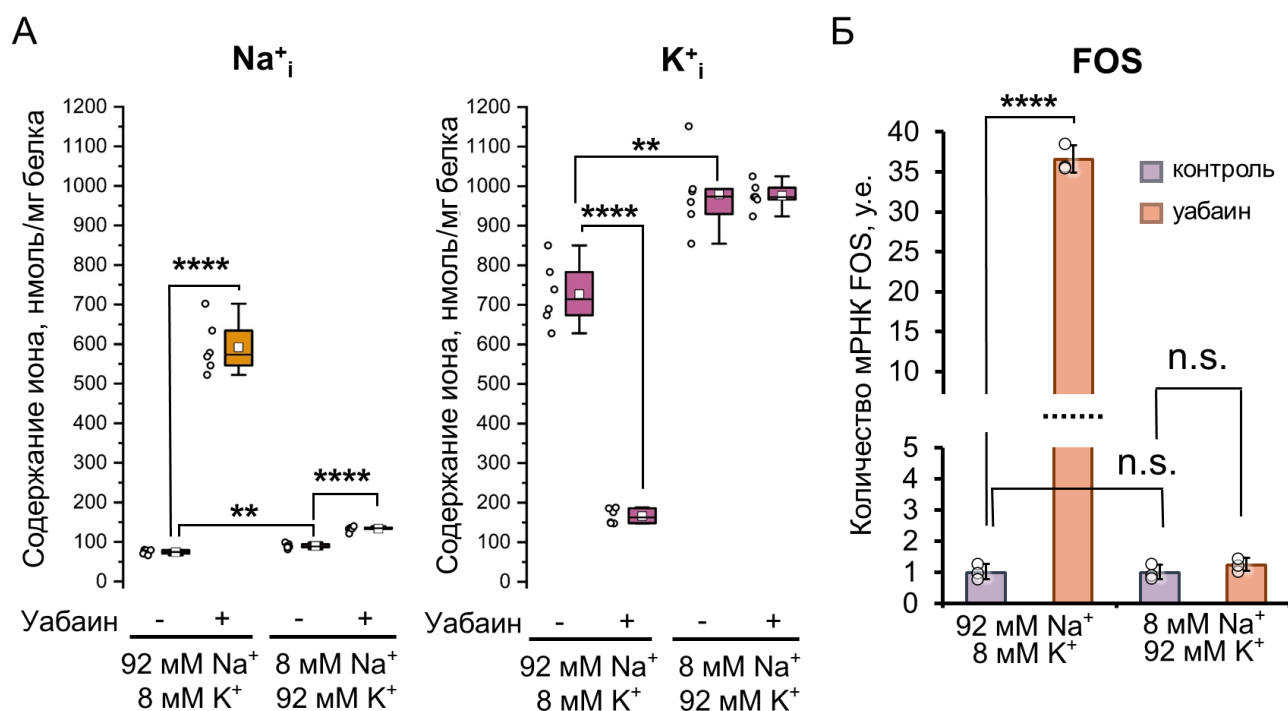


Рис. 15. Влияние ингибирования Na,K -АТФазы клеток HeLa 3 мкМ убаином в средах с различным соотношением внеклеточных концентраций Na^+/K^+ в течение 3 ч на внутриклеточное содержание Na^+_i и K^+_i (А) и количество мРНК FOS, нормированное на контроль (Б). Результаты представлены в виде «ящичков с усами» (А), отражающих медиану (прямая) и среднее (белый квадрат) $\pm$ интерквартильный размах («ящик») и 1,5 интерквартильного размаха («усы»), либо геометрических средних $\pm$ стандартное отклонение (Б). Количество независимых экспериментов составляло 6 (А) или 3 (Б), индивидуальные значения представлены в виде кругов. Статистически значимые отличия выявляли методом ANOVA с последующим тестом Тьюки, n.s. – p -value $> 0,05$; * – p -value $< 0,05$; ** – p -value $< 0,01$; **** – p -value $< 0,0001$.

4. Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ приводит к активации MAPK

Поскольку экспрессия гена *FOS* тесно связана с активностью MAPK в клетке, мы определили уровень их фосфорилирования в разработанной нами модели. После инкубации клеток HeLa в присутствии 3 мкМ убаина в течение 0,5 ч уровень фосфорилирования ERK1/2, JNK1/2 и p38 не изменялся, тогда как после 3 ч инкубации наблюдалось значительное фосфорилирование ERK1/2, JNK1/2 и p38. Этот эффект мы регистрировали только в случае, когда клетки инкубировали в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ . В среде с инвертированным Na^+/K^+ -соотношением убаин не влиял на фосфорилирование этих киназ (Рис. 16 А).

Затем мы оценили вклад MAPK в активацию транскрипции гена *FOS*. Для этого клетки инкубировали в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , в присутствии 3 мкМ убаина и селективных ингибиторов этих киназ: 20 мкМ BVD-523 (ингибитор ERK1/2), 20 мкМ SP600125 (ингибитор JNK), 20 мкМ SKF-86002 (ингибитор p38). Инкубация клеток в присутствии SP600125 не оказала влияния на экспрессию *FOS*, в то время как эффект BVD-523 и SKF-86002 выражался в уменьшении количества мРНК этого гена до 23 и 39% соответственно по сравнению с контрольными образцами (Рис. 16 Б). Одновременное присутствие SP600125, BVD-523 и SKF-86002 в среде обеспечивало уменьшение уровня мРНК *FOS* до 6% по сравнению с количеством мРНК *FOS* в контрольных образцах. Несмотря на это, ингибиторы MAPK не оказали влияния на величину активации экспрессии *FOS* убаином, которая составила 2,4, 2,9, 2,3, 2,2 и 2,1 в случае контроля, BVD-523, SP600125, SKF-86002 и одновременного внесения 3-х ингибиторов соответственно (Рис. 16 Б).

Таким образом, невзирая на активацию MAPK в ответ на увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ , наличие их активности не является необходимым условием для обеспечения Na^+/K^+ -зависимой регуляции *FOS*.

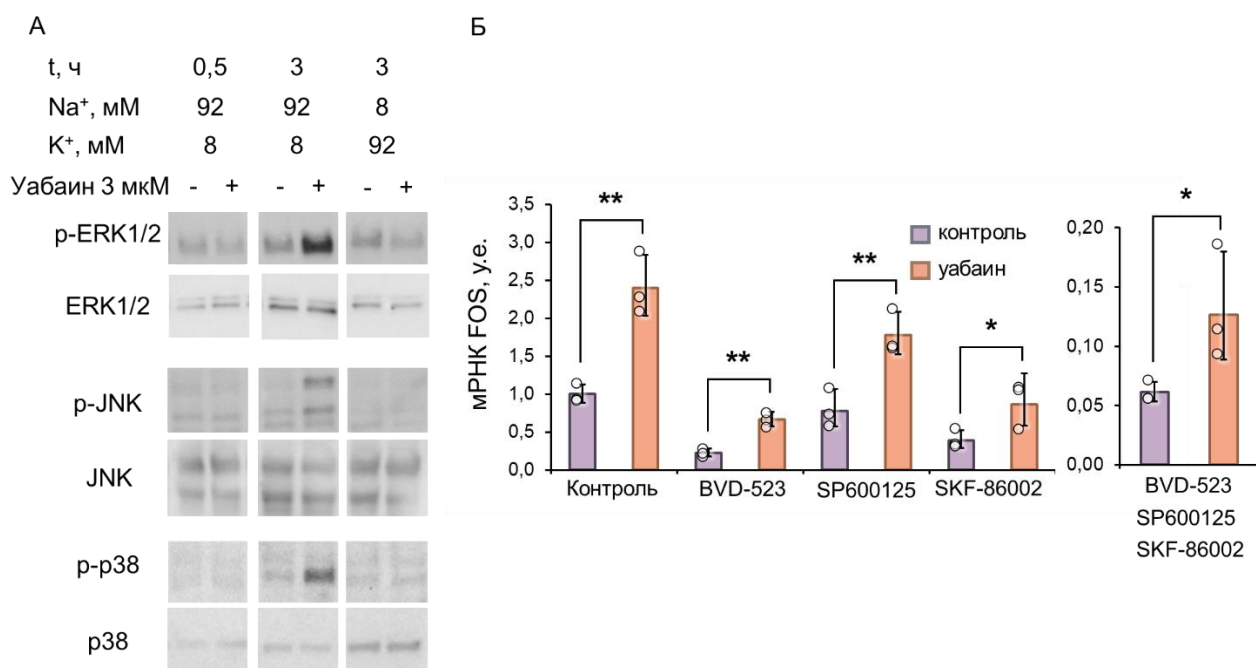


Рис. 16. Роль MAPK в индукции экспрессии FOS при ингибировании Na,K-АТФазы в клетках HeLa. Клетки инкубировали в среде, содержащей 92 мМ Na⁺ и 8 мМ K⁺, или в среде с инверсией Na⁺/K⁺-соотношения в отсутствие ионов Ca²⁺ и в присутствии 50 мкМ ЭГТА, а также в присутствии и в отсутствие 3 мкМ уабаина в течение 0,5 и 3 ч. Уровень фосфорилирования ERK1/2, JNK1/2 и p38 определяли методом Вестерн блоттинга. А – репрезентативные изображения мембран после визуализации. Б – уровень мРНК FOS в отсутствие или в присутствии 20 мкМ ингибиторов MAPK (n = 3, геометрическое среднее ± стандартное отклонение, индивидуальные значения представлены в виде кругов). Статистически значимые отличия выявляли t-тестом, * - p-value < 0,05; ** - p-value < 0,01.

5. Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ в отсутствие внеклеточных ионов Ca^{2+} не вызывает накопления Ca^{2+} в цитоплазме HeLa

Поскольку изменение Na^+/K^+ -соотношения тесно связано с Ca^{2+} -зависимой клеточной сигнализацией, мы оценили влияние увеличения этого параметра на внутриклеточную динамику Ca^{2+} . Для этого клетки HeLa нагружали флуоресцентным зондом Fluo8, после чего инкубировали их в средах, содержащих 92 мМ Na^+ : 8 мМ K^+ или 8 мМ Na^+ : 92 мМ K^+ (полный состав см. в таблице Таблица 2). Важно отметить, что в этих средах отсутствовали ионы Ca^{2+} , поэтому увеличение концентрации этого иона в цитоплазме возможно только благодаря его выходу из внутриклеточного депо.

В ходе выполнения данной части исследования мы сделали ряд наблюдений. Во-первых, мы не регистрировали увеличения флуоресценции Fluo8 в течение 3 ч ни в одном из экспериментальных условий (Рис. 17 А, Б, левые диаграммы). Более того, в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , наблюдалось медленное уменьшение интенсивности флуоресценции вплоть до 60% от начального значения (Рис. 17 А, левая диаграмма). Во-вторых, внесение гистамина в среду обеспечивало быстрое увеличение интенсивности флуоресценции вплоть до 4 раз во всех экспериментальных условиях (Рис. 17 А, Б, правые диаграммы), что обусловлено выходом Ca^{2+} из внутриклеточного депо. В-третьих, в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , эффект убаина выражался в значительном увеличении амплитуды изменения флуоресценции по сравнению с контрольными образцами (4 против 1,4 раза), а также времени затухания Ca^{2+} -ответа клеток на гистамин (640 против 240-270 с) (Рис. 17 А, Б, правые диаграммы).

Таким образом, повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} не приводит к увеличению выхода Ca^{2+} из внутриклеточного депо, но при этом значительно модулирует Ca^{2+} -ответ клеток HeLa на гистамин.

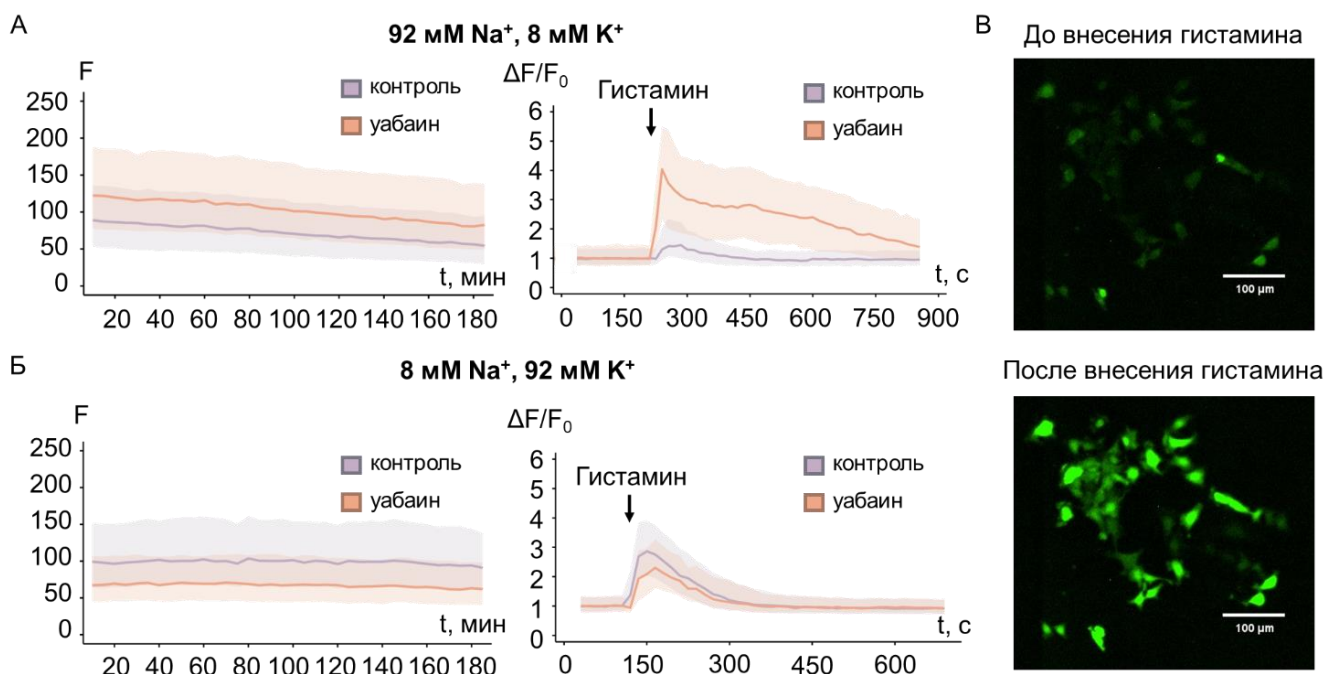


Рис. 17. Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках HeLa при ингибировании Na,K-АТФазы. Клетки инкубировали в среде, содержащей 92 mM Na^+ и 8 mM K^+ (А), и в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения (Б) в отсутствие ионов Ca^{2+} и в присутствии 50 мкМ ЭГТА, а также в присутствии и в отсутствие 3 мкМ убаина в течение 3 ч с интервалом съемки 5 мин. На левых диаграммах изображено изменение интенсивности флуоресценции зонда Fluo8 (медиана $\pm$ интерквартильный размах, количество клеток составляет 784 - 1378) во времени в минутах. После окончания инкубации в среду вносили 20 мкМ гистамина, что изображено на диаграммах справа. Представлена зависимость изменения флуоресценции Fluo8 по отношению к базовой линии флуоресценции (медиана $\pm$ интерквартильный размах, количество клеток составляет 209 - 506) от времени в секундах. В – репрезентативные изображения клеток после 3 ч инкубации в среде, содержащей 92 mM Na^+ и 8 mM K^+ в присутствии 3 мкМ убаина. Представлены клетки непосредственно до и после внесения 20 мкМ гистамина. Линейка отражает расстояние 100 мкм.

6. Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ приводит к увеличению внутриклеточного pH и не стимулирует генерацию активных форм кислорода

Поскольку внутриклеточное соотношение Na^+/K^+ может быть связано с внутриклеточным pH, а также гипотетически способно влиять на генерацию активных форм кислорода, мы трансфицировали клетки HeLa генетически кодируемыми сенсорами HyPer7, который чувствителен к редокс-статусу клетки [145], и SypHer3s, который чувствителен к внутриклеточному pH [146].

Результаты флуоресцентной микроскопии представлены на рисунке Рис. 18. Мы обнаружили что сигнал HyPer7 в среде, содержащей 92 mM Na^+ и 8 mM K^+ , был постоянным (Рис. 18А, левая панель), в то время как в среде, содержащей 8 mM Na^+ и 92 mM K^+ , он увеличивался со временем (Рис. 18Б, левая панель). Внесение 3 мкМ убаина в среду инкубации не влияло на сигнал HyPer7 как в присутствии 92 mM $\text{Na}^+ : 8 \text{ mM } \text{K}^+$, так и в присутствии 8 mM $\text{Na}^+ : 92 \text{ mM } \text{K}^+$. Добавление 200 мкМ H_2O_2 после 3 ч инкубации клеток в присутствии убаина обеспечивало более чем 10-кратный рост сигнала, что указывает, во-первых, на чувствительность сенсора к окислению в используемых нами экспериментальных условиях и, во-вторых, на отсутствие влияния внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения на сигнал HyPer7.

При микроскопии клеток, экспрессирующих SypHer3s, мы обнаружили, что в присутствии 8 mM $\text{Na}^+ : 92 \text{ mM } \text{K}^+$ сигнал сенсора падает со временем, указывая на возможное закисление цитоплазмы (Рис. 18Б, правая панель). В этой среде внесение 3 мкМ убаина не влияло на флуоресценцию сенсора в течение 3 ч. В присутствии 92 mM $\text{Na}^+ : 8 \text{ mM } \text{K}^+$ сигнал сенсора был стабилен на протяжении всего времени съемки, а внесение 3 мкМ убаина приводило к постепенному повышению сигнала, достигающего пика при 2 ч инкубации, и последующему его падению вплоть до значений ниже уровня контроля (Рис. 18А, правая панель).

Таким образом, увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения не приводит к увеличению концентрации активных форм кислорода в цитоплазме клетки, но приводит к временному повышению внутриклеточного pH.

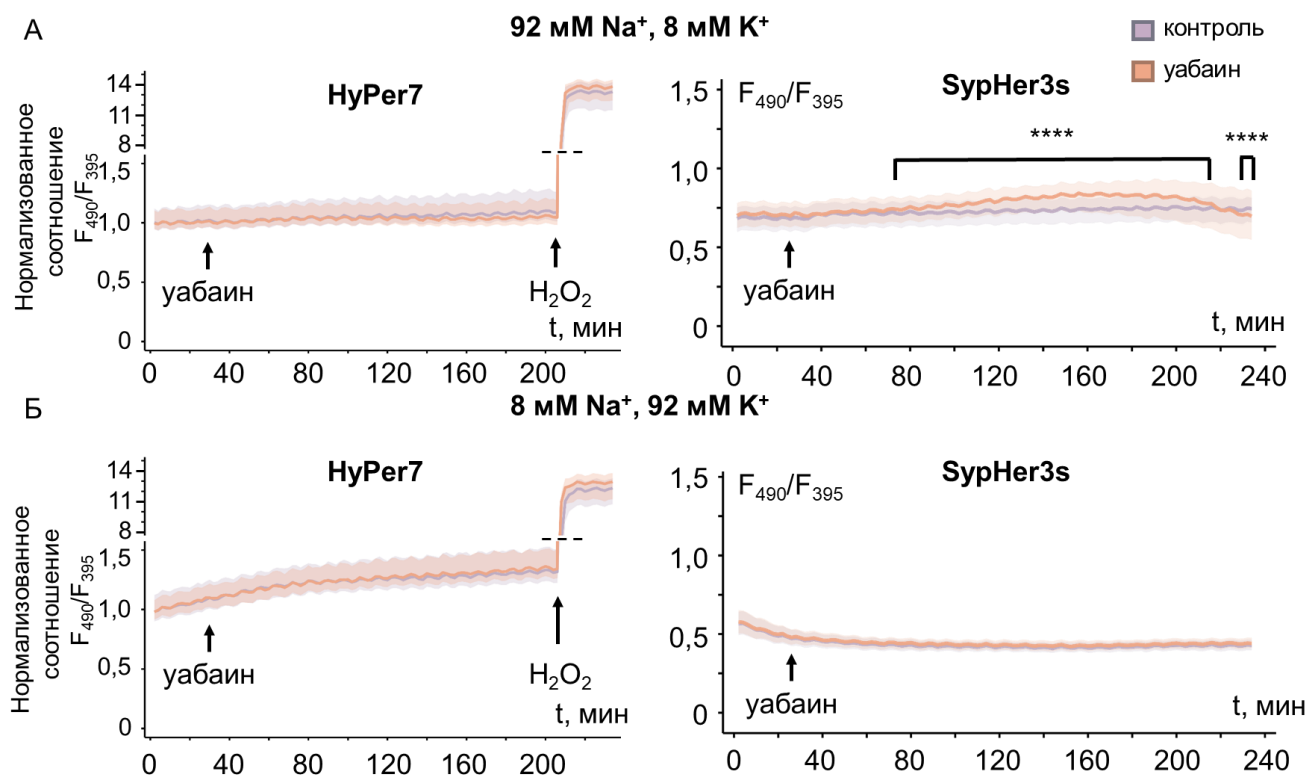


Рис. 18. Динамика редокс-статуса клетки и pH в клетках HeLa. Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими HyPer7 и SypHer3s. Клетки помещали в среды, содержащие 92 мМ Na⁺ и 8 мМ K⁺ (А) или 8 мМ Na⁺ и 92 мМ K⁺ (Б). После записи базовой линии флуоресценции в среду вносили убаин до конечной концентрации 3 мкМ и вели съемку клеток в течение 3 ч с интервалом 2 мин. В контрольные образцы убаин не вносили. Затем в лунки с клетками, экспрессирующими HyPer7, добавляли 200 мкМ H₂O₂. Для SypHer3s представлено соотношение флуоресценции при длинах волн возбуждения 490 и 395 нм, для HyPer7 представлено соотношение, нормализованное на базовую линию. Увеличение сигнала HyPer7 соответствует повышению уровня окислителей. Увеличение сигнала SypHer3s соответствует росту внутриклеточного pH. Представлены медианы ± интерквартильный размах, количество клеток составило 805 - 1102. Пунктирная линия обозначает разрыв по оси ординат. Статистически значимые отличия между выборками в контрольных лунках и в лунках, обработанных убаином, выявляли тестом Манна-Уитни, **** - p -value < 0.001.

7. В промоторной области гена *FOS* человека обнаруживается как минимум три G-квадруплекса, обладающих чувствительностью к Na^+/K^+ -соотношению

Как уже было упомянуто в разделе «Обзор литературы», G-квадруплексы (G4) являются перспективным кандидатом на роль сенсора одновалентных катионов. Любопытным фактом является их крайне высокая встречаемость в промоторах протоонкогенов. Гены *MYC* и *KIT* уже давно изучают как классические модели генов, имеющих в составе своих промоторов G4. Хотя *FOS* также относится к протоонкогенам, нам не удалось найти в литературе четких указаний на присутствие G4 в его промоторной области. В связи с этим мы провели биоинформатический анализ промоторного региона *FOS* человека и обнаружили как минимум три последовательности, потенциально способных формировать G4 (PQS).

Поскольку известно, что G4 особенно чувствительны к присутствию Li^+ , который, как считается, дестабилизирует эти структуры, мы предприняли попытку заменить одновалентные катионы металлов внутри клеток HeLa на ионы Li^+ . Полная замена внеклеточных ионов Na^+ на Li^+ с последующей инкубацией клеток течение 4 ч в таких условиях приводила к падению внутриклеточных содержаний Na^+_i с 69 до 12 нмоль/мг белка, K^+_i с 646 до 288 нмоль/мг белка, а также к накоплению Li^+ до значения 546 нмоль/мг белка (Рис. 19 А). Уменьшение внутриклеточного содержания K^+_i скорее всего связано с ингибированием Na,K-АТРазы, которое происходит из-за отсутствия потока Na^+ в клетку. Эти изменения в ионном составе клеток сопровождались увеличением количества мРНК *FOS* до 9 раз, а также уменьшением количества мРНК *KIT* и *MYC* на 20 и 94% соответственно (Рис. 19 Б).

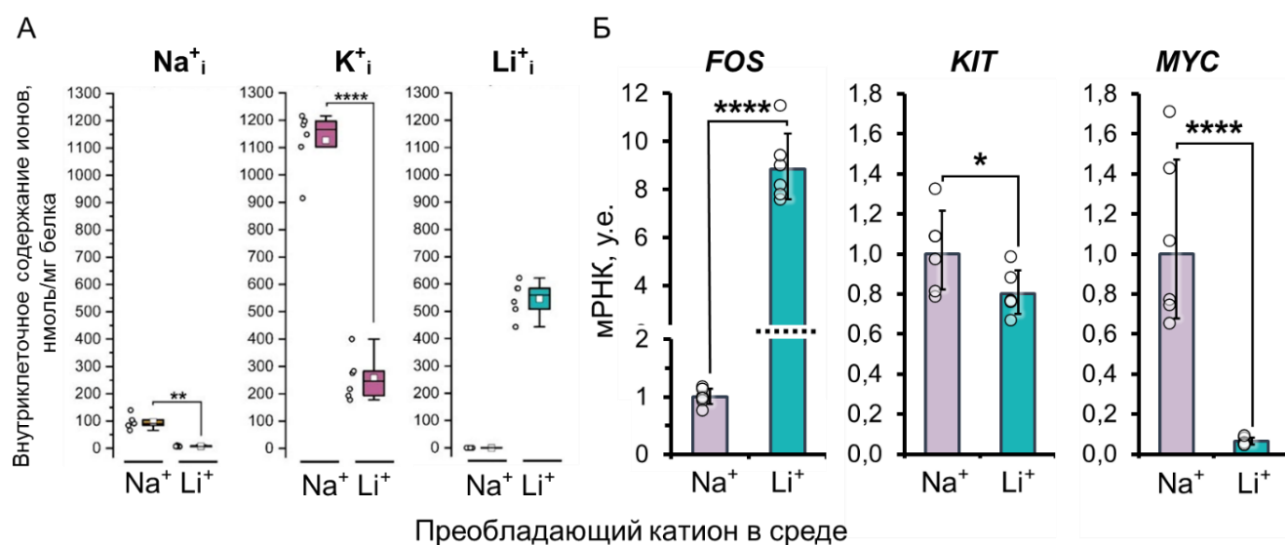


Рис. 19. Влияние полной замены ионов Na^+ во внеклеточной среде на ионы Li^+ с последующей инкубацией в течение 4 ч (состав сред см. в таблице Таблица 3) на ионный состав клеток HeLa (А) и количество мРНК FOS, KIT и MYC (Б). Результаты представлены в виде «ящичков с усами» (А), отражающих медиану (прямая) и среднее (белый квадрат) $\pm$ интерквартильный размах («ящик») и 1,5 интерквартильного размаха («усы»), либо геометрических средних $\pm$ стандартное отклонение (Б). Количество независимых экспериментов составляло 6. Статистически значимые отличия выявляли с помощью *t*-теста Стьюдента, * - $p\text{-value} < 0,05$; **** - $p\text{-value} < 0,0001$.

Кроме того, мы оценили влияние пиридостатина – лиганда, стабилизирующего G4, на фоне увеличения внутриклеточного $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -соотношения на транскрипцию генов *FOS*, *KIT* и *MYC*. Показано, что пиридостатин способен проникать в клетки, вызывая повреждение ДНК и уменьшая количество мРНК *MYC* на ~30% [154]. При этом его действие на транскрипцию *KIT* и *FOS* не изучено. В первую очередь важно отметить, что инкубация клеток в присутствии 10 мкМ пиридостатина в течение 24 ч не приводила к значимым изменениям внутриклеточного содержания Na^+_i и K^+_i (Рис. 20 А – 3), в отличие от действия 3 мкМ убаина (Рис. 20 А – 2). Пиридостатин также не влиял на экспрессию исследуемых генов. Увеличение внутриклеточного $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -соотношения сопровождалось увеличением количества мРНК *FOS* примерно в 7 раз как в присутствии пиридостатина, так и в его отсутствие, и не влияло на количество мРНК *KIT* и *MYC* (Рис. 20 Б).

