

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Епремян Хорен Хачатурович

**ПЕРВЫЕ МОДЕЛИ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ БЕЛОК ВИРУСА ГЕПАТИТА В НВХ И
АМИЛОИД АВ42: ИЗМЕНЕНИЯ В МОРФОЛОГИИ И ФУНКЦИЯХ
МИТОХОНДРИЙ**

Специальность 1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Научные руководители:

д.б.н., профессор Звягильская Р.А.

к.б.н. Зиновкин Р.А.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Роль митохондрий и активных форм кислорода в норме и патологии.....	10
1.1.1. Митохондрии. Значение при нормальной физиологии.....	10
1.1.2. Митохондриальная дисфункция.....	13
1.1.3. АФК: функции в клетке и организме.....	14
1.1.4. Влияние АФК на патофизиологические процессы.....	17
1.1.5. Митохондриально-направленные соединения.....	18
1.2. Гепатоцеллюлярная карцинома.....	19
1.2.1. Общие сведения.....	19
1.2.2. Роль НВх при развитии ГЦК.....	20
1.2.3. Модели для изучения внутриклеточных эффектов НВх.....	25
1.2.4. Необходимость упрощения моделей.....	27
1.3. Болезнь Альцгеймера.....	28
1.3.1. Общие сведения	28
1.3.2. Роль А β 42 и Тау-белка при развитии БА.....	30
1.3.3. Роль митохондрий при развитии БА, гипотеза митохондриального каскада.....	34
1.3.4. Модельные системы для изучения БА.....	35
1.3.5. Необходимость упрощения моделей.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46

2.1. Реагенты	46
2.2. Модельные организмы	47
2.3. Аналитические методы.....	49
2.4. Статистический анализ.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	54
3.1. Создание и первичная характеристика дрожжевых моделей, экспрессирующих НВх и Аβ42.....	54
3.2. Морфология митохондрий дрожжевых клеток экспрессирующих НВх.	57
3.3. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжевых клеток экспрессирующих НВх.....	59
3.4. Функциональные свойства митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, экспрессирующих НВх.	62
3.5. Морфология митохондрий дрожжевых клеток экспрессирующих Аβ42.....	68
3.6. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжевых клеток экспрессирующих Аβ42.....	70
3.7. Функциональные свойства митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, экспрессирующих Аβ42.....	72
ВЫВОДЫ	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	80

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода;
- ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома;
- БА – болезнь Альцгеймера;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- APP – белок предшественник бета-амилоида;
- МАРТ – microtubule-associated protein tau;
- PSEN1, PSEN2 – пресенилин 1 и 2;
- TNF- α – фактор некроза опухолей α ;
- мТАФК – митохондриальные активные формы кислорода;
- мтДНК – митохондриальная ДНК;
- NFT – нейрофибриллярные клубки;
- HBV – вирус гепатита В;
- TGF- β – трансформирующий ростовой фактор бета;
- Трис – трис(гидроксиметил)аминометан;
- DTT – dithiothreitol;
- АТФ – adenosine triphosphate;
- АДП – adenosine diphosphate;
- BSA – bovine serum albumin;
- GFP – green fluorescent protein;
- DHE – dehydroethidium;
- ОП – оптическая плотность;
- SIM – structured-illumination microscopy;
- КЦХФ – карбонил цианид хлорфенилгидразон;
- ДК – дыхательный контроль;
- ДК_{Ch1}, ДК_{Ch2} – дыхательный контроль по Чансу-1 и по Чансу-2;
- SkQThy – 10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинолил-6)-децил (трифенил)фосфоний бромид;
- t*-ВНР – *терт*-бутилгидропероксид

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень разработанности. Митохондрии принимают участие в большинстве биохимических процессов клетки. Кроме своей основной энергетической функции, они являются ключевым звеном множества сигнальных путей, процессов пролиферации, общего обмена, апоптоза, воспаления и многих других. Высокий уровень интеграции митохондрий в жизненные процессы клетки позволяет сделать предположение об их вовлеченности и в патологические процессы. Действительно, в последние годы накопилось множество данных о ключевой роли митохондриального окислительного стресса в развитии онкологических, нейродегенеративных и ряда других социально-значимых заболеваний. И, хотя триггером патологии могут выступать структурные элементы онкогенных вирусов, амилоидные белки и другие соединения, эти заболевания на определенных этапах патогенеза развиваются по схожим путям: избыточная продукция активных форм кислорода (АФК) вследствие дисфункции митохондрий становится основным источником массивных повреждений редокс-чувствительных компонентов клетки (нуклеиновые кислоты, липиды, белки и др.), т.е. приводит к развитию генерализованного окислительного стресса, что становится основой для следующих этапов патогенеза.

Нейродегенерация и канцерогенез – это сложнейшие комплексные патологии, а многообразие и взаимозависимость процессов, связанных с митохондриями, создает серьезную преграду для верификации первичности митохондриальной патологии в развитии этих заболеваний. Следовательно, для изучения влияния митохондриальной дисфункции требуются упрощенные модели, позволяющие определить морфологические и биоэнергетические изменения в клетках под воздействием предполагаемых стимулов отдельно от факторов (хроническое воспаление, иммунный ответ и т.д.), вызывающих окислительный стресс, как вторичный процесс. В связи с этим в качестве модельного организма использовали дрожжи аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*. Эти дрожжи как нельзя лучше подходят для такого рода исследований.

Они нетоксичны, являются облигатными аэробами, растут с высокой скоростью на разнообразных средах простого состава, их геном полностью секвенирован, структура дыхательной цепи этих дрожжей во многом сходна с таковой млекопитающих, что делает их репрезентативной моделью для изучения морфологии и динамики митохондрий.

В качестве объектов исследования были выбраны белок НВх вируса гепатита В, связанный с развитием гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и его усеченная по С-концу форма НВх120, а также амилоиды А β 42 и А β 40, маркеры болезни Альцгеймера (БА).

Изучение биоэнергетических показателей в упрощенных клеточных моделях, экспрессирующих вышеуказанные белки, позволит проверить выявить конкретные молекулярные механизмы их воздействия на митохондрии. В совокупности с уже накопленными знаниями, это прольет свет на роль митохондрий в развитии ГЦК и БА, что поможет в поиске новых терапевтических подходов, учитывающих митохондриальный компонент патогенеза этих социально-значимых заболеваний, а также подкрепит фундаментальную основу для поиска аналогичных подходов в отношении других онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

Цели исследования: изучить патологическое воздействие белка НВх и пептида А β 42 на митохондрии и биоэнергетические параметры клеток в упрощенной дрожжевой модели; определить возможность предотвращения этих процессов с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов. В соответствии с этой целью были поставлены следующие **задачи исследования**

- 1) Разработка и создание моделей гетерологической экспрессии белка НВх и пептида А β 42 на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica*.
- 2) Исследование морфологии митохондрий в дрожжах *Y. lipolytica*, экспрессирующих НВх и А β 42, а также конструкции, несущие целевые белки, слиты с зеленым флуоресцентным белком.
- 3) Определение уровней окислительного стресса и клеточной смерти в дрожжах *Y. lipolytica*, экспрессирующих НВх и А β 42.

- 4) Комплексное исследование функциональных параметров митохондрий, выделенных из дикого штамма дрожжей *Y. lipolytica* и мутантов, экспрессирующих НВх и Аβ42.
- 5) Исследование влияния митохондриально-направленного антиоксиданта SkQThy и прооксиданта *tert*-бутилгидропероксида на состояние клеток дрожжей *Y. lipolytica*, экспрессирующих НВх и Аβ42.

Научная новизна. Впервые созданы мутанты дрожжей *Y. lipolytica*, способные экспрессировать белок НВх, НВх120 (усеченный по С-концу), пептиды Аβ42 и Аβ40, а также мутанты, экспрессирующие вышеуказанные белки, слитые с зеленым флуоресцентным белком eGFP С- и N-концов. Проведено комплексное исследование функциональных свойств митохондрий, выделенных из мутантов, определившее механизмы, лежащие в основе дисфункции митохондрий, индуцированной экспрессируемыми белками. Прослежены последствия индуцированной дисфункции митохондрий на целых клетках мутантов. На созданных мутантах протестировано действие хорошо изученного в нашей лаборатории митохондриально-направленного антиоксиданта SkQThy и показано, что он в низких концентрациях снижал уровень окислительного стресса и клеточной смерти в исследуемых клетках и предотвращал фрагментацию митохондрий в них.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты свидетельствуют о прямом патологическом действии НВх и Аβ42 на митохондрии клеток, что должно учитываться в дальнейших исследованиях и при поиске перспективных средств терапии социально-значимых заболеваний, связанных с активностью этих пептидов. Митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ могут быть эффективными агентами, снижающими проявления, характерные для экспрессии НВх и Аβ42, связанные с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1) Впервые созданы дрожжевые модели гетерологической экспрессии белков НВх, НВх120 и пептидов Аβ42 и Аβ40 на основе дрожжей *Y. lipolytica*, моделирующие их воздействие на митохондрии.

2) Экспрессия белков НВх и Аβ42 в клетках дрожжей *Y. lipolytica* вызывает фрагментацию митохондрий, а экспрессируемые белки образуют агрегаты.

3) Экспрессия НВх и Аβ42 повышает уровень общего окислительного стресса и клеточной гибели.

4) Экспрессия НВх и Аβ42 вызывает дисфункцию митохондрий дрожжей, которые имеют пониженные величины дыхательного контроля (степень сопряженности дыхания и фосфорилирования) и скорость синтеза АТФ, повышенный уровень образования АФК и/или сниженную устойчивость к воздействию прооксидантов.

5) Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично обращал фрагментацию митохондрий, снижал окислительный стресс, увеличивая выживаемость клеток дрожжей.

Личный вклад диссертанта. Автором лично осуществлялся сбор и анализ литературных данных, совместно с научными руководителями сформированы цели и задачи исследования. Автором самостоятельно осуществлялся дизайн праймеров для ПЦР и секвенирования, созданы генетические конструкции, несущие гены изучаемых белков, осуществлена их трансфекция в дрожжи *Y. lipolytica* и произведены отбор и культивирование созданных мутантов дрожжей с последующим их изучением и интерпретацией полученных данных.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях: XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2019, Москва; 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» – 2020, Москва; VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН – 2020, Санкт-Петербург.

Публикации. По материалам работы опубликовано 3 статьи в зарубежных и отечественных журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ:

1. **Епремян Х.Х.**, Голева Т.Н., Звягильская Р.А. Влияние Тау-белка на функции митохондрий // Биохимия. – 2022. – Т. 87(6). – С. 1014–1029.

2. **Epremyan K.K.**, Goleva T.N., Rogov A.G., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. The First *Yarrowia lipolytica* Yeast Models Expressing Hepatitis B Virus X Protein: Changes in Mitochondrial Morphology and Functions // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10(9). – P. 1817.

3. **Epremyan K.K.**, Rogov A.G., Goleva T.N., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. Altered Mitochondrial Morphology and Bioenergetics in a New Yeast Model Expressing A β 42 // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(2). – P. 900.

Методология и методы исследования. В данной работе применялся широкий комплекс молекулярно-биологических (ПЦР, секвенирование, молекулярное клонирование, трансформация, трансфекция) и биохимических (спектрофотометрия, флуориметрия, амперометрия) методов, а также методы микробиологии и клеточной биологии (проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, культивирование микроорганизмов).

Структура и объем работы.

Работа изложена на 113 страницах печатного текста, содержит 29 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы (307 источников).

Степень достоверности. Научные положения и выводы диссертации обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Роль митохондрий и активных форм кислорода в норме и патологии.

1.1.1. Митохондрии. Значение при нормальной физиологии.

Митохондрия – это двумембранная органелла, характерная для большинства эукариотических организмов, основная функция которой заключается в окислении органических соединений с трансформацией выделяющейся энергии в электрохимический мембранный потенциал, который расходуется на синтез аденозинтрифосфата (АТФ), а также частично рассеивается в виде тепла.

Митохондрия состоит из наружной и внутренней мембран, межмембранного пространства и матрикса. Наружная митохондриальная мембрана отделяет внутреннее пространство митохондрий от цитоплазмы и осуществляет перенос соединений между ними. Межмембранное пространство располагается между наружной и внутренней мембранами. Внутренняя митохондриальная мембрана образует множественные складки, называемые кристами, что существенно увеличивает ее площадь. Она содержит большое количество белков, представленных ферментами дыхательной цепи: НАДН-дегидрогеназный комплекс (комплекс I), сукцинатдегидрогеназа (комплекс II), цитохром-*bc*1-комплекс (комплекс III), цитохром-*c* оксидаза (комплекс IV); АТФ-синтазными комплексами и транспортными белками (Рис. 1). Благодаря особому фосфолипиду – кардиолипину, внутренняя мембрана не проницаема для протонов, в связи с чем возможность переноса протонов в межмембранное пространство выполняют ферменты дыхательной цепи, а в обратном направлении АТФ-синтазный комплекс. Матрикс – это пространство, ограниченное внутренней мембраной, которое содержит ряд ферментативных систем, митохондриальную ДНК и белоксинтезирующий аппарат митохондрий.

