

УДК 577.2

Поддержание стабильности генома у *Heterocephalus glaber*

И. О. Петрусева¹, А. Н. Евдокимов¹, О. И. Лаврик^{1,2,3*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1³Алтайский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

*E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 11.05.2017

Принята к печати 30.08.2017

РЕФЕРАТ *Heterocephalus glaber* (голый землекоп) – одна из перспективных моделей для изучения функционирования систем поддержания стабильности генома, в том числе и за счет эффективной репарации повреждений ДНК. *H. glaber* отличается высокой продолжительностью жизни, повышенной устойчивостью к раковым заболеваниям и рядом других уникальных фенотипических черт. На протяжении по крайней мере 80% жизни это животное не проявляет признаков старения и сохраняет способность к размножению. *H. glaber* привлекает большое внимание исследователей, занятых изучением молекулярных основ высокой продолжительности жизни и устойчивости к развитию опухолей. Несмотря на то что *H. glaber* обитает в условиях постоянного генотоксического (окислительного и др.) стресса, его геном и протеом отличаются стабильностью и эффективностью функционирования. В соматических клетках *H. glaber* отсутствует «репликативное» старение, при этом в фибробластах существует дополнительный p53/pRb-зависимый механизм раннего контактного торможения, контролирующий пролиферацию клеток, а также механизм их *arf*-зависимого старения. Уникальные фенотипические черты и выявленные особенности функционирования генома, транскриптома и протеома, присущие *H. glaber*, указывают на высокую прочность и эффективное функционирование молекулярных машин, противостоящих накоплению повреждений в его геноме. В представленном обзоре проанализированы результаты изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе высокой продолжительности жизни *H. glaber* и его способности сопротивляться развитию опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Heterocephalus glaber*, онкоустойчивость, стабильность генома и протеома, репарация ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОП – окислительные повреждения; GPX1 – глутатионпероксидаза; GSH – восстановленный глутатион; PКТ – раннее контактное торможение; HA – гиалуроновая кислота; HAS2 – гиалуронсинтаза 2; PАРP – поли(ADP-рибоза)-полимераза; PARG – поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения ДНК, обусловленные воздействием внешних факторов и нормальных метаболических процессов, возникают с частотой от 1000 до 1 млн на клетку живого организма в день [1]. В результате поврежденным оказывается всего 0.00017% человеческого генома, состоящего из 3 млрд п. н., однако повреждение критически важных генов (таких, как гены белков-супрессоров опухолей) может приводить к серьезным нарушениям в функционировании клеток. Эффективная работа систем репарации ДНК, противостоящих накоплению повреждений, вносит существенный вклад в поддержание стабильности генома, которое является одной из критически

важных функций клетки. Накопление повреждений ДНК и мутаций увеличивает риск развития рака и связано со старением [2–4]. У человека дефекты в работе систем репарации ДНК ассоциированы с рядом генетически обусловленных заболеваний [1–4]. Кроме того, высокая консервативность путей репарации позволяет считать эффективность работы систем, отвечающих за удаление повреждений из ДНК, одной из основ долголетия [2–7]. Количество экспериментальных исследований, посвященных поиску корреляции между активностью систем репарации ДНК и максимальной продолжительностью жизни, невелико [8, 9]. Сложность подобных исследований и противоречивые результаты, получаемые при их

проведении, могли быть следствием как несовершенства методов оценки активности, так и некорректного выбора модельных систем [10].

В качестве одной из перспективных моделей для исследования функционирования систем поддержания стабильности генома, в том числе и за счет эффективной репарации повреждений ДНК, интерес представляет голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). *H. glaber* – обитающее в норах на Юго-Востоке Африки (Эфиопия, Кения, Сомали) экстремально долго живущее мелкое млекопитающее, немногим превышающее по размерам мышь. Около 60 зоопарков мира, а также ряд лабораторий содержат колонии *H. glaber*. Это один из примерно 50 известных обитающих под землей травоядных грызунов, который является представителем исключительно редких истинно эусоциальных млекопитающих [11]. На фоне повышенного интереса к *H. glaber* журнал Science в 2013 году назвал его «позвоночным года». Продолжительность жизни *H. glaber* может достигать 32 лет, что в 10 раз больше, чем у мыши. Большую часть жизни (не менее 80%) это животное не имеет признаков старения и сохраняет способность к размножению [12–14], а механизмы защиты от раковых заболеваний, в том числе индуцированных [15], у него работают очень эффективно. В 2016 году впервые были зарегистрированы единичные случаи развития опухолей у содержащихся в неволе особей [16]. *H. glaber* привлекает большое внимание научного сообщества, вовлеченного в изучение молекулярных основ высокой продолжительности жизни и устойчивости к развитию опухолей.

Заметное продвижение в этом направлении обеспечили исследования, выполненные с использованием созданных в лабораториях линий клеток *H. glaber*, а также биоинформатических и «омиксных» подходов [17–21]. Были открыты уникальные особенности процессов метаболизма *H. glaber* и их регуляции.

В данном обзоре мы попытались проанализировать результаты этих исследований, а также работ, выполненных с применением биохимических и молекулярно-генетических подходов, с целью составить представление о возможных особенностях работы систем репарации ДНК у *H. glaber*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМА И ТРАНСКРИПТОМА *H. glaber* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Развитие методов высокоэффективного полногеномного секвенирования предоставило беспрецедентную возможность выявления генетических отличий *H. glaber*, лежащих в основе его уникальных черт. Анализ данных, полученных при первом секвени-

ровании генома *H. glaber*, позволил обнаружить ряд характерных и важных особенностей, в частности, черты, говорящие о его повышенной стабильности [17]. Позже была получена и проанализирована еще одна версия генома [18] и создан web-портал Naked Mole Rat Genome Resource (<http://www.nakedmole-rat.org>). Сравнительный анализ полных транскриптомов *H. glaber* и мыши выявил существенно более высокую транскрипционную активность некоторых генов *H. glaber*. В основном, это гены, ассоциированные с окислением-восстановлением и функционированием митохондрий. Обнаружено рекордное 300- и 140-кратное повышение уровня экспрессии генов *Ercat* и *A2m*, кодирующих внеклеточные белки. Уровни экспрессии генов, кодирующих белки репарации, у мыши и *H. glaber* различались не столь существенно [19].

Первые результаты глубокого (98.6%) секвенирования генома самца *H. glaber* были опубликованы в 2011 году [17]. Тогда же появились данные о различиях в уровне экспрессии митохондриальных генов и генов, имеющих отношение к окислительно-восстановительной системе, у *H. glaber* и мыши [19]. На основе результатов секвенирования были предсказаны последовательности 22000 генов *H. glaber*. Анализ синтетических областей хромосом *H. glaber* и человека позволил идентифицировать у *H. glaber* 750 приобретенных и 320 утраченных генов; 739 приобретенных и 448 утраченных генов выявлено у *H. glaber* при сравнении с мышью. Среди приобретенных генов 75.5% транскрибируются, а список утраченных включает много генов, имеющих отношение к функционированию рибосом и путям биосинтеза нуклеозидов. Среди псевдогенов у *H. glaber* преобладают гены, связанные со зрительной системой, обонянием, сперматогенезом и убиквитинированием белков [17]. Превращение этих генов в псевдогены (нефункциональные гены) коррелирует с ослабленными или подавленными у *H. glaber* физиологическими функциями [13] и к менее интенсивному, чем у мыши, накоплению убиквитинированных белков с возрастом [22].

С использованием GATK (Genome Analysis Toolkit, <https://software.broadinstitute.org/gatk/>) идентифицировано также 1.87 млн гетерозиготных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Значение нуклеотидного разнообразия составило 7×10^{-4} (среднее на нуклеотид), что гораздо ниже, чем в популяциях мыши или крысы и сравнимо с изменчивостью у человека. Низкий уровень изменчивости может отражать низкий эффективный размер популяции *H. glaber*, но может быть связан с высоким уровнем инбридинга, сниженной скоростью мутаций или высокой эффективностью работы систем репарации ДНК [17].

Предполагается, что со стабильностью генома коррелирует пониженное содержание транспозонов. Согласно [17] только 25% генома *H. glaber* представлено повторами, происходящими из транспозонов (у человека – 40%, у мыши – 37%, у крысы – 35%).