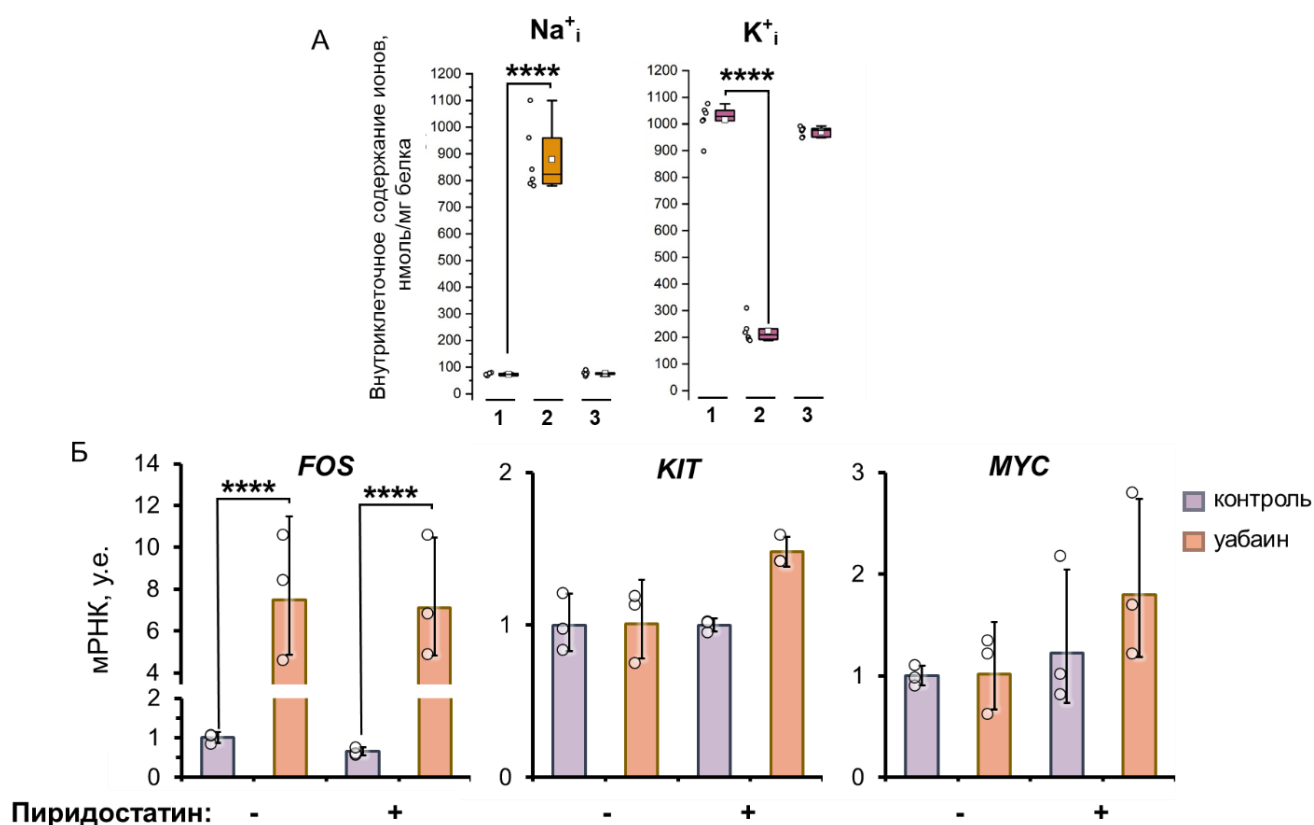


Рис. 20. Влияние лиганда G4 пиридостатина и убаина на внутриклеточный ионный состав (A) и количество мРНК FOS, KIT, MYC (Б) в клетках HeLa. Клетки инкубировали в DMEM, содержащей 0,1% FBS, в присутствии или в отсутствие 20 мкМ пиридостатина в течение 24 ч; за 3 ч до конца инкубации в среду вносили убаин до конечной концентрации 3 мкМ. В контрольные образцы убаин не вносили. Легенда панели A: 1 – контроль, 2 – 3 мкМ убаин 3 ч, 3 – 10 мкМ пиридостатин 24 ч. Результаты представлены в виде «ящичков с усами» (A), отражающих медиану (прямая) и среднее (белый квадрат) $\pm$ интерквартильный размах («ящик») и 1,5 интерквартильного размаха («усы»), либо геометрических средних $\pm$ стандартное отклонение (Б). Количество независимых экспериментов составляло 6 (A) или 3 (Б). Статистически значимые отличия выявляли с помощью ANOVA с последующим тестом Тьюки, **** - p -value < 0,0001.

Далее мы синтезировали олигонуклеотиды, соответствующие PQS в промоторе гена *FOS* (Рис. 21 А), и с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма оценили структуру этих олигонуклеотидов в присутствии разных соотношений K^+/Na^+ : 100 мМ : 0 мМ, 80 мМ : 20 мМ, 50 мМ : 50 мМ, 20 мМ : 80 мМ и 0 мМ : 100 мМ. Кроме того, мы использовали среду, которая содержит 2 мМ Na^+ , 40 мМ K^+ и 80 мМ Li^+ . Этот состав отражает приблизительные значения концентраций одновалентных катионов в клетках HeLa при замене внеклеточных ионов Na^+ на ионы Li^+ . Кроме того, мы использовали G4 из промоторов *KIT* и *MYC*, а также 22AG, который является G4 теломерной ДНК человека.

В первую очередь следует отметить, что все изучаемые нами последовательности в присутствии 100 мМ K^+ имели спектры, характерные для сформированных G4, однако эти G4 формировали структуры разных типов (Рис. 21 Б). FOS_{G41} во всех используемых средах имел отрицательный пик при 240 нм и положительный пик при 260 нм, что соответствует параллельной структуре. Увеличение концентрации Na^+ в растворе приводило к падению амплитуды пиков примерно на 30%, однако этот эффект наблюдался только при полной замене K^+ на Na^+ . Присутствие Li^+ снижало амплитуду пиков на 40%.

FOS_{G42} во всех растворах характеризовался отрицательным пиком при 240 нм и положительными пиками при 270 и 295 нм, что соответствует гибричному G4. Существенное изменение спектра наблюдалось только в присутствии 100 мМ Na^+ и проявлялось в виде падения эллиптичности при 260 нм до 0 миллиградусов. Спектр FOS_{G43} в присутствии ионов K^+ имел два положительных пика около 240 и 295 нм и один отрицательный пик при 260 нм. При увеличении Na^+/K^+ -соотношения до 80:20 наблюдалось уменьшение амплитуды пиков на 20-50%, наличие Li^+ оказывало схожий эффект. В присутствии 100 мМ Na^+ отрицательный пик смещался к 240 нм, а положительные пики – к 260 и 285 нм, что не характерно для G4 структур.

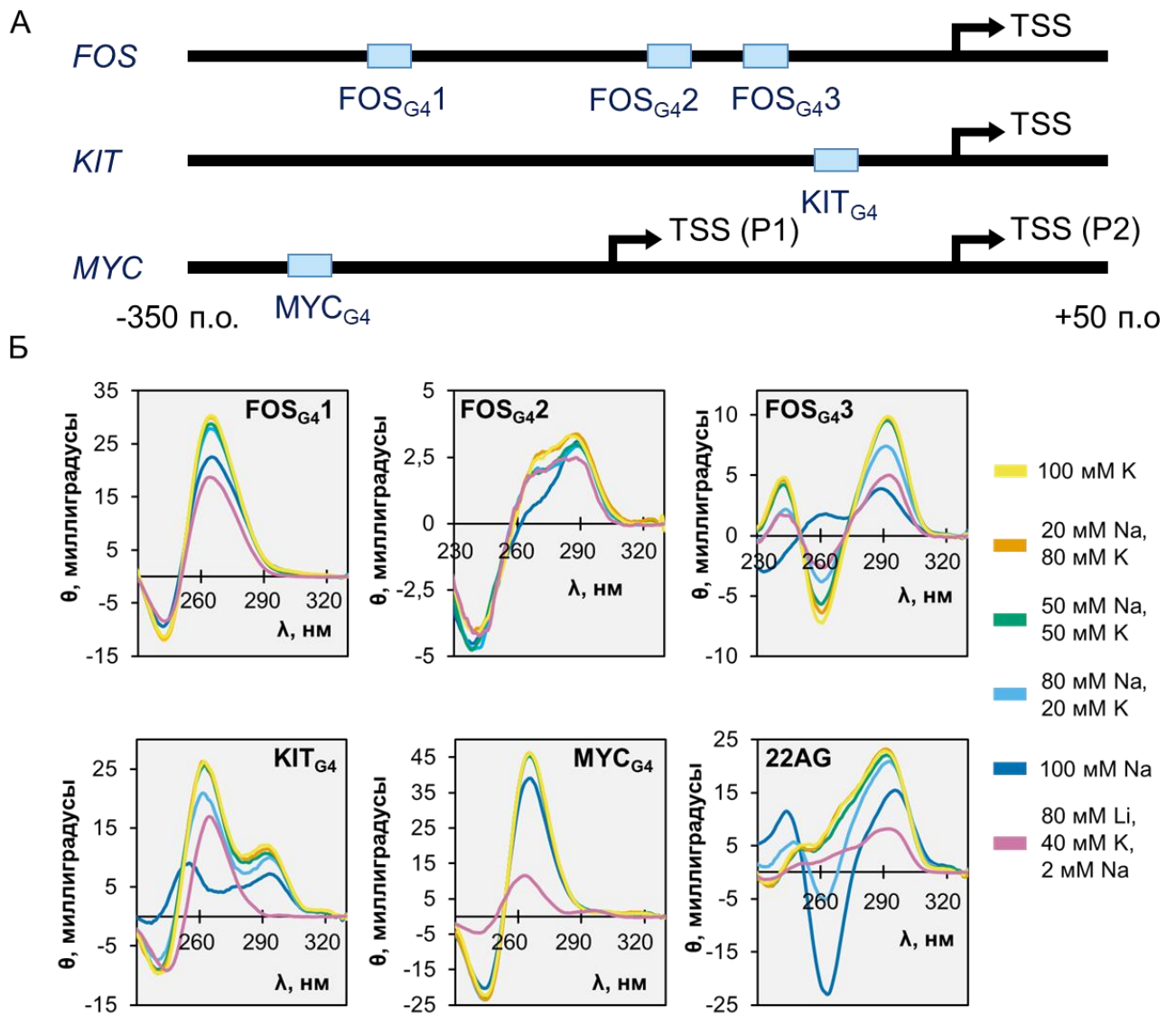


Рис. 21. Спектры кругового дихроизма последовательностей, потенциально формирующих G-квадруплексы (PQS). А – относительное расположение PQS в промоторах генов *FOS*, *KIT* и *MYC* (от – 350 до +50 п.о. относительно старта транскрипции). Б – спектры кругового дихроизма PQS в присутствии различных соотношений концентраций одновалентных катионов.

KIT_{G4} в присутствии K^+ и в отсутствие Li^+ образовывал гибридный G4 и характеризовался отрицательным пиком при 240 нм и положительными пиками при 260 и 295 нм, амплитуда этих пиков уменьшалась на 0-20% при повышении соотношения Na^+/K^+ до 80:20. В присутствии только ионов Na^+ спектр приобретал не характерные для G4 свойства. В присутствии Li^+ G4 имел параллельную структуру, характеризующуюся отрицательным пиком при 240 нм и положительным пиком при 260 нм.

Спектр MYC_{G4} имел типичную для параллельного G4 картину: отрицательный пик при 240 нм и положительный – при 260 нм. Полная замена K^+ на Na^+ снижала амплитуду пиков на 15%, а присутствие Li^+ – на 80%. При Na^+/K^+ -соотношении 50:50 и меньше спектр 22AG имел небольшой отрицательный пик при 240 нм и положительный пик при 290 нм, что свидетельствует о гибридной структуре. В присутствии Li^+ амплитуда пиков падала на 75%. Повышение Na^+/K^+ -соотношения до 80:20 и более приводило к изменению типа G4 на антипараллельный: отрицательный пик при 240 нм исчезал и появлялся отрицательный пик при 260 нм.

Таким образом, все изучаемые нами олигонуклеотиды, в том числе 3 PQS из промотора *FOS*, формировали G4 структуры разных типов в условиях *in vitro*. Все эти последовательности характеризуются разной чувствительностью к соотношениям концентраций одновалентных катионов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Повышение внеклеточной осмолярности в физиологическом диапазоне не вызывает индукцию экспрессии *FOS* в клетках эндотелия

Как уже было сказано ранее, несмотря на то, что концентрация Na^+ в крови строго поддерживается на постоянном уровне, при некоторых патологических состояниях она может повышаться. При гипернатриемии этот показатель превышает 145 мМ [74]. В условиях наших экспериментов мы увеличивали внеклеточную концентрацию Na^+ до 140 мМ, тем самым, не превышая физиологическую норму. При этом мы наблюдали увеличение активности Na,K-ATPазы в клетках HUVEC при 1-3 ч инкубации, которое устранялось в присутствии 1 мкМ амилорида (Рис. 13 и Рис. 14). Это указывает на усиление входа Na^+ в клетку через ENaC . По-видимому, локальное повышение внутриклеточной концентрации Na^+_i рядом с плазматической мембраной вызывает увеличение активности Na,K-ATPазы . Интересно, что после 1 ч инкубации внутриклеточное содержание Na^+_i даже снижается, что может указывать на более медленную регуляцию Na,K-ATPазы , чем повышение скорости ферментативной реакции простым увеличением концентрации ее субстрата (внутриклеточного Na^+). Можно предположить влияние Na^+_i на некие механизмы регуляции активности Na,K-ATPазы , такие как активация протеинкиназ. К примеру, в клетках эпителия собирательного протока почки крысы увеличение внутриклеточной концентрации Na^+_i приводит к увеличению представленности α -субъединицы Na,K-ATPазы на плазматической мембране. Этот эффект не был связан с синтезом новых белков, но был обусловлен увеличением активности протеинкиназы A , хотя при этом и не зависел от внутриклеточной концентрации cAMP. Исследователи предполагают, что Na^+_i влияет на степень деградации неизвестного регуляторного белка, который связывает протеинкиназу A , модулируя ее активность, а протеинкиназа A , в свою

очередь, способна регулировать встраивание Na,K-АТРазы в плазматическую мембрану из внутреннего пула [155]. Следует отметить, что в контексте эндотелия Na^+ -зависимая регуляция активности Na,K-АТРазы остается неизученной.