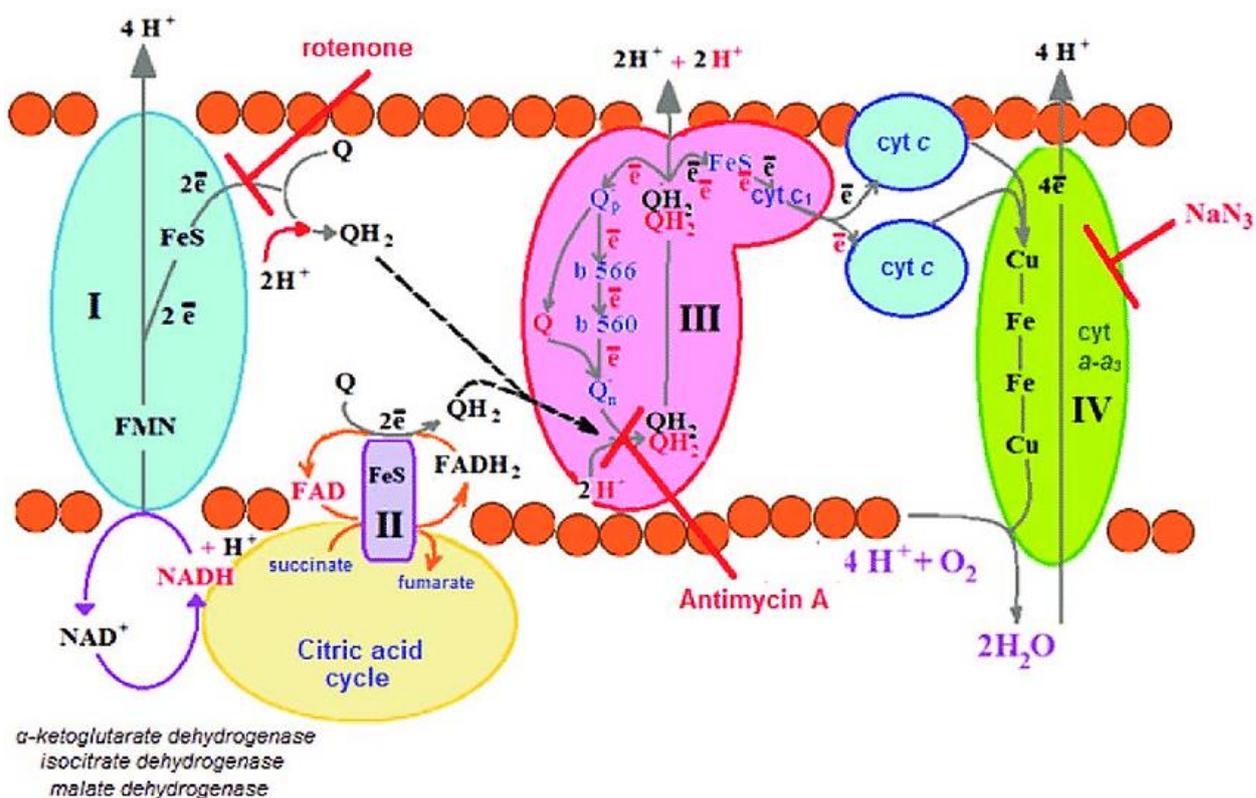


Рис. 1. Перенос электронов и ингибиторы комплексов дыхательной цепи митохондрий. Комплекс I – НАДН-убихинон-оксидоредуктаза, II – сукцинатдегидрогеназа, III – убихинонцитохром-с оксидоредуктаза, IV – цитохром-с оксидаза, Q – убихинон, QH – убихинол [1]

Основная функция митохондрий – удовлетворение клеточных потребностей в энергии в виде молекул АТФ, реализующейся путем субстратного фосфорилирования в матриксе и окислительного фосфорилирования на внутренней мембране с созданием электрохимического мембранного потенциала, основанного на градиенте протонов.

Также митохондрии участвуют в широком спектре клеточных процессов, и они имеют решающее значение для выживания и смерти клеток. Помимо их основной энергетической функции, они глубоко интегрированы в клеточный метаболизм, необходимый для роста и пролиферации [2], поддержание гомеостаза кальция [3,4] и передачу сигналов кальция, а также регулирование адаптации клеток к внешним стрессорам [5,6]. Они участвуют в иммунном ответе клетки [7],

модуляции передачи сигналов активных форм кислорода (АФК) и поддержании окислительного гомеостаза [8,9], регуляции апоптоза путем секвестрации цитохрома С в нормальных условиях и управления его высвобождения в стрессовых условиях [10-12].

В зависимости от потребностей, клетки осуществляют контроль количества и качества митохондрий с помощью процессов биогенеза – образования новых митохондрий, и митофагии – избирательного удаления митохондрий путем аутофагии (Рис. 2).

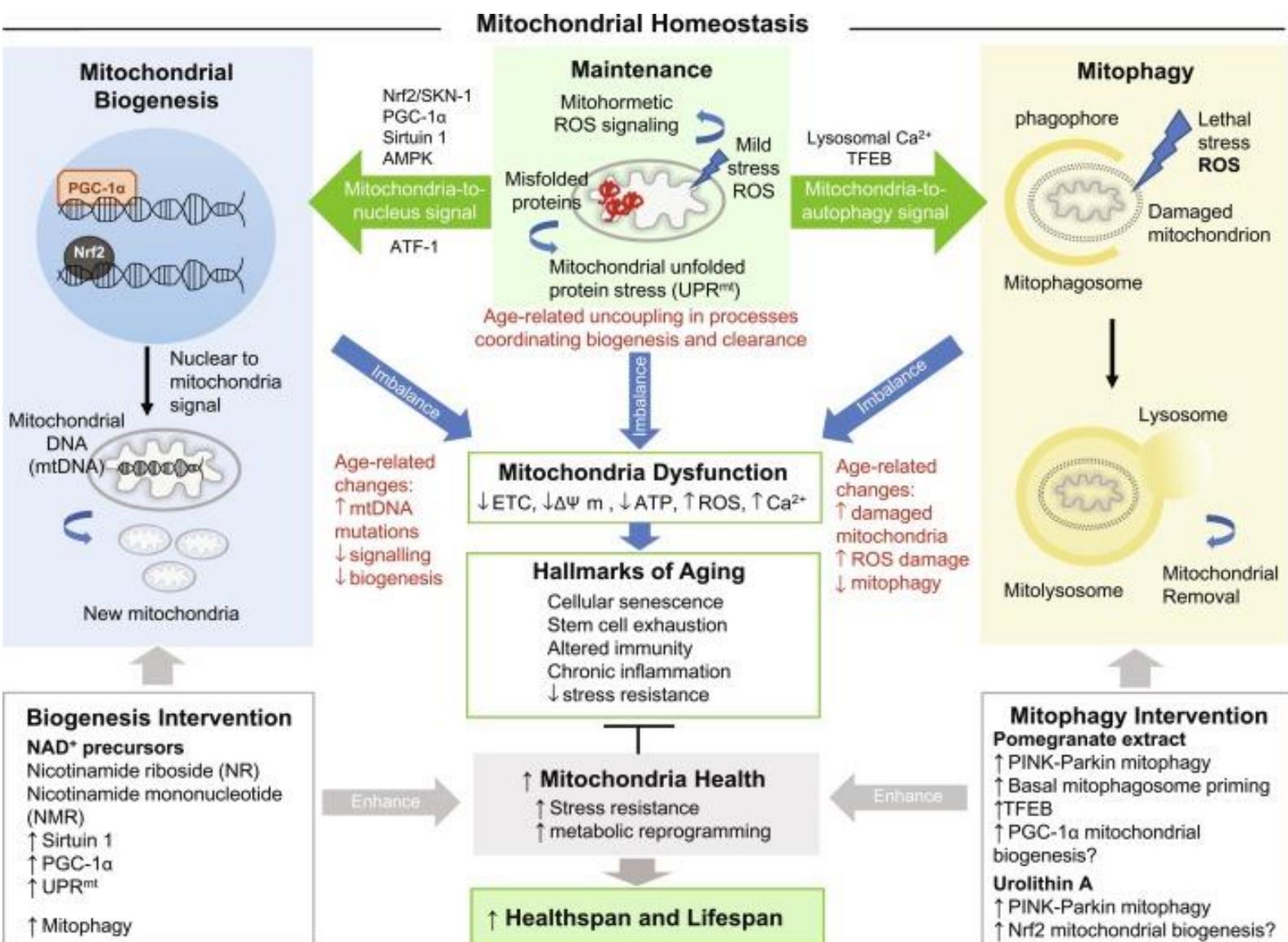


Рис. 2. Митохондриальный биогенез и митофагия [13]

Динамика митохондрий регулируется непрерывным слиянием и делением [14]. Слияние осуществляется митофузинами Mfn1 и Mfn2, интегральными мембранными белками внешней мембраны митохондрий [15] и OPA1, ассоциированным с внутренней митохондриальной мембраной [16]. В клетках млекопитающих динамин-подобный белок Drp1 играет ключевую роль в делении митохондрий [17]. Динамика митохондрий определяет морфологию, размер, распределение и функции митохондрий [18].

1.1.2. Митохондриальная дисфункция.

Под митохондриальной дисфункцией понимается несоответствие между функциональными возможностями митохондрий и потребностями клеток в энергии. Это может быть следствием качественных изменений (снижение дыхательной способности, снижение митохондриального мембранного потенциала и т.д.), или количественных (нарушения процессов слияния/деления, биогенеза, митофагии) [19].

Прямым следствием митохондриальной дисфункции является дефицит энергии в клетке, активизация свободнорадикальных повреждений и инициация апоптоза. Например дефицит АТФ и метаболитов, обеспечиваемых митохондриями могут приводить к метаболическим заболеваниям, таким как сахарный диабет II типа и саркопении [20]. Окислительное повреждение ДНК является одним из ключевых патогенетических звеньев при канцерогенезе [2]. А избыточный апоптоз приводит к ряду нейродегенеративных заболеваний [21].

Нарушение регуляции пролиферации вследствие дисфункции митохондрий основывается на активации пролиферативных киназ, таких как Akt и ERK1/2, которые доставляются в митохондрии, где они активируются окислительно-восстановительными модификациями. При этом нарушение регуляции апоптоза часто связано с повышением проницаемости внешней митохондриальной мембраны и выходом цитохрома С, прокаспаз и AIF, реализующих митохондриальный апоптотический путь, а также с активацией проапоптотических путей JNK и p38MAPK. Различные комбинации

пролиферативных и апоптотических сигналов лежат в основе опухолевых и нейродегенеративных заболеваний и связаны с митохондриальной дисфункцией. Во всех перечисленных случаях триггером или прямым активатором чаще всего являются митохондриальные АФК [22].

1.1.3. АФК: функции в клетке и организме.

Высокий химический потенциал атома кислорода связан с наличием двух неспаренных электронов на внешнем электронном уровне. Это означает, что в химических реакциях кислород выступает в роли сильнейшего акцептора электронов. Данное свойство кислорода аэробные организмы используют для получения энергии в результате окислительно-восстановительных реакций, где донором электрона выступает два атома водорода, акцептором атом кислорода, а конечным продуктом является вода. Однако в случае, если у кислорода остается неспаренный электрон, то данная молекула называется свободным радикалом. Если атомы кислорода соединяются друг с другом одной связью и образуют пероксогруппу —O—O— , называются перекисью. Если кислород получает недостающие электроны, но их отрицательный заряд не компенсируется, то молекула становится ионом кислорода. Во всех трех случаях данная молекула называется активной формой кислорода (АФК). Существует несколько структур АФК (перекись водорода, супероксид-анион, гидроксильный радикал, оксид азота и др.) (Рис. 3), но во всех случаях эти молекулы характеризуются низкой кинетической стабильностью, что придает им крайне высокую химическую реактивность.