В число генов, подвергнутых действию положительного отбора, у землекопа, в отличие от крысы и мыши, входят *Terp1* и *Terf1*, вовлеченные в регуляцию длины теломер [23]. Длина теломер *H. glaber* невелика, они короче, чем у лабораторных мышей или крыс, и имеют примерно такую же длину, как теломеры человека. Ген *Tert*, кодирующий каталитическую субъединицу теломеразы, стабильно экспрессируется в соматических клетках *H. glaber* в любом возрасте. Активность теломеразы при этом невысока. В результате сравнительного исследования пришли к заключению, что между уровнями экспрессии теломеразы и размерами грызунов существует обратная корреляция, тогда как не найдено корреляции между длиной теломер и продолжительностью жизни [21, 24, 25]. Недавно выполненное детальное сравнение структуры генов теломеразной РНК (*hgTerc*) *H. glaber* и других видов выявило два основных отличия. Это замена А → G в первой петле псевдоузла P2b-p3, что соответствует нуклеотиду 111 в теломеразной РНК человека, и замена G → A в домене CR7-r8b (соответствует нуклеотиду 421 *hTERC*). В промоторных участках гена *hgTerc* идентифицированы два сайта связывания факторов транскрипции: сайт взаимодействия с факторами семейства ETS, найденный в промоторных участках всех проанализированных генов, и сайт связывания фактора SOX17, уникальный для гена *H. glaber*. Еще одной отличительной чертой гена *Terc* *H. glaber* оказалось отсутствие одного из сайтов связывания Sp1 [26]. Таким образом, ген *Terc* *H. glaber* имеет уникальный полиморфизм и структуру промоторов.

Как показали результаты секвенирования РНК, выделенных из мозга, печени и почек новорожденного, молодого (4 года) и старого (20 лет) *H. glaber*, лишь у малого числа генов уровень экспрессии с возрастом изменялся. В мозге человека в процессе старения падал уровень экспрессии 33 генов, а у 21, наоборот, возрастал [27]. У *H. glaber* уровень экспрессии 32 из этих генов не изменялся существенно с возрастом: у 30 генов он был стабильным, и только у двух генов (*Cyp46a1* и *Smad3*) он несколько возрастал [17]. Транскрипционная активность этих генов человека с возрастом снижалась [27].

Также был выполнен биоинформатический анализ 39 генов *H. glaber*, кодирующих ряд белков, ассоциированных с G1/S-переходом, термогенезом и зрением, в том числе циклин E1 (*Ccne1*), белок UCP1 (*Ucp1*) и гамма-кристаллин (γ -crystallin), а также генов,

кодирующих белки, непосредственно участвующие в процессах метаболизма ДНК: мультифункциональный белок репарации оснований AP-эндонуклеазу APE1, большую субъединицу фактора репликации/репарации RFC1 и топоизомеразу TOP2A. TOP2A контролирует топологию ДНК во время транскрипции и наряду с TERP1 и TERF1 является частью комплекса пяти белков альтернативного пути удлинения теломер. В результате сравнения с ортологами, представленными в геномах 36 млекопитающих, в генах *H. glaber* были найдены отличия, говорящие о присутствии 45 уникальных замен аминокислотных остатков в соответствующих белках [17].

Таким образом, первое предпринятое секвенирование [17] позволило выявить важные особенности генома *H. glaber*, хотя некоторые результаты позже уточнялись и пересматривались [18, 28, 29]. Так безволосый фенотип *H. glaber* был объяснен замещением консервативного аминокислотного остатка в белке, ассоциированном с ростом волос (HR) [17]. Такая интерпретация была основана на том, что подобные мутации в данном кодоне приводят к потере волосяного покрова у мыши, крысы и человека. Однако два других грызуна – дамараландский пескорой и морская свинка, также содержат эту мутацию в гене *Hr*, но имеют волосяной покров [29]. По-видимому, различия между генами *Hr* *H. glaber* и мыши/человека скорее отражают филогенетическую дивергенцию от мыши до человека [29, 30]. Отличия в структуре HAS2 (гиалуронсинтаза 2) *H. glaber* связывают с исключительной устойчивостью *H. glaber* к раку [31]. Однако некоторые из предположительно важных мутаций, найденных в гене, кодирующем Has2, одинаковы у нескольких видов, включая морскую свинку. Эти мутации не всегда ассоциированы с онкоустойчивостью, их функциональные последствия скорее неизвестны [32]. Интересно, что высокомолекулярные гиалуронаны синтезируются также у онкоустойчивого долгоживущего землекопа *Spalax galili*, однако его геном не содержит ни одной из мутаций, отнесенных к ключевым у *H. glaber* [33, 34]. Кроме того, под вопросом остается вывод [17] о пониженном содержании источника нестабильности – транспозонов – в геноме *H. glaber* по сравнению с мышью и человеком [28].

Сравнительный анализ группы генов, участвующих в поддержании стабильности генома у человека, мыши и землекопа, показал, что для генома *H. glaber* не характерно повышение числа копий генов [20]. В то же время ген *Cebpg*, кодирующий фактор транскрипции, участвующий в регуляции процессов репарации, представлен тремя копиями, ген *Tinf2* компонента шелтеринового комплекса – двумя. Кроме того, у *H. glaber* и человека, в отличие от мыши, в геноме

найден ген *Rpa4*, кодирующий аналог второй субъединицы белка RPA, состоящего из трех субъединиц (RPA1, RPA2 и RPA3) и участвующего во многих процессах, связанных с превращениями ДНК. Ранее полноразмерные кодирующие последовательности этого гена были обнаружены только у приматов и лошади [35]. Белки RPA4 и RPA2 могут экспрессироваться одновременно, а соотношение их количества зависит от типа ткани. Гетеротример α RPA (альтернативный RPA, содержащий субъединицу RPA4 вместо RPA2) не способен поддерживать репликацию SV40 (распространенная модель для изучения процесса репликации *in vitro*), но имеет повышенное сродство к поврежденной ДНК, участвует в репарации, а также в активации процесса контроля клеточного цикла (стадии G2/M) [36–38].

Возросшее качество аннотаций генома позволило по результатам следующего секвенирования идентифицировать ~1800 некодирующих, ~42000 кодирующих участков ДНК и примерно столько же белков. В результате у *H. glaber* выявлен ряд особенностей в последовательностях генов, связанных с противостоянием канцерогенезу и старению [18]. Выявлены уникальные замены во фрагменте гена *p53*, который кодирует участок, участвующий в регуляции апоптоза, и в генах рецепторов гиалуронана CD44 и HMMR. Кроме того, *p53 H. glaber* содержит мотивы PXXP (P – пролина, X – любая другая аминокислота), аналогичные PXXP *p53* человека.

Исследование геномов и транскриптомов девяти видов африканских голых землекопов показало, что у этих видов положительной селекции подвержены гены, связанные с супрессией опухолей, регуляцией теломера, делением клеток, репарацией ДНК и ответом на воздействие стресса [30].

Современные биоинформатические подходы позволяют проводить полноценное направленное сравнение транскриптомов групп генов у различных видов животных. Известно, что печень – орган с высоким уровнем окислительного метаболизма и большим количеством спонтанно возникающих повреждений. Направленное сравнение уровней экспрессии генов, кодирующих белки репарации, в тканях печени долгоживущих видов (человека и *H. glaber*) и короткоживущей мыши было проведено в работе [39]. Сравнение выборки из 130 генов выявило более высокую транскрипционную активность этих генов у долгоживущих видов. Среди 12 генов, уровень экспрессии которых не менее чем в 2 раза повышен и у человека, и у *H. glaber*, есть и ген опухолевого супрессора *p53*, важнейшего регулятора эксцизионных путей репарации. Повышен уровень экспрессии генов, кодирующих белки «мисматч» репарации (MSH3) и репарации оснований – ДНК-гликозилазы

(MUTYH, MBD4, NEIL1, NEIL2 и TDG), белки, участвующие в негомологичной рекомбинации (NHEJ1, Ku70, ДНК-полимераза λ – POLL и κ – POLK), а также убиквитинлигазу UBE2N.

