

## AGR2, ERP57/GRP58 И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИДИЗОМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

©2013 г. С. С. ШИШКИН, Л. С. ЕРЕМИНА,  
Л. И. КОВАЛЕВ, М. А. КОВАЛЕВА

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва*

I. Введение. II. Общие характеристики семейства протеин-дисульфидизомераз человека. III. Белок AGR2 человека – необычный представитель семейства протеин-дисульфидизомераз: основные свойства, биохимический полиморфизм. IV. Белок ERp57/GRP58 человека – типичный представитель семейства протеин-дисульфидизомераз: общие характеристики, функциональные свойства. V. ERdj5, TMX и некоторые другие протеин-дисульфидизомеразы человека. VI. Исследования AGR2 и ERp57/GRP58 в раковых и других активно пролиферирующих клетках человека. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

За последние 5 лет в семействе протеин-дисульфидизомераз (f-PDI) человека, которое насчитывает около двадцати белков, участвующих в многочисленных физиологических и патологических процессах [1–4], особое внимание привлекают два белка. Первый из них – это нетипичный для данного семейства белок AGR2 (Anterior gradient homolog 2, также известный как AG2, hAG-2, GOB-4 и др.) [например, по 5, O95994 UniProt]. Вторым является типичная протеин-дисульфидизомераза – изоформа A3 (PDIA3) или белок ERp57/GRP58 [6]. К характерным особенностям этого фермента относят способность катализировать реакции образования, распада и изомеризации дисульфидных связей в молекулах белков.

---

*Принятые сокращения:* f-PDI – семейство протеин-дисульфидизомераз; Mm – молекулярная масса; NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; SNP's – однонуклеотидные замены; Tr-sf – тиоредоксиновое суперсемейство; а.о. – аминокислотные остатки; ИФА – иммуноферментный анализ; кДа – килодальтоны; ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СЭР – стресс эндоплазматического ретикулума; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

*Адрес для корреспонденции:* shishkin@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке Госконтракта № 14.740.11.0762.

О каждом из указанных белков в NCBI PubMed представлено по сотне статей, опубликованных только за прошедшую пятилетку. Такой интерес, по-видимому, в значительной степени обусловлен тем, что в ряде исследований было выявлено участие AGR2 и ERp57/GRP58 в молекулярных процессах, обеспечивающих пролиферацию раковых клеток. Соответственно, появились серьезные основания рассматривать эти белки как потенциальные биомаркеры опухолей и молекулярные мишени для химиотерапевтических воздействий [5–7].

При этом в ряде лабораторий продолжают активно изучать роль AGR2 и ERp57/GRP58 в различных функционально важных процессах, проходящих у человека (а также у других позвоночных) – от онтогенетических изменений и апоптоза до обеспечения фолдинга и стресс-устойчивости. В целом, накапливающиеся результаты свидетельствуют о том, что указанные белки можно относить к полифункциональным [5–8] и, соответственно, рассматривать как весьма перспективные объекты для дальнейших исследований. Среди других доводов в пользу данной позиции следует отметить обнаружение различных проявлений биохимического полиморфизма AGR2 и ERp57/GRP58, включая существование близкородственных белков, например AGR3 [9], а также PDI и PDIp (продукты генов *PDI1* и *PDI2*, соответственно) [1], которые являются членами f-PDI.

Показано, что и другие представители f-PDI могут играть различные роли в обеспечении контроля за клеточной пролиферацией, а при его нарушениях вовлекаться в процессы канцерогенеза [1, 10, 11].

Таким образом, учитывая большую значимость для решения различных биомедицинских проблем представителей семейства PDI (в первую очередь, белков AGR2 и ERp57/GRP58), представляется актуальным рассмотреть основные результаты недавних исследований этих белков и проанализировать их возможные перспективы.

## II ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕМЕЙСТВА ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИДИЗОМЕРАЗ ЧЕЛОВЕКА

К f-PDI большинство авторов относят белки, существенно различающиеся по размерам (диапазон от 19 до 90 кДа) и по ряду функциональных свойств (в частности, среди них есть как обладающие дисульфидизомеразной активностью, так и неактивные) [1–4, 12]. Объединяет эти белки важная структурная особенность – наличие одного или нескольких так называемых тиоредоксин-подобных доменов (Thioredoxin-like domains), а также сходная внутриклеточная локализация – в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и/или других мембранных образованиях.

Эти критерии были сформулированы в одном из первых обстоятельных обзоров, посвященных f-PDI [1], и затем использовались в последующих публикациях [4, 12].

В свою очередь f-PDI рассматривается как часть тиоредоксинового суперсемейства (Tr-sf), разнообразные представители которого содержат в своих полипептидных цепях своеобразный структурный блок или модуль (~ 100–120 а.о.), сходный с небольшим белком тиоредоксином по аминокислотной последовательности, включающей характерный мотив из четырех а.о. (Cys–X–X–Cys) [13, 14].

Созданные трехмерные модели тиоредоксин-подобных доменов свидетельствуют о том, что этот важнейший модуль в структуре различных белков f-PDI обычно состоит из пяти  $\beta$ -слоев, чередующихся с четырьмя  $\alpha$ -спиральными участками ( $\beta$ – $\alpha$ – $\beta$ – $\alpha$ – $\beta$ – $\alpha$ – $\beta$ – $\alpha$ ), причём  $\alpha$ -спирали, в целом, занимают периферийное положение относительно центрально расположенных  $\beta$ -слоев [13, 15].

Найденные сначала у прокариотических организмов многочисленные представители Tr-sf выявлены и у эукариот, включая человека, в организме которого белки выполняют целый ряд важных функций, связанных с окислительно-восстановительными реакциями (т.е. являются оксидоредуктазами) [13, 14]. Кроме того, у многих белков Tr-sf обнаружены свойства шаперонов, что, как считается, обусловлено именно наличием в их структуре тиоредоксин-подобных доменов. У самого тиоредоксина выявлены разные функции [16, 17], среди которых особое упоминание заслуживает нуклеотидредуктазная активность, обеспечивающая образование дезоксирибонуклеотидов и, следовательно, жизненно необходимая для биосинтеза ДНК. Таким образом, очевидно, что исследование белков Tr-sf, включая f-PDI, представляются перспективным подходом к изучению молекулярных процессов, принципиально важных для обеспечения жизнедеятельности, в частности, ведущих к формированию различных функционально активных биополимеров.

Для того, чтобы характеризовать общие свойства f-PDI, учитывая наличие в этом семействе членов, существенно различающихся по ряду показателей, представляется целесообразным выделить среди рассматриваемых белков три основные подгруппы и несколько необычных представителей. Общие планы строения отдельных белков из этих подгрупп показаны на рис. 1.

Первую подгруппу естественно составляют шесть типичных PDI – белки с Mm в диапазоне 50–70 кДа, содержащие, как правило, по два тиоредоксин-подобных домена, обладающих ферментной активностью (обычно обозначаемые – **a** и **a'**), и по два домена (**b** и **b'**), сходных по строению, но лишенных ферментной активности.

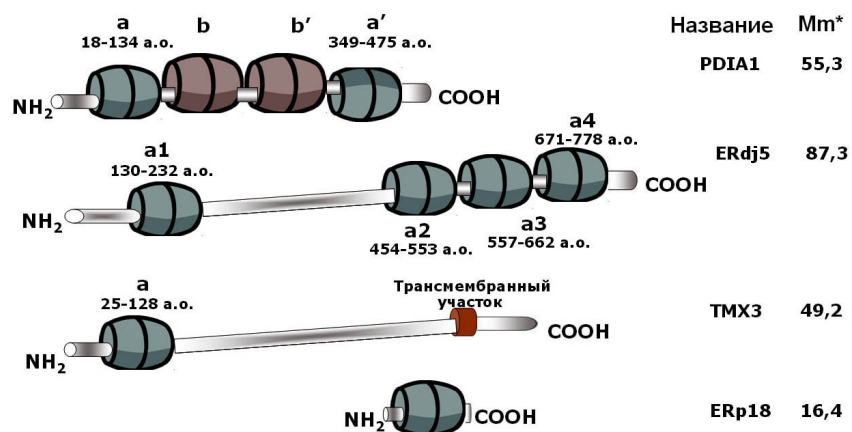


Рис. 1. Общие схемы структурной организации белков из трех основных подгрупп f-PDI человека (PDIA1, представляющие типичные протеин-дисульфидизомеразы; ERdj5 – белки ЭР; TMX3 – трансмембранные белки), а также необычных членов этого семейства, на примере ERp18. Расчетные значения Mm в кДа приведены без учета сигнальных пептидов.

**a** и **a'** – тиоредоксин-подобные домены, обладающие ферментной активностью;

**b** и **b'** – сходные по строению тиоредоксин-подобные домены, но лишённые ферментной активности.

Классическим примером и типичным представителем первой подгруппы в f-PDI можно считать протеин-дисульфидизомеразу A1 (которую обозначают как PDI, PDIA1 Cellular thyroid hormone-binding protein, Prolyl 4-hydroxylase subunit beta, ERBA2L, p55, по P07237 UniProt). Этот фермент катализирует реакции образования, распада и изомеризации дисульфидных связей в молекулах белков, обладает свойствами шаперона, выступает в качестве субъединицы в пролил-4-гидроксилазном комплексе, способен связывать тиреоидные гормоны и, по-видимому, участвует в транспорте триацилглицеролов [12, 18, 19]. Схематически его структура показана на рис. 1.

Практически сходный план строения был обнаружен ещё у трех белков этой подгруппы (PDIp, ERp57/GRP58, PDILT), тогда как у белков ERp72 и PDIg оказалось по три тиоредоксин-подобных домена, обладающих ферментной активностью [по 1 и UniProt]. При этом у белка ERp72, как и у других представителей этой подгруппы, остаются сохраненными два тиоредоксин-подобных домена, лишённые ферментной активности, и, соответственно, его Mm примерно на 20% больше, чем у остальных. Напротив, у PDIg – типичная

величина Mm, поскольку имеется только один лишенный ферментной активности тиоредоксин-подобный домен.

Таким образом, эти PDI очевидно представляют собой один из образцов реализации принципа «блочного строительства», обеспечившего в ходе молекулярной эволюции формирование широкого разнообразия белков у высших эукариот.

Ко второй подгруппе можно отнести четыре белка ЭР (ERdj5, ERp5, ERp46, ERp44), которые содержат только тиоредоксин-подобные домены, обладающие ферментной активностью [1, 4, 12]. В структуре ERdj5 таких доменов оказалось четыре (рис. 1), в ERp46 – три, в ERp5 – два, и у ERp44 – один.

Третью подгруппу представляют четыре трансмембранных белка (обозначаемые ТМХ и ТМХ2-4), в структуре которых выделяют по одному активному тиоредоксин-подобному домену и гидрофобному трансмембранному участку (по [1] и Q9H3N1, Q9Y320, Q96JJ7, Q9H1E5 UniProt). На рис. 1, в качестве примера, представлена схема строения ТМХ3.

Необычными членами f-PDI, по всей видимости, можно признать белки ERp27, Erp28 (ERp29), а также ERp18 (Thioredoxin domain-containing protein 12) с близко родственными AGR2 и AGR3. Эти белки обладают существенно меньшими величинами Mm (<30 кДа), чем другие члены f-PDI, и содержат по одному тиоредоксин-подобному домену за исключением ERp27, у которого было найдено два подобных, но функционально-неактивных домена (**b** и **b'**) [1, 5, 12, 20]. Надо отметить, что ERp27 все же оказался способным достаточно специфично связываться с ERp57/GRP58.

Известно, что у человека имеется, как минимум, две основные изоформы тиоредоксина (Trx1 – цитоплазматическая/ядерная и Trx2 – митохондриальная), которые кодируются разными генами (*TXN* и *TXN2*) [16, 17], а также множество белков, содержащих тиоредоксин-подобные домены, включая представителей f-PDI. При этом обнаружены разнообразные проявления их биохимического полиморфизма, обусловленные альтернативным сплайсингом, единичными аминокислотными заменами и постсинтетическими модификациями. В частности, при экспрессии гена *TXN* за счет альтернативного сплайсинга образуются изоформы 1 и 2 (по P10599 UniProt). Отдельные примеры биохимического полиморфизма некоторых белков f-PDI будут приведены ниже. Тем не менее, функционально важные участки в тиоредоксин-подобных доменах остаются достаточно консервативными, что можно видеть при сравнении фрагментов аминокислотных последовательностей тиоредоксинов и



Рис. 2. Фрагменты аминокислотных последовательностей, принадлежащих основным тиоредоксидам человека и некоторым представителям f-PDI, в которых располагаются характерные (Cys-X-X-Cys) или измененные мотивы из четырех а.о., обеспечивающие функциональную активность (заклучены в рамку и выделены желтым маркером). Гидрофобные а.о., фланкирующие указанные мотивы с N-концевой стороны, показаны серым маркером, а положительно заряженные остатки лизина и аргинина, располагающиеся с C-концевой стороны, – голубым.

тиоредоксин-подобных доменов с характерными мотивами, имеющимися у некоторых типичных представителей f-PDI человека (рис. 2).

У четырех рассматриваемых белков (PDIA1, ERp57/GRP58, ERp46 и TMX3), которые относятся к разным подгруппам, но обладают протеин-дисульфидизомеразной активностью, в структуре тиоредоксин-подобных доменов присутствуют характерные мотивы (CGHC), фланкированные с N-концевой стороны остатком триптофана (W). C-концевая последовательность у них практически всегда начинается положительно заряженным остатком лизина, за которым может располагаться еще один положительно заряженный остаток (K или R). Исключение составляет ERp46, у которого в данной позиции находится Q и лишь затем располагается положительно заряженный R. Обращает на себя внимание также то, что с N-концевой стороны от мотивов обнаруживаются блоки из нескольких гидрофобных а.о.