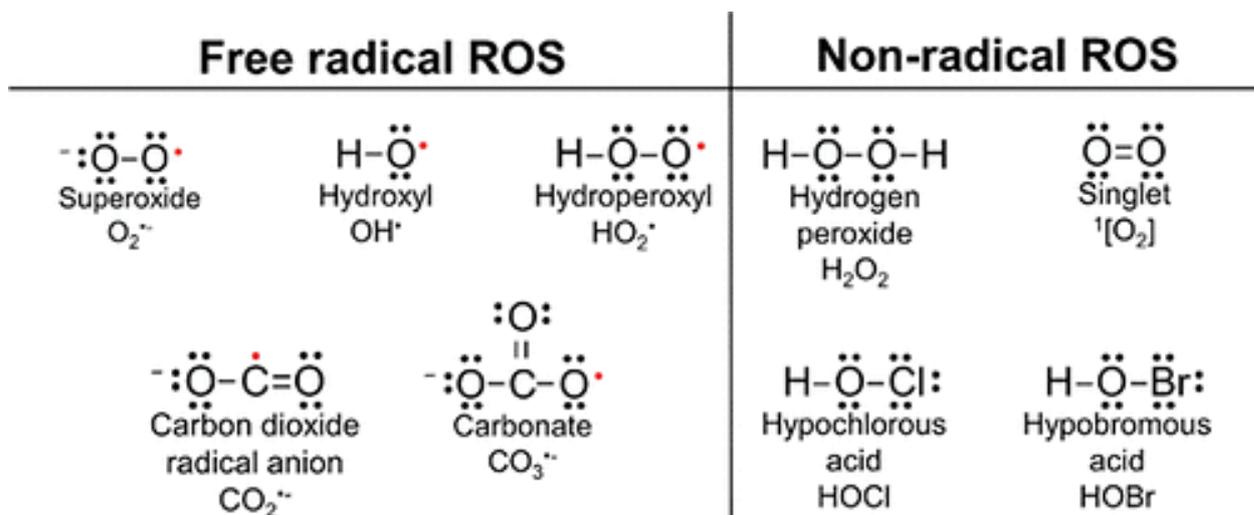


Рис. 3. Структуры Льюиса некоторых АФК. Свободнорадикальные АФК (слева) и нерадикальные АФК (справа) [23]

АФК играют двойную роль в биологических системах. Изначально АФК были описаны как простые побочные продукты метаболизма, вызывающие окислительное повреждение и хронические заболевания, а также старение [24].

Однако все большее количество доказательств свидетельствует, что АФК играют более сложную роль, чем предполагалось ранее, выступая в качестве ключевых медиаторов в передаче сигналов в клетке (Рис. 4). Как сигнальные молекулы, АФК очень универсальны из-за их разнообразных свойств, в том числе разных уровней реактивности, мест образования (внутриклеточная компартментация) и способности проникать через биологические мембраны. Было установлено, что они регулируют деление, развитие, дифференциацию, окислительно-восстановительные уровни, системные реакции, адаптацию к стрессу, взаимодействия с другими организмами и гибель клеток у большинства эукариотических организмов [25-27]. В частности, АФК влияют на сигнальные белки клетки, ионные каналы и переносчики, а также модифицируют киназы и убиквитин-протеасомную систему [28]. Существует баланс между производством АФК для передачи сигналов, базовым уровнем АФК, продуцируемым в результате метаболизма, скоростью диффузии и реактивностью АФК, а также удалением и восприятием АФК в разных компартментах клетки. Интеграция этих

АФК-зависимых реакций / сигналов, регулирует общий ответ клетки на определенный стимул [26]. Множественные внутриклеточные генераторы АФК могут быть активированы, одновременно или последовательно, соответствующими сигнальными молекулами для окислительно-восстановительных биологических функции [27]. Легкие окислительно-восстановительные стрессы могут защитить организм от последующих более серьезных стрессов и улучшают обмен веществ и иммунную систему, тем самым усиливая его приспособляемость и продлевая его продолжительность жизни [6,29].

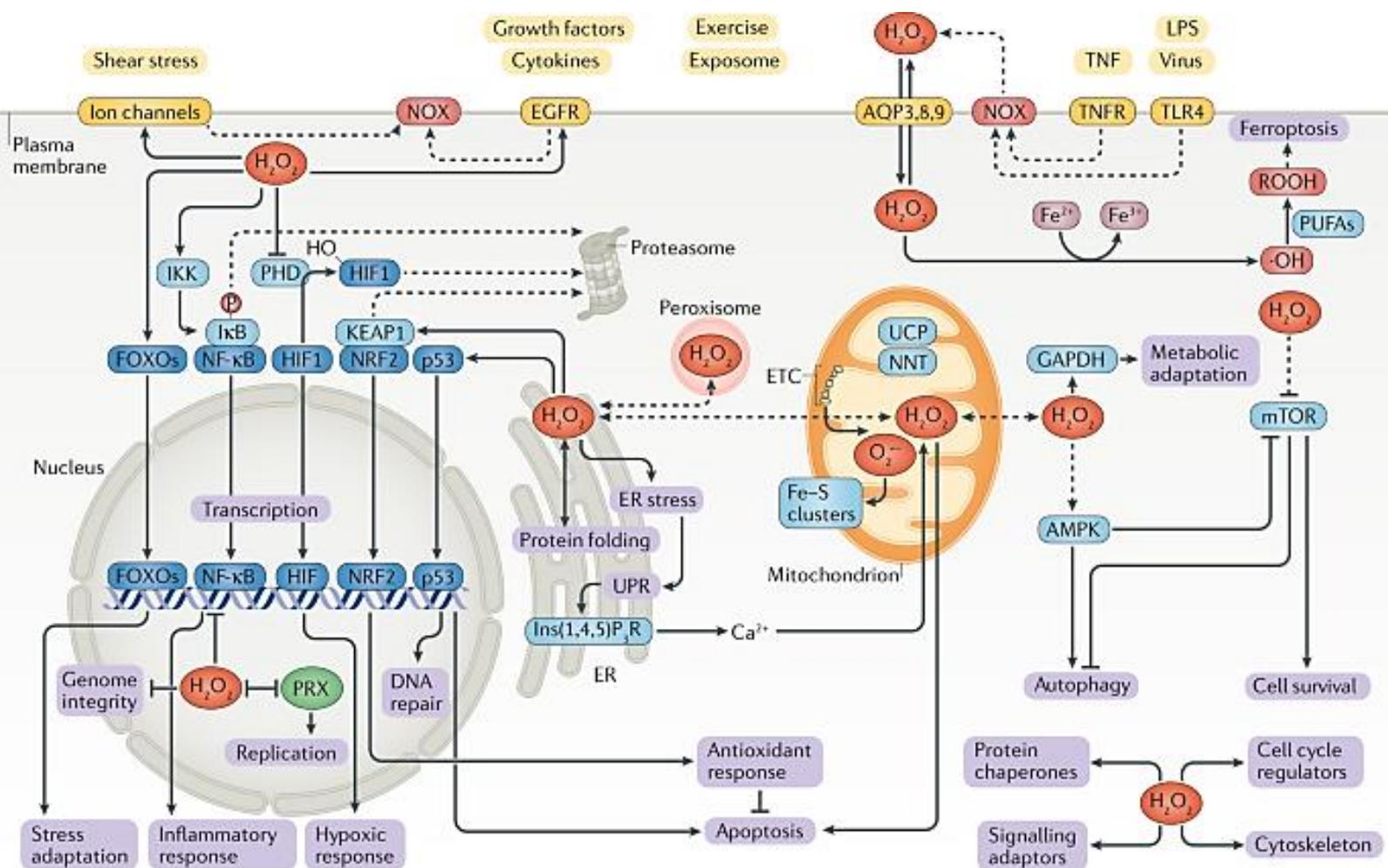


Рис. 4. АФК-зависимый сигналинг [30]

Принято считать, что митохондрии являются начальной и главной органеллой, отвечающей за образование АФК в клетке, хотя некоторые ферменты

и процессы также способствуют генерации АФК. Недавно появились данные о фундаментальной роли митохондрий даже в высокогликолитических клетках с относительно низкими потребностями в энергии. Таким образом митохондрии содержатся в стволовых клетках [31], эпителии [32] и нейтрофилах [33]. Считалось, что в этих типах клеток снижены или вовсе отсутствуют митохондриальные функции, за исключением продукции АФК, что подчеркивает критическую роль этой митохондриальной функции в поддержании клеточного гомеостаза.

1.1.4. Влияние АФК на патофизиологические процессы.

Чрезмерное производство АФК (окислительный стресс) в результате дисбаланса между образованием и утилизацией АФК, часто приводит к разнообразным поражениям клеток, включая снижение уровня АТФ, повышение цитозольного Ca^{2+} , повреждение компонентов клетки, включая ДНК, белки и липиды [34] и нарушение множественных клеточных сигнальных путей, что приводит к обострению многих заболеваний [35,36] и индукции апоптоза [37].

Митохондрии обладают рядом процессов образования свободных радикалов, при этом дыхательная цепь является основным источником АФК в патофизиологических условиях. Есть мнение, что чрезмерное образование АФК в значительной степени связано с дисфункцией митохондрий, вызывающей патологии [38-40]. Митохондриальные АФК (мтАФК) являются критическим фактором в механизме, лежащем в основе мышечной атрофии и слабости (например, саркопении) [41], и они, возможно, играют роль в патогенезе рассеянного склероза [42], в возрастных хронических заболеваниях [43], в диабете 2 типа, связанного с ожирением [44], и при старении мышцей с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) [45]. Была выдвинута гипотеза, что в долгоживущих нейронах, где функционально активные митохондрии должны сохраняться в течение всей жизни, роль митохондриальных АФК в нормальном функционировании и патологии (болезни Альцгеймера, Паркинсона, болезни мотонейронов и Хантингтона) может иметь решающее значение [46]; в раковых

клетках продукция мТАФК способствует эволюции в сторону более агрессивных фенотипов [47]. На атрофию эпителиальных клеток тимуса также влияют мТАФК [48].

1.1.5. Митохондриально-направленные соединения.

Стоит отметить, что выводы о возможном участии мТАФК в развитии патологий в первую очередь основывались на способности антиоксидантов, нацеленных на митохондрии (Рис. 5), обращать или даже предотвращать патологические эффекты [38,49-58].

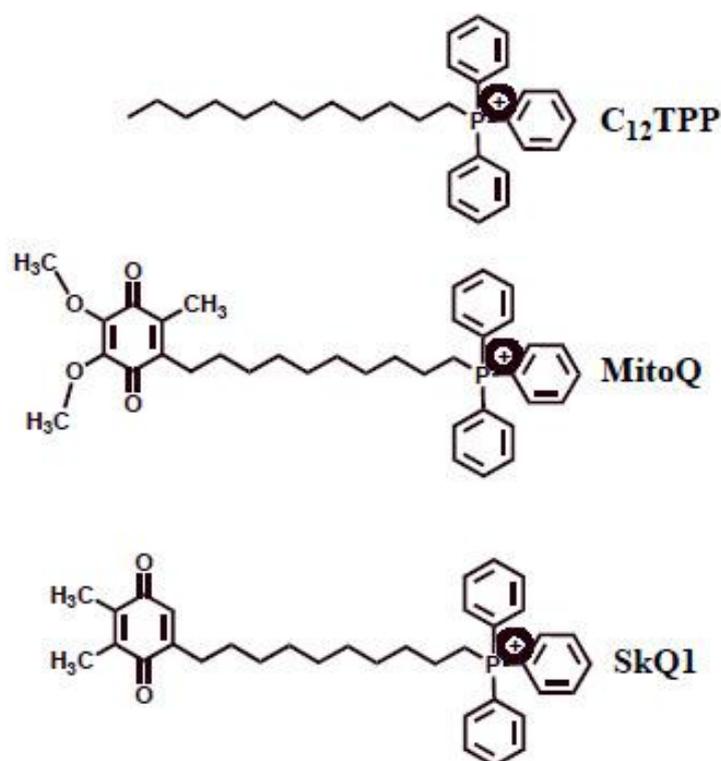


Рис. 5. Примеры химической структуры митохондриально-направленных липофильных катионов трифенилфосфония (TPP), MitoQ и SkQ1 [58]

Все эти агенты, нацеленные на митохондрии, внесли свой вклад в новую область терапии, называемую митотерапией [59].

В последнее время митохондриально нацеленные (т.е. транспортирующиеся исключительно в митохондрии) агенты, полученные в результате прикрепления катионов к различным лекарственным соединениям, возникли как новая стратегия химиотерапии рака [60]. Большинство из них содержат трифенилфосфоний

(TRP⁺), катион, который был введен в употребление в области митохондриальных исследований Скулачевым с коллегами в конце 60-х гг. [61]. Позже катионы, проникающие через мембрану, получили название «ионы Скулачева» благодаря Д. Грину [62], а семейство соединений, нацеленных на митохондрии и разработанных в лаборатории Скулачева, названа «SkQs». Эти агенты накапливаются внутри клеток и митохондрий (единственный отрицательно заряженный компартмент в клетке) из-за мембранного потенциала в цитоплазме или внутренней митохондриальной мембране. Более того, они преимущественно накапливаются в митохондриях раковых клеток, вероятно, из-за более высокого мембранного потенциала, создаваемого в митохондриях опухолей, по сравнению с нетрансформированными клетками [63].

Таким образом, изучение роли митохондрий в развитии патологий является одним из перспективных направлений биомедицинских исследований, с огромным потенциалом практической значимости.

1.2. Гепатоцеллюлярная карцинома.