Интересно, что инкубация клеток HUVEC в течение 6 ч и более в присутствии 140 мМ Na^+ не приводила к усилению входа Rb^+ в клетку по сравнению с контрольными образцами (Рис. 13). Возможно, клетка эндотелия способна ограничивать поток Na^+ в цитоплазму спустя какое-то время после повышения внеклеточной концентрации этого иона. Например, в эпителиальных клетках при увеличении внутриклеточной концентрации Na^+_i функционирует механизм отрицательной обратной связи, который приводит к уменьшению представленности ENaC в мембране, а также к ограниченному протеолизу этих каналов. Однако для эндотелиальных клеток скорее характерно увеличение представленности и проводимости ENaC в ответ на повышение внеклеточной концентрации Na^+_o [156]. Кроме того, нельзя исключать возможность повышения цитоплазматической концентрации Ca^{2+} благодаря активации NCX и дальнейшего влияния этого иона на регуляторные системы клетки.

Повышение внеклеточной концентрации Na^+ на 15 мМ в течение 1-24 ч не влияло на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC (Рис. 13). При этом гораздо более сильное повышение осмолярности внеклеточной среды на 100 мОсм приводило к повышению внутриклеточной концентрации Na^+_i с 16 до 35 мМ и индукции экспрессии этого гена (Рис. 12). Эти наблюдения доказывают, что экспрессия *FOS* регулируется именно увеличением внутриклеточного $\text{Na}^+_i/\text{K}^+_i$ -соотношения, а не изменением осмолярности внеклеточной среды или увеличением внеклеточной концентрации Na^+ .

Таким образом, повышение концентрации Na^+ в крови в пределах физиологической нормы скорее не затрагивает *FOS*-зависимую систему клеточной сигнализации в эндотелии, однако мы не можем исключить возможность активации этой системы в условиях гипернатриемии.

2. Увеличение внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения приводит к повышению количества мРНК *FOS*

Как было сказано выше, повышение осмолярности внеклеточной среды на 100 мОсм приводило к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+_{i} и индукции экспрессии гена *FOS* в клетках HUVEC (Рис. 12). Поскольку эффект индукции *FOS* проявлялся только при увеличении внутриклеточной концентрации Na^+_{i} , а не в результате других стимулов, которые приводили к такому же изменению осмолярности внеклеточной среды и объема клетки, но не увеличивали Na^+_{i} (Рис. 12, гиперосмотическое сжатие в среде, не содержащей ионы Na^+ , или изоосмотическое сжатие), мы можем заключить, что экспрессия *FOS* в клетках эндотелия регулируется именно внутриклеточным $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношением.

Здесь следует сделать важную ремарку. Поскольку внутриклеточное $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношение тесно связано с Na,K-АТразой и для манипуляции этим параметром зачастую используются КТС, очень важно отсекаать связанные с ними побочные эффекты. Как уже было сказано ранее, Na,K-АТРаза рассматривается в качестве сенсора внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения. Она контактирует с регуляторными белками, в том числе с Src-киназой, которые, как предполагают исследователи, могут инициировать запуск сигнальных путей при изменении конформации Na,K-АТРазы [132]. Известно, что убаин стабилизирует Na,K-АТразу в E2Р конформации, что, предположительно, влияет на связывание с другими белками, в том числе с Src-киназой. Причем этот эффект может проявляться даже при таких низких концентрациях КТС, которые не приводят к явному ингибированию фермента [130]. Кроме того, убаин гипотетически может связываться с другими мишенями, к примеру, с рецепторами стероидных гормонов [153]. Поэтому в рамках данного исследования мы решили прояснить роль Na,K-АТРазы и сигнальных каскадов с участием КТС в $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимой регуляции экспрессии *FOS*.

Этот вопрос мы изучали, используя клетки HeLa, которые являются immortalizированными и имеют эпителиальное происхождение. В этой части работы мы использовали среды с разным соотношением Na^+/K^+ и не содержащие ионы Ca^{2+} .

Ингибирование Na,K-АТФазы убаином в присутствии нормального соотношения внеклеточных концентраций Na^+ и K^+ , как и ожидалось, приводило к увеличению внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения и индуцировало экспрессию *FOS* (Рис. 15). Однако в условиях инверсии внеклеточного Na^+/K^+ -соотношения убаин не увеличивал количество мРНК *FOS*. Как известно, сродство Na,K-АТФазы к убаину обратно пропорционально концентрации K^+ во внеклеточной среде [19], в связи с чем можно предположить отсутствие связывания КТС с этим ферментом в условиях инверсии внеклеточного Na^+/K^+ -соотношения. Инкубация клеток в этой среде в присутствии убаина приводила к значимому увеличению внутриклеточного содержания Na^+_{i} (Рис. 15 А, 8 мМ Na^+ и 92 мМ K^+), что указывает, во-первых, на наличие активности Na,K-АТФазы в таких условиях, и, во-вторых, на факт связывания убаина с Na,K-АТФазой, причем в количестве, достаточном для заметного ингибирования этого фермента. Отсутствие эффекта убаина на экспрессию *FOS* в подобных условиях связано, по всей видимости, с недостаточным увеличением внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения: так, в среде с нормальным соотношением оно повышается в 35 раз, а в среде с инверсией – всего в 1,5 раза (Рис. 15), указывая на корреляцию между величиной $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения и уровнем экспрессии *FOS*. Этот факт служит еще одним косвенным доказательством в пользу $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимой регуляции экспрессии *FOS*. Кроме того, мы можем сделать еще одно важное наблюдение: деполяризация плазматической мембраны сама по себе (по крайней мере в отсутствие внеклеточных ионов Ca^{2+}) не влияет на экспрессию *FOS*.

Учитывая все эти умозаключения, мы полагаем, что сигнальные каскады, инициируемые Na,K-АТФазой в результате связывания КТС с этим ферментом или другими мишенями в клетке, а также деполяризацией мембраны, не лежат в основе

механизма, обеспечивающего Na^+/K^+ -зависимую регуляцию экспрессии гена *FOS* человека.

3. Повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения приводит к активации MAPK, что не является необходимым для индукции *FOS*

Используя описанную в предыдущем разделе систему с изменением внеклеточных концентраций Na^+ и K^+ , мы показали, что именно увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения, а не иное действие убаина приводит к фосфорилированию трех канонических MAPK: ERK1/2, JNK и p38. При этом уровень фосфорилирования начинает увеличиваться между 0,5 и 3 ч после начала ингибирования Na,K-АТФазы (Рис. 16 А). Это может указывать на то, что существует определенный порог внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения, при превышении которого происходит активация протеинкиназ, фосфорилирующих MAPK.

Как и ожидалось, ингибиторы ERK1/2 и p38 снижали базовый уровень мРНК *FOS*. Однако при этом удивительно, что ингибирование MAPK как по отдельности, так и совместное, не повлияло на амплитуду ответа *FOS* на действие убаина (Рис. 16 Б). Это указывает на мультипликативный характер совместного действия стимулов, подавляющих активность MAPK, и увеличения Na^+/K^+ -соотношения в контексте экспрессии *FOS*. Мультипликативный характер взаимодействия стимулов указывает на взаимодействие механизмов регуляции экспрессии генов, в отличие от аддитивного характера, который указывает на независимые друг от друга пути. К примеру, кооперативное связывание двух транскрипционных факторов с ДНК будет характеризоваться мультипликативным влиянием на экспрессию, в то время как связывание двух факторов никак не взаимодействующих друг с другом скорее приведет к аддитивному характеру взаимодействия [157]. Кроме того, изменение скорости деградации мРНК *FOS* под

действием одного из стимулов также может быть причиной мультипликативного взаимодействия стимулов (формула 3). Следует отметить, что в присутствии ингибитора транскрипции актиномицина D увеличения количества мРНК *FOS* в гладкомышечных клетках сосудов крысы при действии убаина не происходило [5], что является указанием на отсутствие эффекта Na^+/K^+ -соотношения на время полужизни мРНК *FOS*.

$$[mRNA] = \frac{k_{\text{синтеза}}}{k_{\text{деградации}}}$$

Формула 3. Концентрация мРНК в клетке в стационарных условиях определяется отношением констант скорости синтеза и распада мРНК.

Таким образом, мы можем сделать несколько умозаключений. Во-первых, Na^+/K^+ -зависимая регуляция экспрессии *FOS* не опосредована MAPK. Во-вторых, MAPK-опосредованная регуляция экспрессии *FOS* через неизвестный механизм влияет на Na^+/K^+ -зависимую индукцию экспрессии *FOS*.

4. Повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения не приводит к увеличению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} и изменению редокс-статуса цитоплазмы

С использованием внутриклеточного флуоресцентного зонда Fluo8 мы оценили влияние увеличения внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения на концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме HeLa. Эксперимент проводили в системе с разным соотношением внеклеточных концентраций ионов Na^+ и K^+ и в отсутствие ионов Ca^{2+} во внеклеточной среде. К сожалению, мы не регистрировали флуоресценцию Fluo8 до внесения убаина в среду, поэтому ввиду отсутствия базовой линии флуоресценции затруднительно сделать выводы относительно разницы абсолютных значений концентраций Ca^{2+} в клетках, обработанных и необработанных убаином. Однако мы можем сравнить динамику изменения

внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в этих клетках. Результаты четко демонстрируют, что убаин не приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} во времени в течение 3 ч ни в присутствии 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ (Рис. 17 А), ни в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения (Рис. 17 Б). Интересно, что при этом в среде с нормальным Na^+/K^+ -соотношением сигнал сенсора уменьшается со временем, а в среде с инвертированным соотношением сигнал стабилен. Это может указывать на выход зонда из клетки, который, однако, вряд ли сопряжен с транспортом Na^+ или K^+ , поскольку амплитуда падения сигнала была примерно одинаковой для клеток, инкубированных в присутствии и в отсутствие убаина.

После окончания инкубации в среду вносили гистамин, который приводил к выходу Ca^{2+} из внутриклеточного депо в цитоплазму. Гистамин воздействует на H1 -рецептор клетки HeLa, активируя фосфолипазу C, что приводит к формированию инозитолтрифосфата. Это соединение в свою очередь активирует выход Ca^{2+} из депо через лиганд-управляемые каналы на эндоплазматическом ретикулуме [158]. При инкубации клеток в среде без Ca^{2+} его запасы в клеточном депо истощаются со временем [159], а поскольку мы инкубировали клетки в таких средах более 3 ч, в депо должно содержаться относительно небольшое количество Ca^{2+} . Гистамин в подобной среде приводит к истощению депо, оно больше не способно накапливать Ca^{2+} [159]. Интересно, что клетки с повышенным внутриклеточным $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношением отличались значительно более длительным эффектом повышения уровня Ca^{2+} в цитоплазме. Исследования, проведенные с использованием мышечных клеток, показывают, что 99% выброса ионов Ca^{2+} из цитоплазмы осуществляют SERCA на эндоплазматическом ретикулуме и NCX на плазматической мембране, а оставшийся 1% приходится на NCLX и PMCA [36]. Это позволяет предположить, что, скорее всего, повышение внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения влияет либо на SERCA или NCX (если он функционирует в клетках HeLa), либо на сигнальный каскад, запускаемый гистамином.

Кроме того, мы оценили продукцию активных форм кислорода в клетках HeLa с помощью генетически кодируемого сенсора HyPer7. Этот сенсор, в отличие от своих предшественников, менее чувствителен к изменению pH (сигнал стабилен в диапазоне pH 6-8) и обладает большей амплитудой ответа. Чувствительность HyPer7 позволяет детектировать субнанолярные концентрации H_2O_2 в цитоплазме [145]. По результатам микроскопии видно, что убаин не увеличивает долю окисленной формы сенсора ни в присутствии 92 mM Na^+ и 8 mM K^+ (Рис. 18 А), ни в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения (Рис. 18 Б). Важно отметить, что благодаря наличию сильных антиоксидантных систем в цитоплазме и/или в межмембранном пространстве митохондрий увеличение генерации H_2O_2 в митохондриях приводит к ее выходу в цитоплазму в очень редких ситуациях [145]. Поэтому мы не можем утверждать, что повышение Na^+/K^+ -соотношения не ведет к окислительному стрессу в митохондриях.

Таким образом, увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения не вызывает накопление Ca^{2+} в цитоплазме и не приводит к окислительному стрессу в цитоплазме клетки.

5. Повышение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения приводит к увеличению внутриклеточного pH

Используя генетический кодируемый сенсор SypHer3s, мы показали, что увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa ведет к постепенному защелачиванию цитоплазмы, которое сменяется ее закислением (Рис. 18 А). Это наблюдение стало для нас удивительным, поскольку логичнее было бы предположить уменьшение выхода H^+ из клетки через NHE при диссипации Na^+/K^+ -градиента, что привело бы к закислению цитоплазмы. Здесь следует упомянуть, что NHE регулируется не только градиентами Na^+ и H^+ , но также такими клеточными параметрами, как ее объем и уровень АТФ. Так, сжатие клетки

сопровождается активацией некоторых изоформ NHE, в том числе NHE1. Увеличение уровня АТР также сопровождается активацией NHE [8]. Возможно, длительная инкубация клеток в присутствии 3 мкМ убаина приводит к изменению клеточного объема и увеличению концентрации АТР вследствие остановки одного из самых энергозатратных процессов в клетке. Это, гипотетически, может приводить к увеличению активности NHE на начальных этапах ингибирования Na,K-АТРазы, когда градиент Na^+ не полностью диссипирован. Кроме того, известно, что метаболическая активность клеток коррелирует с концентрацией H^+ в цитоплазме [146]. Возможно, замедление метаболической активности вследствие падения затрат АТР является еще одной причиной наблюдаемого алкалоза. Последующее же закисление цитоплазмы может быть обусловлено ингибированием NHE вследствие полной диссипации Na^+ -градиента. Закисление цитоплазмы вследствие деполяризации мембраны в среде, содержащей 8 мМ Na^+ и 92 мМ K^+ , также может быть связано с отсутствием активности NHE при диссипации Na^+ -градиента. Конечно, все эти умозаключения требуют экспериментального подтверждения.

