

*Phalaenopsis* сопровождается изменениями размеров и формы паренхимных клеток, что указывает на значительные перестройки процессов роста и развития данной ткани.

**Список использованных источников:**

1. Черевченко, Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников; под ред. Ж.В. Загоруйко. – Киев: Наук. Думка, 2008. – 560 с.
2. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development / D. Steven [et al.] // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 49. – P. 427–451.
3. Pierik R.L.M. *In vitro* culture of higher plants / Springer Science + Business Media, B.V., 1997. – 348 p.
4. Clonal propagation of orchids / D. Jones [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 6. – P. 181–191.
5. Fast, G. *Orcideen kultur* / G. Fast. – Stuttgart: Ulmer, 1980. – 460 s.
6. Mukerji, K.G. *Glimses in botany. The orchid protocorm: on opinion* / New Delhi: APH Pub. Corp, 1996.

*Charnysh M.<sup>1</sup>, Przhevalskaya D.<sup>1</sup>, Horski I.<sup>1</sup>, Tsybulskaya L.<sup>1</sup>, Zhabinskii V.N.<sup>2</sup>,  
Khrpach V.A.<sup>2</sup>, Demidchik V.<sup>1</sup>*

**BRASSINOSTEROID-INDUCED MODIFICATIONS IN GROWTH AND DEVELOPMENT OF PHALAENOPSIS PROTOCORM IN VITRO CULTURE**

<sup>1</sup>*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

**Summary.** This study showed that addition of 6 main brassinosteroids ( $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M) in the culture medium caused stimulation of growth processes in protocorms *Phalaenopsis* × hybridum Blume. Brassinolide and 24-epibrassinolide showed the greatest stimulating effect on the growth of the protocorms and the biomass production. 28-homobrassinolide was less effective stimulator among the tested brassinosteroids. Effects of brassinosteroids were compared to these that were induced by auxins. These comparative tests demonstrated that brassinosteroids cause similar or even stronger stimulatory action as compared to auxins.

*Чиркин А.А., Долматова В.В.*

**ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛИНГ И ПРОТЕОЛИЗ: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ И ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

*Витебский государственный университет имени П.М. Машерова,  
Витебск, Беларусь*

**Резюме.** В статье рассмотрена роль протеолиза в основных клеточных процессах – экспрессии генов, клеточной пролиферации и запрограммированной смерти (например, по механизмам апоптоза). Благодаря взаимодействию различных сигнальных путей контролируется синтез ряда белков, выполняющих регуляторные функции. Действие их кратковременно, поскольку они быстро уничтожаются системами протеолиза. Таким образом, клеточный сигналинг и регулируемый протеолиз определяют судьбу клетки, а

следовательно, белки и ферменты этих процессов должны были сформироваться на этапе появления многоклеточных организмов.

В обращении к участникам Gordon Research Conference «Understanding Proteases and Their Roles as Regulators of Health and Disease» (3-8 июня 2018 года) указано, что протеазы играют разнообразную роль в регулировании биологии практически всех организмов. Фактически они составляют примерно 5% всех генов в любом данном геноме. Раньше протеазы были молекулярными единицами удаления «мусора», которые просто деградировали отработанные белки для поддержания общего гомеостаза. Однако детальные исследования протеазной функции за последние несколько десятилетий продемонстрировали, что эти ферменты намного сложнее, поскольку играют ключевые роли в качестве сигнальных молекул и регуляторов важных клеточных процессов, таких как деление клеток, гибель клеток и обмен веществ. Нарушения механизмов протеолиза вызывают ряд патологических процессов, что делает их общими целями для разработки клинически значимых терапевтических и диагностических мероприятий.

Внеклеточные белки и некоторые белки поверхности клетки поглощаются эндоцитозом и деградируют в лизосомах. Эти органеллы содержат ряд кислых протеаз, включая катепсины В, Н и D, а также многие другие гидролазы. Некоторые цитозольные белки деградируют в лизосомах после поглощения в аутофагических везикулах, которые сливаются с лизосомами. Учитывая не совпадение сроков деления клетки и ее митохондрий, некоторые исследователи выделяют понятие аутофагии митохондрий как тип запрограммированной гибели. Известна также шаперон-зависимая аутофагия, при которой происходит направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в её полость. При разрушении мембраны лизосом происходит автлиз клетки. Однако во всех тканях живых организмов большинство внутриклеточных белков деградируют с помощью убиквитин (ubiquitin, Ub) - протеасомного пути (UPP). Этот регулируемый тип протеолиза играет наиболее важную роль в сигналинге клетки [8].