В отличие от этого у двух необычных членов f-PDI (ERp27 и AGR2) в соответствующих областях аминокислотных последовательностей обнаруживалось только по одному остатку цистеина. Вместе с тем, мотив в последовательности AGR2 (CPHS) обладал определенным сходством с мотивами функционально активных доменов у некоторых типичных представителей f-PDI. Так, у белка ERdj5 в мотиве второго функционального домена, после обязательного С, во второй позиции содержится Р (по [1] и Q8IXB1 UniProt). Н в третьей позиции встречается в мотивах нескольких типичных белков f-PDI (в частности, у показанных на рис. 2). Наконец, S в четвертой позиции был выявлен также в мотиве CRFS функционально активного домена у белка ERp44 человека ([21] и Q9BS26 UniProt). Надо отметить, что мотив CRFS обнаруживался не только у AGR2 человека, но и в последовательностях отдельных белков-представителей f-PDI у других эукариот, при этом такие белки сохраняли каталитическую активность, правда, на сравнительно меньшем уровне [21, 22]. Кроме того, в аминокислотной последовательности AGR2 с N-концевой стороны от выделенного мотива CPHS присутствует блок из гидрофобных а.о., а в С-концевой последовательности – тандем КК. Таким образом, указанное сходство может рассматриваться как довод в пользу признания членства AGR2 в f-PDI.

### **III. БЕЛОК AGR2 ЧЕЛОВЕКА – НЕОБЫЧНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ СЕМЕЙСТВА ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИДИЗОМЕРАЗ: ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА, БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ**

Белок AGR2 и его близкий родственник AGR3 были причислены к f-PDI позже всех остальных его членов [22]. Однако, наиболее доказательные данные, подтверждающие его принадлежность к этому семейству, были получены несколько позднее. Среди них принципиальную роль, по-видимому, сыграли результаты Park S.W. et al. [23]. Этим авторам в исследовании на лабораторных мышцах удалось выявить необычную каталитическую активность у AGR2, который оказался способным взаимодействовать с муцином 2, большим гликопротеином, богатым цистеиновыми остатками (MUC2). Было показано, что остаток цистеина, имеющийся в тиоредоксин-подобном домене AGR2, образует гетеродисульфидную связь с остатками цистеина в молекуле MUC2. Эта реакция является существенным условием для экскреции MUC2 клетками кишечного эпителия, что позволяет указанному белку выполнять защитную функцию в кишечнике.



Соответствуют представлениям о принадлежности AGR2 и AGR3 к f-PDI также сведения об их локализации в ЭР [например, 5, 23]. Недавно было показано, что за данное свойство у AGR2 отвечает особый С-концевой KTEL мотив, полное удаление которого или аминокислотные замены в нем нарушают функции белка [24]. Однако известно, что у других членов f-PDI соответствующие мотивы (при сохранной функции) имеют иное строение (например, KDEL, KVLE) [1]. В целом, в некоторых базах данных NCBI белок AGR2 (и его ген) обозначают как семнадцатый член f-PDI (protein disulfide isomerase family A, member 17), а белок AGR3 – как восемнадцатый (protein disulfide isomerase family A, member 18).

Надо отметить, что исследованиям белка AGR2 человека предшествовало обнаружение в 1998 г. соответствующего гена у ксенопуса (гладкой шпорцевой лягушки, *Xenopus laevis*) [25]. Этот ген, который обеспечивал нормальное развитие эктодермальных клеток в раннем эмбриогенезе, авторы обозначили как XAG-2, а его белковый продукт охарактеризовали как секретируемый белок. В том же году появилось сообщение о присутствии в геноме человека гомологичного гена (обозначенного сначала hAG-2), который активно функционировал в культивируемых клетках рака молочной железы (по результатам анализа соответствующей кДНК-библиотеки) [26]. Параллельно в декабре 1998 г. в объединенную базу данных Genbank (EMBL/GenBank/DDBJ databases) поступила информация от Zhang J.S. и Smith D.I. о повышенной экспрессии указанного гена в опухолях, при этом объектом исследований был рак простаты. Представленная информация осталась неопубликованной в печати, но была зарегистрирована (AF115926.1; GI:17998665 GenBank). Таким образом, по-видимому, эта информация является первым указанием на вероятное повышение продукции белка AGR2 при раке простаты.

К настоящему времени ген, кодирующий белок AGR2 человека, детально охарактеризован [10551 Gene NCBI]. Он локализован в области 7p21.1, занимает около 26 kb, содержит 7 экзонов и соседствует с геном, кодирующим AGR3 ([27, 28] и 606358 OMIM NCBI), что дает основание рассматривать эти гены (и кодируемые ими белки), как пример полилокусного полиморфизма.

Имеются материалы о возможном существовании в гене *AGR2*, в целом, около 500 SNP's, но в кодирующих участках выявлено только 12 SNP's, из которых шесть являются несинонимичными [по SNP NCBI]. Среди последних подробно изучен полиморфизм rs6842, при котором обнаруживается замена нуклеотидного остатка Т на А, ведущая к аминокислотной замене 147N→К (несинонимичный) или



**Transcript: AGR2-201** ENST00000419572

**Description** anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis) [Source:HGNC Symbol;Acc:328]  
**Location** [Chromosome 7: 16,832,266-16,872,932](#) reverse strand.  
**Gene** This transcript is a product of gene [ENSG00000106541](#)  
 This gene has 8 transcripts (splice variants) [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype	CDS incomplete	CCDS
AGR2-001	<a href="#">ENST00000419304</a>	1778	<a href="#">ENSP00000391490</a>	175	Protein coding	-	<a href="#">CCDS5364</a>
AGR2-201	<a href="#">ENST00000419572</a>	854	<a href="#">ENSP00000386342</a>	195	Protein coding	-	-
AGR2-005	<a href="#">ENST00000401412</a>	782	<a href="#">ENSP00000386025</a>	188	Protein coding	-	-
AGR2-006	<a href="#">ENST00000450569</a>	671	<a href="#">ENSP00000414806</a>	119	Protein coding	5'	-
AGR2-007	<a href="#">ENST00000412973</a>	670	<a href="#">ENSP00000411969</a>	131	Protein coding	3'	-
AGR2-003	<a href="#">ENST00000486219</a>	117	No protein product	-	Processed transcript	-	-
AGR2-002	<a href="#">ENST00000468419</a>	585	No protein product	-	Retained intron	-	-
AGR2-004	<a href="#">ENST00000489523</a>	572	No protein product	-	Retained intron	-	-

Рис. 3. Обобщенные сведения об обнаруженных транскриптах гена AGR2 человека из базы данных The Ensembl Genome project [по [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens)].

замена T→C, которая не ведет к аминокислотной замене (синонимичный). В целом, именно несинонимичные SNP's и обусловленные ими единичные аминокислотные замены являются причинами соответствующего биохимического полиморфизма белка AGR2 (полиаллелизм).

Более того, в базе данных The Ensembl Genome project [по [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens)] приведены сведения о том, что при экспрессии гена AGR2 человека за счет альтернативного сплайсинга образуется восемь транскриптов, пять из которых способны кодировать полипептидные цепи разной длины – от 195 до 119 а.о. (рис. 3). Таким образом, альтернативный сплайсинг, в свою очередь, вносит существенный вклад в биохимический полиморфизм AGR2.

К настоящему времени известно, что в процессе постсинтетических модификаций от полипептидной цепи вновь синтезированного AGR2 отщепляется N-концевой сигнальный пептид из 20 а.о. ([29] и O95994 UniProt). Затем клетки секретируют AGR2, который попадает в различные биологические жидкости. Так, секреция AGR2 в культуральную жидкость была показана при выращивании раковых клеток *in vitro*, при этом секретированный AGR2 сохранял свою способность к стимулированию клеточной пролиферации [30]. У больных некоторыми формами рака регистрировалось повышенное содержание AGR2 в плазме крови [31]. Более того, недавно даже был разработан метод иммуоферментного анализа для определения AGR2 в моче, позволяющий детектировать этот белок в pg/μg общего белка и затем конвертировать в pg/ml мочи [32].

По результатам транскриптомного и иммунохимического анализа получены данные о том, что экспрессия гена *AGR2* происходит не только в клетках рака молочной железы и простаты (как отмечалось выше). Этот белок был найден и в других раковых клетках, а также и в некоторых нормальных клетках (в частности, в клетках кишечника, трахеи, мозга, и др.) ([5], O95994 UniProt и [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Подробнее материалы исследований *AGR2* при онкологических заболеваниях будут рассмотрены ниже.

Имеются сведения, что в регуляции экспрессии гена *AGR2* важная роль принадлежит транскрипционным факторам семейства FOXA (Hepatocyte nuclear factor 3). В частности, было показано, что FOXA1 и FOXA2 воздействуют на промотор гена *AGR2* и усиливают его экспрессию [33, 34]. В результате такого воздействия у клеток рака простаты повышалась способность к метастазированию и инвазии. Напротив, белок, связывающий ErbB3 (EBP1), блокировал промотор гена *AGR2* и снижал стимулирующее влияние FOXA1 и FOXA2 [34]. К настоящему времени известно, что EBP1 (обозначаемый также как Proliferation-associated protein 2G4 и Cell cycle protein p38-2G4 homolog) способен выступать как корепрессор андрогенного рецептора и связываться с самыми различными белками, включая ацетилированную форму гистона H1 [по Q9UQ80 UniProt].

Надо отметить также, что существуют различные данные о влиянии эстрогенов и андрогенов на экспрессию гена *AGR2* [26, 35–37]. Так, ещё в 1998 г. в клетках рака молочной железы была выявлена коэкспрессия гена *AGR2* и гена ER, кодирующего рецептор эстрогенов [26]. Позднее группа исследователей из США охарактеризовала ген *AGR2* как андроген-индуцибельный [35]. Далее по результатам изучения обнаруженного феномена коэкспрессии гена *AGR2* и гена ER удалось установить, что усиление экспрессии гена *AGR2* происходит как в гормон-чувствительных, так и в гормон-нечувствительных клетках [8, 9]. Наконец, в 2013 г. Vu H. et al. [36] в нескольких сериях экспериментов получили прямые доказательства влияния эстрогенов и андрогенов на транскрипцию гена *AGR2* (а также гена *AGR3*) в клетках рака простаты. Практически параллельно появились материалы, которые указывали на вовлеченность белка *AGR2* в сигналинг, индуцируемый эстрогенами, и свидетельствовали о возможном использовании этого белка как молекулярной мишени при разработке химиотерапевтических воздействий при раке молочной железы [7, 37]. В итоге в настоящее время многие авторы определяют *AGR2* как эстроген- и андроген-чувствительный белок, у которого не только биосинтез, но и последующее функционирование связано с

метаболическими процессами, контролируруемыми половыми стероидными гормонами [7, 35–37].

Таким образом, не вызывает сомнений то, что регуляция на уровне транскрипции играет важную роль в биосинтетических процессах, ведущих к образованию белка AGR2 в норме и при патологии. Более того, недавно появились данные о том, что даже некоторые генотоксиканты (в частности, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) могут оказывать влияние на экспрессию гена AGR2 [38]. По-видимому, подобные внешнесредовые воздействия способны вносить свой вклад в дисрегуляцию экспрессии гена AGR2.

Среди работ, посвященных изучению экспрессии гена AGR2, особого внимания заслуживает публикация Hong X.Y. et al. [39], свидетельствующая о том, что транскрипция AGR2 может регулироваться и особым белковым фактором, индуцируемым гипоксией (hypoxia induced factor-1, HIF-1). Установлено, что HIF-1 состоит из нескольких субъединиц и представляет собой крупный транскрипционный комплекс, который называют «мастером контроля за переключением» генов под влиянием гипоксии («master control switch») [39, 40]. При этом исходно индуцируемым гипоксией белком является  $\alpha$ -субъединица HIF-1. Соответственно, считается, что при возникновении гипоксии в клетках начинается активная продукция HIF-1 $\alpha$ , а далее, как следствие, включается «мастер контроля за переключением» генов и определенным образом изменяется весь клеточный транскрипционный профиль. Показано, что многие клетки раковых опухолей находятся в состоянии гипоксии, которая приводит к существенным изменениям в генной экспрессии, а также в метаболических процессах, и эти изменения рассматриваются как возможные причины возникновения у раковых клеток определенной резистентности к действию химиотерапевтических агентов и других повреждающих факторов [по 41]. Таким образом, дисрегуляция экспрессии гена AGR2 в условиях гипоксии может вносить свой вклад в фенотипические особенности раковых клеток.

Функциональные свойства AGR2 пока изучены недостаточно, хотя установлено, что этот белок способен усиливать клеточную пролиферацию, клеточную подвижность и способствовать выживанию клеток при культивировании [30, 42]. Имеются данные о том, что AGR2 может участвовать и в процессах клеточной трансформации. По крайней мере, культивируемые нормальные мышечные фибробласты (линия NIH3T3), приобретаемая после трансфицирования способность к продукции AGR2, приобрели и ряд свойств раковых клеток, которые регистрировались и *in vitro*, и *in vivo* [42].

Значительный интерес вызвали сведения, указывающие на возможность того, что AGR2 способен ингибировать транскрипцию и/или фосфорилирование белка p53, известного важнейшего супрессора опухолевого роста [43, 44]. Эти данные подробно обсуждались в последующих обзорах и других публикациях, однако считается, что молекулярные механизмы ингибирующего влияния AGR2 на p53 остаются не вполне ясными [5, 45].