Большинство генов, кодирующих белки репарации, экспрессируются конститутивно и регулируются посттранскрипционными модификациями. Тем не менее, транскрипция некоторых генов этой группы индуцируется именно при генотоксическом стрессе, в том числе генов, кодирующих ключевые белки системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER): DDB1, DDB2, ERCC1, XPC, ERCC4 (XPF) и ERCC5 (XPG) [40]. С использованием специализированного алгоритма для сигнальных путей [41] показано, что у долгоживущих видов на генотоксическое воздействие более интенсивно реагируют пути, контролируемые ATM, BRCA1, *p53* и PTEN [39].

РАННЕЕ КОНТАКТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ

Опубликовано большое количество результатов изучения биохимических особенностей *H. glaber* с целью поиска механизмов, лежащих в основе реализации необычных фенотипических признаков *H. glaber*, в том числе устойчивости к раку. Один из таких механизмов – уникальная система раннего контактного торможения (early contact inhibition) роста клеток *H. glaber*, открытая в 2009 году [31].

Контактное торможение – ключевой механизм, блокирующий деление клеток при достижении культурой клеток плотности, при которой они начинают контактировать друг с другом или с внеклеточным матриксом [42]. У человека и мыши регулярное контактное торможение управляется мембранными белками и происходит при повышении уровня экспрессии ингибитора циклинзависимой киназы (CDK) *p27^{Kip1}*. *P27^{Kip1}* связывает комплексы циклин-CDK и останавливает клетки в фазе G1 клеточного цикла. Ключевые онкосупрессорные пути, пути Rb и *p53*, активируются продуктами генов *Ink4a* и *Arf* [43–46]. Белок *p16^{INK4a}* – продукт гена *Ink4a*, связывается с CDK 4/6 и ингибирует ее, что, в свою очередь, приводит к активации Rb [43]. Продукт гена *Arf* активирует *p53*, связывая и ингибируя белок MDM2. Таким образом, гены *Ink4a* и *Arf* играют критическую роль в старении и защите от рака [44–48].

Для фибробластов *H. glaber* не характерно репликативное старение, но в культуре они растут медленно и прекращают рост (деление) при низкой плотности, демонстрируя гиперчувствительность к появлению межклеточных контактов. Показано, что в этих клетках существует дополнительный механизм, контролирующий пролиферацию, названный «ранним контактным торможением» (PKT). Первоначально предполагалось, что PKT у *H. glaber*

M. musculus

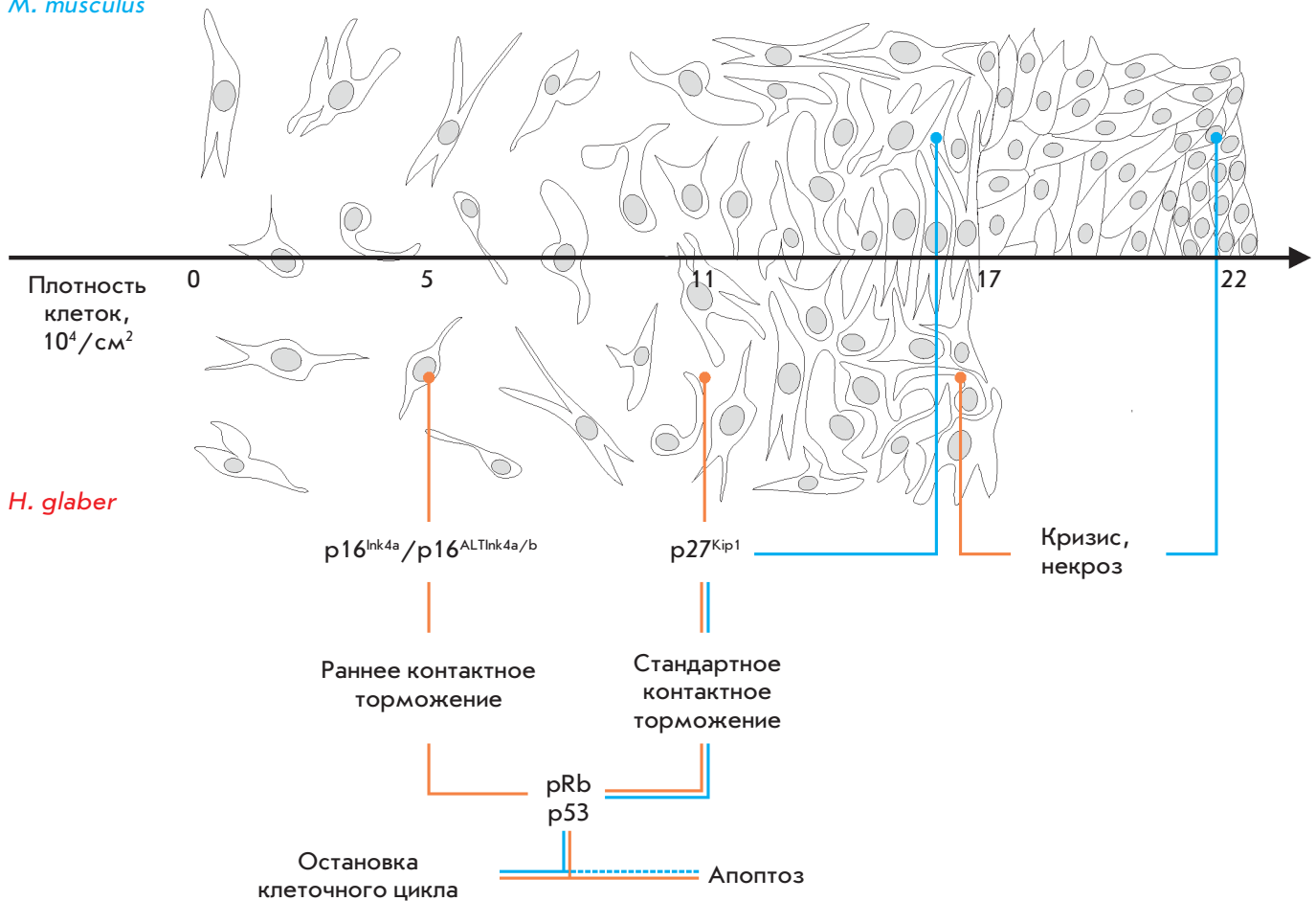


Рис. 1. Двухуровневое контактное торможение характерно для *H. glaber*, в отличие от одноуровневого у мыши. На основе данных, представленных в работах [31, 49]

ассоциировано, прежде всего, с повышенными уровнями белка $p16^{\text{INK4a}}$ [31]. Основанием для такого предположения послужил тот факт, что в мутантных клетках *H. glaber* SFMut, спонтанно образующихся в процессе длительного культивирования и утративших способность к раннему контактному торможению, $p16^{\text{INK4a}}$ не экспрессируется. С использованием рекомбинантных ДНК (плазмид), несущих гены, кодирующие мутантные формы большого Т-антигена SV40, инактивирующие либо $p53$ (LTK1; pSG5 LTK1), либо pRb (LTKΔ434-444, pSG5 LTKΔ434-444), либо ген белка дикого типа (wtLT; pSG5 LT), который подавляет активность и $p53$, и pRb , показано, что, в отличие от фибробластов мыши, способность фибробластов *H. glaber* к РКТ после трансфекции такими ДНК снижается в том случае, когда подавлена активность обоих белков-супрессоров. Возможность стандартного контактного торможения, в котором участвует $p27^{\text{Kip1}}$, лишь дублирует РКТ, проис-

ходящее при посредстве ингибитора киназ $p16^{\text{INK4a}}$ [31]. Позже с использованием данных секвенирования РНК показали, что в культивируемых клетках и тканях *H. glaber* при экспрессии продукта альтернативного сплайсинга генов $p15a$, $p15b$ и Arf локуса *Ink* появляется белок, названный $p\text{ALTINK4a/b}$. У мыши и человека белок $p\text{ALTINK4a/b}$ не выявлен. Экспрессия $p\text{ALTINK4a/b}$ индуцируется при РКТ и действии стрессов, таких, как УФ- или ионизирующее излучение, потеря прикрепления к субстрату и экспрессия онкогенов. Кроме того, $p\text{ALTINK4a/b}$ более эффективно индуцирует остановку клеточного цикла, давая клеткам больше времени на то, чтобы справиться с последствиями генотоксического воздействия, в том числе на репарацию повреждений ДНК до начала репликации. Двухуровневое контактное торможение, характерное для клеток *H. glaber* (в отличие от мыши и человека), может способствовать поддержанию стабильности его генома [49] (рис. 1).