Бактерии уже используют регулируемый протеолиз для разрушения или активации регуляторных белков и для получения сигналов для временного и пространственного контроля процессов морфологического развития. В некоторых случаях множественные протеолитические события организованы в пути, например, оборот регуляторного белка активирует протеазу, которая генерирует сигнал [6]. В эпителиальных и нервных клетках «местный протеолиз» за счет кальпаинов и убиквитин-зависимых протеасом формируются компартменты с определенным составом белков, в том числе ферментов, для выполнения специальных клеточных функций [4]. Регулируемый внутримембранный протеолиз, осуществляемый мембраносвязанными протеазами и комплексами  $\gamma$ -секретазы, является фундаментальным процессом трансдукции сигналов от рецепторов цитокинов, факторов роста, рецепторов смерти (фактора некроза опухоли типа I, FasR и TRAIL-R1/2). Протеолиз позволяет высвободить растворимые рецепторные эктодомены и генерировать фрагменты цитоплазматических доменов рецептора. Этот процесс способствует образованию внутриклеточных посредников и формированию расходящихся внутриклеточных сигнальных путей [7,9].

Регулируемый протеолиз (сайт-специфический протеолиз) является важным биологическим механизмом регуляции экспрессии генов, клеточной сигнализации, развития и гибели клеток. Он контролирует метаболизм холестерина путем протеолитической регуляции фактора транскрипции SREBP, расщепление белка-

предшественника амилоида, которое может повлиять на развитие болезни Альцгеймера, активацию сигнального пути Notch во время развития и дифференцировки, запрограммированную гибель клеток, сборку вирусных инфекционных частиц и др. [11].

В обзоре о протеазной сигнальной системе гибели клеток животных и человека, посвященном памяти профессора Кристофера Фролиха (Christopher Froelich) – мирового лидера в области гранзимов, представлены данные об активации протеаз при различных типах клеточной смерти (табл. 1). Авторы полагают, что экзопептидазы не способны разрезать белки в нужном месте, чтобы формировать конформационные изменения в виде отдельных доменов, что характерно для сигнальных путей. Есть два исключения из этого положения: а) фермент дипептидилпептидаза 1 (DPP1, также известный как катепсин С) и б) протеасома. Первый фермент непосредственно участвует в активации гемопозитических сериновых протеаз (HeSPs), а второй участвует в деградации многих клеточных белков, которые определяют судьбу клеток - смерть или выживание. Таким образом, протеасома может быть определена и как протеаза клеточной смерти. В табл. 1 плюсы означают синтез протеазы, важной для данного типа клеточной смерти. Каспаза-8 (Caspase-8) участвует в некроптозе в отрицательном контексте, потому что она инактивирует этот путь.

**Таблица 1- Пептидазы при различных типах гибели клеток [10]**

Protease	Apoptosis	Pyroptosis	Necroptosis	Necrosis	NETosis	Unspecified
Caspase 3,6,7,8,9,10	+++	–	(Caspase - 8)	–	–	–
Caspase 1,4,5	–	+++	–	–	–	–
Granzyme A	–	–	–	–	–	++
Granzyme B	+++	+	–	–	–	–
Cathepsin C (DPP1)	+++	–	–	–	+	–
Cathepsin B	+	+	–	++	–	++
Cathepsin D	+	–	–	++	–	+
Neutrophil Elastase	–	–	–	–	+	–
Calpain 1,2	+	–	–	++	–	+

Протеазы участвуют в клеточной передаче сигналов, включая сигнализацию смерти клеток, путем расщепления белковых субстратов. Функциональный результат расщепления субстрата специфичен для сигнального пути, природы самого белкового субстрата и места протеолиза. Протеазы обычно имеют более одного физиологического субстрата, расщепляя эти белки на определенных участках в зависимости от специфичности протеазы [10].

Деградация белков по АТФ-зависимому убиквитин-протеасомному пути включает в себя два этапа – ковалентное присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепочки и деградацию помеченного белка 26Sпротеасомой. Реакция убиквитирования осуществляется каскадом ферментов E1 (Ubiquitin activating enzyme) – E2 (Ubiquitin conjugating enzyme) – E3 (Ubiquitin ligase). В протеасомах млекопитающих каталитически активными являются только  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- и  $\beta$ 5-субъединицы, причём все эти субъединицы обладают разными ферментативными

активностями (каспаподобной, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной, соответственно). Протеасомное разрушение белков является быстрым процессом, который обеспечивает переключение важнейших процессов экспрессии генов, клеточного цикла и апоптоза путем разрушения регуляторных белков p19, p21, p27, p53 и других, ряда транскрипционных факторов. Часто системы сигналинга понижают энтропию живых систем, увеличивая упорядоченность их, а протеолиз, разрушая конечные продукты сигналинга – регуляторные белки, повышает энтропию живых систем. Поэтому использованию ингибиторов протеасом в онкологии уделяется особое внимание. Протеасомы и каспазы взаимодействуют в борьбе за жизнь и смерть клетки [2, 3, 5].