При изучении молекулярных функций было также показано, что AGR2 может взаимодействовать как с муцином 2 [23] и муцином 1 [46], так и с другими белками, в частности, с  $\alpha$ -дистрогликаном 1 (DAG1) [28], являющимся известным периферическим мембранным белком, выполняющим роль рецептора для ряда белков экстраклеточного матрикса [по Q14118 UniProt]. Кроме того, к числу партнёров AGR2 относят белок, названный Ly6/PLAUR domain-containing protein 3 (синоним GPI-anchored metastasis-associated protein C4.4A homolog) [28], который вовлечен во взаимодействия клеток с экстраклеточным матриксом и в обеспечение клеточной подвижности [по O95274 UniProt].

Одна из наиболее интересных и полных работ, посвященных изучению белок-белковых взаимодействий с участием AGR2, была опубликована в 2010 г. Maslon MM. et al. [47]. Эти авторы показали, что AGR2 достаточно специфично может связываться с рептином (Reptin, RuvB-like 2, CAG38538 Protein NCBI) – белком, который выполняет ряд функций в генетическом аппарате клетки, в частности, участвуя в работе гистон-ацетилазного комплекса и влияя на процессы транскрипции [по Q9Y230 UniProt]. Было установлено также, что в аминокислотной последовательности AGR2 имеется специальный мотив (FVLLNLVY), отвечающий за связывание с рептином (у которого тоже есть особый участок для данной функции) и, по-видимому, способный обеспечивать связывание с некоторыми другими белками. Аминокислотные замены в указанном мотиве (полученные с помощью направленного мутагенеза) приводили к резкому снижению функции связывания. Функциональная значимость выявленного мотива подтверждалась и тем, что оба родственные AGR2 белка (AGR3 и ERp18), у которых имелись отличия в аминокислотных последовательностях данного участка, оказались неспособными связывать рептин.

В 2012 г. Wu J. et al. сообщили [48], что им удалось с помощью метода tandemной аффинной очистки выявить в клетках гепатоцеллюлярной карциномы 18 AGR2-связывающих белков, которые были охарактеризованы как участники MAPK-сигналинга и метаболических путей, контролируемых каспазами.

Среди других работ, посвященных изучению белок-белковых взаимодействий с участием AGR2, отдельного внимания заслуживают публикации 2013 года, свидетельствующие о способности AGR2 к димеризации (или даже к олигомеризации) [49–52]. Сначала Ryu J. et al. [49] показали, что в клетках аденокарциномы из толстого кишечника после трансфекции плазмидой, которая содержала кДНК, кодирующую AGR2, появляются как мономерная, так и димерная форма этого белка. Авторы, использовавшие для выявления указанных форм AGR2 SDS-PAGE и Вестерн-блот-анализ, пришли к заключению, что димеризация происходит за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей подобно тому, как AGR2 формирует гетеродисульфидную связь с остатками цистеина в молекуле MUC2 [23]. Кроме того, были получены данные, свидетельствующие о том, что димеризация AGR2 является необходимым условием для его взаимодействия с другим белком ЭР – GRp78 (синонимы – Endoplasmic reticulum lumenal Ca(2+)-binding protein grp78, Heat shock 70 kDa protein 5, Immunoglobulin heavy chain-binding protein, BiP и др.). С учетом известной роли GRp78 в ответах клетки на различные стрессорные воздействия и шаперонных свойств с формированием мультимерных белковых комплексов [по P11021 UniProt] Ryu J. et al. [49] выдвинули предположение о возможном участии димеров AGR2 в реализации функций GRp78.

Практически параллельно Kaser A. et al. [50], рассмотрев молекулярные механизмы развития так называемого стресса эндоплазматического ретикула (СЭР), сопровождающегося накоплением белков с нарушенным фолдингом, пришли к заключению, что одной из функций AGR2, вероятно, является участие его совместно с GRp78 в обеспечении нормального фолдинга. Было отмечено также, что нарушение этого взаимодействия может быть причиной некоторых воспалительных заболеваний кишечника.

Далее, Patel P. et al. [51] с помощью равновесного аналитического ультрацентрифугирования и ряда других методов, включая хроматографические, обнаружили, что обычный, созревший AGR2 (21–175 а.о.) и его укороченная форма (40–175 а.о.) образуют агрегаты с Mm 30,6 и 26,0 кДа, соответствующие их гомо- и гетеродимерным формам. Дальнейший анализ позволил считать, что для димеризации важен участок E60–K64. Более того, изучение полипептидных цепей с единичными аминокислотными заменами (полученными направленным мутагенезом) показало, что при замене 60E→A димерные формы не образуются. При этом Patel P. et al. [51] отметили, что, поскольку укороченная форма (40–175 а.о.) участвовала в образовании димеров,

то следовательно N-концевой фрагмент AGR2 (21–40 а.о.) в условиях *in vitro* (а также, по-видимому, и *in vivo*) остается неструктурированным. Таким образом, по мнению этих авторов, именно указанный участок может обеспечивать функциональную активность AGR2 по стимуляции клеточной адгезии и иметь отношение к вовлеченности AGR2 в процессы метастазирования.

Появилось также сообщение о разработке специального метода для изучения стабильности димеров AGR2 в условиях воздействия синтетическими пептидами [52]. Авторы характеризовали эту работу как первый шаг к созданию способа целенаправленного изменения свойств AGR2, который рассматривается как перспективная молекулярная мишень для химиотерапии злокачественных опухолей.

В целом, хотя основные свойства AGR2 человека к настоящему времени уже в значительной степени охарактеризованы и свидетельствуют о его мультифункциональности, этот необычный представитель f-PDI продолжают активно изучать, а накапливающиеся материалы указывают на перспективность дальнейших исследований AGR2 для решения различных биомедицинских задач.

#### **IV. БЕЛОК ERP57/GRP58 ЧЕЛОВЕКА – ТИПИЧНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ СЕМЕЙСТВА ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИД ИЗОМЕРАЗ: ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА**

Белок человека, который часто обозначают как ERP57/GRP58 (от англоязычных названий – Endoplasmic reticulum resident protein 57, а также 58 kDa glucose-regulated protein, Endoplasmic reticulum resident protein 60, Disulfide isomerase ER-60, ER-60 protease) и рассматривают как протеин-дисульфидизомеразу A3 [например, по P30101 UniProt и 1, 6], привлекает внимание исследователей с середины 90-ых годов прошлого века. Очевидной причиной такого этого внимания стало то, что уже в одной из первых публикаций об этом белке было высказано предположение о возможном вовлечении ERp57/GRP58 в процессы опухолевой трансформации клеток [53].

В тот же период анализ аминокислотной последовательности ERp57/GRP58, рассчитанной по результатам секвенирования соответствующей кДНК, дал основания считать, что у этого белка имеются два тиоредоксин-подобных домена с характерными мотивами CGHC, а также мотив QEDL, указывающий на локализацию в ЭР, и мотив KPKKKKK, характерный для ядерной локализации [54].

Далее в структуре ERp57/GRP58 отметили, кроме двух тиоредоксин-подобных функциональных доменов (**a** и **a'**), два сходных, но



лишенных ферментной активности домена (**b** и **b'**) [55, 56]. При этом оказалось, что **b** и **b'** домены являются необходимыми для образования устойчивого комплекса с двумя присутствующими в ЭР лектинами – растворимым кальретикулином и мембрано-связанным кальнексином [56, 57]. Более того, было установлено, что ключевую роль в связывании кальнексина играют имеющиеся в **b'** домене а.о. 214K, 274K и 282R.

В целом, по полученным данным общий план строения ERp57/GRP58 вполне соответствовал схеме, характерной для подгруппы традиционных протеин-дисульфидизомераз (рис. 1).

К настоящему времени ряд сведений о белке человека ERp57/GRP58 суммированы в базе данных UniProt [по P3095], а также в недавних обзорах [57,6,3]. По имеющимся материалам полная аминокислотная последовательность ERp57/GRP58 состоит из 505 а.о., из которых 1–24 а.о. являются сигнальным пептидом. Было показано также, что в ERp57/GRP58 может формироваться внутримолекулярная дисульфидная связь (61С–68С в структуре **a** домена) [58].

Достаточно подробно изучен и ген человека, кодирующий рассматриваемый белок (*PDIA3*). Определена хромосомная локализация этого гена (15q15) и общий план строения из 13 экзонов [по 602046 OMIM NCBI и GENE NCBI]. В базе данных SNP NCBI зарегистрировано 554 полиморфных варианта, найденных в гене *PDIA3*.

Собранные за последнее десятилетие экспериментальные данные не оставляют сомнений в том, что ERp57/GRP58 является дисульфидизомеразой, относится к стрессорным белкам (синтез которых усиливается при недостатке глюкозы) и присутствует в ЭР, а также в других клеточных компартментах, где выполняет несколько важных функций [например, по 5, 6, 57].

Во-первых, установлено, что ERp57/GRP58 в комплексе с кальретикулином и кальнексином обеспечивает правильный фолдинг вновь синтезированных гликопротеинов и контролирует его качество, что необходимо для дальнейшей секреции таких белков или встраивания в клеточные мембраны. Эта функция ERp57/GRP58 представляется особенно полно изученной. В нескольких недавних обзорах, где она была детально описана, отмечалось важное биомедицинское значение правильного фолдинга гликопротеинов и патогенетическая роль накапливающихся белков с нарушенным фолдингом при различных заболеваниях [3, 6, 57]. Схематически участие ERp57/GRP58 в обеспечении правильного сворачивания белков с незавершенным или нарушенным фолдингом показано на рис. 4.

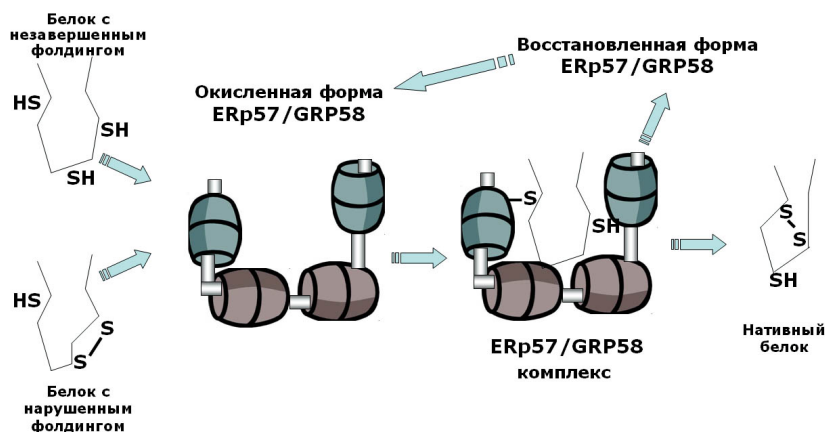


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая участие ERp57/GRP58 в обеспечении правильного сворачивания белков с незавершенным или нарушенным фолдингом [по 3].

Во-вторых, накоплены убедительные материалы, свидетельствующие об участии ERp57 в сборке главного комплекса гистосовместимости (MHC class I). Так, ещё в 1998 г. Lindquist J.A. et al. [59] показали, что рассматриваемый белок катализирует образование дисульфидных связей в тяжелых цепях MHC class I и входит в состав этого комплекса. Кроме того, в указанном комплексе были обнаружены кальретикулин, кальнексин,  $\beta$ 2-микроглобулин, тапазин и особый транспортный белок, обозначаемый аббревиатурой TAP (от англоязычных названий transporter associated with antigen processing или antigen peptide transporter). Эти данные неоднократно подтверждались и уточнялись [например, по 3, 6, 57]. В частности, примерно через десять лет Dong G. et al. [60] сообщили, что на одном из этапов сборки главного комплекса гистосовместимости (MHC class I) между ERp57 и тапазином образуются гетеродимеры за счет ковалентных дисульфидных связей, в которых участвуют 57С молекулы ERp57 и 95С молекулы тапазина. Совсем недавно Boyle L.H. et al. (2013) [61] обнаружили дополнительного участника главного комплекса гистосовместимости – белка, обозначаемого аббревиатурой TAPBPR, которого считают родственным тапазину (Tapasin-related protein или TAP-binding protein-related protein). По их данным главный комплекс гистосовместимости (MHC class I), содержащий TAPBPR, функционирует в аппарате Гольджи. Таким образом, можно думать, что исследования роли ERp57 в сборке главного комплекса гистосовместимости (MHC class I) будут продолжены.

В качестве третьей принципиально важной функции ERp57/GRP58 некоторые авторы отмечают его способность к взаимодействию с ядерной ДНК и влияние на генную экспрессию [например, по 3, 6, 57]. Первые сведения о возможности такого взаимодействия ERp57/GRP58 появились ещё в 90-ых годах прошлого века [по 62]. В 2002 г. Coppari S. et al. [63] сообщили, что ERp57/GRP58 присутствует как в ЭР, так и в клеточных ядрах. У рассматриваемого белка удалось выявить и способность к взаимодействию с молекулами ДНК, за которую отвечал один из функционально активных тиоредоксиновых доменов (a') [64–66]. Оказалось также, что ERp57/GRP58 входит как составной компонент в так называемый STAT3-транскрипционный комплекс [66]. Основным участником этого комплекса представляет собой белок STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), состоящий из 770 а.о., который обеспечивает клеточный ответ на действие интерлейкинов и ряда ростовых факторов [по P40763 UniProt]. STAT3 является одним из представителей семейства STAT, включающего ещё шесть белков с высокой степенью гомологии первичных структур и способностью к регуляции клеточной пролиферации [67]. В 2010 г. Сое Н. et al. [73] подтвердили образование ERp57/GRP58–STAT3 комплексов и способность ERp57/GRP58 модулировать процесс сигналинга, запускаемый STAT3. Кроме того, эти авторы отметили, что, по всей видимости, именно из-за блокирования указанного процесса у нокаутных мышей, не способных к синтезу ERp57/GRP58, наблюдается летальность уже в период эмбрионального развития.