1.2.1. Общие сведения.

Рак печени является распространенной онкологической патологией с быстро растущей заболеваемостью и основным фактором смертности от рака с низкой выживаемостью больных [64]. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), агрессивное злокачественное новообразование человека, является наиболее распространенной формой рака печени [65-67]. Согласно последним эпидемиологическим данным из отчета Globocan 2020, на ГЦК приходится 4,7% всех случаев рака, при этом ежегодно с ГЦК связано более 900 000 новых случаев и около 830 000 смертей [66]. Это пятый по распространенности рак в мире и третья основная причина смертности от рака в мире [68-72].

Преобладание высокого уровня смертности связано с отсутствием чувствительных и специфических биомаркеров для раннего выявления [73], ограниченными возможностями лечения поздней стадии ГЦК [73], лекарственной устойчивостью, инвазивностью и метастазированием [69,74]. Были обнаружены

различия в заболеваемости и смертности от ГЦК по полу, расе/этнической принадлежности, возрастным группам и географическим регионам. Наиболее высокие показатели ГЦК характерны для Восточной и Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Африки [75-77], но в последнее время наметилась тенденция к увеличению числа случаев также в США и Западной Европе [78].

Точные молекулярные механизмы, которые опосредуют развитие ГЦК, до сих пор неясны, но хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (HBV) считается основным фактором риска возникновения ГЦК, и большинство пациентов имеет ГЦК как следствие персистирующей инфекции HBV [68,79,80]. Несмотря на разработку вакцин и терапевтических подходов против HBV, около 300 миллионов человек в настоящее время инфицированы HBV [64]. Распространение HBV-инфекции зависит от факторов окружающей среды, образа жизни, уровня доходов и образования, которые определяют различия в географическом распределении заболеваемости HBV, составляя около 1% в развитых странах и 8% и более в остальных. HBV может передаваться половым и перинатальным путем или при прямом контакте с зараженной кровью или другими жидкостями организма, и он поражает печень, вызывая острые и хронические заболевания [81]. Различия в генотипе и мутациях HBV, генетическая изменчивость, предрасположенность, приобретение опухолеспецифических соматических мутаций и факторы окружающей среды способствуют наблюдаемой индивидуальной вариабельности в развитии ГЦК [82]. Хроническая инфекция HBV, несмотря на наличие вакцины, остается достаточно распространенной [65].

1.2.2. Роль HBx при развитии ГЦК.

HBV является членом семейства *Hepadnaviridae* и рода *Orthohepadnavirus*. Геном HBV очень компактен (всего 3,2 килобазы в длину) и представляет собой кольцевую, частично двухцепочечную молекулу ДНК, которая содержит четыре перекрывающиеся открытые рамки считывания, кодирующие оболочечный белок

(pre-S1/ pre-S2), коровый белок (pre-C/C), вирусную полимеразу и белок X (HBx) [83] (Рис. 6).

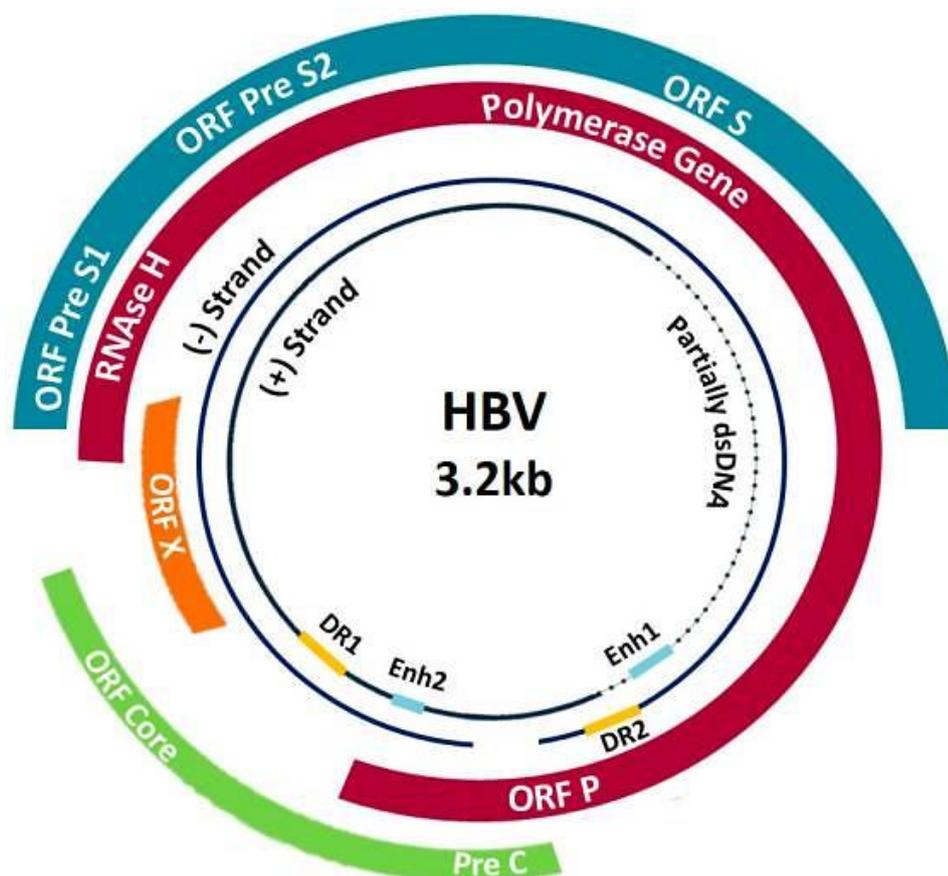


Рис. 6. Схематическое изображение генома вируса гепатита В [84]

Среди белков, продуцируемых HBV, белок HBx тесно связан с развитием ГЦК. Показано, что последовательности, кодирующие вирусные белки HBx и pre-S1/S2, наиболее часто встречаются в опухолевых клетках печени. Кроме того, антитела против HBx детектируются у пациентов, инфицированных HBV, причем значительно чаще у пациентов с ГЦК, чем у пациентов с хроническим гепатитом без опухоли [85].

Репликация вируса гепатита В представляет собой сложный многоэтапный процесс. Сначала нуклеокапсиды проникают в ядро гепатоцита через рецептор NTCP, где ДНК вируса превращается в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК). Для инициации и поддержания репликации вируса необходимо присутствие белка HBx, обладающего свойствами активатора транскрипции. Затем с кзкДНК транскрибируется прегеномная РНК длиной 3,5 т.п.н. и

транспортируется в цитоплазму, где зрелые капсиды секретируются наружу или переносятся обратно в ядро, образуя пул кзкДНК. Благодаря этому механизму некоторые гены HBV могут интегрироваться в хромосомную ДНК инфицированных гепатоцитов [65,80,86,87]. До сих пор не все молекулярные механизмы канцерогенеза, опосредованного HBV, идентифицированы. Предполагается, что иммунный ответ в основном связан с хроническим воспалением и интеграцией вирусного генома в геном гепатоцитов, а ключевую роль в канцерогенезе играет вирусный регуляторный белок HBx [68,88].

Неструктурный белок HBx с молекулярной массой 17 кДа, кодируемый областью X, является многофункциональным неспецифическим трансактиватором. HBx модулирует передачу цитоплазматического сигнала и напрямую взаимодействует с ядерными факторами транскрипции, что позволяет регулировать не только вирусные, но и клеточные промоторы. Структура HBx до сих пор неизвестна, но недавно был предложен ряд моделей HBx *in silico* [27,89]. С-концевой фрагмент HBx, являющийся важным элементом пространственной структуры белка, начинается в положении 120 (остаток триптофана) и экспонируется в цитоплазму. Остатки 113–135, известные как ВНЗ-подобный пептид, участвуют в регуляции репликации HBV [27]. С-концевой фрагмент играет решающую роль в канцерогенезе [90] и необходим для продукции АФК митохондриями гепатоцитов [91]. Интеграция вирусного генома сопровождается укорочением С-концевого фрагмента белка HBx (сt-HBx), что еще больше ускоряет канцерогенез [92] за счет поддержания передачи пролиферативных сигналов [93], обхода супрессоров роста [94], уклонения от иммунного ответа [95,96], облегчения репликативного бессмертия [97], активации воспаления [98], запуска инвазии и метастазирования [99,100], стимулирования ангиогенеза [101] и индукции нестабильности генома [102]. Роль HBx в индукции апоптоза при ГЦК противоречива и в значительной степени зависит от клеточных условий, компонентов, взаимодействующих с HBx, и внутриклеточной локализации HBx дикого типа (wtHBx) и укороченных форм HBx (trHBx) [103].

НВх колокализуется в матриксе митохондрий и ядре и регулирует разрушение белков, клеточную транскрипцию, апоптоз и пролиферацию клеток [104-106]. В ядре НВх стимулирует репликацию HBV [107]. При остром и хроническом гепатите НВх экспрессируется на низком уровне и стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет, то есть запускает несколько путей клеточного апоптоза, генерацию активных форм кислорода, активацию каспазы-8, индуцирует высвобождение цитохрома С и снижает мембранный потенциал митохондрий [108]. Напротив, другие исследования доказали, что экспрессия НВх в клетках Chang и HEK 293 Т-клетках ингибирует апоптоз, индуцируемый белком p53, TGF- β (трансформирующий фактор роста бета), Fas-рецептор и TNF (фактор некроза опухоли) [109]. На линии клеток эмбриональных нефроцитов человека 293Т и линии клеток гепатоцитов HL-7702 человека показана колокализация НВх и белка внутренней митохондриальной мембраны, COXIII, приводящая к усилению работы дыхательной цепи и повышенному образованию АФК, что связывается с канцерогенезом HBV-ассоциированной ГЦК [110]. На клетках печени Huh-7, HepG2 и Chang было показано, что С-концевой домен НВх индуцирует продукцию АФК и образование 8-оксогуанина (8-oxoG), что считается надежным биомаркером окислительного стресса. Продукция АФК, индуцированная С-концевым доменом НВх, приводит к повреждению митохондриальной ДНК, что может играть решающую роль в развитии ГЦК [91]. Чтобы исследовать влияние НВх на выживаемость клеток ГЦК во время метаболического стресса, клеточные линии ГЦК SMMC-7721 и Huh7 трансфицировали НВх. НВх играет ключевую роль в поддержании окислительно-восстановительного и энергетического гомеостаза путем активации окисления жирных кислот, что имеет решающее значение для выживания клеток ГЦК в условиях метаболического стресса [111].

В последние годы накапливается всё больше данных, указывающих на участие НВх в изменении эпигенетической регуляции хозяйских генов, что способствует развитию ГЦК [112]. НВх вызывает гиперметилирование в промоторах целого ряда генов: белка ретинобластомы pRB, онкогена ASPP, белка

клеточной адгезии E-кадгерина, глутатион-S-трансферазы GSTP1 и теломеразы hTERT [113]. Показано, что при ГКЦ окислительный стресс вызывает гиперметилирование CpG островка в промоторе каталазы [114], а также метилирование промотора E-кадгерина [115], в результате чего снижается экспрессия этих белков. Роль митохондрий в эпигенетических изменениях при инфекции HBV до сих пор не исследовалась.

HBx также способен активировать ряд транскрипционных факторов (например, NF κ B, AP-1, NFAT, STAT3), не взаимодействуя с ними напрямую. Показано, что HBx связывается с митохондриями, и для этого необходим лейцин-богатый гидрофобный участок белка. При экспрессии HBx наблюдалось снижение мембранного потенциала, фрагментация и кластеризация митохондрий [116]. Роль митохондрий в репликации вируса и в индукции канцерогенеза остается малоизученной.

Заражение вирусом гепатита В сопровождается выраженным окислительным стрессом, который играет важную роль в канцерогенезе [117]. Механизм индукции окислительного стресса при инфекции HBV неизвестен. Показано, что HBx участвует в индукции окислительного стресса при инфекции HBV, а также вызывает окислительный стресс при экспрессии в клетках гепатомы [118]. Окислительный стресс, источником которого являются митохондрии, потенциально может способствовать опухолевой трансформации клеток печени. Показано, что нокаут основного антиоксидантного фермента митохондрий Mn-содержащей супероксиддисмутазы (MnСОД) в печени мыши приводит к изменению архитектуры органа, появлению опухолевых маркеров и ускоряет опухолеобразование, вызванное химическим канцерогеном [119]. В HBV-зависимом канцерогенезе могут участвовать многие важнейшие сигнальные пути. Показано, что инфекция вызывает активацию MAP киназного каскада и киназы Akt, что ведет к ускоренной пролиферации и подавляет апоптоз [120]. Известно, что ключевую роль в развитии ГКЦ играет активация Wnt-сигналинга, который стимулирует «стволовость» [121] клеток опухоли. Перестройки цитоскелета и индукция эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) под действием HBV

практически не изучены, хотя известно, что ЭМП может происходить при инфекции различными онковирусами [122]. ГЦК развивается на фоне хронического воспаления, которое запускается инфекционными агентами (в частности, вирусами гепатита) или токсическими агентами. При повреждении гепатоцитов происходит активация иммунных клеток (моноцитов, макрофагов, Купферовых клеток), которые генерируют медиаторы воспаления. В свою очередь медиаторы воспаления способствуют опухолевой трансформации гепатоцитов. Транскрипционный фактор NFκB вовлечен как в активацию иммунных клеток, так и в передачу сигналов от медиаторов воспаления в гепатоцитах [123], но детальный механизм остается неясен. Сведения об участии митохондрий в регуляции указанных сигнальных путей носят отрывочный характер. Так, показано, что под действием TNF в клетках ГЦК повышается продукция мтАФК, и это способствует активации NFκB и ускоряет миграцию клеток [124]. Обнаруженное участие митохондрий в регуляции MAP киназного каскада и ЭМП в клетках карциномы шейки матки [125] не получило пока подтверждения в моделях ГЦК.