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА И ОНКОТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК *H. glaber*

В соответствии с данными [32], раннее контактное торможение связано с сверхвысокомолекулярными (6–12 МДа) гиалуронанами (НА, hyaluronic acid), которые синтезируются в тканях и клетках *H. glaber* и выделяются во внеклеточное пространство. Ранее этот полисахарид был более известен как компонент внеклеточного матрикса, связанный с воспалением и раком. Фрагменты НА разной молекулярной массы выполняют разные функции: молекулы среднего размера (30–500 кДа) могут стимулировать деление клеток, а меньшего (< 50 кДа) – их миграцию. Короткие фрагменты НА связываются с рецепторами НА, такими, как CD44 и HMMR, индуцируют воспаление и активируют сигнальные пути, которые способствуют выживанию, миграции и инвазии как опухолевых, так и нормальных клеток. В нормальных биологических жидкостях человека присутствуют НА 1–8 МДа [50, 51]. У *H. glaber* накопление молекул со сверхвысокой молекулярной массой происходит благодаря низкой активности его гиалуронидазы и высокой процессивности гиалуронансинтазы 2 (HAS2), обладающей особой структурой активного центра. Синтезу сверхвысокомолекулярных полимеров НА способствует замена в HAS2 остатков аспарагина в позициях 188 и 301 на серин. Нарушения в работе сигнальных путей, снимающие ограничения для начала онкотрансформации фибробластов мыши, не приводят к трансформации клеток *H. glaber*. Если синтез высокомолекулярной НА остановлен в результате нокдауна HAS2 или происходит быстрая деградация НА в результате повышенного уровня экспрессии гиалуронидазы, то клетки *H. glaber* становятся доступными для трансформации [32].

РАННЕЕ КОНТАКТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ И НОВЫЙ ТИП СТАРЕНИЯ В КЛЕТКАХ *H. glaber* – «ИНДУЦИРОВАННОЕ СУПРЕССИЕЙ *Arf* СТАРЕНИЕ»

Открытый в 2009 году феномен раннего контактного торможения роста фибробластов *H. glaber* продолжает привлекать внимание исследователей. Помимо недавно обнаруженного белка pALTINK4a/b, продукта экспрессии альтернативно сплайсированной формы *Ink4*, участвующего в РКТ [49], был открыт еще один новый, специфичный для клеток *H. glaber* эффект – старение, индуцированное супрессией *Arf*. С использованием классических процедур клонирования и последующего секвенирования по Сэнгеру были определены кодирующие последовательности генов *Ink4a* и *Arf* *H. glaber*, получены лентивирусные конструкции, содержащие эти гены, и высокоспецифичные поликлональные антитела к соответствующим

белкам. Было показано, что в фибробластах *H. glaber* после повреждающих ДНК воздействий или после серии пассажей активируется эндогенная экспрессия *Ink4a* и *Arf* [52]. Повышение уровня экспрессии *Ink4a* или *Arf* вызывало остановку клеточного цикла в фибробластах *H. glaber*. Таким образом, экспериментально доказано, что консервативную функцию ингибиторов клеточного цикла у *H. glaber* выполняют гены, участвующие в создании эффекта раннего контактного ингибирования [52]. Эти результаты использовали при изучении механизмов, которые подавляют развитие опухолей из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток *H. glaber* (induced pluripotent stem cells, iPSCs) [53]. «Опухолеродность» iPSCs была проверена по способности формировать тератомы. Показано, что iPSCs *H. glaber*, подсаженные (привитые) в яички мыши, в отличие от множества других стволовых клеток, не образуют тератом, т.е. не являются опухолеродными. Это уникальное свойство базируется на видоспецифичной активации онкосупрессорного гена *Arf* и супрессорной мутации со сдвигом рамки считывания в экспрессируемом стволовыми клетками онкогене *RAS* (*ERAS*). Повышение уровня экспрессии гена *Arf* в iPSCs мыши заметно снижало их склонность к образованию опухолей. Найден связанный с клетками *H. glaber* механизм, который может защищать iPSCs и соматические клетки от супрессии *Arf* и, как следствие, образования опухолей. Показано также, что в iPSCs *H. glaber* осуществляется особый тип старения – «индуцированное супрессией *Arf* старение» (*Arf* suppression-induced senescence). Специфичное для *H. glaber* *Arf*-зависимое старение может действовать как второй способ защиты, индуцирующий старение (и последующую гибель) клеток путем подавления экспрессии *Arf* в клетках, в которых этот ген был де-репрессирован воздействием стрессоров [53].

АПОПТОЗ

Апоптоз – один из механизмов сопротивления онкотрансформации клеток. Способность клеток *H. glaber* вступать в апоптоз в ответ на генотоксические воздействия к настоящему моменту изучена недостаточно. При изучении механизма РКТ было показано, что уровень спонтанного апоптоза в фибробластах *H. glaber* невысок, он не превышает 7% у фибробластов кожи и 15% – у культуры легочных фибробластов и отличается особым типом регуляции [31]. Примерно двукратное повышение количества апоптотических клеток в этих культурах происходило после трансфекции плазмидами, несущими гены, кодирующие мутантные формы большого Т-антигена SV40, pSG5 LTK1 и pSG5 LTΔ434–444. Трансфекция культур фибробластов *H. glaber* плазмидой pSG5 LT,

несущей ген дикого типа, приводила к падению числа апоптотических клеток ниже контрольного уровня. При этом фибробласты мыши не давали выраженных ответов на такие воздействия [31]. Известно, что у мыши и человека апоптоз в той или иной степени индуцируется и при потере активности регулятора клеточного цикла pRb [54, 55]. Для выяснения механизма, который обеспечивает торможение роста фибробластов *H. glaber* при неактивном p53, трансфицированные (этими рекомбинантными плазмидами) фибробласты *H. glaber* культивировали в присутствии ингибитора каспаз Z-Vad-FMK. Рост фибробластов, трансфицированных pSG5 LTΔ434-444, в присутствии ингибитора апоптоза усиливался. Мутантный белок LTΔ434-444 инактивирует pRb, что нарушает механизм остановки клеточного цикла. Комбинация инактивации pRb и ингибирования апоптоза присутствием Z-Vad-FMK приводит к росту клеток до высокой плотности. Характер роста клеток, трансфицированных pSG5 LTK1, в присутствии ингибитора апоптоза не менялся. Z-Vad-FMK и LTK1 инактивируют p53, но при этом активным остается pRb, он включает остановку клеточного цикла и сдерживает пролиферацию [31].

Для устойчивых к раку слепышей *Spalax (Spalax ehrenbergi, S. galili)* также характерен некротический путь гибели клеток [56]. У *Spalax* p53 отличается от p53 большинства родственных млекопитающих заменой аргинина в положении 174 на лизин. Эта специфическая мутация часто обнаруживается в опухолях человека [57]. Замена аргинина на лизин влияет на свойства ДНК-связывающего домена p53. Белок, содержащий такую замену, способен индуцировать остановку клеточного цикла, но не способен инициировать апоптоз. Мутация R174K в p53 снижает его способность активировать апоптотический каскад и активирует иммуновоспалительные процессы, стимулирующие развитие некроза, индуцируемого интерфероном-бета 1 [55, 56]. Тем не менее, некротическая смерть клеток *Spalax* также нуждается в функционировании пути, ассоциированного с активностью p53 [57–60]. В отличие от *Spalax*, в позиции 174 аминокислотной последовательности p53 *H. glaber*, как и в p53 нормальных клеток человека и мыши, находится остаток аргинина [18].

Изучение токсических воздействий на фибробласты *H. glaber* показало, что эти клетки более устойчивы к метилметансульфонату, параквату и низкому содержанию глюкозы в среде, при этом более чувствительны к H₂O₂, ультрафиолету и ротенону, чем фибробласты мыши [61]. В другой работе было проведено сравнение апоптотического ответа культивируемых клеток артериального эндотелия *H. glaber* и лабораторной мыши на воздействие окислителя (H₂O₂,

от 10⁻⁶ до 10⁻³ M) и повышенной температуры (42°C). Апоптотический ответ клеток *H. glaber* на действие H₂O₂ был в 3–10 раз слабее, а их устойчивость к воздействию повышенной температуры была выше, чем у клеток мышинового эндотелия [62].