Считается, что участие ERp57/GRP58 в регуляции генной экспрессии может быть связано и с тем, что этот белок способен вступать в два других полибелковых комплекса, обозначаемых аббревиатурами mTORC1 и mTORC2 (от mammalian target of rapamycin), состав которых входят особая серин/треониновая протеинкиназа (Serine/threonine-protein kinase mTOR) и ряд других белков [68]. Присутствие данного фермента было обнаружено в ЭР, в ядре и в других компартментах клетки [по P42345 UniProt], что создает вполне благоприятные условия для комплексообразования с ERp57/GRP58. Установлено также, что mTORC1 и mTORC2 являются участниками ряда регуляторных процессов, ведущих в конечном счете к изменениям генной экспрессии [69, 70]. Среди других эффектов, связанных с регуляцией генной экспрессии, недавно было отмечено влияние mTORC1 на STAT3-сигналинг [70].

По результатам, представленным Grillo C. et al. (2006), ERp57/GRP58 может взаимодействовать с достаточно высокой аффинностью с белком Ref-1/APE (apurinic–apyrimidinic endonuclease/redox-

factor 1), который участвует в процессах ДНК-репарации и, кроме того, способен активировать некоторые транскрипционные факторы [71]. Позднее появились данные о том, что комплексы, содержащие Ref-1/APЕ, непосредственно связываются с молекулами ДНК, оказывая влияние на экспрессию некоторых генов и активность транскрипционных факторов [72, 73]. Надо отметить, что в числе транскрипционных факторов (и систем сигналинга), на которые оказывает влияние Ref-1/APЕ, оказались уже упоминавшиеся выше HIF-1 и участники STAT3-сигналинга.

Сообщалось также, что в ядрах лимфоцитов человека (линия Nalm6) имеется ДНК-полибелковый комплекс, белковая часть которого представлена белками В1 и В2 из группы высокой подвижности (high mobility group proteins), а также несколькими другими, включая ERp57/GRP58 (обозначавшийся авторами как ERp60) [74]. Этот комплекс обладал способностью связываться с синтетическими олигодезоксирибонуклеотидами, а в культивируемых клетках мог оказывать влияние на генную экспрессию.

Материалы, прямо свидетельствующие о достаточно специфичном связывании ERp57/GRP58 с фрагментами ДНК, опубликовали в 2007 г. Chichiarelli S. et al. [75]. Указанной группе авторов при исследовании образцов ДНК из клеток HeLa с помощью метода хроматин-иммунопреципитации удалось выделить 10 фрагментов, по которым происходило связывание ERp57/GRP58. Эти фрагменты были клонированы и секвенированы. Девять из них содержали некодирующие нуклеотидные последовательности, причём семь соответствовали интронным областям нескольких идентифицированных генов. Проведенный анализ привел авторов к заключению о том, что некоторые из обнаруженных фрагментов ДНК обладают гиперчувствительностью к ДНКазе. В целом, по их мнению, результатом взаимодействия ERp57/GRP58 с фрагментами ДНК могли стать изменения генной экспрессии двух генов, кодирующих белки, вовлеченные в ДНК-репарацию.

Эти исследования были продолжены на образцах ДНК из клеток меланомы, и полученные результаты, опубликованные в 2013 г. [62], показали, что ERp57/GRP58 способен узнавать ДНК-последовательности, как минимум, в интронах генов *MSH6*, *ETS1*, *LRBA* и в 5'-области гена *TMEM126A*, которые были расценены как гены-мишени. Подавление образования ERp57/GRP58 с помощью интерферирующих РНК сопровождалось снижением экспрессии генов-мишеней. Особое внимание авторы обратили на ген *MSH6*, кодирующий важный белок, участвующий в пострепликативной репара-

ции ДНК [P52701 UniProt]. Им удалось выявить взаимодействие фрагмента гена *MSH6*, узнаваемого ERp57/GRP58, также и с белком Ref-1/APE – ещё одним участником ДНК-репарационных систем (см. выше).

Таким образом, целый ряд косвенных и прямых экспериментальных данных, полученных к настоящему времени, служит достаточным основанием для признания у ERp57/GRP58 способности к взаимодействию с ядерной ДНК и, как результат, влияния на генную экспрессию.

Сравнительно мало известно о других функциональных свойствах ERp57/GRP58. Так, ещё в публикации 1997 г. Urade R. et al. [76] расценивали присутствие СГНС мотивов как свидетельство способности ERp57/GRP58 к протеолитической активности. Соответственно, эти авторы обозначали этот белок как ER-60 protease. В последующем такая точка зрения получила поддержку в работах других авторов [77,78]. В частности, в недавно появившейся статье Rutledge A.C. et al. (2013) [78] представили данные о том, что рассматриваемый белок участвует как цистеиновая протеиназа в деградации апоВ100, происходящей в клетках печени. Имеется также единичное сообщение о возможном наличии у ERp57/GRP58 (ER-60) человека трансглутаминазной активности, обеспечивающей образование поперечных белок-белковых сшивок [79].

Обобщая проведенный анализ литературных материалов о строении и свойствах человеческого ERp57/GRP58, надо отметить, что он является мультифункциональным белком, участвующим в важнейших внутриклеточных процессах, что делает его весьма интересным объектом для различных биомедицинских исследований.

#### **V. ERDJ5, TMX И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИД ИЗОМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА: ОБЩИЕ СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА**

В данном подразделе будут рассмотрены отдельные наиболее изученные представители подгруппы f-PDI, обозначенной выше как «белки ЭР» (ERdj5, ERp5, ERp46, ERp44), а также подгруппы трансмембранных белков. Практически все представители этих подгрупп стали известны только в XXI веке с началом периода постгеномного развития биохимии и при активном использовании соответствующих технологий. Анализ публикаций, представленных в базе данных PubMed NCBI, показал, что среди подгруппы «белков ЭР» значительное внимание было уделено ERdj5, наибольшему по Mm предста-

вителю f-PDI человека (около 25 статей). Как следствие, структурные и функциональные свойства именно этого белка, представляющего указанную подгруппу, будут охарактеризованы ниже.

Первое сообщение о ERdj5 относится к 2003 г., когда Sunneа Р.М. et al. [80] представили убедительные доказательства присутствия в ЭР клеток человека белка с Mm 91 кДа и pI 7,03, содержащего четыре функционально активных тиоредоксин-подобных домена (рис. 1), а также особый, так называемый DnaJ-домен. Этот белок авторы расценили как новый представитель протеин-дисульфидизомераз, который они обозначили символом ERdj5, исходя из особенностей его строения и внутриклеточной локализации. В частности, у ERdj5 в каждом из четырёх тиоредоксин-подобных доменов были выявлены типичные мотивы C-X-X-C, а в N-концевой последовательности определен DnaJ-домен (35–100 а.о.).

Присутствие DnaJ-домена в аминокислотной последовательности ERdj5 стало основанием для включения этого белка в качестве нового члена в известное суперсемейство DnaJ белков, где он получил название DnaJ homolog subfamily C member 10 [по Q8IXB1 UniProt]. Представители этого суперсемейства обнаружены у про- и у эукариот и активно изучаются уже не одно десятилетие, что привело к выявлению у многих таких белков свойств шаперонов [81–83].

Уже в первой работе, посвященной белку ERdj5 человека, Sunneа Р.М. et al. [80] охарактеризовали не только сам белок, но и кодирующий его ген. Этот ген был локализован на хромосоме 2 (p22.1–p23.1), в нем было выявлено 23 экзона и показано, что его транскрипция проходит с альтернативным сплайсингом. Транскрипты гена ERdj5 обнаруживались во всех исследованных органах, но наибольшее их количество регистрировалось в поджелудочной железе.

Две следующие публикации о ERdj5 человека [84,85], одну из которых представила группа Sunneа Р.М. et al. [84], были посвящены изучению ERdj5 в раковых клетках. В частности, в образцах гепатоцеллюлярной карциномы содержание ERdj5, определенное с помощью иммунохимического анализа, оказалось в три раза выше, чем в контроле, что дало основание авторам сделать заключение о перспективности использования ERdj5 в качестве иммунохимического биомаркера при диагностике гепатоцеллюлярных карцином. Кроме того, в рассматриваемой работе по результатам экспериментов с интерферирующими РНК, подавлявшими синтез ERdj5 в культивируемых клетках гепатоцеллюлярной карциномы, было показано, что этот белок может иметь отношение к обеспечению резистентности раковых клеток к некоторым химиотерапевтическим препаратам.



Параллельно Corazzari M. et al. [85] сообщили о том, что ERdj5, так же как и ERp57/GRP58, важен для обеспечения защитных реакций, развивающихся в ЭР в ответ на оксидативный стресс. При подавлении синтеза ERdj5 и ERp57/GRP58 в культивируемых раковых клетках («нокаут» с помощью интерферирующих РНК) авторы обнаружили усиление апоптоза от действия химиопрепаратов, индуцирующих оксидативный стресс. Соответственно, был сделан вывод о том, что ERdj5 и ERp57/GRP58 представляют интерес для разработок новых методов противораковой терапии, где эти белки (и/или кодирующие их гены) могут найти применение в качестве молекулярных мишеней.

Далее в 2008 г. в работе Dong M. et al. [86] при изучении постгенными технологиями молекулярных механизмов патогенеза одного из хронических заболеваний легких, вызванного мутациями в гене *SFTPC*, было установлено, что ERdj5 (а также некоторые другие белки ЭР) участвует в обеспечении нормального фолдинга (и исправлении нарушенного фолдинга) гидрофобного белка SP-C (pulmonary-associated surfactant protein C), который кодируется геном *SFTPC* и весьма важен для легочной функции. В том же году в журнале *Science* была опубликована статья Ushioda R. et al. [87], которые показали, что ERdj5 является одним из ключевых участников происходящего в ЭР процесса деградации белков с незавершенным или неправильным фолдингом (ER-associated degradation of misfolded or unassembled proteins, ERAD). По представленным данным при такой деградации (ERAD) ERdj5 функционирует в составе специального мультисубъединичного комплекса. Другим важным участником ERAD авторы определили белок, названный ER-resident chaperone BiP (синонимы: Heat shock 70 kDa protein 5, 78 kDa glucose-regulated protein, HSPA5 и др. [по P11021 UniProt]).

В серии последующих работ важная роль ERdj5 в процессе ERAD была подтверждена и детализирована, при этом удалось определить и расширить круг белков-участников ERAD [88–91].

В частности, в 2009 г. Riemer J. et al. [88] установили, что наряду с ERdj5 и BiP в процессе ERAD участвует особый флавопротеин, выявление которого началось с анализа геномной информации *in silico*. Среди участков ДНК, предварительно охарактеризованных как содержащие открытую рамку считывания, внимание авторов привлек один из таких потенциальных генов (RefSeq: NP\_079231, gene name: FOXRED2), локализованный на хромосоме 22 [по 613777 OMIM NCBI]. Из анализа его нуклеотидной последовательности следовало, что этот ген может кодировать аминокислотную последовательность, состоящую из 684 а.о., в которой присутствуют N-концевой сигналь-

ный пептид (26 а.о.), динуклеотид-связывающий домен и С-концевой мотив KEEL, характерный для растворимых белков ЭР.

С учетом этого Riemer J. et al. [88] выделили предполагаемый белок из культивируемых клеток человека, охарактеризовали его свойства (которые в принципе соответствовали расчетным), доказали, что он является флавопротеином и способен связываться с ERdj5, а также с некоторыми другими известными участниками ERAD. Этот флавопротеин был назван авторами ERFAD (ER flavoprotein associated with degradation). В настоящее время в качестве синонима используется и его другое название – FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 2 [по Q8IWF2 UniProt].

Кроме того, Riemer J. et al. [88] отметили еще несколько белков, взаимодействующих с ERdj5 и вовлеченных в ERAD, в частности, белок, обозначенный аббревиатурой SEL1L (от названия Protein sel-1 homolog 1, синоним – Suppressor of lin-12-like protein 1) [по Q9UBV2 UniProt]. SEL1L известен также, как участник системы убиквитин-зависимой деградации белков с нарушенным фолдингом. Другой изучавшийся белок OS-9 (синоним Amplified in osteosarcoma 9), являющийся лектином, по имеющимся данным способен вовлекать в ERAD негликозилированные белки с нарушенным фолдингом [по Q13438 UniProt].

Параллельно Thomas C.G. и Spyrou G. [89] провели исследование ERdj5 в клетках нейробластомы и выявили участие ERdj5 в развитии апоптоза, индуцируемого некоторыми химиотерапевтическими препаратами. Как следствие, по мнению этих авторов, ERdj5 представляет интерес в качестве потенциальной молекулярной мишени в разработках противоопухолевых препаратов.

В начале 2010 г. о позитивном вкладе ERdj5 в обеспечение контроля за фолдингом секретрируемых белков сообщили Hosoda A. et al. [90]. Данное исследование было проведено в модельных условиях, в частности, анализировались процессы ERAD в слюнных железах нокаутных лабораторных мышей. Интересно, что нокаутные по ERdj5 мыши характеризовались авторами как жизнеспособные и здоровые.

Основные результаты проведенных в первой декаде XXI века исследований по изучению компонентов ЭР (включая ERdj5), которые участвуют в выявлении белков с незавершенным или неправильным фолдингом и последующем ERAD, были обобщены в обзоре Määttänen P. et al. [91]. Этими авторами была представлена принципиальная схема ERAD, в которой они отразили взаимоотношения ERdj5, BiP, ERFAD, SEL1L и OS-9, а также ещё одного известного участника данного процесса –  $\alpha$ -маннозидаза-подобного белка ЭР (EDEM, или ER degradation enhancing alpha-mannosidase-like protein) [92].