Считают, что протеолитические ферменты являются весьма консервативными и эта система регуляции сформировалась на уровне первичных клеток. Эволюционным источником многих пептидаз высших эукариот являются пептидазы прокариот. В процессе эволюции совершенствовались эндосомно-лизосомальная система и действующие в цитоплазме и ядре клетки убиквитин- и АТФ-зависимая (протеасомная), а также кальций-зависимая (кальпаиновая) системы [1]. Целью работы был сравнительный анализ некоторых протеолитических ферментов у моллюсков и человека.

**Материал и методы:** поиск и отбор последовательностей белков человека осуществлялся на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков осуществлялся на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей человека и моллюсков выполнено в программе MEGA5.2.

**Полученные результаты и обсуждение.** При сравнительном анализе протеолитических ферментов человека и моллюсков было найдено 9 последовательностей ферментов у моллюска *Biomphalaria glabrata*, являющегося родственным организмом с *Planorbarius corneus*. Prolyl oligopeptidase – КФ 3.4.21.26 – представляет собой цитозольную сериновую пептидазу, которая расщепляет пептидную связь С-концевого пролина –гомология 66%; АТФ-dependent Clp protease proteolytic subunit – входит в состав высокоактивной сериновой эндопептидазы Clp (КФ 3.4.21.92) – гомология 68%; Furin – КФ 3.4.21.75 – сериновая протеаза клеток животных, расположенная в аппарате Гольджи, напоминает бактериальный протеолитический фермент субтилизин, гомология 69%; Signal Peptide Peptidase – внутримембранная аспартил-протеаза, расщепляющая остаточные сигнальные пептиды, оставшиеся в мембране после действием сигнальной пептидазы, гомология 67%; Aminopeptidase B (КФ 3.4.11.2) – фермент класса гидролаз, катализирующий отщепление от пептидов N-концевые α-аминокислотные остатки, а также гидролиз α-амидов аминокислот, гомология 66%; Leucyl aminopeptidases (cytosol aminopeptidase) КФ 3.4.11.1) – ферменты, которые преимущественно катализируют гидролиз лейциновых остатков на N-конце пептидов и белков, гомология 66%; Thimet oligopeptidases (КФ 3.4.24.15), известные как TOPs, являются металлопептидазами и у животных они участвуют в деградации пептидов – брадикинина, нейротензина, ангиотензина I и пептида Aβ, гомология 66%; Ubiquitin conjugating factor E4 B-like (КФ 6.3.2.19), конъюгирующие убиквитин ферменты, также известные как ферменты E2, гомология 72%; Ubiquitin conjugating factor E2 W-like, гомология 75%; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5, гомология 72%; Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5, гомология 76%. Для сравнения два фермента пуринового обмена, важного

для синтеза нуклеотидов: Amidophosphoribosyl-transferase (phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase) (КФ 2.4.2.14), содержит аналог каталитической триады цистеиновых протеаз, гомология 64%; Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinase, КФ 4.3.2.2), превращает аденилосукцинат в АМР и фумарат, гомология 68%.

**Заключение.** Три основных клеточных процесса – экспрессия генов, клеточная пролиферация и запрограммированная смерть (например, апоптоз) находятся под постоянным контролем в рамках внутриклеточного сигналинга. Благодаря взаимодействию различных сигнальных путей контролируется синтез ряда белков, выполняющих регуляторные функции. Действие их кратковременно, поскольку они быстро уничтожаются системами протеолиза. Поэтому в норме клетка перемещается по клеточному циклу, преодолевая контрольные пункты. Если в ДНК клетки имеются мутации, то она останавливается, прежде всего, в контрольном пункте перехода G→S для репарации поврежденной ДНК. При их устранении клетка перемещается далее, а если нет, то уничтожается по механизмам апоптоза. При опухолевой трансформации клетка не задерживается в контрольных пунктах клеточного цикла и ускользает от апоптотической гибели. Таким образом, клеточный сигналинг и регулируемый протеолиз определяют судьбу клетки, а, следовательно, белки и ферменты этих процессов должны были сформироваться на этапе появления многоклеточных организмов. Такой взгляд подтверждается биоинформатическими исследованиями в рамках эволюционной биохимии.