ВЫСОКАЯ ТОЧНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ И РАСЩЕПЛЕННАЯ 28S рРНК

Одна из важных особенностей функционирования ключевых систем *H. glaber* – высокая точность процесса трансляции. При близкой скорости трансляции количество ошибочно включенных аминокислот в фибробластах *H. glaber* в 4 раза ниже, чем в фибробластах мыши [63]. Повышение точности трансляции в *H. glaber* связали с тем, что расщепленная на два фрагмента 28S рРНК (так препараты 28S рРНК *H. glaber* выглядят при электрофоретическом анализе в денатурирующих условиях) неким образом оптимизирует укладку и/или динамику большой субъединицы рибосомы [63]. Сравнение транскриптомов ряда грызунов показало, что разрушение 28S рРНК *H. glaber* происходит в результате удаления фрагмента специфической последовательности, расположенной в домене D6 предшественника 28S рРНК [64]. У *H. glaber* и туко-туко (*Stenomys talarum*) эти последовательности отличает высокая степень консервативности, его 28S рРНК также выглядит расщепленной, однако для туко-туко повышенная точность синтеза белка не характерна [64]. Известно немало видов, в РНК которых выявлено подобное расщепление, что никак не коррелировало с продолжительностью их жизни. Неясно также, действительно ли 28S рРНК расщепляется в результате специфического сплайсинга, а фрагменты объединены в одну структуру только водородными связями, или расщепление – артефакт, возникающий при воздействии высокой температуры при выделении или анализе РНК [65–69]. Объяснение необычно высокой точности трансляции в *H. glaber* особенностью структуры 28S рРНК представляется, таким образом, спорным. Высокая точность процесса синтеза белков, безусловно, вносит вклад в стабильность протеома *H. glaber*, однако особенности молекулярных механизмов, ее определяющих, только предстоит изучить. В частности, у *H. glaber* совершенно не изучена первая стадия трансляции – аминоацилирование тРНК, которая в значительной степени определяет точность белкового синтеза [70].

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Теория окислительного стресса рассматривает накопление в клетке окислительных повреждений (ОП) как один из факторов старения. По этой причине внимание исследователей привлекает вопрос о содержа-

нии ОП и особенностях механизмов антиоксидантной защиты у «долгожителя» *H. glaber*.

Одна из главных мишеней, в которых возникают ОП, это белки. Окислительные воздействия могут приводить к нарушению структуры и функций белков, в частности, инактивировать ферменты и способствовать образованию белковых агрегатов, содержащих ковалентные сшивки. Высокой чувствительностью к окислению отличаются SH-группы цистеина, способные формировать как обратимые (дисульфид S-S, сульфеновая кислота), так и необратимые повреждения (сульфиновая и сульфоновая кислоты) [22]. Другой распространенный тип ОП белков – карбонилирование, необратимая модификация боковых цепей остатков пролина, аргинина, лизина, треонина, цистеина и гистидина [71].

В качестве модельных систем для изучения ОП белков используют, в основном, лизаты тканей различных органов *H. glaber* и лабораторных мышей соответствующего физиологического возраста [22, 72–76]. Изучено содержание ОП цистеина и уровень карбонилирования белков, а также влияние ОП на структуру и функционирование белков, а также активность ряда ферментов, участвующих в противостоянии накоплению окислительных повреждений.

Сравнение активности глутатионсинтетазы, каталазы, супероксиддисмутаза и глутатионпероксидазы (GPX1) показало, что в экстракте из печени молодой особи *H. glaber* активность всех ферментов, кроме GPX1, в 1.3–2 раза выше, чем в экстракте из печени мыши C57BL/6 соответствующего физиологического возраста. Активность GPX1 в экстракте *H. glaber* оказалась почти на порядок ниже [72]. В соответствии с более поздними данными у *H. glaber* резко снижен также уровень мРНК *Gpx1* и содержание соответствующего белка [19, 73].

Согласно [22], белки молодого *H. glaber* содержат в 1.6 раза больше как свободных SH-групп, так и обратимых ОП, таких, как S-S и сульфеновые производные цистеина, чем белки мыши (C57BL/6). Кроме того, у мышей количество ОП цистеина с возрастом возрастает в 3.4 раза, растет количество необратимых ОП цистеина и карбонильных повреждений, в то время как у *H. glaber* такие изменения отсутствуют [22, 72–76]. Это указывает на более эффективную работу противостоящих окислительному стрессу систем у *H. glaber*.

Анализ уровней карбонилирования белков в тканях *H. glaber* и мыши показал, что во всех образцах основными мишенями карбонилирования являются триозофосфатизомераза (TPI) и пероксиредоксин 1 (Prdx1). Белки *H. glaber* содержат в 1.5 раза больше карбонильных повреждений, но при этом лучше сохраняют ферментативную активность. Удельная активность

TPI в цитозольной фракции лизата ткани почки *H. glaber* была в 3 раза выше, чем у мыши. Кроме того, при действии окислительного стресса (аскорбат/ Fe^{2+}) TPI и Prdx1 *H. glaber* формируют меньше ковалентно сшитых белковых олигомеров [73, 74].

С использованием 4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфоновой кислоты (BisANS) в качестве неполярного флуоресцентного зонда, взаимодействующего с гидрофобными остатками аминокислот на поверхности белковых глобул, показано, что белки *H. glaber* гораздо более устойчивы к денатурирующему воздействию 1 М мочевины, чем белки мыши. В частности, глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (GAPDH), в активный центр которой входят SH-группы, у *H. glaber* сохраняет 60% активности, в отличие от 10% у GAPDH мыши [22].

Сравнение распределения карбонилированных белков по субклеточным фракциям у долгоживущих, в том числе и *H. glaber*, и короткоживущих млекопитающих показало, что в ядре у долгоживущих животных, в отличие от короткоживущих, относительное содержание белков с ОП ниже, чем в цитоплазме [9, 76]. Это позволило предположить существование обратной корреляции между уровнем окислительных повреждений ядерных белков и продолжительностью жизни [76]. Однако детально это не изучено. Данные о содержании повреждений в белках, участвующих в процессе репарации ДНК, отсутствуют.

Результаты оценок, которые не различают типов повреждений или поврежденных молекул (белков, ДНК), происходящих из различных клеточных компартментов, могут маскировать истинную картину. Затрудняет анализ данных и путаница в названиях методов и препаратов, используемых в различных публикациях. Одной из причин противоречий может быть то, что высокий уровень ОП характерен только для определенных молекул (классов молекул) и/или компартментов клетки [76].

Кроме того, существуют противоречивые данные, касающиеся антиоксидантного статуса. Так, содержание GSH в тканях *H. glaber* в одной работе оценено как в 1.4 раза более низкое [77], в другой – как в 1.4 раза более высокое [22], чем у мыши. Такие противоречия не позволяют сравнивать антиоксидантный статус этих организмов. Кроме того, на результаты экспериментов с использованием экстрактов тканей органов, а также биологических жидкостей *H. glaber* может влиять феномен его эусоциальности [78].

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА И УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР ПРОТЕАЗ – АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИН

Важную роль в поддержании содержания в клетке нужного количества активных белков правильной

структуры (протеостаза) играет убиквитин-протеасомная система [79].