В начале нового десятилетия Tamura T. et al. [93] сообщили, что ERdj5 не только взаимодействует с фактором EDEM1, но и участвует в его созревании. При этом оказалось, что именно взаимодействие с ERdj5 приводит к отщеплению от EDEM1 сигнального пептида и переходу этого фактора в растворимую форму. В свою очередь соотношение растворимой и мембранной форм EDEM1 оценивалось как важный показатель функционирования всей ERAD системы.

Среди публикаций 2011 г. надо отметить также работу Hagiwara M. et al. [94], которые представили результаты детального изучения структуры ERdj5 мыши. Согласно их данным, наряду с четырьмя функционально активными тиоредоксин-подобными доменами в этом белке присутствуют ещё и два неактивных (**b1** и **b2**). Однако в других работах подобные варианты структурной организации ERdj5 человека найти не удалось.

С начала 2013 г. уже появились четыре публикации, посвященные ERdj5 человека [95–98], в которых основное внимание было уделено некоторым биомедицинским аспектам изучения этого белка. Так, Diamanti E. et al. [95] при исследовании влияния на первичные культуры клеток пульпы человека 2-гидрооксиэтил метакрилата (мономера, используемого для приготовления гидрофильных полимеров, применяемых в различных биомедицинских целях) показали, что в этих условиях существенно усиливается синтез ERdj5 (а также BiP), по-видимому, из-за развития СЭР. Основной причиной СЭР считают накопление белков с незавершенным или неправильным фолдингом.

Williams J.M. et al. [96] сообщили о том, что ERdj5 и белок SellL, которому приписывают адапторную функцию, образуют комплекс, участвующий (совместно с BiP) в транспортировке каталитической субъединицы холерного токсина (CTA1). Эти данные вносят определенный вклад в современные представления о молекулярных механизмах, обеспечивающих токсическое действие CTA1. Далее, Munoz-Lobato F. et al. [97] представили результаты, полученные в модельной системе, которые указывали на вероятную вовлеченность и защитную роль ERdj5 в патогенезе некоторых нейродегенеративных заболеваний (например, болезни Альцгеймера и др.). Кроме того, Ока О.В. et al. [98] обнаружили, что ERdj5 за счет своей восстановительной активности разрушает неправильные дисульфидные связи и корректирует фолдинг рецептора липопротеинов низкой плотности – белка, играющего ключевую роль в развитии атеросклероза.

Таким образом, полученные к настоящему времени сведения о свойствах и функциях ERdj5 свидетельствуют о том, что этот представитель f-PDI вовлечен в реакции, защищающие клетки от накопления

белков с незавершенным или неправильным фолдингом. Поскольку СЭР, вызываемый накоплением таких белков, регистрируется при различных заболеваниях, дальнейшие исследования ERdj5, несомненно, представляют значительный биомедицинский интерес.

Относительно функциональных характеристик трех других представителей f-PDI человека, которые были отнесены к подгруппе «белки ЭР» (ERp5, ERp46, ERp44), также уже получена определенная информация, важная для решения различных биомедицинских задач. Например, известно, что ERp5 участвует в ряде регуляторных процессов, протекающих в тромбоцитах [99]. Кроме того, по данным отдельных авторов ERp5, находясь в составе мембран лейкоцитических клеток, выступает в качестве рецептора для так называемых тумор-ассоциированных NKG2D-лигандов и, соответственно, рассматривается как один из участников процессов злокачественной трансформации клеток при лейкозах [100, 101]. Таким образом, очевидно, что изучение ERp5 характеризуется определенной биомедицинской направленностью, и этот белок даже рассматривается как потенциальная молекулярная мишень для химиотерапевтических воздействий [100].

Переходя к рассмотрению представителей подгруппы трансмембранных белков f-PDI, надо отметить, что в открытии и на начальных этапах исследований этих белков определяющая роль принадлежала японским исследователям. Сначала в 2001 г. Matsuo Y. et al. [102] сообщили, что среди генов, которые отвечают на воздействия регуляторными белками семейства TGF- $\beta$  в клетках аденокарциномы человека (A549), имеется ген, кодирующий новый белок, состоящий из 280 а.о. Анализ аминокислотной последовательности этого белка показал наличие в нем тиоредоксин-подобного домена с мотивом Cys-Pro-Ala-Cys, что давало основание для признания изучаемого белка членом тиоредоксинового суперсемейства (Tr-sf). Кроме того, авторы отметили в его аминокислотной последовательности потенциальный трансмембранный домен (183–203 а.о.). Как следствие, выявленный новый белок был назван thioredoxin-related transmembrane protein с аббревиатурой TMX.

Параллельно в экспериментах с рекомбинантным белком TMX Matsuo Y. et al. [102] продемонстрировали наличие у него дисульфидредуктазной активности. Нозерн-блот-анализ выявил экспрессию гена, кодирующего TMX, во всех исследованных образцах тканей человека – от скелетных мышц и сердца, где регистрировались минимальные уровни, до максимальной активности в селезенке и печени. Результаты иммуноблоттинга с антителами против TMX показали,

что этот белок присутствует в основном во фракции микросом, а также отчасти в плазматических мембранах, и не определяется в препаратах ядер. Такое внутриклеточное распределение ТМХ было подтверждено и другими методами, что позволило сделать заключение о его преимущественной локализации в ЭР.

В своей следующей работе Matsuo Y. et al. (2004) [103] показали, что описанный ими ранее ТМХ обладает протеин-дисульфидизомеразной активностью и, по-видимому, выступает как регулятор белкового фолдинга.

В 2009 г. та же группа авторов представила данные о том, что в клетках человека (линий A549 и 293, выведенных из легочной аденокарциномы и эмбриональной почки, соответственно) ТМХ находится в основном в восстановленном состоянии [104]. Кроме того, было показано, что ТМХ способен взаимодействовать с кальнексином, но не с кальретикулином, а для его функционирования принципиально важным является образование гетеродисульфидной связи с молекулами тяжелых цепей (НС) главного комплекса гистосовместимости (MHC class I). Однако в отличие от ERp57/GRP58 ТМХ оказался несущественным для обеспечения правильной сборки MHC class I, но этот белок в условиях СЭР предотвращал транспорт неправильно свернутых НС из ЭР в цитоплазму и последующую их протеосомную деградацию. В итоге был сделан вывод о том, что в ЭР ТМХ выполняет специфичную функцию, связанную с контролем за нарушениями белкового фолдинга.

С учетом перечисленных свойств, включая локализацию в ЭР, Ellgaard L. и Ruddock L.W. [1] (а позднее и другие авторы, например, [3]) стали рассматривать ТМХ как член семейства f-PDI. К этому же семейству относят и ряд других белков, содержащих тиоредоксин-подобные домены и трансмембранные мотивы (ТМХ2-4) [3].

К настоящему времени признано, что ТМХ (называемый также Transmembrane Tx-related protein и ТМХ1) участвует в различных окислительно-восстановительных реакциях, связанных с обратимым окислением двух тиоловых групп, находящихся в активном центре этого белка [по Q9H3N1 UniProt]. При этом представлены достаточно полные данные (полученные на белковом уровне) о первичной структуре ТМХ, а также о его постсинтетических модификациях, среди которых фосфорилирование трех остатков серина.

Более того, недавно при изучении мембран, ассоциированных с митохондриями (которые рассматриваются как особая часть ЭР), Lynes E.M. et al. (2012) [105] показали, что имеющиеся там молекулы ТМХ ковалентно связаны с пальмитиновой кислотой. Полученные

результаты привели их к заключению о том, что это связывание осуществляется через а.о. 205С и 207С и обеспечивает правильное встраивание белка в мембраны, а также его эффективное функционирование.

Наконец, в 2013 г. была опубликована работа, свидетельствующая о том, что ТМХ выполняет защитную функцию в клетках печени при воспалительных процессах и сопровождающем их оксидативном стрессе [106].

Известно, как минимум, ещё три представителя семейства f-PDI, относящиеся к подгруппе трансмембранных белков – ТМХ2, ТМХ3 и ТМХ4 [1, 3] (в некоторых обзорах [3, 107] упоминался еще ТМХ5, однако другой информации о нем найти не удалось). По имеющимся данным указанные белки обладают протеин-дисульфидизмеразной (оксидоредуктазной) активностью и С-концевым мотивом, указывающим на локализацию в ЭР [по Q9Y320, Q96JJ7 UniProt и 108]. Сведения об их функциях пока малочисленны, и можно предполагать, что эти белки станут объектами более широких исследований в ближайшей перспективе.

## **VI. ИССЛЕДОВАНИЯ AGR2 И ERP57/GRP58 В РАКОВЫХ И ДРУГИХ АКТИВНО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

Начиная с первой декады XXI века исследования, направленные на изучение AGR2 и ERp57/GRP58 в раковых клетках человека, развернулись в целом ряде лабораторий США, стран Западной Европы, Китая, а также в России. По данной тематике опубликованы десятки статей, и высокий уровень внимания к этим белкам сохраняется в настоящее время.

Интересно, что фактически всем исследованиям человеческого AGR2 положила начало упоминавшаяся выше работа Thomson D.A. и Weigel R.J. (1998) [26], которая была выполнена именно на раковых клетках. Эти авторы при изучении культивируемых клеток рака молочной железы обнаружили коэкспрессию гена, кодирующего AGR2, и гена рецептора эстрогенов (РЭ), что дало основание для предположения о возможном участии AGR2 в патогенезе высокодифференцированного гормоно-чувствительного рака молочной железы.

Далее, в появившихся до 2005 г. (ещё единичных) сообщениях были представлены данные о присутствии AGR2 в раковых тканях молочной железы и о вовлеченности этого белка в некоторые регуляторные процессы. Так, Fletcher G.C. et al. (2003) [28], по-видимому, впервые



с помощью иммуногистохимического анализа прямо выявили белок AGR2 в раковых тканях молочной железы. Кроме того, по результатам определения соответствующих транскриптов эти авторы сделали заключение об имеющейся прямо пропорциональной корреляции между AGR2 и РЭ при обратно пропорциональной корреляции с эпидермальным фактором роста.

В 2004 г. Huber M. et al. [109] при протеомном анализе белков в клетках гормон-резистентной и гормон-чувствительной линий рака молочной железы на двумерных электрофореграммах идентифицировали AGR2. При этом было отмечено, что в гормон-резистентных клетках уровень AGR2 снижен по сравнению с гормон-чувствительными клетками. Результаты параллельно проведенного изучения транскриптов (с помощью гибридизации на ДНК-чипах) оказались сходными с данными протеомного анализа и, кроме того, подтвердили сведения о корреляции между AGR2 и РЭ. В итоге авторы сделали вывод о том, что AGR2 может быть участником внутриклеточных процессов в гормон-чувствительных клетках рака молочной железы.

Значительное усиление внимания к роли AGR2 при онкозаболеваниях началось с 2005 г. после трех первых публикаций о повышенном содержании этого белка (и/или экспрессии его гена) при раке простаты [35, 110, 111]. Так, Zhang J.S. et al. [35] сообщили, что содержание транскриптов гена *AGR2* было существенно увеличенным в большинстве обследованных ими образцов тканей с раком простаты, а также в модельной клеточной линии LNCaP. Кроме того, результаты иммунохимического определения AGR2 показали высокое содержание этого белка при раке (и при так называемой простатической интраэпителиальной неоплазии), а также в клетках LNCaP. Суммировав свои результаты, эти авторы сделали заключение о том, что AGR2 представляет интерес как потенциальный биомаркер рака простаты и возможная мишень для химиотерапевтических воздействий.

Параллельно Kristiansen G. et al. [110] сообщили о повышенной экспрессии гена *AGR2* в подавляющем большинстве проанализированных ими образцов тканей с раком простаты (89%). В том же году Smirnov D.A. et al. [111] продемонстрировали, что ген *AGR2* активно экспрессируется в циркулирующих раковых клетках у больных с метастазами при раке простаты (а также при раке молочной железы и др.) и таким образом, по их мнению, может быть биомаркером начавшегося метастазирования.

В 2006 г. Ковалев Л.И. с соавторами [112] с помощью протеомных методов (двумерного электрофореза и масс-спектрометрической

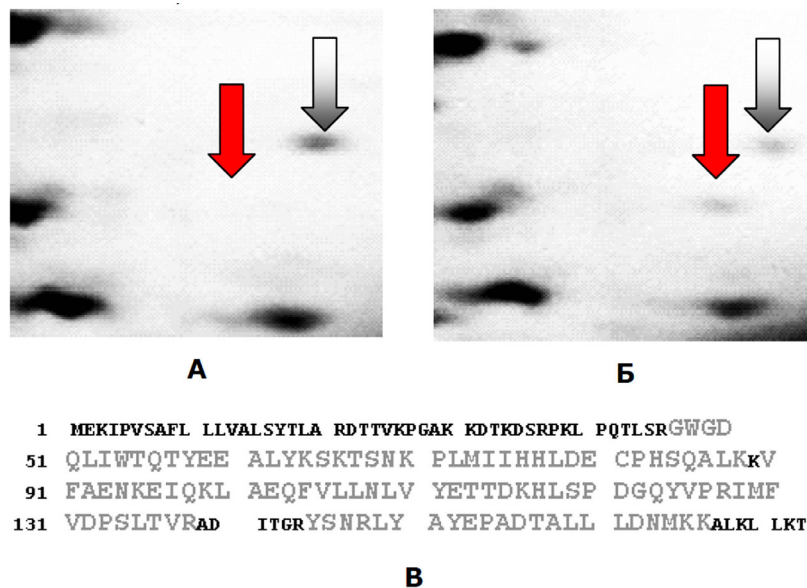


Рис. 5. Результаты протеомной идентификации белка AGR2 в образцах тканей простаты [по 112].