Повышение значения внутриклеточного рН гипотетически может привести к индукции экспрессии *FOS*. Существуют сведения, которые указывают на возможность такой регуляции. Исследователи трансфицировали фибробласты мыши Н-АТФазой дрожжей, которая выбрасывает H^+ из клетки, изменяя рН. Такая трансфекция приводила к увеличению экспрессии *FOS* в 11 раз. Однако следует отметить, что в этой работе не осуществлялся контроль уровня внутриклеточного рН [160]. Также важно, что Na^+/K^+ -зависимая регуляция экспрессии *FOS* происходит уже спустя 60 мин после ингибирования Na,K-АТРазы (Рис. 12) или даже раньше. При этом мы не наблюдали изменения сигнала сенсора SypHer3s при таком времени инкубации. В связи с этим мы полагаем, что изменение внутриклеточного рН не является необходимым фактором для проявления Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии *FOS*, хотя, безусловно, для точного ответа на этот вопрос требуются дальнейшие исследования.

6. Роль G-квадруплексов в Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии гена *FOS*

Как мы уже упоминали ранее, G-квадруплексы (G4) являются перспективным кандидатом на роль внутриклеточного сенсора одновалентных катионов. Нами установлено, что как минимум 3 PQS в составе промотора *FOS* формируют G4 в условиях *in vitro* и обладают разной чувствительностью к соотношению концентраций одновалентных катионов (Рис. 21). Следует отметить, что спектр кругового дихроизма ни одного из исследуемых нами олигонуклеотидов существенно не изменялся при повышении Na^+/K^+ -соотношения от 0:100 до 50:50. Видимые изменения в структуре G4 происходили при повышении Na^+/K^+ -соотношения либо до 80:20 в случае $\text{FOS}_{\text{G4}3}$ и 22AG, либо до 100:0 в случае остальных G4. В присутствии 80 мМ Li^+ , 40 мМ K^+ и 2 мМ Na^+ мы наблюдали существенное уменьшение пиков спектров всех используемых олигонуклеотидов, что указывает на более существенную дестабилизацию G4 ионами Li^+ по сравнению с ионами Na^+ . Также важно отметить, что G4 из промотора *MYC* обладал наименьшей чувствительностью к Na^+/K^+ -соотношению, но при этом его спектр был очень чувствителен к присутствию ионов Li^+ .

Эксперименты по нагрузке клеток стабилизатором G4 пиридостатином или дестабилизатором G4 ионами Li^+ показали неоднозначные результаты. С одной стороны, присутствие Li^+ приводит к сильному изменению количества мРНК генов *FOS*, *KIT* и *MYC* (Рис. 19). Здесь следует уточнить, что этот эффект не обязательно связан с изменением структуры G4 в составе их промоторов, так как Li^+ способен индуцировать различные сигнальные пути, включая cAMP- [161], Wnt/ β -катенин- [162], PI3K/Akt-зависимый сигнальные пути [163]. С другой стороны, пиридостатин не оказал влияния на количество мРНК исследуемых генов (Рис. 20). Поскольку это соединение не влияло на транскрипцию генов *MYC* и *KIT*, с четко показанной ролью G4 в регуляции их транскрипции, мы не можем утверждать, что отсутствие его эффекта на Na^+/K^+ -зависимую регуляцию

экспрессии *FOS* свидетельствует об отсутствии вовлеченности G4 в регуляцию транскрипции *FOS*.

Из полученных нами данных можно вывести несколько умозаключений. Во-первых, разные G4 обладают очень разной чувствительностью к изменению соотношения одновалентных катионов. Эти различия скорее не связаны с направленностью цепей, составляющих G4. Так, амплитуда изменения пиков в присутствии Li^+ для двух параллельных G4 $\text{FOS}_{\text{G4}1}$ и MYC_{G4} сильно отличается. Гибридные G4 $\text{FOS}_{\text{G4}2}$, KIT_{G4} и 22AG также демонстрируют очень отличающиеся друг от друга изменения спектра. Во-вторых, ни один из используемых в данной работе G4 не изменяет свою структуру при повышении Na^+/K^+ -соотношения до величин, которые достаточны для индукции экспрессии *FOS*. Инкубация HUVES в присутствии 0,1 мкМ уабаина в течение 60 мин приводила к индукции транскрипции *FOS* при увеличении Na^+/K^+ -соотношения до 32:65 (Рис. 12), что лежит между значениями 20:80 и 50:50. Это может объясняться либо отсутствием вовлеченности именно этих G4 в Na^+/K^+ -зависимую регуляцию транскрипции гена *FOS*, либо наличием дополнительных факторов, увеличивающих чувствительность G4 к Na^+/K^+ -соотношению в живой клетке.

Таким образом, мы не можем однозначно утверждать, что Na^+/K^+ -зависимая регуляция гена *FOS* обусловлена изменением структуры G4. Чтобы прояснить этот вопрос, необходимы дальнейшие исследования. Существуют и другие гипотетические механизмы, вовлеченность которых в Na^+/K^+ -зависимую регуляцию экспрессии *FOS* нуждается в экспериментальной верификации. Они будут обсуждены в следующем разделе.

7. Иные возможные механизмы регуляции экспрессии *FOS*

Na^+/K^+ -соотношением

Известно, что природа ионов, находящихся в растворе, может влиять на взаимодействие макромолекул. Впервые это явление было описано Францом Гофмейстером и соавторами. Они описали различную способность ряда анионов и катионов высаливать белки из раствора, впоследствии ряды этих ионов получили название серий Гофмейстера (или лиотропных рядов), а само явление известно как эффект Гофмейстера. Причины проявления этого эффекта лежат в различиях физико-химических свойств ионов: все ионы отличаются друг от друга по ионному радиусу и способности упорядочивать молекулы воды вокруг. Эти параметры влияют на взаимодействие ионов с макромолекулами, в частности белками, влияя тем самым на взаимодействие поверхностей макромолекул друг с другом [164]. Катионы щелочных металлов сильно отличаются друг от друга по способности упорядочивать молекулы воды. Так, ион Li^+ является космотропом (то есть сильно упорядочивает воду вокруг себя), K^+ является хаотропом (не структурирует воду вокруг, при этом связь между молекулой воды и ионом слабее, чем связи молекул воды друг с другом), а Na^+ по этому параметру находится между этими двумя ионами. Для ионов Rb^+ и Cs^+ характерна способность структурировать воду, подобная иону K^+ — данные катионы также являются хаотропами [165].

В связи с этим межмолекулярные взаимодействия макромолекул в присутствии определенной концентрации Na^+ могут отличаться от их взаимодействия в присутствии той же концентрации K^+ . Разумеется, степень проявления этого эффекта в физиологических условиях может сильно отличаться для разных макромолекул. Помимо проявления эффекта Гофмейстера, для одновалентных катионов металлов характерна способность образовывать координационные связи, которая обуславливает высокую специфичность взаимодействия этих ионов с ионными каналами и другими белками [164].

Описано существование белков, способных специфически связывать ионы Na^+ или K^+ , которые при этом не относятся к классическим ионным каналам и переносчикам, ряд этих белков мы рассмотрим далее. Следует отметить, что идентификация Na^+/K^+ -чувствительных белков крайне затруднена из-за того, что центры связывания одновалентных катионов образуются аминокислотами, находящимися в удаленных друг от друга участках полипептидной цепи и сближающимися при формировании третичной структуры белка [166]. В связи с этим очень вероятно, что далеко не все такие белки были идентифицированы.

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR) являются одними из белков, способных специфически связывать ионы Na^+ . Они представляют собой мембранные рецепторы, которые при связывании с лигандами вызывают активацию G-белков. Выделяется 4 класса GPCR – A, B, C и F (Frizzled). Класс A является самым многочисленным – у человека около 700 GPCR принадлежит этому классу, среди них мускариновые, опиоидные, 5HT, адренэргические, аденозиновые, дофаминовые, эндотелиновые и многие другие. GPCR класса A содержат аллостерический участок связывания Na^+ , который влияет на активацию рецептора при его связывании с лигандами. В отсутствие Na^+ активация рецептора лигандом не происходит. Значение EC_{50} активации клеточной сигнализации ионами Na^+ составляет около 50 мМ. Из-за того, что участок связывания Na^+ доступен как с цитоплазматической, так и с внеклеточной стороны, в физиологических условиях он скорее всего всегда связан с ионом Na^+ . Физиологическая роль этого аллостерического участка и его чувствительность к внутриклеточной концентрации Na^+ до сих пор остается малоизученной [167]. Кроме того, сами G-белки, по-видимому, также обладают чувствительностью к Na^+/K^+ -соотношению. Так, показано, что диссоциация α_{GDP} - и $\beta\gamma$ -субъединиц G-белка в нейрональных клетках активируется повышением внутриклеточной концентрации Na^+ [168].

Семейство белков теплового шока Hsp70 является высококонсервативным, эти белки обеспечивают фолдинг синтезированных или денатурированных белков в клетке, гидролизуя при этом молекулы АТР. АТРазная активность Hsp70 зависит

от концентрации K^+ и в меньшей степени от концентрации Rb^+ и NH_4^+ , максимальная активация наблюдается при увеличении концентрации K^+ до 100 мМ. При этом ионы Na^+ , Li^+ и Cs^+ не оказывают влияния на активность при тех же концентрациях [169]. Пируваткиназа также чувствительна к одновалентным катионам. Ионы K^+ , Rb^+ и NH_4^+ увеличивают активность этого фермента, в то время как ионы Na^+ влияют на этот параметр гораздо слабее [170]. Кроме того, существуют сведения, которые указывают на то, что внутриклеточная концентрация K^+_i влияет на гликолиз в клетках HeLa и HEK293 через AMPK и гексокиназу II [171].

Известно, что ионы K^+ важны для структурной организации рибосом. Участки связывания этих ионов обнаружены в декодирующем и пептидил-трансферазном центрах рибосомы, в интерфейсах взаимодействия рибосомных белков с РНК и в структуре рибосомной РНК (рРНК). В частности, K^+ образует координационные связи с кетогруппами в 6-м положении остатков гуанина, стабилизируя их взаимодействие в рРНК. Примечательно, что этот механизм схож с механизмом стабилизации структуры G4 при связывании с катионами металлов [172]. Важно отметить, что специфичность этих взаимодействий именно для иона K^+ относительно иона Na^+ не показана экспериментально, однако существуют данные, указывающие на чувствительность процесса трансляции именно к концентрации K^+ . Так, с использованием клеток *E.coli* было показано, что синтез белка ингибируется при понижении внутриклеточной концентрации K^+_i . При этом также был обнаружен антагонизм Na^+ и K^+ . Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na^+_i сильно ингибировало синтез белка. Этот эффект проявлялся также при трансляции *in vitro* в бесклеточной системе. Следует отметить, что ионы Rb^+ обладали тем же эффектом в отношении синтеза белка, что и ионы K^+ [173].

Подобный эффект наблюдается также у высших эукариот: так, диссипация Na^+/K^+ -градиента ведет к подавлению синтеза белка в клетках крыс [85]. В клетках эукариот рибосомы связаны с рядом киназ, обеспечивающих контроль процесса трансляции и клеточного ответа на дисфункцию рибосом, к примеру, MAPKKK

ZAK α . При рибосомном стрессе, связанным с наличием поврежденной мРНК в клетке, происходят столкновения рибосом. В результате формируются рибосомные олигомеры, наличие которых индуцирует клеточный ответ на рибосомный стресс. По-видимому, в основе такого ответа лежит автофосфорилирование киназы ZAK α . Эта киназа фосфорилируется при действии ингибиторов элонгации трансляции, при недостатке аминокислот, а также при повреждении мРНК ультрафиолетовым излучением, в дальнейшем приводя к фосфорилированию киназ p38 и JNK, что приводит к апоптозу клетки [174]. Также важно отметить, что существуют данные, указывающие на возможность ZAK киназ фосфорилировать ERK1/2 [175].

Другие процессы, связанные с РНК, например, сплайсинг, по-видимому, также зависят от одновалентных катионов металлов. Так, сплайсинг интронов I и II групп требует наличия именно ионов K⁺: в присутствии других одновалентных катионов, в том числе Na⁺, активность сплайсинга этих интронов существенно подавляется [165].

Учитывая все вышесказанное, мы можем заключить, что Na⁺_i/K⁺_i-соотношение является крайне важным параметром любой клетки животного. Не удивительно, что клетки способны отвечать на увеличение Na⁺_i/K⁺_i-соотношения посредством разных механизмов, в том числе изменяя экспрессию генов. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты позволили раскрыть некоторые детали механизма Na⁺_i/K⁺_i-зависимой регуляции экспрессии генов на примере гена *FOS*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все результаты, полученные в ходе выполнения этой работы, мы можем заключить, что в клетке существует сенсор концентраций одновалентных катионов, который может регулировать экспрессию гена *FOS*. Для работы этого сенсора не требуются повышение концентраций ионов Ca^{2+} или активных форм кислорода в цитоплазме, изменение объема клетки, наличие активности МАРК. Кроме того, влияние этого сенсора на экспрессию гена *FOS* не обусловлено изменением мембранного потенциала (Рис. 22). Также этим сенсором, скорее всего, не является Na,K-АТРаза: ее ингибирование при слабо изменяющемся внутриклеточном Na^+/K^+ -соотношении не приводило к индукции экспрессии *FOS*.