1.2.3. Модели для изучения внутриклеточных эффектов HBx.

Хотя установлено, что HBx является многофункциональным регулятором и привлекательной терапевтической мишенью для лечения хронического гепатита В и ГЦК, специфические молекулярные механизмы HBV-ассоциированного ГЦК, а также роль белка HBx в канцерогенезе изучены недостаточно хорошо и требуют дальнейших исследований [126,127]. Данные о влиянии HBx на энергетический метаболизм клеток немногочисленны и противоречивы [128]. Сложность самой системы и комплексное взаимодействие многих факторов затрудняют понимание механизмов, лежащих в основе этих процессов. Наиболее очевидное решение - использовать более простые системы и уменьшить количество взаимодействующих факторов. Действительно, использование соответствующих клеточных линий предоставило ценную новую информацию и пролило свет на

лежащие в основе молекулярные механизмы и новые терапевтические мишени для HBx, HBV и ГЦК. Приведем лишь несколько наиболее ярких работ.

Было разработано новое моноклональное антитело, позволяющее проводить пространственно-временной анализ HBx в естественных условиях, а именно в инфицированных HBV первичных гепатоцитах человека. При помощи конфокальной микроскопии с этим антителом было показано, что HBx начинает экспрессироваться вскоре после заражения, имеет короткий период полувыведения и преимущественно локализуется в ядре [129,130], при этом основной мишенью для HBx в цитоплазме являются митохондрии [129]. Снижение экспрессии miR-30c может привести к прогрессированию хронической инфекции HBV за счет стимуляции репликации HBV и пролиферации клеток [131]. Способность полноразмерного белка HBx и его укороченных форм воздействовать на регуляторные белки клеточного цикла является одним из основных звеньев патогенеза ГЦК [132]. HBx способствует пролиферации, эпителиально-мезенхимальному переходу, инвазии и миграции клеток ГЦК путем воздействия на HMGA2, потенциальную терапевтическую мишень для HBV-ассоциированной ГЦК [133]; вмешивается в регуляцию LONP1 и Parkin, усиливая митофагию при энергетическом дефиците [134]; способствует метастазированию ГЦК путем модификаций внеклеточного матрикса посредством пути HIF-1 α /LOX [135]; и изменяет экспрессию длинных некодирующих РНК, чтобы способствовать прогрессированию ГЦК [70]. HBx-индуцированный S100A9 играет ключевую роль в метастазировании ГЦК [136]; SHP2, индуцируемый путем HBx-NF- κ B, способствует фиброзу во время раннего развития ГЦК у человека [137], а взаимодействие между centrosomным P4.1-ассоциированным белком (CPAP) и HBx обеспечивает микроокружение, способствующее развитию ГЦК за счет усиления активации NF- κ B, продукцию воспалительных цитокинов и злокачественное новообразование [138]. Обнаружена двойная роль клеточного ингибирующего белка FLICE (с-FLIP) в регуляции репликации HBV; с-FLIP взаимодействует с HBx, повышает его стабильность и регулирует экспрессию или стабильность ядерных факторов гепатоцитов, необходимых для транскрипции

генома HBV [126]. Белок, взаимодействующий с тиоредоксином (TXNIP), ключевой медиатор внутриклеточных АФК, может быть вовлечен в HBV-опосредованное метастазирование ГЦК, ассоциированного с HBV [139]. Связанный с аутофагией белок 16-1 (ATG16L1) связывается с конъюгатом ATG12-ATG5 и образует большой белковый аутофагосомный комплекс, участвующий в HBV-ассоциированном ГЦК [140].

1.2.4. Необходимость упрощения моделей.

Хотя применение соответствующих клеточных линий в значительной степени способствовало лучшему пониманию некоторых процессов, связанных с ГЦК, они остаются достаточно сложными чтобы иметь ряд недостатков, включая низкую скорость роста клеток, плотную ассоциацию клеток и возможное влияние богатой среды культивирования. Дрожжевые модели лишены этих недостатков. Дрожжевые клетки, простейшие эукариотические организмы, обладающие хорошо сохранившимися универсальными молекулярными и клеточными механизмами, регулирующими сигнальные пути [141,142], протеостаз, аутофагию, окислительный стресс, секреторные пути [143,144] и гибель клеток [144], особенно хорошо подходят для изучения взаимосвязи между окислительным стрессом, митохондриальной динамикой (митохондриальное слияние и фрагментация) и митохондриальной дисфункцией. Более того, из-за способности быстро расти на простых доступных питательных средах определенного состава, разработанного передового набора генетических инструментов и широкого применения в синтетической биологии и метаболической инженерии дрожжи стали ценным модельным эукариотическим организмом для раскрытия сложных внутриклеточных механизмов, лежащих в основе биологии и патологии человека [145,146]. Кроме того, клетки дрожжей в природе лишены белка HBx, что позволяет определять морфологические и биоэнергетические изменения в клетках под влиянием вирусного белка HBx отдельно от других факторов (хроническое воспаление, иммунный и

цитокиновый ответ и др.), вызывающих окислительный стресс как вторичный процесс.

Непатогенные, нетоксичные (в целом считающиеся безопасными), облигатные аэробные клетки аскомицетов дрожжей *Y. lipolytica*, имеющие дыхательный метаболизм, близкий к таковому у клеток млекопитающих [147-150], разносторонний профиль использования субстрата, высокую скорость роста, развитые технологии редактирования генома, а также уникальные физико-химические свойства и секреторный механизм, способствующие необычайной способности к продукции и секреции гетерологичных белков [151], еще лучше подходят для такого рода исследований.

1.3. Болезнь Альцгеймера.

1.3.1. Общие сведения.

Известны две формы болезни Альцгеймера (БА) [152]: ранняя семейная (составляет 1–2% всех случаев БА) и наиболее распространенная поздняя спорадическая форма. Спорадическая форма представляет собой прогрессирующее, сложное, неизлечимое, возрастное нейродегенеративное заболевание, вызывающее преобладающую форму деменции, характеризующуюся прогрессирующей потерей нейронной структуры, множественными когнитивными нарушениями, изменениями поведения и личности [153-156].

В настоящее время БА разрушает жизнь более 50 миллионов человек [153,157], и ожидается, что это число значительно возрастет в связи с увеличением продолжительности жизни [153,158-160]. При отсутствии эффективных методов лечения БА, совокупная стоимость ухода за пациентами с БА станет тяжелым бременем для систем здравоохранения во всем мире [159].

Некоторые факторы риска могут вызывать БА, среди которых ведущими являются старение и иммуносенесценция [161]. У лиц с аллелем $\epsilon 4$ аполипопротеина E (APOE4) и мутациями других переносчиков холестерина в головном мозге вероятность заболевания выше [162-164]. К модифицируемым

факторам риска БА и деменции относятся изменения гематоэнцефалического барьера [165-167], сосудистые нарушения (повышение артериального давления) [162,163,168], метаболические факторы (повышенная инсулинорезистентность при сахарном диабете 2 типа, ожирение, повышенное содержание холестерина, нарушение метаболизма глюкозы) [163,168,169], инфекции, воспаление [166,170], преобладание пола (женщины) [171], факторы образа жизни (нездоровое питание, злоупотребление алкоголем, курение, гиподинамия, низкий уровень когнитивного развития в раннем возрасте, дисбиоз) [162,163,172]. Другие причины включают семейный анамнез [173], стресс, депрессию, недостаточный сон и редкие социальные контакты [168].

NIA-AA (Национальный институт старения и Ассоциация болезни Альцгеймера) рекомендовал рассматривать БА как заболевание, характеризующееся постепенным прогрессированием с деменцией на его последней стадии, и диагностировать БА путем мониторинга биомаркеров, объективно измеряемых параметров, лежащих в основе патологии у больных при жизни, используя клинические симптомы только на стадии заболевания [174-176]. Своевременное выявление ранней стадии БА особенно важно, так как это может способствовать внедрению раннего и, следовательно, эффективного лечения этого заболевания. Точная ранняя диагностика БА с использованием чувствительных, специфических, надежных, воспроизводимых, неинвазивных и простых в использовании биомаркеров для выявления специфической патологии БА и выбора оптимального ухода за пациентами занимает центральное место в исследованиях БА [177,178].

Сегодня биомаркеры для выявления доклинического прогрессирования болезни Альцгеймера включают: соотношение $A\beta_{42}:A\beta_{40}$, общий тау (T-tau) и фосфорилированный тау (P-tau) в спинномозговой жидкости (цереброспинальная жидкость, ЦСЖ) [179,180], измеренное с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с трассерами, специфичными для $A\beta$, тау и синаптических нарушений [181]. Однако глобальное использование ЦСЖ и ПЭТ не получило широкого распространения из-за высокой стоимости и инвазивности [182]. Более

новые модели для ранней диагностики БА предлагают использовать слюну [183], глаза [184] и кровь [176,185].

1.3.2. Роль А β 42 и Тау-белка при развитии БА.

Принято считать, что отложение внеклеточных сенильных бляшек нерастворимого β -амилоидного пептида (А β 42) и внутринейронных включений (нейрофибриллярных клубков, NFT), состоящих из укороченных и гиперфосфорилированных форм тау-белка, стабилизирующего микротрубочки (P-tau), потеря синапсов и нейронов, а также изменения в морфологии и функциях микроглии и астроцитов являются наиболее патологически значимыми фенотипическими признаками БА [159,166,186,187].

А β пептид обладает выраженной способностью подвергаться конформационным изменениям и обладает высокой амилоидогенностью. Он возникает путем протеолиза β - и γ -секретазами белка-предшественника бета-амилоида (APP), что приводит к появлению А β с аминокислотными последовательностями, содержащими от 40 до 51 аминокислот, причем А β 40 и А β 42 являются конечными фрагментами. Затем эти пептиды могут высвобождаться во внеклеточное пространство, где они могут связываться с различными рецепторами или оставаться связанными со структурами плазматической мембраны и липидного рафта. Амилоидогенный путь занимает центральное место в так называемой «гипотезе амилоидного каскада», которая гласит, что сформированные структуры А β последовательно олигомеризуются и агрегируют, тем самым вызывая нейротоксичность и деменцию. Однако прямой корреляции между амилоидными бляшками и потерей синапсов и нейронов в мозге пациентов с БА нет [188].

Первоначальное накопление А β затрагивает глиальные клетки, такие как микроглия и астроциты, иммунные клетки центральной нервной системы, которые впоследствии активируют иммунные реакции. Микроглия может идентифицировать и связывать олигомеры и фибриллы А β через рецепторы, присутствующие на поверхности клетки. Активация микроглии уменьшает

отложения A β , усиливая его фагоцитоз. A β , в свою очередь, способен активировать путь NF- κ B, который является центральным сигнальным путем для продукции цитокинов [189]. Когда астроциты стимулируются провоспалительными цитокинами, такими как IL-1 и IL-6, они становятся активированными (реактивные астроциты) и стимулируют воспаление посредством секреции цитокинов, таких как фактор некроза опухолей α (TNF- α) и IL-6. В дополнение к прямому цитотоксическому действию на соседние нейроны, эти цитокины приводят к уменьшению количества рецепторов и разрушающих A β ферментов в микроглии, снижая их нейропротекторную роль по мере прогрессирования заболевания. Продолжительная продукция и высвобождение провоспалительных цитокинов (таких как TNF α , IL-1, IL-12 и IL-23), простагландина E₂, NO, АФК и матриксных металлопротеиназ приводит к хроническому воспалительному процессу и дисфункции микроглии [190]. Хемокины, такие как TNF α , могут усиливать продукцию APP и A β пептидов [191]. Кроме того, A β может напрямую связываться с поверхностью клеток микроглии для активации пути MAPK / ERK и индуцировать провоспалительные гены, включая цитокины и хемокины [192], тем самым приводя к хроническому воспалению и вызывая прямое повреждение нейронов. Исследования метабомики также пролили свет на ряд фундаментальных изменений, происходящих во время прогрессии БА. Накапливающиеся данные свидетельствуют о связи между диабетом, ожирением, неалкогольным стеатозом печени и прогрессированием БА [193]. Метаболические изменения, наблюдаемые у пациентов с БА и в моделях БА, включают расщепление глюкозы и окисление пирувата [194], нарушение синтеза белка на ранней стадии БА [195], повышение уровня некоторых аминокислот, метаболитов серотонина, катехоламина и цикла Кребса [194,196,197], изменения в метаболических путях пурина [194,197], дисбаланс холестерина [198] и сфинголипидов [199], серьезные нарушения в путях биосинтеза и передачи сигналов церамида и фосфоинозотида [200], нарушения в клеточных системах метаболизма (поглощение, внутриклеточный

транспорт и хранение белка) переходных металлов [201,202], нарушение регуляции одноуглеродного обмена [203] и некоторые другие.