А – Фрагмент двумерной электрофореграммы белков из образца ткани с доброкачественной опухолью; серая стрелка указывает на реперный белок (идентифицированный как пептидилпролил цис-транс изомераза В), красная стрелка – на предполагаемое расположение белка AGR2.

Б – Подобный фрагмент двумерной электрофореграммы белков из образца раковой ткани; обозначения серой и красной стрелками такие же, как на рис. 5 А.

В – Результаты масс-спектрометрического анализа фракции, показанной красной стрелкой на рис. 5 Б. На аминокислотной последовательности белка AGR2 крупным шрифтом и более светлым цветом выделены участки последовательности, соответствующие выявленным триптическим пептидам (покрытие 64%).

идентификации) выявили AGR2 в образцах раковых опухолей простаты и отметили, что, поскольку этот белок не обнаруживался при доброкачественной гиперплазии (рис. 5), то он представляет интерес как потенциальный биомаркер злокачественных опухолей простаты.

В последующий период появилось ещё более десятка публикаций, посвященных изучению AGR2 при раке простаты, и их основные результаты практически не оставляют сомнений в том, что этот белок обладает биомаркерными свойствами в отношении указанной онкопатологии. Краткие сведения об основных работах, выполненных по указанной тематике и опубликованных в период 2007–2013 гг., суммированы в таблице.

Таблица.  
**Основные публикации 2007–2013 г.г., посвященные изучению AGR2 при раке простаты.**

Изучавшиеся биоматериалы	Основные методы	Основные результаты	Авторы
Образцы тканей. Клетки линий PC-3, PC-3M (рак простаты) и линии PNT-2 (доброкачественная гиперплазия)	Иммуногистохимия, иммуноблоттинг	Обнаружение увеличенного уровня AGR2 при раке по сравнению с нормой	Zhang Y. et al. (2007) [113]
Клетки линии LNCaP и её метастатический вариант C4-2B	Методы геной инженерии, тканевые микрочипы, анализ миграционной способности и инвазивности, иммуногистохимия	AGR2 увеличивает подвижность и инвазивность клеток при метастатическом раке, сайленсинг его гена в метастатической линии блокирует метастазирование	Zhang Y. et al. (2010) [34]
Образцы тканей и мочи. Клетки линий LNCaP, 22Rv1, PC3 и DU-145 (рак простаты) и линии VPH1 (доброкачественная гиперплазия)	Тканевые микрочипы, обратная транскрипция с последующим ПЦР-анализом, методы геной инженерии, анализ пролиферативной способности	Обнаружение увеличенного уровня AGR2 (мРНК и белка) при раке. Относительно низкий уровень AGR2 – прогностический фактор рецидива после радикальной простатэктомии	Maresch E.L. et al. (2010) [114]
Образцы тканей и мочи	ПЦР в реальном времени, иммуногистохимия	Обнаружение увеличенного уровня AGR2 при раке и ПИН по сравнению с нормой. Выявление транскриптов AGR2 в моче с существенным повышением их уровня при раке	Bu H. et al. (2011) [115]
Циркулирующие опухолевые клетки и плазма крови больных метастатическим раком простаты	Обратная транскрипция с последующим ПЦР-анализом, ИФА	Обнаружение повышенного уровня AGR2 в крови при метастатическом раке простаты, в особенности при раке с нейроэндокринным фенотипом	Kani K. et al. (2013) [116]
Андроген-зависимые клеточные линии Образцы тканей	ОТ-ПЦР, иммуноблоттинг Иммунофенотипирование	Транскрипция AGR2 стимулируется андрогенами и эстрогенами AGR2(+) опухоли ассоциированы с более долгой безрецидивной выживаемостью	Bu H. et al. (2013) [36] Ho M.E. et al. (2013) [117]

В период 2007–2013 г.г. было опубликовано также около десятка статей, в которых регистрировался повышенный уровень AGR2 в тканях и клеточных линиях первичного рака молочной железы, например, Wu Z.S. et al. (2008) [118] и Hengel S.M. et al. (2011) [119]. Имеются также данные о высоком содержании AGR2 (и/или его транскриптов) в раковых опухолях другой локализации, в частности при раке яичников [120], пищевода [121], желудка [122], поджелудочной железы [30] и легких [123].

При этом многие авторы указывали на существование связи между высоким уровнем AGR2 и повышенной подвижностью раковых клеток, например, Park K. et al. (2011) [120], а также их способностью к метастазированию, например, Barraclough D.L. et al. (2009) [124] или Patel P. et al. (2013) [51]. Надо отметить, что, по-видимому, AGR2 способствует подвижности (и диссеминации) не только раковых клеток. Так, недавно Narangama D.K. et al. (2012) сообщили об участии AGR2 в обеспечении повышенной инвазивности клеток эндометрия при эндометриозе и последующей эктопии этих клеток [125].

В целом, обобщение приведенных выше результатов, полученных десятками разных исследователей, дает основание для заключения о том, что AGR2, являясь секретлируемым белком, по-видимому, может рассматриваться как достаточно общий биомаркер аденокарцином различной локализации. При этом отдельные пилотные исследования, проведенные на ограниченных группах пациентов с онкопатологией (например, [126]), указывают на целесообразность организации клинических испытаний для обеспечения валидации AGR2 как диагностически значимого белкового маркера.

Однако требуется учитывать и то, что изменения уровня AGR2 могут происходить при ряде предраковых заболеваний. Во всяком случае, повышенный уровень AGR2 (оценивавшийся по содержанию мРНК и/или белка) наблюдался при простатической интраэпителиальной неоплазии [35,115], при интестинальной метаплазии пищевода [127] и при панкреатической интраэпителиальной неоплазии [128]. Однако при язвенном колите, считающимся факультативным предраком, уровень AGR2, который определяли по транскриптам, был понижен [33].

Указывая на возможность использования AGR2 в качестве биомаркера аденокарцином, нельзя оставить без внимания то, что этот белок выполняет важные функции в эмбриогенезе не только у ксенопусов (как отмечалось выше) но и, очевидно, у млекопитающих. По крайней мере, Gupta A. et al. (2013) [129] показали, что в процессе формирования желудка в эмбриогенезе у крыс AGR2 обеспечивает

баланс между пролиферацией и дифференцировкой клеток. Так, AGR2 способствовал дифференцировке и специализации клеток желудочного эпителия, при этом ингибируя пролиферативную активность стволовых клеток.

В заключение необходимо подчеркнуть, что в единичных публикациях сообщалось и о снижении уровня AGR2 при отдельных формах рака. В частности, Izquierdo L. et al. (2010) [130] обнаружили пониженный уровень AGR2 при уротелиальной карциноме мочевого пузыря, а Ko W.C. et al. [131] – при плоскоклеточном раке ротовой полости.

О существующем интересе к роли AGR2 при злокачественных новообразованиях можно судить и по результатам библиометрического анализа числа публикаций, представленных в базе данных PubMed NCBI. В целом из 128 работ, посвященных AGR2, 75% статей содержат сведения, полученные при изучении злокачественных опухолей и/или культивируемых раковых клеток. При этом 90% всех исследований, связанных с изучением AGR2 при раке, были опубликованы в 2005 г. и позднее. Более того, если в период 2005–2009 г.г. ежегодно по указанной тематике появлялось в печати 4–6 статей, то в 2010–2011 г.г. таких статей стало выходить по 16 в год, а в 2012 г. – уже 25.

Наряду с AGR2, считающимся необычным членом семейства f-PDI, типичная протеин-дисульфидизомераза – белок ERp57/GRP58 также пользуется значительным вниманием исследователей, изучающих особенности метаболизма в клетках злокачественных опухолей. Как отмечалось выше, ещё в середине 90-ых годов прошлого века появились сообщения, указывающие на возможную вовлеченность этого белка в онкогенную трансформацию [53]. При этом в тот же период отдельные авторы [132] указывали, что ERp57/GRP58 (ERp61 – один из синонимов) может секретироваться опухолевыми клетками в культуральную среду, хотя основное количество этого белка остается внутри клеток.

В 2002 г. Guo G.G. et al. [133] сообщили, что ERp57/GRP58 взаимодействует с некоторыми участниками так называемого STAT-сигналинга (в частности, со STAT3), который, как уже было известно, играет важную роль в злокачественной трансформации клеток (например, см. обзор Frank D.A. (1999) [134]).

Вскоре Celli C.M. и Jaiswal A.K. (2003) [135] по результатам Нозерн-блот анализа пришли к заключению, что в опухолях молочной железы, матки, легких и желудка повышено содержание транскриптов, кодирующих ERp57/GRP58, по сравнению с соответствующими

образцами нормальных тканей. В той же работе были представлены и убедительные данные об участии ERp57/GRP58 в обеспечении цитотоксического действия известного противоопухолевого препарата митомицина С. В частности, оказалось, что ERp57/GRP58, благодаря своей оксидоредуктазной активности способствует индукции митомицином С образования поперечных сшивок в молекулах ДНК.

Эти данные, свидетельствующие о вовлеченности ERp57/GRP58 в процессы канцерогенеза и в механизмы действия некоторых противоопухолевых препаратов, в последующем подтверждались и уточнялись в работах различных исследователей.

Например, Eufemi M. et al. (2004) [66] сообщили о присутствии ERp57/GRP58 в составе регуляторного комплекса STAT3–ДНК, а Adikesavan A.K. и Jaiswal A.K. (2007) [136] установили, что именно функционально-активные тиоредоксин-подобные домены ERp57/GRP58 необходимы для формирования митомицин-индуцируемых ДНК-сшивок. Основные материалы изучения ERp57/GRP58, полученные в первой декаде XXI века, были рассмотрены в обзоре Сое Н., Michalak M. et al. [57].

В 2011–2012 г.г. из печати вышло около десятка работ, расширяющих представления о роли и механизмах функционирования ERp57/GRP58 в раковых клетках. Так, Grindel B.J. et al. [137], отметив дисрегуляцию происходящей экспрессии гена, кодирующего ERp57/GRP58, показали, что при обработке клеток гепатоцеллюлярной карциномы фактором некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) происходит изменение внутриклеточного распределения ERp57/GRP58 – этот белок начинает активно транспортироваться из цитоплазмы в ядро. Liao C.J. et al. [138] продемонстрировали у ERp57/GRP58 способность модулировать инвазивность клеток рака шейки матки и предложили использовать этот белок в качестве прогностического биомаркера. В работе Garg A.D. et al. [139] ERp57/GRP58 (наряду с HSP70 и кальретикулином) изучался в раковых клетках, подвергавшихся действию так называемой фотодинамической терапии.

Наконец, в 2013 г. Elisa G. et al. [140] сообщили о том, что в клетках рака молочной железы ERp57/GRP58 участвует в каскадных процессах, запускаемых рецептором эпидермального фактора роста, роль которого в процессах канцерогенеза охарактеризована во многих экспериментальных работах и обзорах (например, Laurie S.A. и Goss G.D. [141]). Также в 2013 г. Santana-Codina N. et al. [142] после проведенного анализа белок-белковых взаимодействий в клетках рака молочной железы, включая особый остеотрофный субклон, пришли к заключению, что ERp57/GRP58 выполняет функцию своеобразного



молекулярного центра в белковой сети у раковых клеток и способствует образованию костных метастазов.

Таким образом, накопленные материалы определенно свидетельствуют о том, что ERp57/GRP58 вовлечен в процессы канцерогенеза и его свойства необходимо учитывать при изучении злокачественных опухолей, включая прогнозирование метастазирования и разработки новых химиотерапевтических средств.

В целом, очевидно, что и AGR2, и ERp57/GRP58 в ближайшей перспективе будут оставаться весьма привлекательными объектами для различных биомедицинских исследований, направленных на решение актуальных задач в молекулярной онкологии.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За сравнительно короткий период (менее двадцати лет), в течение которого активно изучаются белки человека, названные AGR2 и ERp57/GRP58, уже получены многочисленные сведения об их строении, функциях и биохимическом полиморфизме. Определяющую роль в этом сыграли транскриптомные, протеомные и другие постгеномные технологии.

Установленные свойства стали основанием для отнесения указанных белков к достаточно большому семейству протеин-дисульфидизомераз (f-PDI). Среди отличительных признаков, определяющих принадлежность к f-PDI, естественно, первое место принадлежит способности к катализу реакций образования дисульфидных связей в молекулах белков. Эти способности были выявлены и у AGR2, и у ERp57/GRP58. Присутствие в их аминокислотных последовательностях тиоредоксин-подобных доменов и особых С-концевых мотивов, характерных для белков с локализацией в эндоплазматическом ретикулуме, также признаются важными доводами для определения членства в семействе f-PDI.

К настоящему времени основные функции, выполняемые белком ERp57/GRP58 в нормальных клетках, по-видимому, уже в значительной степени охарактеризованы, тогда как роль белка AGR2 у человека в норме остается недостаточно изученной. Кроме того, о ряде других представителей семейства f-PDI пока имеется сравнительно мало информации, и это оставляет достаточно широкое поле для дальнейших исследований.

Результаты изучения AGR2 (небольшого по размерам белка, имеющего единственный тиоредоксин-подобный домен с особым каталитическим мотивом) дают основания считать его необычным

представителем семейства f-PDI. В отличие от него, ERp57/GRP58 обладает свойствами типичной протеин-дисульфидизомеразы. Вместе с тем, оба рассматриваемых белка оказались участниками процессов канцерогенеза, что привлекло и продолжает привлекать к ним внимание многих исследователей в разных странах.