Для будущих исследований мы предлагаем рассмотреть два возможных механизма, лежащих в основе активации транскрипции *FOS* при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения: изменение внутриклеточного pH и изменение конформации G-квадруплексов в составе промотора *FOS* (Рис. 22). Так, мы обнаружили, что увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения сопровождается временным повышением внутриклеточного pH, которое сменяется закислением цитоплазмы. В дальнейшем необходимо изучить роль повышения этого параметра в регуляции экспрессии *FOS*. Также мы впервые показали, что в промоторе *FOS* человека существует как минимум три последовательности, формирующие G-квадруплексы в условиях *in vitro* и обладающие разной чувствительностью к одновалентным катионам. Однако, чтобы подтвердить вовлеченность этих структур в Na^+/K^+ -зависимую регуляцию экспрессии *FOS*, необходимы дальнейшие исследования.

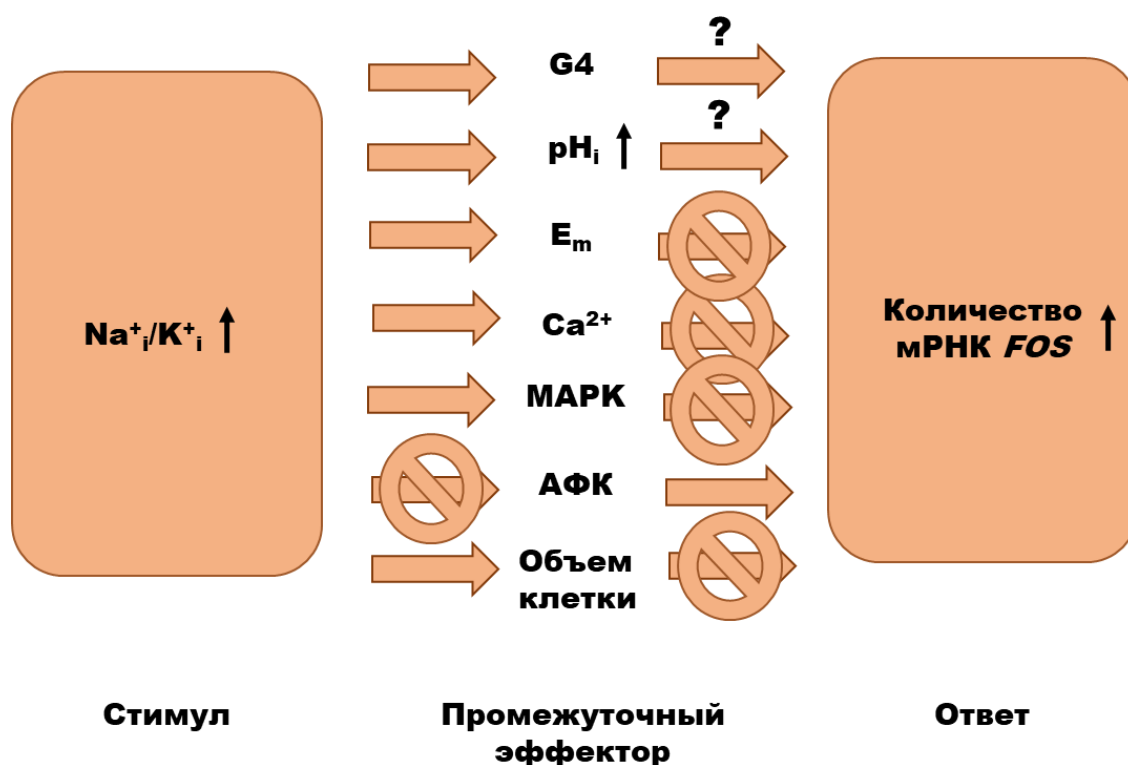


Рис. 22. Увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения увеличивает количество мРНК FOS через механизм, не связанный с изменением потенциала плазматической мембраны клетки (E_m), повышением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, увеличением активности МАРК, увеличением генерации активных форм кислорода (АФК) или изменением объема клетки. Результаты диссертационной работы указывают на возможное участие двух промежуточных эффекторов в Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии FOS: увеличение внутриклеточного pH и изменение конформации G4 в геноме клетки.

Внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение вопреки расхожему мнению не является постоянным параметром в клетках животных, при патологических состояниях оно может изменяться. Это делает изучение Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии генов крайне важным для понимания механизмов патогенеза огромного ряда заболеваний, затрагивающих ион-транспортирующие системы. К ним относятся сердечно-сосудистые, онкологические, нейропатологические заболевания. Эта диссертационная работа может послужить в качестве основы для будущих исследований в малоизученной области Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии генов и работ по разработке новых подходов к терапии заболеваний, связанных с нарушениями ионного транспорта.

ВЫВОДЫ

1. Изменение объема клеток HUVEC приводит к увеличению экспрессии *FOS* в этих клетках только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
2. Увеличение внеклеточной концентрации Na^+ от 125 до 140 мМ приводит к увеличению активности Na,K-АТФазы и не влияет на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.
3. Убаин индуцирует экспрессию *FOS* в клетках HeLa только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
4. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa сопровождается фосфорилированием ERK1/2, JNK и p38. Ингибирование этих протеинкиназ не подавляет активацию транскрипции *FOS* в ответ на увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
5. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa не приводит к генерации активных форм кислорода в цитоплазме и сопровождается временным повышением внутриклеточного pH.
6. Три последовательности из промоторного региона *FOS* человека формируют G-квадруплексы *in vitro*, которые изменяют свою структуру в зависимости от Na^+/K^+ -соотношения или в присутствии ионов Li^+ .

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3'-НТО – 3'-нетранслируемая область

5'-НТО – 5'-нетранслируемая область

5НТ – 5-гидрокситриптамиин

ADP – аденозиндифосфат

Akt – протеинкиназа Б

AMPA – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

ANOVA – дисперсионный анализ

AP-1 – активирующий белок 1

ARE – AU-богатый элемент

ATF1 – активирующий транскрипционный фактор 1

ATP – аденозинтрифосфат

C11-MDCK – клон 11 клеточной линии клеток почки собаки Мадин-Дарби

C7-MDCK – клон 7 клеточной линии клеток почки собаки Мадин-Дарби

CA1 – Cornu Ammonis 1

cAMP - циклический аденозинмонофосфат

Ca_v – потенциал-чувствительный Ca-канал

CRE – элемент ответа на c-AMP

CREB – фактор, связывающий элемент CRE

DISUR – реконструкция поверхности клетки с помощью двух изображений

DMEM – модифицированная среда Дульбеко

DSIF – фактор, индуцируемый 5,6-дихлоро-1- β -D-рибофуранозилбензимидазолом

EC₅₀ – концентрация, при которой наблюдается 50% изменения параметра

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

ELK1 – подобная E26 киназа 1

E_m – потенциал на плазматической мембране

ENAC – амилорид-чувствительные эпителиальные натриевые каналы
 ERK1/2 – протеинкиназа, активируемая внеклеточными стимулами 1/2
 FBS – сыворотка новорожденных коров
FOS – гомолог онкогена вируса остеосаркомы мыши FBJ
 G4 – G-квадруплекс
 GAG – гликозаминогликан
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
 GDP – гуанозиндифосфат
 GTP – гуанозинтрифосфат
 GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белками
 H9C2 – субклон линии эмбриональной сердечной ткани крысы BD1X
 HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
 HIF – фактор, индуцируемый гипоксией
 Hsp70 – белок теплового шока с массой 70 кДа
 HuR – антиген человека R
 HUVEC – клетки эндотелия пупочной вены человека
 JAK – янус-киназа
 JNK – протеинкиназа N-конца JUN
JUN – гомолог онкогена вируса саркомы птиц 17
 KCC – K⁺,Cl⁻-зависимый котранспортер
 KSRP – сплайсинг регулирующий белок КН-типа
 K_v – потенциал-чувствительный K-канал
 LB – лизогенная среда
 MAP2K – протеинкиназакиназа MAP-киназы
 MAP3K – протеинкиназакиназа MAP2-киназы
 MAPK – митогенактивируемая протеинкиназа
 MAPKAPK – протеинкиназа, активируемая MAPK

mCRD – основной детерминант дестабилизации, находящийся в белок-кодирующей части мРНК

MEK – митогенактивируемая протеинкиназа киназы

MSK1/2 – протеинкиназа, активируемая факторами роста и стрессом 1/2

mTOR – протеинкиназа млекопитающих, являющаяся мишенью рапамицина

Na_v – потенциал-чувствительный Na-канал

NBC – Na, HCO₃-котранспортер

NCC – Na, Cl-котранспортер

NCLX – митохондриальный Na/Li/Ca-обменник

NCX – Na/Ca-зависимый обменник

NELF – негативный фактор элонгации

NFAT5 – ядерный фактор 5 активированных Т-клеток

NF-I – ядерный фактор I

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би»

NHE – Na, H-обменник

NIH 3T3 – фибробласты мыши

NKCC – Na, K, Cl-котранспортер

NMDA – N-метил-D-аспартат

NMDG – N-метил-D-глюкамин

PARP1 – поли(ADP-рибоза)-полимераза 1

PBS – фосфатно-солевой буфер

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PKA – протеинкиназа A

PKC – протеинкиназа C

PMCA – Ca-АТРаза плазматической мембраны

PMSF – фенилметилсульфонил фторид

PQS – последовательность, потенциально формирующая G-квадруплекс

Raf – киназа быстро развивающейся фибросаркомы

Ras – белок вируса саркомы крысы

RIPA – буфер для радиоиммунопреципитации

RPLP0 – субединица бокового стебля рибосомального белка P0

RSK – S6 киназа рибосомы

RVD – регуляторное уменьшение объема

RVI – регуляторное увеличение объема

RVSMC – клетки гладкой мускулатуры аорты крысы

SDS – додецилсульфат натрия

SERCA – Ca-АТРаза эндоплазматического ретикулума

SRE – элемент ответа на сыворотку

SRF – фактор ответа на сыворотку

STAT – трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции

TBS – солевой трис-буфер

TBST – солевой трис-буфер, содержащий Tween 20

TPA – 12-О-тетрадеканоилфорбол 13-ацетат

TRE – элемент ответа на 12-О-тетрадеканоилфорбол 13-ацетат

TRP – каналы с потенциалом временного рецептора

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов

ZAK – митоген-активируемая протеинкиназа киназы киназы 20

ZFP36 – ген, кодирующий белок с мотивом цинкового пальца 36

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

КТС – кардиотонический стероид

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – информационная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

РТ-ПЦР – количественная ПЦР в «реальном времени»

ТФ – транскрипционный фактор

ТХУ – трихлоруксусная кислота

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЭГТА – этиленгликольдиаминтетрауксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harootunian A.T. и др. Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na^+ in individual fibroblasts and lymphocytes // J. Biol. Chem. 1989. Т. 264, № 32. С. 19458–19467.
2. Balkay L. и др. Flow cytometric determination of intracellular free potassium concentration // Cytometry. 1997. Т. 28, № 1. С. 42–49.
3. Skou J.C., Esmann M. The Na,K -ATPase // J. Bioenerg. Biomembr. 1992. Т. 24, № 3. С. 249–261.
4. Lopina O.D. и др. G-Quadruplexes as Sensors of Intracellular Na^+/K^+ Ratio: Potential Role in Regulation of Transcription and Translation // Biochem. Mosc. 2024. Т. 89, № 1. С. S262–S277.
5. Taurin S. и др. c-Fos Expression in Ouabain-Treated Vascular Smooth Muscle Cells from rat Aorta: Evidence for an Intracellular-Sodium-Mediated, Calcium-Independent Mechanism // J. Physiol. 2002. Т. 543, № 3. С. 835–847.
6. Haloui M. и др. $[\text{Na}^+]_i$ -induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements // FEBS J. 2007. Т. 274, № 14. С. 3557–3567.
7. Koltsova S. V. и др. Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -Sensitive Transcriptome in Mammalian Cells: Evidence for Ca^{2+}_i -Independent Excitation-Transcription Coupling // PLoS ONE / под ред. Tsuji Y. Public Library of Science, 2012. Т. 7, № 5. С. e38032.
8. Orłowski J., Grinstein S. Na^+/H^+ Exchangers // Compr. Physiol. 2011. Т. 1, № 4. С. 2083–2100.
9. Семенова С.Б. Принципы формирования кальциевого сигнала в клетках эукариот // Цитология. 2020. Т. 62, № 9. С. 611–622.
10. Berend K., van Hulsteijn L.H., Gans R.O.B. Chloride: The queen of electrolytes? // Eur. J. Intern. Med. 2012. Т. 23, № 3. С. 203–211.
11. Kaplan J.H. Biochemistry of Na,K -ATPase // Annu. Rev. Biochem. 2002. Т. 71, № 1. С. 511–535.

12. Yoon K.L., Guidotti G. Studies on the membrane topology of the (Na,K)-ATPase // J. Biol. Chem. 1994. T. 269, № 45. C. 28249–28258.
13. Lingrel J.B., Kuntzweiler T. Na⁺,K⁺-ATPase // J. Biol. Chem. 1994. T. 269, № 31. C. 19659–19662.
14. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function // Am. Physiol. Soc. 1998. T. 275. C. 633–650.
15. Vadász I., Raviv S., Sznajder J.I. Alveolar epithelium and Na,K-ATPase in acute lung injury // Intensive Care Med. 2007. T. 33, № 7. C. 1243–1251.
16. Crambert G. и др. Transport and Pharmacological Properties of Nine Different Human Na,K-ATPase Isozymes // J. Biol. Chem. 2000. T. 275, № 3. C. 1976–1986.
17. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase // Am. J. Physiol.-Ren. Physiol. 2006. T. 290, № 2. C. F241–F250.
18. Klimanova E.A. и др. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation // FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies, 2015. T. 589, № 19. C. 2668–2674.
19. Comparison of the Effects of Potassium on Ouabain Binding to Native and Site-Directed Mutants of Na,K-ATPase // Arch. Biochem. Biophys. Academic Press, 1995. T. 317, № 1. C. 133–141.
20. Morth J.P. и др. Crystal structure of the sodium–potassium pump // Nature. Nature Publishing Group, 2007. T. 450, № 7172. C. 1043–1049.
21. Kawamura A. и др. On the structure of endogenous ouabain // Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. T. 96, № 12. C. 6654–6659.
22. Pierre S., Xie Z. The Na, K-ATPase receptor complex // Cell Biochem. Biophys. 2006. T. 46. C. 303–315.
23. Hamlyn J.M. и др. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma // Natl. Acad. Sci. 1991. T. 88. C. 6259–6263.
24. Bagrov A.Y., Fedorova O.V. Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the Na⁺,K⁺-pump in human mesenteric arteries. // J Hypertens. 1998. T. 16 (12). C. 1953–1958.