Последние работы показывают, что амилоидная патология развивается за 15-20 лет до нейродегенерации и появления симптомов в спорадических и аутосомно-доминантных формах БА, тогда как патология тау-белка непосредственно коррелирует с клиническими симптомами, такими как снижение когнитивных функций и деменция [204]. Снижение уровня тау-белка нивелирует Аβ-опосредованную цитотоксичность, делая тау-белок привлекательной терапевтической мишенью [205].

Тау-белок преимущественно присутствует в нейронных и глиальных аксонах, где он имеет первостепенное значение для многих физиологических процессов благодаря его влиянию на динамику системы микротрубочек [206], регулирует транспорт/удлинение/созревание аксонов, синаптическую пластичность и поддержание целостности ДНК и РНК [188]. Ясно, что потеря функции тау-белка может инициировать нейротоксичность путем нарушения различных процессов, в которых он участвует.

Нативный тау-белок обладает неупорядоченной структурой и имеет тенденцию принимать форму, подобную скрепке, в которой N- и C-концевые домены и повторяющиеся области расположены близко друг к другу [188]. Это заряженный и гидрофильный белок, что делает его хорошо растворимым и стабильным в водных средах в широком диапазоне рН и температуры. Однако при патологических состояниях, включая БА, гиперфосфорилированные (PP-tau) мономеры тау отделяются от микротрубочек и имеют тенденцию агрегировать сначала в олигомеры, а затем в нейрофибриллярные клубки, в которых части его домена, связывающего микротрубочки, преимущественно положительно заряженные, плотно упаковываются [207]. Функция тау-белка регулируется несколькими посттрансляционными модификациями, включая фосфорилирование, гликозилирование, изомеризацию, ацетилирование, O-гликозилирование, убиквитинирование, дезамидирование, метилирование и окисление [208,209]. В ходе БА его распределение претерпевает заметные

изменения, приводящие к образованию тау-включений в соматодендритном компартменте [210].

Фосфорилирование тау хорошо изучено. Белок содержит 80 предполагаемых сайтов фосфорилирования серина/треонина и 5 потенциальных сайтов фосфорилирования тирозина. В фосфорилировании тау принимают участие многочисленные киназы, принадлежащие к 4 разным классам. Совсем недавно было обнаружено, что GSK3 α , GSK3 β , MAPK13 и AMP-активированная протеинкиназа играет непосредственную роль в фосфорилировании тау *in vivo* в различных клеточных линиях [211,212]. Дефосфорилирование тау является важным фактором, влияющим на его сродство к микротрубочкам, тем самым регулируя его роль в деполимеризации микротрубочек. С другой стороны, aberrantное фосфорилирование (так называемое гиперфосфорилирование) в некоторых эпитопах (например, Thr181, Thr231, Ser202, Ser205, Ser214, Ser396, Ser404, Ser409 и Ser422), серьезно влияет на связывающую способность и стабилизирующие свойства тау-белка, что может приводить к повышенной склонности тау-белка к последующей олигомеризации и агрегации в парные спиральные нити и нейрофибриллярные клубки, которые характерны для группы нейродегенеративных заболеваний, называемых таупатиями, включая БА [188].

Многочисленные тау-мутации, вызывающие БА или другие таупатии, изучались на протяжении многих лет и могут быть либо миссенс-мутациями, либо нейтральными, либо представлять собой делецию. В зависимости от природы мутации и местоположения гена, мутация может напрямую нарушать способность тау-белка к связыванию с микротрубочками, тем самым увеличивая склонность к агрегации, или косвенно, влияя на сплайсинг тау-белка [188].

Гипотеза амилоидного каскада, которая доминировала в течение длительного времени [213,214], постулировала, что агрегаты A β инициируют каскад клеточных изменений, включая гиперфосфорилирование тау-белка, воспаление, окислительное повреждение митохондрий, дефицит митохондрий, высвобождение проапоптотических факторов, апоптоз нейронов, вызывая синаптическую недостаточность и потерю нейронов, нейротоксичность и

деменцию [174,215]. Однако справедливость гипотезы все чаще подвергалась сомнению [188,205,216]. Более того, появляется все больше данных о том, что основные патологические процессы уже имеют место за десятилетия до того, как были клинически диагностированы первые симптомы [217]. Новые теории, которые предполагают привлечение других факторов в качестве движущей силы развития БА, изучаются и исследуются более пристально [218]. Были предложены новые механизмы и новые гипотезы для объяснения развития и прогрессирования этого заболевания, включая гипотезу окислительного стресса, гипотезу клеточного цикла, гипотезу сосудов и холестерина, гипотезу нарушения передачи сигналов инсулина и другие [219]. В последнее время дисфункцию митохондрий рассматривают как один из самых ранних внутриклеточных процессов, вовлеченных во многие нейродегенеративные заболевания, включая БА [156,220,221].

1.3.3. Роль митохондрий при развитии БА, гипотеза митохондриального каскада.

В последнее время представлено множество доказательств важной роли митохондриальной дисфункции в сочетании с увеличением образования АФК, дефектами в митохондриальном биогенезе и транспорте / распределении, повторным появлением aberrантного клеточного цикла в нейронах и митофагией при развитии БА (так называемая гипотеза митохондриального каскада) [222].

Нейроны, постмитотические возбудимые клетки, имеют высокие энергетические потребности для поддержания потенциала покоя с помощью ионных насосов, высвобождения нейротрансмиттеров во время синаптических передач, коммуникации с другими нейронами и транспорта органелл [223,224]. Они почти исключительно полагаются на систему митохондриального окислительного фосфорилирования для удовлетворения своих энергетических потребностей. Кроме того, нейроны разделены на части, включая такие структуры, как: клеточное тело, аксон, дендриты и даже более специфические компартменты, которые являются синапсами, что делает правильное

распределение митохондрий основополагающим фактором для поддержания потребности в энергии в определенных местах внутри различных нейронных компартментов [225-227]. Митохондриальные дефекты включают избыток митохондриальных АФК, повреждения мтДНК, нерегулируемый транспорт митохондриального кальция, снижение окислительного фосфорилирования и продукции АТФ, деполяризацию мембран, уменьшение количества митохондрий и т.д. Все эти дефекты в совокупности вызывают значительное снижение жизнеспособности нейронов [228,229]. Решающая роль митохондрий в поддержке синаптической функции и сопутствующем возникновении нарушения продукции энергии митохондриями при БА, по-видимому, подтверждают гипотезу о том, что дисфункция митохондрий лежит в основе синаптической недостаточности при БА [230-236]. Понимание митохондриальной дисфункции и нацеливание на биоэнергетику при БА может стать новым подходом к лечению, обладающим большими перспективами для предотвращения и/или замедления развития БА [237].

1.3.4. Модельные системы для изучения БА.

Стремление к лучшему пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе БА, с ее разнообразием симптомов и сложным взаимодействием кофакторов, привело к разработке более простых эукариотических моделей, включая модели животных [238-242], *C. elegans* [243-245] и *Drosophila* [244,246,247].

Исследования БА далеко продвинулись благодаря использованию этих моделей, особенно в понимании механизмов агрегации А β и Р-tau и потери их функций. Однако, несмотря на новые достижения, эти модели оставались слишком сложными и не полностью воспроизводили патологию БА человека.

Используются различные модели для изучения патологий, связанных с БА. В частности, были исследованы химические особенности агрегации тау и появления структуры клубочков [248]. Рекомбинантный нативный тау слабо агрегирует *in vitro* из-за отсутствия посттрансляционных модификаций. Поэтому более

распространена модель рекомбинантного усеченного тау, имеющего только коровый домен, который агрегирует гораздо лучше [249]. Добавление в среду инкубации анионных кофакторов нивелируют поверхностный заряд нативного рекомбинантного тау и усиливают степень его агрегации [250]. Полианионные кофакторы, такие, как гепарин, с высокой эффективностью повышают степень агрегации фрагментов тау, содержащих домены, связывающие микротрубочки (K18 и K19) [250]. Известно также, что мутантный тау (P301L или deltaK280) имеет лучше экспонированный бета-лист, на основе которого и происходит агрегация [251]. Используя *in vitro* модели таупатий, были исследованы динамика фосфорилирования и механизмы агрегации тау в реальном времени, а также разработаны флуоресцентные биомаркеры и методы визуализации белковых агрегатов, позволяющие проследить основные этапы, приводящие к образованию NFT [252]. Разработка адекватной модели агрегации тау-белков не только *in vitro*, но и в живых клетках была бы полезна в исследованиях новых терапевтических биомаркеров и потенциальных лекарственных препаратов [248]. Поскольку внутриклеточные модификации тау могут быть многочисленны и разнообразны, их агрегация исследовалась на широком спектре тау-индуцированных клеточных линий, созданных в основном на базе клеток нейробластомы N2a [253], где агрегацию тау возможно отслеживать флуоресцентными методами посредством их окраски красителями Тиофлавин С или Конго красным. Агрегация целевых белков при этом усиливалась добавлением экзогенных агрегатов в среду инкубации клеток [254]. Такие исследования успешно воспроизвели агрегацию экспрессируемого тау внутри клеток и ассоциированную с этим цитотоксичность. Минусом модели, безусловно, является необходимость использования экзогенных красителей и иммунохимии, что не позволяет следить за процессом развития таупатии [248]. Клеточные модели, построенный на базе FRET-технологии экспрессировали GFP- и YFP-конъюгированный тау, а флуоресцентный сигнал появлялся в случае агрегации тау и пространственного сближения тэгов. С помощью описанной модели были исследованы основные этапы внутриклеточной агрегации тау, а также феномен межклеточной передачи агрегатов [255].

Наиболее продвинутыми можно считать модели БА и таупатий на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, способных отражать генетические особенности патогенеза в мозге больных [256]. Применение методов геномного редактирования к индуцированным стволовым клеткам серьезно продвинуло понимание вклада отдельных генов, а также нуклеотидных полиморфизмов в патогенез заболевания. Одним из достоинств описанной модели являлась возможность исследовать ранние стадии развития болезни и влияние генетических особенностей пациентов на патогенез. Индукция дифференцировки таких стволовых клеток позволила получить множество клеточных линий для изучения различных аспектов БА и таупатии [257]. Тем не менее, основным недостатком стволовых клеток в исследованиях патологий, связанных со старением, является их неспособность передавать возрастные маркеры пациентов, свойственные соматическим клеткам [258]. Связанные с возрастом изменения в нейронах, такие как сокращение теломер, дисфункция митохондрий и старение клеток не свойственно плюрипотентным стволовым клеткам [259]. Для обхода этих ограничений создаются комплексные подходы ускоренного клеточного старения [260], однако, они связаны со сложными генетическими и биохимическими манипуляциями, что снижает адекватность модели [261].

Клеточные модели и современные методики количественной оценки белковых взаимодействий внесли огромный вклад в понимание механизма агрегации тау и потери им функции, что содействовало разработке перспективных терапевтических средств и стратегий, наиболее популярные из которых включают в себя снижение гиперфосфорилирования тау через ингибирование киназ или активацию фосфатаз, активацию протеосомной деградации тау-белка, удаление агрегатов методом иммунотерапии и стабилизацию микротрубочек. Конечно, такие модели не дают представления о состоянии гетерогенной и сложно организованной нервной ткани, поэтому наиболее распространенными являются модели таупатий *in vivo*.

Исследования БА, часто связаны с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих патологическую форму тау. На таких моделях подробно

рассмотрена динамика распространения патологического тау-белка в разных отделах мозга и его влияние на когнитивные функции. Показано, что не только агрегация, но и присутствие патологических растворимых форм тау приводит к гибели нейронов [262]. У таких мышей нарушение синаптической передачи и когнитивных функций проявлялись задолго до появления NFT [263].

Зачастую трансгенные мыши экспрессируют человеческий тау с мутациями, приводящими к таупатии, однако такие модели скорее относятся к генетическим формам патологий и существенно отличаются от спорадической, наиболее распространенной формы БА и таупатий [264].