Среди материалов, накопленных при изучении AGR2 и ERp57/GRP58 в образцах злокачественных опухолей и в культивируемых раковых клетках, особо выделяются данные, указывающие на то, что эти белки обладают биомаркерными свойствами. Как следствие, можно считать, что уже сложились вполне определенные предпосылки для начала работ по валидации AGR2 и ERp57/GRP58, и в случае успеха они смогут найти применение в диагностике онкозаболеваний. Имеются и другие перспективы для продолжения биомедицинских исследований белков AGR2 и ERp57/GRP58, связанные, в частности, с разработками в области химиотерапии.

В целом, можно надеяться, что дальнейшее изучение различных представителей семейства f-PDI с привлечением постгеномных технологий расширит современные представления о функциях этих белков в организме человека, что, в свою очередь, будет способствовать решению актуальных биомедицинских задач.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ellgaard, L., Ruddock, L.W. (2005) EMBO Rep., **6**, 28-32.
2. Feige, M.J., Hendershot, L.M. (2011) Curr. Opin. Cell Biol., **23**, 167-175.
3. Andreu, C.I., Woehlbier, U., Torres, M., Hetz, C. (2012) FEBS Lett., **586**, 2826-2834.
4. Laurindo, F.R., Pescatore, L.A., Fernandes, Dde C. (2012) Free Radic. Biol. Med., **52**, 1954-1969.
5. Brychtova, V., Vojtesek, B., Hrstka, R. (2011) Cancer Lett., **304**, 1-7.
6. Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., Chichiarelli, S. (2011) Cell Mol. Biol. Lett., **16**, 539-563.
7. Salmans, M.L., Zhao, F., Andersen, B. (2013) Breast Cancer Res., **15**, 204. [Epub ahead of print] 23635006 [PubMed – as supplied by publisher]
8. Verma, S., Salmans, M.L., Geyfman, M., Wang, H., Yu, Z., Lu Z, Zhao, F., Lipkin, S.M., Andersen, B. (2012) Dev. Biol., **369**, 249-260.
9. Gray, T.A., MacLaine, N.J., Michie, C.O., Bouchalova, P., Murray, E., Howie, J., Hrstka, R., Maslon, M.M., Nenutil, R., Vojtesek, B., Langdon, S., Hayward, L., Gourley, C., Hupp, T.R. (2012) J. Immunol. Methods. **378**, 20-32.
10. Zhang, D., Richardson, D.R. (2011) Int. J. Biochem. Cell. Biol., **43**, 33-36.
11. Benham, A.M. (2012) Antioxid. Redox. Signal., **16**, 781-789.
12. Imaoka, S. (2011) Int. Rev. Cell. Mol. Biol., **290**, 121-166.
13. Carvalho, A.P., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2006) Prog. Biophys. Mol. Biol., **91**, 229-248.

14. Pan, J.L., Bardwell, J.C. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 2217–227.
15. Gulerez, I.E., Kozlov, G., Rosenauer, A., Gehring, K. (2012) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**, 378–381.
16. Watson, W.H., Yang, X., Choi, Y.E., Jones, D.P., Kehrer, J.P. (2004) *Toxicol. Sci.*, **78**, 3–14.
17. Myers, C.R., Myers, J.M., Kufahl, T.D., Forbes, R., Szadkowski, A. (2011) *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 1361–1374.
18. Lumb, R.A., Bulleid, N.J. (2002) *EMBO J.*, **21**, 6763–6770.
19. Schwaller, M., Wilkinson, B., Gilbert, H.F. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 7154–7159.
20. Alanen, H.I., Williamson, R.A., Howard, M.J., Hatahet, F.S., Salo, K.E., Kauppila, A., Kellokumpu, S., Ruddock, L.W. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33727–33738.
21. Anelli, T., Alessio, M., Mezghrani, A., Simmen, T., Talamo, F., Bachi, A., Sitia, R. (2002) *EMBO J.*, **21**, 835–844.
22. Persson, S., Rosenquist, M., Knoblach, B., Khosravi-Far, R., Sommarin, M., Michalak, M. (2005) *Mol. Phylogenet. Evol.*, **36**, 734–740.
23. Park, S.W., Zhen, G., Verhaeghe, C., Nakagami, Y., Nguyenvu, L.T., Barczak, A.J., Killeen, N., Erle, D.J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**, 6950–6955.
24. Gupta, A., Dong, A., Lowe, A.W. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 4773–4782.
25. Aberger, F., Weidinger, G., Grunz, H., Richter, K. (1998) *Mech. Dev.*, **72**, 115–130.
26. Thompson, D.A., Weigel, R.J. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.*, **251**, 111–116.
27. Petek, E., Windpassinger, C., Egger, H., Kroisel, P.M., Wagner, K. (2000) *Cytogenet. Cell. Genet.*, **89**, 141–142.
28. Fletcher, G.C., Patel, S., Tyson, K., Adam, P.J., Schenker, M., Loader, J.A., Daviet, L., Legrain, P., Parekh, R., Harris, A.L., Terrett, J.A. (2003) *Br. J. Cancer*, **88**, 579–585.
29. Zhang, Z., Henzel, W.J. (2004) *Protein Sci.*, **13**, 2819–2824.
30. Ramachandran, V., Arumugam, T., Wang, H., Logsdon, C.D. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 7811–7818.
31. Chung, K., Nishiyama, N., Yamano, S., Komatsu, H., Hanada, S., Wei, M., Wanibuchi, H., Suehiro, S., Kakehashi, A. (2011–2012) *Cancer Biomark.*, **10**, 101–107.
32. Wayner, E.A., Quek, S.I., Ahmad, R., Ho, M.E., Loprieno, M.A., Zhou, Y., Ellis, W.J., True, L.D., Liu, A.Y. (2012) *Prostate*, **72**, 1023–1034.
33. Zheng, W., Rosenstiel, P., Huse, K., Sina, C., Valentonyte, R., Mah, N., Zeitlmann, L., Grosse, J., Ruf, N., Nürnberg, P., Costello, C.M., Onnie, C., Mathew, C., Platzer, M., Schreiber, S., Hampe, J. (2006) *Genes Immun.*, **7**, 11–18.
34. Zhang, Y., Ali, T.Z., Zhou, H., D'Souza, D.R., Lu, Y., Jaffe, J., Liu, Z., Passaniti, A., Hamburger, A.W. (2010) *Cancer Res.*, **70**, 240–248.
35. Zhang, J.S., Gong, A., Chevillat, J.C., Smith, D.I., Young, C.Y. (2005) *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 249–259.
36. Bu, H., Schweiger, M.R., Manke, T., Wunderlich, A., Timmermann, B., Kerick, M., Pasqualini, L., Shehu, E., Fuchsberger, C., Cato, A.C., Klocker, H. (2013) *FEBS J.*, **280**, 1249–1266.
37. Vanderlaag, K.E., Hudak, S., Bald, L., Fayadat-Dilman, L., Sathe, M., Grein, J., Janatpour, M.J. (2010) *Breast Cancer Res.*, **12**(3):R32. doi: 10.1186/bcr2586.
38. Ambolet-Camoit, A., Buim L.C., Pierre, S., Chevallier, A., Marchand, A., Coumoul, X., Garlatti, M., Andreau, K., Barouki, R., Aggerbeck, M. (2010) *Toxicol. Sci.*, **115**, 501–512.

39. Hong, X.Y., Wang, J., Li, Z. (2013) *Cell. Biochem. Biophys.*, May 28. [Epub ahead of print] PMID: 23712868
40. Lu, X., Kang, Y. (2010) *Clin. Cancer Res.*, **16**, 5928–5935.
41. Gardner, L.B., Corn, P.G. (2008) *Cell Cycle*, **7**, 1916–1924.
42. Wang, Z., Hao, Y., Lowe, A.W. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 492–497.
43. Pohler, E., Craig, A.L., Cotton, J., Lawrie, L., Dillon, J.F., Ross, P., Kernohan, N., Hupp, T.R. (2004) *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 534–547.
44. Murray, E., McKenna, E.O., Burch, L.R., Dillon, J., Langridge-Smith, P., Kolch, W., Pitt, A., Hupp, T.R. (2007) *Biochemistry*, **46**, 13742–13751.
45. Wu, J., Wang, C., Li, X., Song, Y., Wang, W., Li, C., Hu, J., Zhu, Z., Li, J., Zhang, W., Lu, Z., Yang, C.J. (2012) *PLoS One*, **7**(9):e46393. doi: 10.1371/journal.pone.0046393.
46. Norris, A.M., Gore, A., Balboni, A., Young, A., Longnecker, D.S., Korc, M. (2012) *Oncogene*, Sep 3. doi: 10.1038/onc.2012.394.
47. Maslon, M.M., Hrstka, R., Vojtesek, B., Hupp, T.R. (2010) *J. Mol. Biol.*, **404**, 418–438.
48. Yu H, Zhao J, Lin L, Zhang Y, Zhong F, Liu Y, Yu Y, Shen H, Han M, He F, Yang P. Proteomic study explores AGR2 as pro-metastatic protein in HCC. *Mol Biosyst.* 2012 Oct;8(10):2710-8.
49. Ryu, J., Park, S.G., Lee, P.Y., Cho, S., Lee, do H., Kim, G.H., Kim, J.H., Park, B.C. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 610–615.
50. Kaser, Am, Adolph, T.E., Blumberg, R.S. (2013) *Semin. Immunopathol.*, **35**, 307–319.
51. Patel, P., Clarke, C., Barraclough, D.L., Jowitt, T.A., Rudland, P.S., Barraclough, R., Lian, L.Y. (2013) *J. Mol. Biol.*, **425**, 929–943.
52. Gray, T.A., Murray, E., Nowicki, M.W., Remnant, L., Scherl, A., Muller, P., Vojtesek, B., Hupp, T.R. (2013) *Protein Sci.*, Jun 18. doi: 10.1002/pro.2299. [Epub ahead of print]
53. Hirano, N., Shibasaki, F., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T., Hirai, H. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **234**, 336–342.
54. Bourdi, M., Demady, D., Martin, J.L., Jabbour, S.K., Martin, B.M., George, J.W., Pohl, L.R. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**, 397–403.
55. Alanen, H.I., Salo, K.E., Pekkala, M., Siekkinen, H.M., Pirneskoski, A., Ruddock, L.W. (2003) *Antioxid. Redox. Signal.*, **5**, 367–374.
56. Russell, S.J., Ruddock, L.W., Salo, K.E., Oliver, J.D., Roebuck, Q.P., Llewellyn, D.H., Roderick, H.L., Koivunen, P., Myllyharju, J., High, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18861–18869.
57. Coe, H., Michalak, M. (2010) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **42**, 796–799.
58. Frickel, E.M., Frei, P., Bouvier, M., Stafford, W.F., Helenius, A., Glockshuber, R., Ellgaard, L. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18277–18287.
59. Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M., Hämmerling, G.J. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2186–2195.
60. Dong, G., Wearsch, P.A., Peaper, D.R., Cresswell, P., Reinisch, K.M. (2009) *Immunity*, **30**, 21–32.
61. Boyle, L.H., Hermann, C., Boname, J.M., Porter, K.M., Patel, P.A., Burr, M.L., Duncan, L.M., Harbour, M.E., Rhodes, D.A., Skjodt, K., Lehner, P.J., Trowsdale, J. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3465–3470.
62. Aureli, C., Gaucchi, E., Arcangeli, V., Grillo, C., Eufemi, M., Chichiarelli, S. (2013) *Gene*. **524**, 390–395.
63. Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A., Chichiarelli, S., Eufemi, M., Turano, C. (2002) *J. Cell. Biochem.*, **85**, 325–333.