Оценка протеолитической активности в сочетании с результатами вестерн-блот-анализа выявила более высокую химотрипсин-подобную (chymotrypsin like, ChT-L) и трипсин-подобную (trypsin-like, TL) протеазную активность 26S и 20S протеасом в экстрактах ткани печени *H. glaber*. Показано, что удельная ChT-L активность протеасом *H. glaber* в 3–5 раз выше, чем у протеасом мыши [80]. Основная часть этой активности обеспечивается работой 26S протеасом. Кроме того, известно, что 20S протеасомы могут осуществлять убиквитин независимый гидролиз белков, содержащих ОП, например карбонилированных белков [79]. Это может способствовать поддержанию стабильной работы протеома *H. glaber*, уровень убиквитинирования белков которого невысок и не увеличивается с возрастом. Содержание 19S регуляторных субъединиц и каталитических субъединиц иммупротеасом ($\beta 5i$ и $\beta 2i$) у *H. glaber* также выше, чем у мыши [80]. Кроме того, у *H. glaber* выше базовый уровень экспрессии ключевых шаперонов: HSP72, HSP40 и HSP25. Два из этих шаперонов входят в состав так называемого цитозольного фактора, который защищает протеасомы от ингибиторов и увеличивает эффективность их работы [81]. Наблюдаемое у *H. glaber* увеличение пептидазной активности и участие шаперонов в защите протеасом от действия ингибиторов не относятся к ранее известным функциям шаперонов. Все это может отражать высокий уровень контроля качества протеома у *H. glaber*.

С поддержанием протеостаза связан и многофункциональный белок плазмы крови – альфа-2-макроглобулин (A2m). Известно, что A2m человека способен связывать различные цитокины, факторы роста (TGF- $\beta 1$, TNF- α , IL-1 β) и является универсальным ингибитором протеиназ (трипсина, химотрипсина, эластазы и металлопротеиназ). Связывание A2m-протеиназных комплексов с рецептором LRP1 (CD91) запускает их быстрое удаление из крови и тканей путем рецепторзависимого эндоцитоза. Предполагается, что этот белок обладает функцией шаперона, предотвращающего агрегацию белков, а также способствует удержанию в клетках цинка, снижение концентрации которого с возрастом сопровождается развитием ряда заболеваний у человека [82–85]. Уровень транскрипции гена, кодирующего A2m в печени *H. glaber*, повышен в 140 раз по сравнению с уровнем в печени мыши [19]. Концентрация белка A2m в плазме крови *H. glaber* в 2–3 раза выше, чем в плазме крови человека. Вероятно, с этим связана протеолитическая активность плазмы крови *H. glaber*, пониженная по сравнению с активностью в плазме крови человека [86].

Еще одна важная особенность *H. glaber* – постоянная активность сигнального пути, регулируемого фактором Nrf2, который активирует транскрипцию более 200 генов, принимающих участие в антиоксидантном и противовоспалительном ответе организма на эндогенные и экзогенные воздействия [87].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: СТАБИЛЬНЫЙ ГЕНОМ, СТАБИЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СТАБИЛЬНЫЙ ПРОТЕОМ, ЭФФЕКТИВНАЯ РЕПАРАЦИЯ ДНК

Одной из основ поддержания стабильности генома считается эффективная работа систем репарации ДНК. К характерным особенностям генома *H. glaber* относятся повышенная стабильность его структуры и функционирования, которые сохраняются на протяжении всей жизни. Стабильностью отличается и его белковая система (протеом). Высокая точность трансляции, повышенный уровень экспрессии ключевых шаперонов и постоянно активные протеасомы в сочетании с высоким уровнем экспрессии A2m способствуют поддержанию в клетках *H. glaber* пула эффективно функционирующих белков. Экспериментально доказана устойчивость ряда белков *H. glaber* к денатурирующим воздействиям и их способность сохранять функциональную активность в условиях постоянного окислительного стресса. Все это, а также повышенный уровень экспрессии ряда генов, кодирующих белки репарации, и интенсивность ответа сигнальных путей на повреждение позволяют предполагать, что эффективность работы систем репарации ДНК у *H. glaber* должна быть высока. С таким предположением согласуются, в частности, результаты исследований, в которых были использованы клетки млекопитающих с различной продолжительностью жизни. Скорость УФ-индуцированного синтеза ДНК в фибробластах долгоживущего белоногого (оленье) хомячка (*Peromyscus leucopus*) была в 2.5 раза выше, чем скорость синтеза ДНК в фибробластах мыши (*Mus musculus*) [8]. В фибробластах мутантной мыши-долгожителя (Snell dwarf mice) удаление УФ-повреждений происходит более эффективно, чем в фибробластах мыши с нормальной продолжительностью жизни [9]. Сравнение активности поли(ADP-рибоза)-полимераз (PARP) в моноядерных лейкоцитах крови 13 видов млекопитающих выявило положительную корреляцию между уровнем активности PARP и максимальной продолжительностью жизни, характерной для этих млекопитающих. В частности, активность PARP в клетках человека была в 5 раз выше, чем в клетках крысы. При этом содержание соответствующего белка не отличалось, а отсутствие в условиях эксперимента значимой видоспецифичной деградации полимера

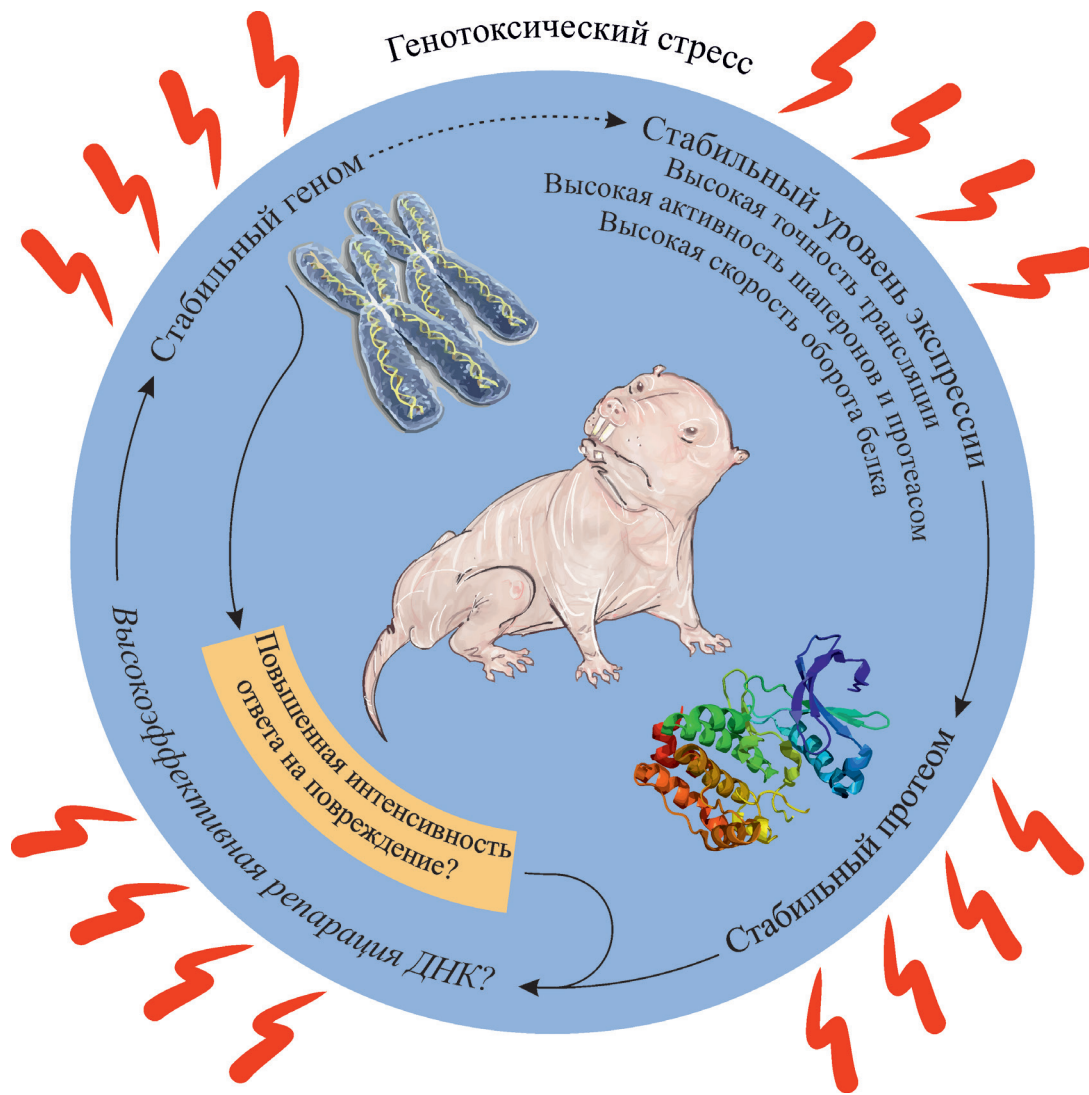


Рис. 2. Стабильный уровень экспрессии белков, стабильный протеом, повышенная интенсивность ответа на повреждение и эффективная репарация ДНК как составляющие устойчивости *H. glaber* к генотоксическим воздействиям

поли(ADP-рибозы) позволило исключить искажение результатов оценки активности PARP вследствие работы PARG (поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза). Высказано предположение, что более высокая способность к поли(ADP-рибозил)ированию может вносить вклад в эффективное поддержание целостности и стабильности геномов долгоживущих видов [88].