25. Paczula A., Więcek A., Piecha G. The role of endogenous cardiotonic steroids in pathogenesis of cardiovascular and renal complications of arterial hypertension // *Postepy Hig Med Dosw.* 2016. T. 70. C. 243–250.
26. Orlov S.N. и др. Na,K-ATPase as a target for endogenous cardiotonic steroids: What's the evidence? // *Genes Dis.* 2021. T. 8, № 3. C. 259–271.
27. Russell J.M. Sodium-Potassium-Chloride Cotransport // *Physiol. Rev. American Physiological Society*, 2000. T. 80, № 1. C. 211–276.
28. Orlov S.N. и др. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension // *Genes Dis.* 2015. T. 2, № 2. C. 186–196.
29. Lauf P.K., Adragna N.C. K-Cl Cotransport: Properties and Molecular Mechanism // *Cell. Physiol. Biochem.* 2001. T. 10, № 5–6. C. 341–354.
30. Casey J.R., Grinstein S., Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2010. T. 11, № 1. C. 50–61.
31. Wakabayashi S. и др. Kinetic Dissection of Two Distinct Proton Binding Sites in Na⁺/H⁺ Exchangers by Measurement of Reverse Mode Reaction * // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 2003. T. 278, № 44. C. 43580–43585.
32. Pedersen S.F., Counillon L. The SLC9A-C Mammalian Na⁺/H⁺ Exchanger Family: Molecules, Mechanisms, and Physiology // *Physiol. Rev. American Physiological Society*, 2019. T. 99, № 4. C. 2015–2113.
33. Quednau B.D., Nicoll D.A., Philipson K.D. The sodium/calcium exchanger family—SLC8 // *Pflüg. Arch.* 2004. T. 447, № 5. C. 543–548.
34. Blaustein M.P., Lederer W.J. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications // *Physiological Reviews. American Physiological Society*, 1999. T. 79, № 3. C. 763–854.
35. Furman I. и др. Cloning of two isoforms of the rat brain Na⁺Ca⁺ exchanger gene and their functional expression in HeLa cells // *Febs lett.* 1993. T. 319, № 1–2. C. 105–109.
36. Boyman L. и др. NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013. T. 59. C. 205–213.

37. Catterall, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels // *Annu. Rev. Biochem. Annu Rev Biochem*, 1995. T. 64.
38. Hanukoglu I., Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases // *Gene*. 2016. T. 579, № 2. C. 95–132.
39. Renigunta V., Schlichthörl G., Daut J. Much more than a leak: structure and function of K2P-channels // *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 2015. T. 467, № 5. C. 867–894.
40. Wright S.H. Generation of resting membrane potential // *Adv. Physiol. Educ. American Physiological Society*, 2004. T. 28, № 4. C. 139–142.
41. McDonald T.F. и др. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells // *Physiological Reviews. American Physiological Society*, 1994. T. 74, № 2. C. 365–507.
42. Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: The molecular pathways of exercise // *Biol. Rev. John Wiley & Sons, Ltd*, 2011. T. 86, № 3. C. 564–600.
43. Abdul Kadir L., Stacey M., Barrett-Jolley R. Emerging Roles of the Membrane Potential: Action Beyond the Action Potential // *Front. Physiol. Frontiers*, 2018. T. 9.
44. Zhou Y. и др. Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2015. T. 349, № 6250. C. 873–876.
45. Al-Habori M. Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001. T. 33, № 9. C. 844–864.
46. Lang F. Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation // *J. Am. Coll. Nutr. Taylor & Francis*, 2007. T. 26, № sup5. C. 613S-623S.
47. Burg M.B., Ferraris J.D. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation * // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2008. T. 283, № 12. C. 7309–7313.
48. Chen L.-Q. и др. Transport of Sugars // *Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews*, 2015. T. 84, № Volume 84, 2015. C. 865–894.

49. Wright E.M., Loo D.D.F., Hirayama B.A. Biology of Human Sodium Glucose Transporters // *Physiol. Rev. American Physiological Society*, 2011. T. 91, № 2. С. 733–794.
50. Bröer S., Fairweather S.J. Amino Acid Transport Across the Mammalian Intestine // *Compr. Physiol.* 2019. T. 9, № 1.
51. Rolfe D.F., Brown G.C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals // *Physiol. Rev. American Physiological Society Bethesda, MD*, 1997.
52. Petrushanko I.Yu. и др. The ability of cells to adapt to low-oxygen conditions is associated with glutathionylation of Na,K-ATPase // *Mol. Biol.* 2015. T. 49, № 1. С. 153–160.
53. Gerkau N.J. и др. Relation between activity-induced intracellular sodium transients and ATP dynamics in mouse hippocampal neurons // *J. Physiol.* 2019. T. 23, № 597. С. 5687–5705.
54. Murphy K.T., Nielsen O.B., Clausen T. Analysis of exercise-induced Na^+ - K^+ exchange in rat skeletal muscle in vivo // *Exp. Physiol.* 2008. T. 93, № 12. С. 1249–1262.
55. Kironenko T.A. и др. Effect of Dynamic and Static Load on the Concentration of Myokines in the Blood Plasma and Content of Sodium and Potassium in Mouse Skeletal Muscles // *Biochem. Mosc.* 2021. T. 86, № 3. С. 370–381.
56. Danilov K. и др. Electrical pulse stimulation decreases electrochemical Na^+ and K^+ gradients in C2C12 myotubes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. T. 493, № 2. С. 875–878.
57. Rose C.R., Konnerth A. NMDA Receptor-Mediated Na^+ Signals in Spines and Dendrites // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 2001. T. 21, № 12. С. 4207–4214.
58. Kiedrowski L. и др. Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient // *Neuron*. 1994. T. 12, № 2. С. 295–300.
59. Gerkau N.J. и др. Relation between activity-induced intracellular sodium transients and ATP dynamics in mouse hippocampal neurons // *J. Physiol.* 2019. T. 597, № 23. С. 5687–5705.

60. Groschup B. и др. Probing intracellular potassium dynamics in neurons with the genetically encoded sensor *lc-LysM GEPII 1.0* in vitro and in vivo // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2024. Т. 14, № 1. С. 13753.
61. Heinemann U., Dieter Lux H. Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat // *Brain Res.* 1977. Т. 120, № 2. С. 231–249.
62. Liu J. и др. A sensitive and specific nanosensor for monitoring extracellular potassium levels in the brain // *Nat. Nanotechnol. Nature Publishing Group*, 2020. Т. 15, № 4. С. 321–330.
63. Lo E.H., Dalkara T., Moskowitz M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. Т. 4, № 5. С. 399–415.
64. Wang Y. и др. Brain Tissue Sodium Is a Ticking Clock Telling Time After Arterial Occlusion in Rat Focal Cerebral Ischemia // *Stroke. American Heart Association*, 2000. Т. 31, № 6. С. 1386–1392.
65. Wengert E.R., Patel M.K. The Role of the Persistent Sodium Current in Epilepsy // *Epilepsy Curr. SAGE Publications Inc*, 2021. Т. 21, № 1. С. 40–47.
66. Muz B. и др. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy // *Hypoxia*. 2015. Т. 3. С. 83–92.
67. Ratan R.R. и др. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke // *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 2007. Т. 85, № 12. С. 1331–1338.
68. Lefere S. и др. Hypoxia-regulated mechanisms in the pathogenesis of obesity and non-alcoholic fatty liver disease // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. Т. 73.
69. Koltsova S.V. и др. Transcriptomic Changes Triggered by Hypoxia: Evidence for HIF-1 α -Independent, [Na⁺]_i/[K⁺]_i-Mediated, Excitation-Transcription Coupling // *PLOS ONE. Public Library of Science*, 2014. Т. 9, № 11. С. e110597.
70. Hernansanz-Agustín P. и др. Na⁺ controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain // *Nature. Nature Publishing Group*, 2020. Т. 586, № 7828. С. 287–291.
71. Murphy E., Eisner D.A. Regulation of Intracellular and Mitochondrial Sodium in Health and Disease // *Circ. Res. Lippincott Williams & Wilkins*, 2009.

72. Burg M.B. Molecular basis of osmotic regulation // *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 1995.
73. Rust P., Ekmekcioglu C. Impact of salt intake on the pathogenesis and treatment of hypertension // *Adv. Exp. Med. Biol.* Springer New York LLC, 2017. T. 956. C. 61–84.
74. Qian Q. Hypernatremia // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2019. T. 14, № 3. C. 432–434.
75. Karppanen H., Mervaala E. Sodium Intake and Hypertension // *Prog. Cardiovasc. Dis.* W.B. Saunders, 2006. T. 49, № 2. C. 59–75.
76. Dahl L.K. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension // *Essential Hypertension.* Springer Berlin Heidelberg, 1960. C. 53–65.
77. Kawasaki T. и др. The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension // *Am. J. Med.* Elsevier, 1978. T. 64, № 2. C. 193–198.
78. Lifton R.P., Gharavi A.G., Geller D.S. Molecular mechanisms of human hypertension // *Cell.* Elsevier B.V., 2001. T. 104, № 4. C. 545–556.
79. Titze J. и др. Internal sodium balance in DOCA-salt rats: A body composition study // *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* American Physiological Society, 2005. T. 289, № 4 58-4. C. 793–802.
80. Machnik A. и др. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2009. T. 15, № 5. C. 545–552.
81. Reitsma S. и др. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* Springer, 2007. T. 454, № 3. C. 345–359.
82. Oberleithner H. и др. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium // *Pflugers Arch.* Springer, 2011. T. 462, № 4. C. 519–528.
83. Orlov S.N. и др. Inversion of the Intracellular Na⁺/K⁺ Ratio Blocks Apoptosis in Vascular Smooth Muscle at a Site Upstream of Caspase-3 // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 1999. T. 274, № 23. C. 16545–16552.

84. Orlov S.N. и др. Na^+/K^+ pump and endothelial cell survival: $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of $[\text{Na}^+]_i$ // *Pflüg. Arch.* 2004. T. 448, № 3. C. 335–345.
85. Orlov S.N. и др. Inversion of the Intracellular Na^+/K^+ Ratio Blocks Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells by Induction of RNA Synthesis // *Hypertension. American Heart Association*, 2000. T. 35, № 5. C. 1062–1068.
86. Taurin S. и др. Proteome Analysis and Functional Expression Identify Mortalin as an Antiapoptotic Gene Induced by Elevation of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ Ratio in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells // *Circ. Res. American Heart Association*, 2002. T. 91, № 10. C. 915–922.
87. Bahrami S., Drabløs F. Gene regulation in the immediate-early response process // *Adv. Biol. Regul.* 2016. T. 62. C. 37–49.
88. Kappelmann M., Bosserhoff A., Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma // *Eur. J. Cell Biol.* 2014. T. 93, № 1. C. 76–81.
89. Szalóki N. и др. Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling // *Mol. Cell. Biol.* 2015. T. 35, № 21. C. 3785–3798.
90. Chinenov Y., Kerppola T.K. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity // *Oncogene. Nature Publishing Group*, 2001. T. 20, № 19. C. 2438–2452.
91. Yao H. и др. Role of c-Fos in DNA damage repair.
92. Caputto B.L., Cardozo Gizzi A.M., Gil G.A. c-Fos: An AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 2014. T. 1841, № 9. C. 1241–1246.
93. Johnson R.S., Spiegelman B.M., Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene // *Cell. Elsevier*, 1992. T. 71, № 4. C. 577–586.
94. Brown J.R. и др. Fos Family Members Induce Cell Cycle Entry by Activating Cyclin D1 // *Mol. Cell. Biol. Taylor & Francis*, 1998. T. 18, № 9. C. 5609–5619.

95. Whitmarsh A.J. и др. Integration of MAP Kinase Signal Transduction Pathways at the Serum Response Element // *Science*. 1995. Т. 269, № 5222. С. 403–407.
96. Ets ternary complex transcription factors // *Gene*. Elsevier, 2004. Т. 324. С. 1–14.
97. Price M.A., Rogers A.E., Treisman R. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). // *EMBO J.* John Wiley & Sons, Ltd, 1995. Т. 14, № 11. С. 2589–26012601 с.
98. Angel P., Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*. 1991. Т. 1072, № 2. С. 129–157.
99. Morgan J.I., Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression // *Nature*. Nature Publishing Group, 1986. Т. 322, № 6079. С. 552–555.
100. Sharp F.R. и др. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 1991. Т. 11, № 8. С. 2321–2331.
101. Kovács K.J. Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map // *Neurochem. Int.* 1998. Т. 33, № 4. С. 287–297.
102. Templeton D.M., Wang Z., Miralem T. Cadmium and calcium-dependent *c-fos* expression in mesangial cells // *Toxicol. Lett.* 1998. Т. 95, № 1. С. 1–8.
103. Senecal A. и др. Transcription Factors Modulate c-Fos Transcriptional Bursts // *Cell Rep.* Elsevier, 2014. Т. 8, № 1. С. 75–83.
104. Nose K. и др. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line // *FEBS J.* 1991. Т. 201, № 1. С. 99–106.
105. Hollander M.C., Fornace A.J. Jr. Induction of fos RNA by DNA-damaging Agents // *Cancer Res.* 1989. Т. 49, № 7. С. 1687–1692.
106. Isfort R.J. и др. Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation // *FEBS J.* 1993. Т. 213, № 1. С. 349–357.
107. O'Donnell A., Yang S.-H., Sharrocks A.D. MAP Kinase-Mediated c-fos Regulation Relies on a Histone Acetylation Relay Switch // *Mol. Cell.* Elsevier, 2008. Т. 29, № 6. С. 780–785.