Продвинутой моделью считается экзогенное интрацеребральное введение агрегатов тау-белка, характерных для БА, запускающее каскадное развитие патологии в мозге [265] не трансгенных мышей. Благодаря такой модели были получены современные данные о межклеточном распространении и прион-подобном действии патологических форм тау [265]. На мышинных моделях впервые показаны нарушения функций нейронов на ранней стадии развития БА, когда не происходит детектируемого накопления патологических белков и когнитивной дисфункции [266]. Показано появление префиламентных агрегатов тау-белка, зафиксирована дисфункция митохондрий и повышение уровня окислительного стресса в нейронах [267]. Кроме того, показано, что агрегаты тау не всегда вызывают повреждения клеток, приводящие к патологическим изменениям в мозге [268].

Недостатком мышинных моделей, безусловно, является тот факт, что исследования спорадической формы имеют ограничения, связанные со временем наступления старости у мышей [268].

Более репрезентативной моделью, характеризующей связанные с возрастом изменения в нервной ткани и сопутствующие нарушения когнитивных функций, является трансгенное насекомое *Drosophila melanogaster*, экспрессирующее патологические формы тау-белка [269]. *D. melanogaster* обладает такими преимуществами, как относительно небольшой размер аннотированного генома, короткий жизненный цикл и относительная дешевизна разведения. Кроме того, *D.*

melanogaster обладает некоторыми простыми поведенческими реакциями, что роднит ее с высшими организмами, а также в норме экспрессирует нативные тау и амилоидные белки [270]. Из модели БА на основе *D. melanogaster* выделяют первичную культуру нейронов [271], а также к организму применимы методы флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии [272].

На модели *D. melanogaster*, экспрессирующей человеческий тау, показано влияние нейродегенерации на циркадные циклы в организме [273], а также снижение стабильности микротрубочек при нормальном уровне экспрессии патологической формы тау [274].

Основным недостатком модели является невозможность исследования комплексных процессов и взаимодействия тканей в мозге из-за разности строения центральной нервной системы мух и высших животных [275].

С момента своего создания в 1974 году, модель *C. elegans* приобрела огромную популярность в качестве модельной системы в биологии. Причина заключается в коротком репродуктивном жизненном цикле, состоящем из 3 основных стадий эмбриогенеза, развития личинок и зрелости, всего 3 дня; небольшой размер; и короткая продолжительность жизни ~2 недель [276]. Оплодотворенные яйца, откладываемые после эмбриогенеза, вывода и животных, проходят через 4 личиночные стадии (L1-L4), каждая из которых отмечена линькой, что в итоге приводит к половозрелому взрослому гермафродиту с 959 соматическими клетками [276]. Одна треть этих соматических клеток составляют нервную систему. Ее полезность в качестве модельной системы еще более усиливается тем фактом, что известна полная нейронная линия и все синапсы, произведенные нейронами [276]. Кроме того, гены, участвующие в регуляции физиологии нейронов у *C. elegans*, демонстрируют высокую степень гомологии с генами в нервной системе позвоночных [276]. База данных OrthoDisease, основанная на 2466 генах болезней человека, предсказала более 500 ортологов у *C. elegans* [276]. Эта высокая степень гомологии предоставила биологам уникальную возможность подвергнуть эту модельную систему стандартным методам идентификации новых генов. Промоторы, стимулирующие клеточно-

специфическую экспрессию, вызывают различные фенотипы, которые могут быть легко проанализированы [276]. *C. elegans* был использован для моделирования БА. В частности, нейротоксичные пептиды, Аβ42 и тау, способствуют подобной нейродегенерации у *C. elegans* [277].

Сравнение списка регулируемых генов из *C. elegans* с 60 генами, связанными с БА у человека, подтвердило совпадение 8 генов [278]. Несколько трансгенных линий *C. elegans*, экспрессируют тау человека в паннейронах. Эти черви имели поведенческие отклонения в зависимости от экспрессии тау. Нокдаун тубулин-специфического шаперона или подмножества тубулина приводил к повышенной тау-токсичности даже у тау-трансгенных червей с низкой экспрессией, у которых не было поведенческих отклонений [279]. Трансгенный *Caenorhabditis elegans*, экспрессирующий мутант 2N4R-TauA152T, был подвержен двигательным дефектам, нейродегенерации и ускоренному старению [280]. В моделях БА, экспрессирующих как Аβ42, так и тау в *Caenorhabditis elegans* стимуляция митофагии предотвращала когнитивные нарушения, посредством PINK-1, PDR-1 или DCT-1 зависимых путей [281].

Действительно, исследования *C. elegans* расширили наше понимание процесса старения и многих заболеваний человека. Хотя основным преимуществом низших животных моделей, таких как *C. elegans*, в раскрытии молекулярных путей, вызывающих эти заболевания, является наличие сильных генетических и визуализирующих инструментов в сочетании с короткой продолжительностью жизни и низкой стоимостью, модели более высших животных (например, мыши или крысы) имитируют нервную систему человека более близко [276].

1.3.5. Необходимость упрощения моделей.

В исследованиях, для большего понимания БА, в основном используют человеческие клеточные линии и модели трансгенных мышей. Тем не менее, модели дрожжевых клеток играют все более важную роль в раскрытии основных аспектов БА [282-285].

Поиски простой модели заставили исследователей обратить внимание на одноклеточные дрожжи, простейшие эукариотические организмы. Высокая степень сохранности различных фундаментальных биологических процессов, включая рост и деление клеток, функции органелл, энергетический метаболизм, протеостаз, передачу сигналов, реакцию на стресс, перенос везикул, ход клеточного цикла, эндоцитоз, старение и гибель клеток [286] делают дрожжи многообещающей моделью для исследования БА [287]. Более того, 31% генов дрожжей имеют человеческие ортологи [35], что дает дополнительную привлекательность возможным исследованиям с использованием этой модели.

Дрожжевые модели обладают большими преимуществами по сравнению с другими моделями заболеваний, позволяя использовать быстрый и относительно простой метод установления ассоциаций ген-белок-функция, в основном благодаря простоте, короткому жизненному циклу, недорогим методам культивирования, дающим большое количество генетически однородных клеток, восприимчивости к простым генетическим манипуляциям, а также доступности мощных геномных и протеомных инструментов и высокопроизводительных методов скрининга, что усиливает обоснованность использования дрожжей в качестве ценной модели БА [286,288].

Клетки дрожжей обладают многими консервативными биологическими процессами, такими как прогрессирование клеточного цикла, обмен белков, везикулярный перенос и передача сигнала. Основным преимуществом использования дрожжей является их меньшая сложность по сравнению с моделями млекопитающих. Большинство исследований было проведено на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Пекарские дрожжи *S. cerevisiae* достигли статуса идеального одноклеточного эукариотического модельного организма благодаря простоте использования, как в классической, так и молекулярной генетике, короткому времени генерации, наличию человеческих ортологов, большой базе знаний и собранных данных, доступных различных челночных векторов для быстрого конструирования клонов в дрожжах, амплификации в *E.coli* и экспрессии в нейронах [289]. Этот модельный организм стал отличным

средством скрининга соединений, связанных с БА. Кроме того, тау-белок и А β не имеют функциональных дрожжевых ортологов. Следовательно, гетерологическая экспрессия тау-белка и А β может быть высокоинформативной и даст полезную новую информацию о патологическом действии этих белков *in vivo*.

Исследования А β в дрожжах были в основном сфокусированы на процессинге APP *in vivo*, локализации А β , олигомеризации и токсичности. Чтобы исследовать местоположение и взаимодействия А β ₄₂, к нему был присоединен GFP. Помимо индукции дефекта роста, А β ₄₂ также вызывал реакцию теплового шока [290]. Последнее соответствует данным, полученным от пациентов с БА, которые указывают на то, что экспрессия белка теплового шока повышена при БА в качестве защитной меры [291]. После того, как в дрожжах были гетерологически экспрессированы человеческие секретазы, был дан новый толчок пониманию процесса обработки APP человека. Логическим следствием этого стало открытие ингибиторов VACE1 и подробное изучение индивидуальной функции каждого компонента комплекса γ -секретазы [292,293]. В последнее время в литературе приводится огромное количество сведений о наибольшей токсичности олигомерных форм пептида А β , по сравнению с амилоидными фибриллами. В результате наиболее ранние стадии олигомеризации А β попали под более пристальное внимание исследователей. В этом деле также оказались актуальны дрожжевые модели. Они позволили более подробно изучить как олигомеризацию А β на различных стадиях, так и молекулярные взаимодействия, связанные с агрегацией. При всем этом, дрожжевые модели крайне удобный инструмент для подбора потенциальных терапевтических соединений, направленных на патологические процессы, связанные с агрегацией. В другой дрожжевой модельной системе были исследованы начальные стадии олигомеризации А β ₄₂ [294] путем слияния пептида А β ₄₂ со средним и С-терминальным доменом Sup35. Используя эту репортерную систему, было показано, что дрожжевой шаперон Hsp104, проявляющий в других дрожжевых моделях нейродегенеративных заболеваний стабилизирующие свойства, препятствующие выпадению белков в агрегаты, судя по всему, при БА проявляет

противоположные свойства и препятствует уже дезагрегации и деградации агрегатов Аβ. Олигомеризация Аβ также была предметом исследования с использованием репортера, состоящего из фрагмента Аβ, слитого с GFP. Было показано, что слитый Аβ-GFP вызывает небольшое, но заметное снижение роста дрожжей и активирует реакцию теплового шока. Скрининг генетических модификаторов позволил идентифицировать 40 генов, способных модулировать токсичность Аβ [188]. Среди них 12 имели гомологи у людей, 3 относились к клатрин-опосредованному эндоцитозу и 7 функционально связаны с цитоскелетом. Любопытным является факт, что все предшествующие гены имели супрессорные свойства в отношении токсичности Аβ. Кроме того было установлено их взаимодействие с известными факторами риска.

Дрожжи также использовались в качестве модели для скрининга разработанных соединений [295]. Клетки дрожжей, конститутивно продуцирующие нативный Аβ, направленный на секреторный путь, демонстрировали более низкую скорость роста, более низкий выход биомассы, более низкую скорость дыхания, повышенный окислительный стресс, признаки дисфункции митохондрий и дисфункции убиквитин-протеасомной системы [284,296].

Скрининг на основе дрожжей выявил, что клиохинол и дигидропиримидинтионы являются соединениями, способными снижать токсичность Аβ синергетическим, зависимым от металла способом с помощью различных механизмов, таких как увеличение оборота Аβ, восстановление транспорта везикул и защиты от окислительного стресса [297,298]. Эти исследования и клинические исследования подчеркивают тот факт, что скрининг соединений на основе дрожжей чрезвычайно важен для выявления перспективных молекул, которые снижают токсичность Аβ.

Исторически в области изучения БА доминировали исследования, подтверждающие, что Аβ играет основную роль в патогенезе. Только после обнаружения нескольких мутаций МАРТ в FTDP-17 исследования тау-белка получили значительное и обоснованное распространение. Таким образом, до

настоящего времени для БА было опубликовано лишь ограниченное количество исследовательских статей о патологических эффектах тау-белка с использованием дрожжей *S. cerevisiae* в качестве модельного организма. При избыточной экспрессии у *S. cerevisiae* тау становится гиперфосфорилированным и приобретает несколько патологических фосфоэпитопов. Было показано, что протеинкиназы Pho85 и Mds1, дрожжевые ортологи таукиназ человека Cdk5 и GSK3 β , соответственно, играют ключевую роль в модулировании фосфорилирования тау [188].

Было обнаружено, что окислительный стресс и митохондриальная дисфункция, независимо от фосфорилирования тау, также значительно индуцируют активность тау в клетках дрожжей [299]. Стоит также упомянуть, что индуцирование окислительного стресса привело к дефосфорилированию тау в соответствии с другими результатами, полученными на нейронах человека, крысы и мыши [300]. Модели дрожжей были полезны для понимания модификаций тау [208]. С помощью анионообменной хроматографии тау также выделяли из штамма *S. cerevisiae* rho85 Δ , поддерживая его гиперфосфорилирование [301]. Возможность очистки этих стабильных, патологически релевантных структур тау из клеток *S. cerevisiae* открыла путь для использования очищенного тау-белка в качестве источника антигена для иммунизации мышей [302]. Эта стратегия дает значительное преимущество по сравнению с выделением тау на основе кишечной палочки и выработкой антител, поскольку тау не подвергается посттрансляционной модификации в бактериальных клетках. Антитело, разработанное иммунизацией мышей 2N/4R тау, выделенное из штамма *S. cerevisiae* rho85 Δ , способно обнаруживать как моно-, так и олигомерный белок тау [302]. Это антитело недавно было успешно внедрено на платформе цифрового иммуноферментного анализа (ELISA) и способно определять аттомолярные концентрации белка тау, открывая, таким образом, потенциал тау-белка как биомаркера БА на основе сыворотки. Таким образом, за последнее десятилетие дрожжи превратились из надежного модельного организма, просто используемого для более глубокого понимания патологических особенностей тау, таких как

агрегация и фосфорилирование, в очень подходящую платформенную модель для производства антигенов, связанных с заболеванием.