Вполне вероятно, что активность процессов поли(ADP-рибозил)ирования, регулирующих различные механизмы репарации [89], повышена и у экстремально долгоживущего *H. glaber*, однако экспериментальные доказательства этого факта на сегодняшний день отсутствуют.

Очевидно, что в основе уникальных фенотипических характеристик *H. glaber* [90] лежат особенности устройства и регуляции работы его генома и протеома.

Для изучения этих особенностей используются модельные системы различной степени сложности с использованием все более широкого набора методов [91]. Недавно в исследовании, проведенном с использованием фибробластов 16 видов млекопитающих, было показано, что для долгоживущих млекопитающих характерен повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих белки, имеющие отношение к репарации ДНК [92]. Моделирование и анализ стабильности генных сетей, связывающих возраст, устойчивость к стрессу и замедленное физиологическое старение, показали, что стабильность простейшей модельной генной сети резко возрастает при введении в расчеты такого параметра, как «эффективная репарация». Кроме того, согласно результатам моделирования, вклады в стабильность генной сети процессов репарации ДНК и процессов, обеспечивающих

присутствие в клетке эффективно функционирующих белков («поддержание протеостаза», «репарация протеома»), в равной степени существенны, а сами эти процессы взаимосвязаны [7].

Можно, таким образом, полагать, что молекулярные «машины», противостоящие накоплению повреждений в геноме *H. glaber*, включая механизмы репарации ДНК, функционируют с высокой эффективностью. Мы попытались проиллюстрировать этот вывод схемой, представленной на рис. 2. Однако отсутствие исследований процесса индукции апоптоза при различных генотоксических воздействиях и экспериментальных данных о работе систем репарации

ДНК образует своего рода белое пятно в знаниях о реальном вкладе этих процессов в долголетие и онкорезистентность *H. glaber*. Сравнительная оценка функциональной активности систем репарации ДНК представляется в этой связи весьма важной и актуальной задачей. ●

Авторы выражают глубокую благодарность академику В.П. Скулачеву за прочтение обзора и ценные замечания.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00038).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scharer O.D. // *Angew. Chem. Int.* 2003. V. 42. № 26. P. 2946–2974.
- Vijg J., Suh Y. // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. V. 75. P. 645–668.
- Hoeijmakers J.H.J. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 361. № 15. P. 1475–1485.
- Friedberg E.C., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P.C., Hays J.B., Lehmann A.R., Lindahl T., Lowndes N., Sarasin A., Wood R.D. // *DNA Repair (Amst.)*. 2006. V. 5. № 8. P. 986–996.
- Hanawalt P.C. // *Mech. Ageing Dev.* 2008. V. 129. P. 503–505.
- Promislow D.E. // *J. Theor. Biol.* 1994. V. 170. P. 291–300.
- Kogan V., Molodtsov I., Menshikov L.I., Reis R.J.S., Fedichev P. // *Sci. Repts.* 2015. V. 5. № 13589. P. 1–12.
- Hart R.W., Sacher G.A., Hoskins T.L. // *J. Gerontol.* 1979. V. 34. P. 808–817.
- Salmon A.B., Ljungman M., Miller R.A. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. V. 63. № 3. P. 219–231.
- Hanawalt P.C. // *Environ. Mol. Mutagen.* 2001. V. 38. № 23. P. 89–96.
- Begall S., Burda H., Schleich C. *Subterranean Rodents: News from Underground*. Berlin Heidelberg: Springer, 2007.
- Gorbunova V., Seluanov A., Mao Z., Hine C. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 22. P. 7466–7474.
- Buffenstein R. // *J. Comp. Physiol. B.* 2008. V. 178. № 4. P. 439–445.
- Gorbunova V., Bozzella M.J., Seluanov A. // *AGE*. 2008. V. 30. № 2. P. 111.
- Liang S., Mele J., Wu Y., Buffenstein R., Hornsby P.J. // *Aging Cell.* 2010. V. 9. № 4. P. 626–635.
- Delaney M.A., Ward J.M., Walsh T.F., Chinnadurai S.K., Kerns K., Kinsel M.J., Treuting P.M. // *Vet. Pathol.* 2016. V. 53. № 3. P. 691–696.
- Kim E.B., Fang X., Fushan A.A., Huang Z., Lobanov A.V., Han L., Marino S.M., Sun X., Turanov A.A., Yang P., et al. // *Nature*. 2011. V. 479. № 7372. P. 223–227.
- Keane M., Craig T., Alfoldi J., Berlin A.M., Johnson J., Seluanov A., Gorbunova V., Di Palma F., Lindblad-Toh K., Church G.M., et al. // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. № 24. P. 3558–3560.
- Yu C., Li Y., Holmes A., Szafranski K., Faulkes C.G., Coen C.W., Buffenstein R., Platzer M., de Magalhães J., Church G.M. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 11. P. e26729.
- MacRae S.L., Zhang Q., Lemetre C., Seim I., Calder R.B., Hoeijmakers J., Suh Y., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., et al. // *Aging Cell.* 2015. V. 14. № 2. P. 288–291.
- Seluanov A., Hine C., Bozzella M., Hall A., Sasahara T.H., Ribeiro A.A., Catania K.C., Presgraves D.C., Gorbunova V. // *Aging Cell.* 2008. V. 7. № 6. P. 813–823.
- Perez V.I., Buffenstein R., Masamsetti V., Leonard S., Salmon A.B., Mele J., Andziak B., Yang T., Edrey Y., Friguet B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 9. P. 3059–3064.
- Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Malyavko A.N., Naraikina Y., Zvereva M.I., Dontsova O.A. // *Acta Naturae*. 2012. V. 4. № 2. P. 44–61.
- Gomes N.M.V., Ryder O.A., Houck M.L., Charter S.J., Walker W., Forsyth N.R., Austad S.N., Venditt C., Pagel M., Shay J.W., et al. // *Aging Cell.* 2011. V. 10. № 5. P. 761–768.
- Gorbunova V., Seluanov A. // *Mech. Ageing Dev.* 2009. V. 130. № 12. P. 3–9.
- Evfratov S.A., Smekalova E.M., Golovin A.V., Logvina N.A., Zvereva M.I., Dontsova O.A. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 2. P. 41–47.
- Hong M.G., Myers A.J., Magnusson P.K., Prince J.A. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 8. P. e3024.
- Lewis K.N., Soifer I., Melamud E., Roy M., McIsaac R.S., Hibbs M., Buffenstein R. // *Mammalian Genome*. 2016. V. 27. P. 259–278.
- Delsuc F., Tilak M.K. // *Genome Biol. Evol.* 2015. V. 7. № 3. P. 768–774.
- Davies K.T., Bennett N.C., Tsagkogeorga G., Rossiter S.J., Faulkes C.G. // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. № 12. P. 3089–3097.
- Seluanov A., Hine C., Azpurua J., Feigenson M., Bozzella M., Mao Z., Catania K.C., Gorbunova V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 46. P. 19352–19357.
- Faulkes C.G., Davies K.T.J., Rossiter S.J., Bennett N.C. // *Biol. Lett.* 2015. V. 11. № 20150185. P. 1–8.
- Tian X., Azpurua J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablavaeva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A. // *Nature*. 2013. V. 499. № 7458. P. 346–349.
- Manov I., Hirsh M., Iancu T.C., Malik A., Sotnichenko N., Band M., Avivi A., Shams I. // *BMC Biol.* 2013. V. 11. № 91. P. 1–17.
- Mullins D.N., Crawford E.L., Khuder S.A., Hernandez D.A., Yoon Y., Willey J.C. // *BMC Cancer*. 2005. V. 5. P. 141.
- Haring S.J., Humphreys T.D., Wold M.S. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 3. P. 846–858.
- Kemp M.G., Mason A.C., Carreira A., Reardon J.T., Haring S.J., Borgstahl G.E.O., Kowalczykowski S.C., Sancar A., Wold M.S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 7. P. 4788–4797.
- Mason A.C., Roy R., Simmons D.T., Wold M.S. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. № 28. P. 5919–5928.
- MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A.,

- Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., et al. // *Aging* (Albany NY). 2015. V. 7. № 12. P. 1171–1184.
40. Christmann M., Kaina B. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 18. P. 8403–8420.
41. Buzdin A.A., Zhavoronkov A.A., Korzinkin M.B., Venkova L.S., Zenin A.A., Smirnov P.Y., Borisov N.M. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 1–20.
42. Abercrombie M. // *Nature.* 1979. V. 281. № 5729. P. 259–262.
43. Serrano M., Hannon G.J., Beach D. // *Nature.* 1993. V. 366. № 6456. P. 704–707.
44. Hannon G.J., Beach D. // *Nature.* 1994. V. 371. № 6494. P. 257–261.
45. Quelle D.E., Zindy F., Ashmun R.A., Sherr C.J. // *Cell.* 1995. V. 83. № 6. P. 993–1000.
46. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. // *Cell.* 1997. V. 88. № 5. P. 593–602.
47. Gil J., Peters G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 9. P. 667–677.
48. Campisi J. // *Aging Cell.* 2008. V. 7. № 3. P. 281–284.
49. Tian X., Azpurua J., Ke Z., Augereau A., Zhang Z.D., Vijg J., Gladyshev V.N., Gorbunova V., Seluanov A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 4. P. 1053–1058.
50. Cowman M.K., Lee H.-G., Schwertfeger K.L., McCarthy J.B., Turley E.A. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. № 261. P. 1–8.
51. Schwertfeger K.L., Cowman M.K., Telmer P.G., Turley E.A., McCarthy J.B. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 236.
52. Miyawaki S., Kawamura Y., Hachiya T., Shimizu A., Miura K. // *Inflammation Regeneration.* 2015. V. 35. № 1. P. 42–50.
53. Miyawaki S., Kawamura Y., Oiwa Y., Shimizu A., Hachiya T., Bono H., Koya I., Okada Y., Kimura T., Tsuchiya Y., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11471.
54. Martel C., Batsche E., Harper F., Cremisi C. // *Cell Death Differ.* 1996. V. 3. P. 285–298.
55. Morgenbesser S.D., Williams B.O., Jacks T., DePinho R.A. // *Nature.* 1994. V. 371. P. 72–74.
56. Shams I., Malik A., Manov I., Joel A., Band M., Avivi A. // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 7. P. 1111–1118.
57. Ashur-Fabian O., Avivi A., Trakhtenbrot L., Adamsky K., Cohen M., Kajakaro G., Joel A., Amariglio N., Nevo E., Rechavi G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 33. P. 12236–12241.
58. Avivi A., Ashur-Fabian O., Joel A., Trakhtenbrot L., Adamsky K., Goldstein I., Amariglio N., Rechavi G., Nevo E. // *Oncogene.* 2007. V. 26. № 17. P. 2507–2512.
59. Malik A., Korol A., Weber M., Hankeln T., Avivi A., Band M. // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 1–20.
60. Band M., Ashur-Fabian O., Avivi A. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 16. P. 3347–3452.
61. Salmon A.B., Sadighi A.A., Buffenstein R., Miller R.A. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. V. 63. P. 232–241.
62. Labinskyy N., Csiszar A., Orosz Z., Smith K., Rivera A., Buffenstein R. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. V. 291. P. 2698–2704.
63. Azpurua J., Ke Z., Chen I.X., Zhang Q., Ermolenko D.N., Zhang Z.D., Gorbunova V., Seluanov A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 43. P. 17350–17355.
64. Fang X., Seim I., Huang Z., Gerashchenko M.V., Xiong Z., Turanov A.A., Zhu Y., Lobanov A.V., Fan D., Yim S.H., et al. // *Cell Reports.* 2014. V. 8. № 5. P. 1354–1364.
65. Melen G.J., Pesce C.G., Rossi M.S., Kornblihtt A.R. // *EMBO J.* 1999. V. 18. № 11. P. 3107–3118.
66. Winnebeck E.C., Millar C.D., Warman G.R. // *J. Insect Sci.* 2010. V. 10. P. 1–7.
67. McCarthy S.D., Dugon M.M., Power A.M. // *Peer J.* 2015. V. 3. P. e1436.
68. Ishikawa H., Newburgh R.W. // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 64. № 1. P. 135–144.
69. Fujiwara H., Ishikawa H. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 16. P. 6393–6401.
70. Yadavalli S.S., Ibba M. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2012. V. 86. P. 1–43.
71. Nystrom T. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 1311–1317.
72. Andziak B., O'Connor T.P., Buffenstein R. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. V. 126. № 11. P. 1206–1212.
73. Kasaikina M.V., Lobanov A.V., Malinouski M.Y., Lee B.C., Seravalli J., Fomenko D.E., Turanov A.A., Finney L., Vogt S., Park, T.J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 19. P. 17005–17014.
74. Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., van Remmen H., Buffenstein R. // *Aging Cell.* 2006. V. 5. № 6. P. 463–471.
75. De Waal E.M., Liang H., Pierce A., Hamilton R.T., Buffenstein R., Chaudhuri A.R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 434. № 4. P. 815–819.
76. Bhattacharya A., Leonard S., Tardif S., Buffenstein R., Fischer K.E., Richardson A., Austad S.N., Chaudhuri A.R. // *Aging Cell.* 2011. V. 10. № 4. P. 720–723.
77. Andziak B., Buffenstein R. // *Aging Cell.* 2006. V. 5. № 6. P. 525–532.
78. Новиков Е.А., Кондратюк Е.Ю., Бурда Г. // *Зоол. журн.* 2015. Т. 94. № 1. С. 119–124.
79. Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. // *Успехи биол. химии.* 2009. Т. 49. С. 3–76.
80. Rodriguez K.A., Edrey Y.H., Osmulski P., Gaczynska M., Buffenstein R. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. e35890.
81. Rodriguez K.A., Osmulski P.A., Pierce A., Weintraub S.T., Gaczynska M., Buffenstein R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 11. P. 2060–2072.
82. Sottrup-Jensen L. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 20. P. 11539–11542.
83. Birkenmeier G., Muller R., Huse K., Forberg J., Glaser C., Hedrich H., Nicklisch S., Reichenbach A. // *Exp. Neurol.* 2003. V. 184. № 1. P. 153–161.
84. Borth W. // *FASEB J.* 1992. V. 6. № 15. P. 3345–3353.
85. Isaac L., Florido M.P., Fecchio D., Singer L.M. // *Inflamm Res.* 1999. V. 48. № 8. P. 446–452.
86. Thieme R., Kurz S., Kolb M., Debebe T., Holtze S., Morhart M., Huse K., Szafranski K., Platzer M., Hildebrandt T.B., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 6. P. e0130470.
87. Lewis K.N., Wason E., Edrey Y.H., Kristan D.M., Nevo E., Buffenstein R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 12. P. 3722–3727.
88. Grube K., Bürkle A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 24. P. 11759–11763.
89. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Молекуляр. биология.* 2016. Т. 50. № 4. С. 655–673.
90. Skulachev V.P., Holtze S., Vyssokikh M.Y., Bakeeva L.E., Skulachev M.V., Markov A.V., Hildebrandt T.B., Sadovnichii V.A. // *Physiol. Rev.* 2017. V. 97. № 2. P. 699–720.
91. Dziegielewska M., Holtze S., Vole C., Wachter U., Menzel U., Morhart M., Groth M., Szafranski K., Sahm A., Sponholz C., Dammann P., Huse K., Hildebrandt T., Platzer M. // *Redox Biol.* 2016. V. 8. P. 192–198.
92. Ma S., Upneja A., Galecki A., Tsai Y.M., Burant C.F., Raskind S., Zhang Q., Zhang Z.D., Seluanov A., Gorbunova V., et al. // *Elife.* 2016. V. 5. pii: e19130.