108. Komura J., Ono T. Nucleosome Positioning in the Human c-FOS Promoter Analyzed by in Vivo Footprinting with Psoralen and Ionizing Radiation // *Biochemistry*. American Chemical Society, 2003. T. 42, № 51. C. 15084–15091.
109. O'Donnell A., Odrowaz Z., Sharrocks A.D. Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? // *Biochem. Soc. Trans.* 2012. T. 40, № 1. C. 58–66.
110. Cohen-Armon M. и др. DNA-Independent PARP-1 Activation by Phosphorylated ERK2 Increases Elk1 Activity: A Link to Histone Acetylation // *Mol. Cell*. Elsevier, 2007. T. 25, № 2. C. 297–308.
111. Nakagawa Y., Rivera V., Larner A.C. A role for the Na/K-ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription. // *J. Biol. Chem.* 1992. T. 267, № 13. C. 8785–8788.
112. HealyShannon и др. Histone H3 phosphorylation, immediate-early gene expression, and the nucleosomal response: a historical perspective11This article is part of Special Issue entitled Asilomar Chromatin and has undergone the Journal's usual peer review process. // *Biochem. Cell Biol.* NRC Research Press, 2012.
113. Anjum R., Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2008. T. 9, № 10. C. 747–758.
114. Shimada M. и др. cAMP-response Element-binding Protein (CREB) Controls MSK1-mediated Phosphorylation of Histone H3 at the c-fos Promoter in Vitro* // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 2010. T. 285, № 13. C. 9390–9401.
115. He H., Ping F. The SIE, SRE, CRE, and FAP-1 four intracellular signal pathways between stimulus and the expression of c-fos promoter // *J. Cell. Biochem.* T. 106, № 5. C. 764–768.
116. Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation // *Histol. Histopathol.* 2000. T. 15, № 3. C. 921–928.
117. Carrión A.M. и др. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor // *Nature*. Nature Publishing Group, 1999. T. 398, № 6722. C. 80–84.

118. Robbins P.D., Horowitz J.M., Mulligan R.C. Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product // *Nature*. Nature Publishing Group, 1990. T. 346, № 6285. C. 668–671.
119. Fujita T., Piuz I., Schlegel W. Negative elongation factor NELF controls transcription of immediate early genes in a stimulus-specific manner // *Exp. Cell Res.* 2009. T. 315, № 2. C. 274–284.
120. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation // *Pharmacol. Res.* 2012. T. 66, № 2. C. 105–143.
121. Silvers A.L., Bachelor M.A., Bowden G.T. The Role of JNK and p38 MAPK Activities in UVA-Induced Signaling Pathways Leading to AP-1 Activation and c-Fos Expression // *Neoplasia*. 2003. T. 5, № 4. C. 319–329.
122. Treisman R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences // *Cell*. 1985. T. 42, № 3. C. 889–902.
123. Degese M.S. и др. An interplay between the p38 MAPK pathway and AUBPs regulates c-fos mRNA stability during mitogenic stimulation // *Biochem. J.* 2015. T. 467, № 1. C. 77–90.
124. Grosset C. и др. A Mechanism for Translationally Coupled mRNA Turnover: Interaction between the Poly(A) Tail and a c-fos RNA Coding Determinant via a Protein Complex // *Cell*. Elsevier, 2000. T. 103, № 1. C. 29–40.
125. Vesely P.W. и др. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins // *Mutat. Res. Mutat. Res.* 2009. T. 682, № 1. C. 7–12.
126. Roux P. и др. Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals // *Cell*. Elsevier, 1990. T. 63, № 2. C. 341–351.
127. Gomard T. и др. Fos family protein degradation by the proteasome // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. T. 36, № 5. C. 858–863.
128. Sidorenko S. и др. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca²⁺_i-mediated and Ca²⁺_i-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // *Cell Calcium*. 2018. T. 76. C. 72–86.

129. Kometiani P. и др. Multiple Signal Transduction Pathways Link Na⁺/K⁺-ATPase to Growth-related Genes in Cardiac Myocytes: THE ROLES OF Ras AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES * // J. Biol. Chem. Elsevier, 1998. T. 273, № 24. С. 15249–15256.
130. Xie Z., Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer // FEBS J. 2002. T. 268, № 10. С. 2434–2439.
131. Askari A. The other functions of the sodium pump // Cell Calcium. 2019. T. 84. С. 102105.
132. Ye Q. и др. Identification of a Potential Receptor That Couples Ion Transport to Protein Kinase Activity* // J. Biol. Chem. 2011. T. 286, № 8. С. 6225–6232.
133. Geys S.A., Bamberg E., Dempsey R.E. Ligand-Dependent Effects on the Conformational Equilibrium of the Na⁺,K⁺-ATPase As Monitored by Voltage Clamp Fluorometry // Biophys. J. Elsevier, 2009. T. 96, № 11. С. 4561–4570.
134. Lipps H.J., Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function // Trends Cell Biol. Elsevier, 2009. T. 19, № 8. С. 414–422.
135. Robinson J. и др. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? // Nucleic Acids Res. 2021. T. 49, № 15. С. 8419–8431.
136. Zhang Z.-H. и др. In vivo dynamics and regulation of DNA G-quadruplex structures in mammals // Cell Biosci. 2023. T. 13, № 1. С. 117.
137. Bhattacharyya D., Mirihana Arachchilage G., Basu S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability // Front. Chem. 2016. T. 4.
138. Sen D., Gilbert W. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA // Nature. 1990. T. 344, № 6265. С. 410–414.
139. Wang Z.-F. и др. Structural basis of sodium–potassium exchange of a human telomeric DNA quadruplex without topological conversion // Nucleic Acids Res. 2014. T. 42, № 7. С. 4723–4733.
140. Kleyman T.R., Cragoe E.J. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport // The Journal of Membrane Biology. Springer-Verlag, 1988. T. 105, № 1. С. 1–21.

141. Boudreault F., Grygorczyk R. Evaluation of rapid volume changes of substrate-adherent cells by conventional microscopy 3D imaging // J. Microsc. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. T. 215, № 3. C. 302–312.
142. Ponomarchuk O.O. и др. A Method to Simultaneously Detect Changes in Intracellular Ca^{2+} Concentration and Cell Volume // Biophysics. 2018. T. 63, № 3. C. 369–374.
143. Lowry O.H. и др. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. T. 193. C. 265–275.
144. Vereninov A. и др. Pump and Channel K^+ (Rb^+) Fluxes in Apoptosis of Human Lymphoid Cell Line U937 // Cell. Physiol. Biochem. 2008. T. 22, № 1–4. C. 187–194.
145. Pak V.V. и др. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function // Cell Metab. 2020. T. 31, № 3. C. 642.
146. Ermakova Y.G. и др. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range // Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 2018. T. 54, № 23. C. 2898–2901.
147. Pachitariu M., Rariden M., Stringer C. Cellpose-SAM: superhuman generalization for cellular segmentation. bioRxiv, 2025. C. 2025.04.28.651001.
148. Stringer C. и др. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation // Nat. Methods. Nature Publishing Group, 2021. T. 18, № 1. C. 100–106.
149. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Method // Methods. 2001. T. 25, № 4. C. 402–408.
150. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. Nature Publishing Group, 1970. T. 227, № 5259. C. 680–685.
151. Doluca O. G4Catchall: A G-quadruplex prediction approach considering atypical features // J. Theor. Biol. 2019. T. 463. C. 92–98.

152. Korte S. и др. Firewall function of the endothelial glycocalyx in the regulation of sodium homeostasis // *Pflügers Arch.* 2012. Т. 463, № 2. С. 269–278.
153. Askari A. The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies // *Pharmacol. Res. Perspect.* 2019. Т. 7, № 4. С. e00505.
154. Rodriguez R. и др. Small-molecule–induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes // *Nat. Chem. Biol.* Nature Publishing Group, 2012. Т. 8, № 3. С. 301–310.
155. Vinciguerra M. и др. Intracellular Na⁺ Controls Cell Surface Expression of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA Pathway in Mammalian Kidney Collecting Duct Cells // *Mol. Biol. Cell.* American Society for Cell Biology (mboc), 2003. Т. 14, № 7. С. 2677–2688.
156. Zhang J. и др. Detrimental or beneficial: Role of endothelial ENaC in vascular function // *J. Cell. Physiol.* 2021. Т. 237, № 1. С. 29–48.
157. Sanford E.M. и др. Gene regulation gravitates toward either addition or multiplication when combining the effects of two signals // *eLife.* Т. 9. С. e59388.
158. Bootman M.D., Berridge M.J., Taylor C.W. All-or-nothing Ca²⁺ mobilization from the intracellular stores of single histamine-stimulated HeLa cells. // *J. Physiol.* 1992. Т. 450, № 1. С. 163–178.
159. Barrero M.J., Montero M., Alvarez J. Dynamics of [Ca²⁺] in the Endoplasmic Reticulum and Cytoplasm of Intact HeLa Cells: A COMPARATIVE STUDY // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 1997. Т. 272, № 44. С. 27694–27699.
160. Murguía J.R. и др. Activation of the C-fos promoter by increased internal pH // *J. Cell. Biochem.* 1995. Т. 57, № 4. С. 630–640.
161. Masana M.I. и др. In Vivo Evidence that Lithium Inactivates G_i Modulation of Adenylate Cyclase in Brain // *J. Neurochem.* 1992. Т. 59, № 1. С. 200–205.
162. Rao A.S. и др. Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/β-catenin signalling // *Eur. J. Endocrinol.* 2005. Т. 153, № 6. С. 929–938.
163. Zeng Z. и др. Lithium ions attenuate serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells through regulation of the Akt/FoxO1 signaling pathways // *Psychopharmacology (Berl.)*. 2016. Т. 233, № 5. С. 785–794.

164. Okur H.I. и др. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2017. Т. 121, № 9. С. 1997–2014.
165. Danchin A., Nikel P.I. Why Nature Chose Potassium // J. Mol. Evol. 2019. Т. 87, № 9. С. 271–288.
166. Klimanova E.A. и др. Search for Intracellular Sensors Involved in the Functioning of Monovalent Cations as Secondary Messengers // Biochem. Mosc. 2019. Т. 84, № 11. С. 1280–1295.
167. Katritch V. и др. Allosteric sodium in class A GPCR signaling // Trends Biochem. Sci. Elsevier, 2014. Т. 39, № 5. С. 233–244.
168. Rishal I. и др. Na⁺ Promotes the Dissociation between GαGDP and Gβγ, Activating G Protein-gated K⁺ Channels * // J. Biol. Chem. Elsevier, 2003. Т. 278, № 6. С. 3840–3845.
169. O'Brien M.C., McKay D.B. How Potassium Affects the Activity of the Molecular Chaperone Hsc70: I. POTASSIUM IS REQUIRED FOR OPTIMAL ATPase ACTIVITY (*) // J. Biol. Chem. 1995. Т. 270, № 5. С. 2247–2250.
170. Seubert W., Schoner W. The Regulation of Pyruvate Kinase // Current Topics in Cellular Regulation / под ред. Horecker B.L., Stadtman E.R. Academic Press, 1971. Т. 3. С. 237–267.
171. Bischof H. и др. Potassium ions promote hexokinase-II dependent glycolysis // iScience. 2021. Т. 24, № 4. С. 102346.
172. Rozov A. и др. Importance of potassium ions for ribosome structure and function revealed by long-wavelength X-ray diffraction // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2019. Т. 10, № 1. С. 2519.
173. On the role of intracellular potassium in protein synthesis // Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Nucleic Acids Relat. Subj. Elsevier, 1964. Т. 80, № 4. С. 614–631.
174. Wu C.C.-C. и др. Ribosome Collisions Trigger General Stress Responses to Regulate Cell Fate // Cell. Elsevier, 2020. Т. 182, № 2. С. 404-416.e14.

175. Chang Y. и др. Leucine-zipper and Sterile- α Motif Kinase (ZAK): A Potential Target for Drug Discovery // Curr. Med. Chem. T. 23, № 33. С. 3801–3812.

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь мне хотелось бы выразить свою глубокую благодарность моему научному руководителю кандидату биологических наук Климановой Елизавете Андреевне за чуткое руководство, помощь на всех этапах выполнения этой работы и поддержку самостоятельной разработки и ведения научных проектов. Также глубоко благодарю доктора биологических наук Лопину Ольгу Дмитриевну за помощь в планировании экспериментов и интерпретации результатов, а также за ценные замечания к этой работе. Выражаю отдельную благодарность моим коллегам аспирантам Горбунову Андрею Михайловичу и Квитко Ольге Евгеньевне за помощь в проведении экспериментов. Выражаю глубокую благодарность кандидату биологических наук Шиян Александре Андреевне за помощь в измерении клеточного объема. Выражаю глубокую благодарность кандидату биологических наук Кулебякину Константину Юрьевичу и кандидату медицинских наук Чечехину Вадиму Игоревичу за помощь в проведении экспериментов по визуализации Ca^{2+} в клетках. Выражаю глубокую благодарность доктору химических наук Варижук Анне Михайловне за помощь в проведении экспериментов по спектроскопии кругового дихроизма. Выражаю глубокую благодарность Катрухе Веронике Алексеевне и Чебаненко Виктории Валерьевне за предоставление плазмид, кодирующих HyPer7 и SynHer3s, и обучению работе на флуоресцентном микроскопе в режиме “широкого поля”. Выражаю глубокую благодарность кандидату биологических наук Сидоренко Светлане Вадимовне за любезно предоставленные клетки HeLa. Выражаю глубокую благодарность кандидату биологических наук Воротникову Александру Вячеславовичу и кандидату медицинских наук Моисеевой Наталье Ивановне за предоставление ингибиторов MAPK. Отдельно хочется поблагодарить весь коллектив кафедры биохимии за теплую атмосферу и ценные советы. И наконец, выражаю глубочайшую благодарность своей семье за всестороннюю поддержку на всех этапах подготовки кандидатской диссертации.