#### **Список использованных источников:**

1. Немова, Н.Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов / Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева // Биомедицинская химия. – 2008. – том. 54, в. 1. – С. 42–57.
2. Сорокин, А.В. Протеасомная система дигградации и процессинга белков // А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи молекулярной биологии. – 2009. – том 49. – С. 3–76.
3. Цимоха, А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А.С. Цимоха // Цитология. – 2010. – том 52, №4. – С. 277–300.
4. Borquez, D.A. Regulation of cell polarity by controlled proteolytic systems / D.A. Bórquez, C. González-Billault // Biol. Res. – 2011. - Vol. 44 (1). – P. 35–41.
5. Burger, A.M. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications / A.M. Burger, A.K. Seth // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40(15). – P. 2217–2229.
6. Konovalova, A. Regulated proteolysis in bacterial development / A. Konovalova, L.Sogaard-Andersen, L. Kroos // FEMS Microbiology Reviews. – 2014. – Vol.38 (3). – P. 493–522.
7. Lai, M. Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions / M.Lai, M.Caplan // Physiology (Bethesda). – 2011. – Vol.26(1). – P. 34–44.
8. Lecker, S.H. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States / S. H. Lecker, A.L. Goldberg, W.E. Mitch // JASN. – 2006. – Vol. 17. – P. 1807–1819.
9. McCarthy, A.J. Regulated intramembrane proteolysis: emergent role in cell signalling pathways / A.J. McCarthy, C. Coleman-Vaughan, J.V. McCarthy // Biochem. Soc. Trans. – 2017. – Vol. 45(6). – P. 1185–1202.
10. Salvesen, G.S. Protease signaling in animal and plant - regulated cell death / G. S. Salvesen, A. Hempel , N. S. Coll // FEBS J. – 2016. – Vol. 283 (14). – P. 2577–2598.

11. Vogel, J.L. Autocatalytic proteolysis of the transcription factor-coactivator C1 (HCF): A potential role for proteolytic regulation of coactivator function / J. L. Vogel, T.M. Kristie // PNAS. – 2000. – Vol. 97 (17). – P. 9425–9430.

*Chirkin A.A., Dolmatova V.V.*

## **INTRACELLULAR SIGNALING AND PROTEOLYSIS: EVOLUTION AND ONCOLOGICAL ASPECTS**

*Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus*

**Summary.** The role of proteolysis in the basic cellular processes - gene expression, cell proliferation and programmed death (for example, apoptosis) is considered in the article. Due to the interaction of various signaling pathways, the synthesis of a number of proteins that perform regulatory functions is controlled. Their action is short-lived, as they are quickly destroyed by proteolysis systems. Thus, cellular signaling and regulated proteolysis determine the fate of the cell, and, consequently, the proteins and enzymes of these processes that were to be formed at the stage of emergence of multicellular organisms.

*Шевцова А.И., Ткаченко В.А.*

## **КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ГЛИКИРОВАНИЯ И ИХ РЕЦЕПТОРЫ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА**

*ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины»,  
Днепр, Украина*

**Резюме.** В работе обсуждается роль продуктов окислительно-карбонильной модификации белков и конечных продуктов гликирования (КПГ) в патогенезе ишемического повреждения миокарда (ИПМ) и рассматриваются механизмы коррекции ИПМ с точки зрения взаимодействия КПГ с рецепторами типа AGE-R3. Впервые показано, что увеличение КПГ в крови при ИПМ сопровождается олигомеризацией AGE-R3 с формированием ди-, три- и тетрамерных форм. На основании анализа перераспределения моно- и олигомерных форм AGE-R3 под действием различных препаратов обосновывается диагностико-прогностическая значимость взаимодействий КПГ-AGE-R3 в развитии ИПМ и оценке эффективности его терапии.

**Введение.** Конечные продукты гликирования (КПГ, advanced glycation end products или AGE) – гетерогенная группа соединений, образованных комбинацией процессов гликирования, окисления и/или карбонилирования белков, нуклеиновых кислот и аминофосфолипидов. До сих пор образование и токсические эффекты этих продуктов в организме человека связывали с длительной гипергликемией, обусловленной сахарным диабетом. Однако работы последних лет свидетельствуют о значительно более широком спектре патологических состояний, ассоциированных с накоплением КПГ, среди которых особый интерес представляют заболевания сердечно-сосудистой системы. Оказалось, что повышение уровня КПГ связано с заболеваниями периферических артерий и их осложнениями, такими как острый инфаркт миокарда, острый ишемический инсульт, которые часто заканчиваются смертью [4,9]. Патогенетическое действие КПГ на сердечно-сосудистую систему может быть результатом их непосредственного влияния на структуру и функции