64. Grillo, C., Coppari, S., Turano, C., Altieri, F. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 67–73.
65. Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A. (2002) *J. Cell. Physiol.*, **193**, 154–163.
66. Eufemi, M., Coppari, S., Altieri, F., Grillo, C., Ferraro, A., Turano, C. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 1306–1312.
67. Yang, J., Stark, G.R. (2008) *Cell Res.*, **18**, 443–451.
68. Ramirez-Rangel, I., Bracho-Valdes, I., Vazquez-Macias, A., Carretero-Ortega, J., Reyes-Cruz, G., Vazquez-Prado, J. (2011) *Mol Cell Biol.* Apr;31(8):1657-16571.
69. Topisirovic, I., Sonenberg, N. (2011) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **76**, 355–367.
70. Laplante, M., Sabatini, D.M. (2013) *J. Cell. Sci.* **126**, 1713–1719.
71. Grillo, C., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Maceroni, M., Merluzzi, S., Turano, C., Altieri, F. (2006) *Free Radic Biol. Med.*, **41**, 1113–1123.
72. Bhakat, K.K., Mantha, A.K., Mitra, S. (2009) *Antioxid. Redox. Signal.*, **11**, 621–638.
73. Cardoso, A.A., Jiang, Y., Luo, M., Reed, A.M., Shahda, S., He, Y., Maitra, A., Kelley, M.R., Fishel, M.L. (2012) *PLoS One*, **7**(10):e47462. doi: 10.1371/journal.pone.0047462.
74. Krynetski, E.Y., Krynetskaia, N.F., Bianchi, M.E., Evans, W.E. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 100–106.
75. Chichiarelli, S., Ferraro, A., Altieri, F., Eufemi, M., Coppari, S., Grillo, C., Arcangeli, V., Turano, C. (2007) *J. Cell. Physiol.*, **210**, 343–351.
76. Urade, R., Oda, T., Ito, H., Moriyama, T., Utsumi, S., Kito, M. (1997) *J. Biochem.*, **122**, 834–842.
77. Okudo, H., Urade, R., Moriyama, T., Kito, M. (2000) *FEBS Lett.*, **465**, 145–147.
78. Rutledge, A.C., Zhang, R., Urade, R., Adeli, K. (2013) *Arch. Biochem. Biophys.*, Jul 1. pii: S0003-9861(13)00183-5. doi: 10.1016/j.abb.2013.06.013.
79. Okudo, H., Kito, M., Moriyama, T., Ogawa, T., Urade, R. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1423–1426.
80. Cunnea, P.M., Miranda-Vizuete, A., Bertoli, G., Simmen, T., Dandimopoulos, A.E., Hermann, S., Leinonen, S., Huikko, M.P., Gustafsson, J.A., Sitia, R., Spyrou, G. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1059–1066.
81. Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D., Lithgow, T. (2004) *EMBO Rep.*, **5**, 567–571.
82. Sterrenberg, J.N., Blatch, G.L., Edkins, A.L. (2011) *Cancer Lett.*, **312**, 129–142.
83. Cheong, K., Choi, J., Choi, J., Park, J., Jang, S., Lee, Y.H. (2013) *Genomics Inform.*, **11**, 52–54.
84. Cunnea, P., Fernandes, A.P., Capitano, A., Eken, S., Spyrou, G., Bjornstedt, M. (2007) *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **20**, 17–24.
85. Corazzari, M., Lovat, P.E., Armstrong, J.L., Fimia, G.M., Hill, D.S., Birch-Machin, M., Redfern, C.P., Piacentini, M. (2007) *Br. J. Cancer*, **96**, 1062–1071.
86. Dong, M., Bridges, J.P., Apsley, K., Xu, Y., Weaver, T.E. (2008) *Mol. Biol. Cell.*, **19**, 2620–2630.
87. Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y., Nagata, K. (2008) *Science*, **321**, 569–572.
88. Riemer, J., Appenzeller-Herzog, C., Johansson, L., Bodenmiller, B., Hartmann-Petersen, R., Ellgaard, L. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14831–14836.
89. Thomas, C.G., Spyrou, G. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 6282–6290.
90. Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., Iwawaki, T. (2010) *Biochem. J.*, **425**, 117–125.



91. Määttänen, P., Gehring, K., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. (2010) *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **21**, 500–511.
92. Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K. (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 415–422.
93. Tamura, T., Cormier, J.H., Hebert, D.N. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 24906–24915.
94. Hagiwara, M., Maegawa, K., Suzuki, M., Ushioda, R., Araki, K., Matsumoto, Y., Hoseki, J., Nagata, K., Inaba, K. (2011) *Mol. Cell.*, **41**, 432–444.
95. Diamanti, E., Mathieu, S., Jeanneau, C., Kitraki, E., Panopoulos, P., Spyrou, G., About, I. (2013) *Int. Endod J.*, **46**, 160–168.
96. Williams, J.M., Inoue, T., Banks, L., Tsai, B. (2013) *Mol. Biol. Cell.*, **24**, 785–795.
97. Munoz-Lobato, F., Rodriguez-Palero, M.J., Naranjo-Galindo, F.J., Shephard, F., Gaffney, C.J., Szezyk, N.J., Hamamichi, S., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Link, C.D., Miranda-Vizuete, A. (2013) *Antioxid. Redox. Signal.*, Jul 3. [Epub ahead of print] PMID: 23641861
98. Oka, O.B., Pringle, M.A., Schopp, I.M., Braakman, I., Bulleid, N.J. (2013) *Mol. Cell.*, **50**, 793–804.
99. Jordan, P.A., Stevens, J.M., Hubbard, G.P., Barrett, N.E., Sage, T., Authi, K.S., Gibbins, J.M. (2005) *Blood*, **105**, 1500–1507.
100. Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.T., Gonzalez S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., Spies, T. (2007) *Nature*, **447**, 482–486.
101. Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A.P., Contesti, J., Gonzalez, E., López-Soto, A., Fernandez-Guizan, A., Acebes-Huerta, A., de Los Toyos, J.R., Lopez-Larrea, C., Groh, V., Spies, T., Gonzalez, S. (2012) *Cancer Immunol. Immunother.*, **61**, 1201–1210.
102. Matsuo, Y., Akiyama, N., Nakamura, H., Yodoi, J., Noda, M., Kizaka-Kondoh, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 10032–10038.
103. Matsuo, Y., Nishinaka, Y., Suzuki, S., Kojima, M., Kizaka-Kondoh, S., Kondo, N., Son, A., Sakakura-Nishiyama, J., Yamaguchi, Y., Masutani, H., Ishii, Y., Yodoi, J. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**, 81–87.
104. Matsuo, Y., Masutani, H., Son, A., Kizaka-Kondoh, S., Yodoi, J. (2009) *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 4552–4562.
105. Lynes, E.M., Bui, M., Yap, M.C., Benson, M.D., Schneider, B., Ellgaard, L., Berthiaume, L.G., Simmen, T. (2012) *EMBO J.*, **31**, 457–470.
106. Matsuo, Y., Irie, K., Kiyonari, H., Okuyama, H., Nakamura, H., Son, A., Lopez-Ramos, D.A., Tian, H., Oka, S., Okawa, K., Kizaka-Kondoh, S., Masutani, H., Yodoi, J. (2013) *Antioxid. Redox. Signal.*, **18**, 1263–1272.
107. Kozlov, G., Määttänen, P., Thomas, D.Y., Gehring, K. (2010) *FEBS J.*, **277**, 3924–3936.
108. Roth, D., Lynes, E., Riemer, J., Hansen, H.G., Althaus, N., Simmen, T., Ellgaard, L. (2009) *Biochem. J.*, **425**, 195–205.
109. Huber, M., Bahr, I., Krätzschmar, J.R., Becker, A., Müller, E.C., Donner, P., Pohlenz, H.D., Schneider, M.R., Sommer, A. (2004) *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 43–55.
110. Kristiansen, G., Pilarsky, C., Wissmann, C., Kaiser, S., Bruemmen-dorf, T., Roepcke, S., Dahl, E., Hinzmänn, B., Specht, T., Pervan, J., Stephan, C., Loening, S., Dietel, M., Rosenthal, A. (2005) *J. Pathol.*, **205**, 359–376.
111. Smirnov, D.A., Zweitzig, D.R., Foulk, B.W., Miller, M.C., Doyle, G.V., Pienta, K.J., Meropol, N.J., Weiner, L.M., Cohen, S.J., Moreno,



- J.G., Connelly, M.C., Terstappen, L.W., O'Hara, S.M.* (2005) *Cancer Res.*, **65**, 4993–4997.
112. *Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Хасигов П.З., Дзеранов Н.К., Казаченко А.В., Ковалева М.А., Торопыгин И.Ю., Мамыкина С.В.* (2006) *Приклад биохимия и микробиол.*, **42**, 480–484.
113. *Zhang, Y., Forootan, S.S., Liu, D., Barraclough, R., Foster, C.S., Rudland, P.S., Ke, Y.* (2007) *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **10**, 293–300.
114. *Maresh, E.L., Mah, V., Alavi, M., Horvath, S., Bagryanova, L., Liebeskind, E.S., Knutzen, L.A., Zhou, Y., Chia, D., Liu, A.Y., Goodglick, L.* (2010) *BMC Cancer*, **10**, Dec 13;10:680. doi: 10.1186/1471-2407-10-680.
115. *Bu, H., Bormann, S., Schäfer, G., Horninger, W., Massoner, P., Neeb, A., Lakshmanan, V.K., Maddalo, D., Nestl, A., Sultmann, H., Cato, A.C., Klocker, H.* (2011) *Prostate*, **71**, 575–587.
116. *Kani, K., Malihi, P.D., Jiang, Y., Wang, H., Wang, Y., Ruderman, D.L., Agus, D.B., Mallick, P., Gross, M.E.* (2013) *Prostate*, **73**, 306–315.
117. *Ho, M.E., Quek, S.I., True, L.D., Morrissey, C., Corey, E., Vessella, R.L., Dumpit, R., Nelson, P.S., Maresh, E.L., Mah, V., Alavi, M., Kim, S.R., Bagryanova, L., Horvath, S., Chia, D., Goodglick, L., Liu, A.Y.* (2013) *Mod. Pathol.*, **26**, 849–859.
118. *Wu, Z.S., Wu, Q., Ding, X.D., Wang, H.Q., Shen, Y.X., Fang, S.Y.* (2008) *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, **37**, 109–113. (PMID:18681322).
119. *Hengel, S.M., Murray, E., Langdon, S., Hayward, L., O'Donoghue, J., Panchaud, A., Hupp, T., Goodlett, D.R.* (2011) *J. Proteome Res.*, **10**, 4567–4578.
120. *Park, K., Chung, Y.J., So, H., Kim, K., Park, J., Oh, M., Jo, M., Choi, K., Lee, E.J., Choi, Y.L., Song, S.Y., Bae, D.S., Kim, B.G., Lee, J.H.* (2011) *Exp. Mol. Med.*, **43**, 91–100.
121. *DiMaio, M.A., Kwok, S., Montgomery, K.D., Lowe, A.W., Pai, R.K.* (2012) *Hum. Pathol.*, **43**, 1799–1807.
122. *Lee, do H., Lee, Y., Ryu, J., Park, S.G., Cho, S., Lee, J.J., Choi, C., Park, B.C.* (2011) *Mol. Cells.*, **31**, 563–571.
123. *Chung, K., Nishiyama, N., Wani-buchi, H., Yamano, S., Hanada, S., Wei, M., Suehiro, S., Kakehashi, A.* (2012) *Osaka City Med. J.*, **58**, 13–24.
124. *Barraclough, D.L., Platt-Higgins, A., de Silva Rudland, S., Barraclough, R., Winstanley, J., West, C.R., Rudland, P.S.* (2009) *Am. J. Pathol.*, **175**, 1848–1857.
125. *Hapangama, D.K., Raju, R.S., Valentijn, A.J., Barraclough, D., Hart, A., Turner, M.A., Platt-Higgins, A., Barraclough, R., Rudland, P.S.* (2012) *Hum. Reprod.*, **27**, 394–407.
126. *Шишкин С.С., Дзеранов Н.К., Топров К.И., Казаченко А.В., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Ковалева М.А., Торопыгин И.Ю.* (2009) *Урология*, №1, 56–58.
127. *Pizzi, M., Fassan, M., Realdon, S., Balistreri, M., Battaglia, G., Giacometti, C., Zaninotto, G., Zagonel, V., De Boni, M., Rugge, M.* (2012) *Hum. Pathol.*, **43**, 1839–1844.
128. *Chen, R., Pan, S., Duan, X., Nelson, B.H., Sahota, R.A., de Rham, S., Kozarek, R.A., McIntosh, M., Brentnall, T.A.* (2010) *Mol. Cancer*, **9**, 149. doi: 10.1186/1476-4598-9-149.
129. *Gupta, A., Wodziak, D., Tun, M., Bouley, D.M., Lowe, A.W.* (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 4321–4333.
130. *Izquierdo, L., Mengual, L., Gazquez, C., Ingelmo-Torres, M., Alcaraz, A.* (2010) *BJU Int.*, **106**, 868–872.
131. *Ko, W.C., Sugahara, K., Sakuma, T., Yen, C.Y., Liu, S.Y., Liaw, G.A.,*

- Shibahara, T.* (2012) *Oncol. Lett.*, **3**, 75–81.
132. *Kozaki, K., Miyaishi, O., Asai, N., Iida, K., Sakata, K., Hayashi, M., Nishida, T., Matsuyama, M., Shimizu, S., Kaneda, T., Saga S.* (1994) *Exp. Cell. Res.*, **213**, 348–358.
133. *Guo, G.G., Patel, K., Kumar, V., Shah, M., Fried, V.A., Etlinger, J.D., Sehgal, P.B.* (2002) *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**, 555–563.
134. *Frank D.A.* (1999) *Mol. Med.*, **5**, 432–456.
135. *Celli, C.M., Jaiswal, A.K.* (2003) *Cancer Res.*, **63**, 6016–6025.
136. *Adikesavan, A.K., Jaiswal, A.K.* (2007) *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 2719–2727.
137. *Grindel, B.J., Rohe, B., Safford, S.E., Bennett, J.J., Farach-Carson, M.C.* (2011) *J. Cell. Biochem.*, **112**, 2606–2615.
138. *Liao, C.J., Wu, T.I., Huang, Y.H., Chang, T.C., Wang, C.S., Tsai, M.M., Lai, C.H., Liang, Y., Jung, S.M., Lin, K.H.* (2011) *Cancer Sci.*, **102**, 2255–2263.
139. *Garg, A.D., Krysko, D.V., Vandena-beele, P., Agostinis, P.* (2012) *Cancer Immunol. Immunother.*, **61**, 215–221.
140. *Elisa, G., Fabio, A., Turano, C., Silvia, C.* (2013) *J Cell Biochem.* 2013 May 20. doi: 10.1002/jcb.24590. [Epub ahead of print] PMID: 23696074
141. *Laurie, S.A., Goss, G.D.* (2013) *J. Clin. Oncol.*, **31**, 1061–1069.
142. *Santana-Codina, N., Carretero, R., Sanz-Pamplona, R., Cabrera, T., Guney, E., Oliva, B., Clezardin, P., Olarte, O.E., Loza-Alvarez, P., Méndez-Lucas, A., Perales, J.C., Sierra, A.* (2013) *Mol Cell Proteomics.* 2013 Apr 26. [Epub ahead of print] PMID: 23625662.