Однако, несмотря на то, что дрожжи являются полезной и мощной модельной системой, у них есть свои естественные ограничения. Межклеточные взаимодействия, синаптическая передача, аксональный транспорт, глиально-нейрональные взаимодействия, иммунные и воспалительные реакции, а также специализация нейронов играют важную роль в нейродегенерации, а когнитивные аспекты БА не могут быть воспроизведены у дрожжей. Тем не менее, несмотря на эти ограничения, дрожжевые модели играют все более важную роль в выявлении основных фундаментальных процессов при БА и скрининге родственных БА соединений [147].

Хотя *S. cerevisiae* является наиболее распространенной моделью, этот факультативный анаэроб с немногочисленными, небольшими, плохо структурированными митохондриями не является биоэнергетическим эквивалентом нейронов, требующих высокой энергии, почти исключительно полагаясь на митохондриальное окислительное фосфорилирование. В этом отношении *Yarrowia lipolytica*, нетоксичный аэробный вид дрожжей с хорошо охарактеризованным геномом, имеющим статус GRAS (обычно считается безопасным), метаболическим разнообразием и гибкостью, быстрыми темпами использования, уникальными биосинтетическими и секреторными способностями, энергетическим метаболизмом, в значительной степени напоминающий таковой у млекопитающих и восприимчивый к инструментам молекулярной генной инженерии [151], может быть многообещающей альтернативной моделью для расшифровки митохондриально-связанного патогенеза БА.

Таким образом, основной целью работы было создание, улучшенной модели дрожжей на основе *Y. lipolytica* для выявления прямого влияния экспрессии амилоида A β 42 на структуру и динамику митохондрий, редокс-статус, и жизнеспособности клеток, а также на биоэнергетику на митохондриальном уровне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реагенты

В работе использовались бактоагар, бактопептон, дитиотреитол (DTT), дрожжевой экстракт и Tris (ultra-pure) («Becton Dickinson and Company», США); ампициллин, антимицин А, 3-амино-1,2,4-триазол, глюкоза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (КЦХФ), маннитол, олигомицин, пируваткиназа, ротенон, P5-ди(аденозин-5)пентафосфат, сукцинат, фосфоенолпируват, ЭГТА, ЭДТА, ADP, Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody, АТР, DABCO, LiAc, MgCl₂, Mowiol 4-88, NaCl, NADP, (NH₄)₂SO₄, (Ap5A), Phenol Red и *tert*-butyl hydroperoxide («Sigma-Aldrich», США); зимолиаза и Coomassie G-250 («MP Biomedicals», США); сафранин О, CaCl₂, K₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, NaCl, («Merck», Германия); 10× DNA Loading Dye, 10× G+ buffer, 10× O+ buffer, 10× R+ buffer, BSA, Dihydroetidium, Sytox Green Dead Cell Stain, DMSO, Gene Jet Gel Extraction Kit, Gene Jet Plasmid Miniprep Kit, Gene Ruler 100 bp+, Gene Ruler 1 kb, Glycogen, Mitotracker Red CmxRos, NotI эндонуклеаза рестрикции, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Phusion High-Fidelity PCR Kit, PvuII эндонуклеаза рестрикции, Rapid DNA Ligation Kit, RNase-A, SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate и XhoI эндонуклеаза рестрикции («Thermo Fisher Scientific», США); агар, агароза LE2, бромистый этидий и глицерин (ultra-pure) («Helicon», Россия); LB BROTH Miller (Luria–Bertani) и NaOAc («Amresco», США); BbsI (BpiI) эндонуклеаза рестрикции («New England Biolabs», США); сорбитол («Диам», Россия); олигонуклеотиды («ДНК-Синтез», Россия). SkQThy (10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинолил-6)-децил(трифенил)фосфоний бромид) был любезно предоставлен Д.С. Есиповым из НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ.

2.2. Модельные организмы

В работе использовались дрожжи, облигатные аэробы *Yarrowia lipolytica*, штамма polf, ауксотрофного по урацилу и лейцину и созданные мутанты данного штамма:

- 1) *Y. lipolytica* polf pZ-0;
- 2) *Y. lipolytica* polf pZ-eGFP;
- 3) *Y. lipolytica* polf pZ-HBx;
- 4) *Y. lipolytica* polf pZ-HBx-eGFP;
- 5) *Y. lipolytica* polf pZ-HBx120;
- 6) *Y. lipolytica* polf pZ-HBx120-eGFP;
- 7) *Y. lipolytica* polf pZ-A β 42;
- 8) *Y. lipolytica* polf pZ-eGFP-A β 42;
- 9) *Y. lipolytica* polf pZ-A β 40;
- 10) *Y. lipolytica* polf pZ-eGFP-A β 40;

Также в работе использовались бактерии *Escherichia coli* штамма XL1-Blue.

Создание модельных организмов.

Дизайн праймеров проводили на основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих HBx, HBx120, A β 42, A β 40 и eGFP (green fluorescent protein) таким образом, чтобы последовательность продукта ПЦР несла в себе полную исходную нуклеотидную последовательность целевых генов. Каждый праймер состоял из участка, комплементарного целевым генам; последовательности нуклеотидов, образующих липкий (непалиндромный) конец после рестрикции; сайта рестрикции BbsI (BpiI); и нуклеотидов для уравнивания GC состава и температуры отжига. При помощи программы SnapGene определили отсутствие сайтов рестрикции BbsI в последовательностях целевых генов; отсутствие аутокомплементарности концов ПЦР-продукта.

Для создания целевых генетических конструкций выбрана плазида pZ-express⁺⁺ с гибридным, зависимым от фазы роста промотором hp4d и транспозонной последовательностью ZETA, имеющей множественную гомологию в геноме *Yarrowia lipolytica*, что при рекомбинации обеспечивает

высокую копияность плазмиды и, как следствие, высокий уровень экспрессии целевого белка. Также плазида имеет ген резистентности к ампициллину и фактор прототрофности по урацилу URA3 из генома *Y. lipolytica*.

Вставку ПЦР-продукта в вектор pZ-express++ проводили по методу Golden Gate Cloning с использованием рестриктазы II типа BbsI и T4 лигазы. Была произведена встройка в вектор последовательностей HBx, HBx-eGFP, HBx120, HBx120-eGFP, A β 42, eGFP-A β 42, A β 40, eGFP-A β 40. Данные генетические конструкции на основе плазмиды pZ-express++ и вышеуказанных вставок созданы впервые. Было осуществлено секвенирование плазмид, которое не выявило мутаций в целевых вставках.

Впервые была осуществлена трансфекция генетических конструкций pZ-HBx, pZ-HBx-eGFP, pZ-HBx120, pZ-HBx120-eGFP, pZ-A β 42, pZ-eGFP-A β 42, pZ-A β 40 и pZ-eGFP-A β 40 в дрожжи *Y. lipolytica* методом электропорации при 1500V. Компетентные клетки были получены путем последовательной инкубации с 0,1M TE-LiAc, 2,5M Dithiothreitol (DTT) и промывкой с mQ и 1M Sorbitol. Трансфицированные дрожжи высевали на чашки Петри с селективной средой, не содержащей урацил, и антибиотиками хлорамфениколом и/или G418, к которым *Y. lipolytica* имеет резистентность.

Условия выращивания бактериальных клеток.

Наращивание биомассы бактерий *E. coli*, производилось посевом ночной культуры в среде LB с ампициллином при 37 °C. После трансформации клетки высевали на чашки Петри со средой LB и ампициллином в качестве фактора селективности, после чего инкубировали в течение 16 часов при 37 °C.

Условия выращивания дрожжевых клеток.

Клетки *Y. lipolytica* выращивали, как описано ранее [303] и собирали в ранней экспоненциальной фазе роста.

Трансфицированные дрожжи *Y. lipolytica* высевали на чашки Петри с селективной средой, не содержащей урацил, и антибиотиками хлорамфениколом и/или G418, к которым *Y. lipolytica* имеет резистентность, и инкубировали 60-72 часа при 28 °C.

2.3. Аналитические методы

Вестерн-блоттинг

Для выделения белка клетки, собранные в фазе экспоненциального роста ($OD = 0,6$), инкубировали в течение 30 минут при $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ с 10 ед./мл зимолиазой, осаждали (5600 g, в течение 5 мин), ресуспендировали в буфере для лизиса TNE (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, pH 7,5) с добавлением 0,1 M Na_3VO_4 (ингибитор протеаз), замораживали в жидком азоте и разрушали 0,4 мм стеклянными бусами. Затем неразрушенные клетки и дебрис осаждали (500 g, 5 мин). Супернатант (200 мкл), содержащий выделенные белки, разбавляли с 200 мкл 2x SDS-гель-загрузочного буфера (50 mM Tris-HCl, 10 mM дитиотреитола, 2% SDS, 10% глицерина, 0,1% Coomassie G-250, pH 6,8) и кипятили 5 мин.

Вестерн-блоттинг проводили следующим образом: белки анализировали в 15% SDS-полиакриламидном геле с помощью PageRuler™ Prestained Protein Ladder (каждая лунка содержала 5 мкг общего белка); белки переносили на мембрану PVDF. Детекцию eGFP и HBx-eGFP проводили с первичными кроличьими поликлональными антителами к GFP (Anti-GFP antibody, Evrogen, Россия) и вторичными кроличьими антителами (Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich, США). Иммуноблот был проявлен с использованием субстрата SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, США) в системе Chemi-Doc Touch Imaging (BioRad, США).

Визуализация митохондрий в клетках дрожжей *Y. lipolytica*.

Морфология митохондрий созданных мутантов дрожжей *Y. lipolytica* и локализация агрегатов гетерологических белков при максимальном уровне их экспрессии была изучена методами микроскопии структурированного освещения (SIM) и широкопольной флуоресцентной микроскопии. Для этого использовали полученные нами мутанты, несущие генетические конструкции из целевых белков, слитых с eGFP.

Визуализация митохондрий в клетках *Y. lipolytica* с помощью микроскопии структурированного освещения. Для окрашивания митохондрий клетки *Y.*

lipolytica нагружали 500 нМ MitoTracker Red CmxRos в течение 30 мин в 50 мМ PBS, pH 5,5. Окрашенные клетки фиксировали 2,5 % PFA в течение 10 мин, затем промывали 50 мМ PBS, pH 5,5, и помещали в среду, содержащую 24 % глицерина, 9,6 % Mowiol и 2,5 % DABCO в 0,1 М Tris, pH 8,5. Визуализация проводилась с помощью инвертированного моторизованного микроскопа Eclipse N-SIM с системой автофокусировки PerfectFocus (Nikon, Токио, Япония). Система микроскопии была оснащена 100-кратным объективом Apo TIRF Oil (NA1.49), диодным лазером с длиной волны 488 и 561 нм и охлаждаемой EM-CCD-камерой iXonDU-897E (Andor, Белфаст, Северная Ирландия, Великобритания) под контролем программного обеспечения NIS-Elements v. 5.11 (Nikon, Токио, Япония). Получение изображения, реконструкция SIM-изображения и выравнивание данных выполнялись с использованием NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония). Затем была выполнена 3D-реконструкция наборов данных SIM x, y и z (z-стеки) с использованием программного обеспечения ICY v.2.5 (Группа анализа биологических изображений, Институт Пастера, Париж, Франция).

Визуализация митохондрий в клетках *Y. lipolytica* с помощью широкопольной флуоресцентной микроскопии. Для окрашивания митохондрий клетки *Y. lipolytica* нагружали 200 нМ MitoTracker Red CmxRos в течение 30 мин в 50 мМ PBS, pH 5,5. Окрашенные клетки высевали на 96-луночный планшет для микроскопии. Серийные оптические срезы были получены с использованием инвертированного моторизованного микроскопа Eclipse Ti2 (Nikon, Токио, Япония) с системой автофокусировки Perfect Focus, оснащенного 100-кратным объективом CFI Plan Apo Vc Oil (NA 1.4), диодным источником света 488 и 561 нм и CMOS-камерой с воздушным охлаждением DS-Qi2 (Nikon, Токио, Япония) под управлением программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония). Деконволюцию выполняли по алгоритму Ричардсона-Люси, включенному в пакет NIS-Elements. 3D-реконструкция была выполнена с использованием программного обеспечения Icy версии 2.0.2.0 [304].

Методом проточной цитометрии с двойным окрашиванием исследовали уровень окислительного стресса в контрольных клетках и мутантах, а также

действие прооксиданта *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-ВНР) и митохондриально-направленного антиоксиданта SkQThy (Рис. 7). Одновременно анализировали выживаемость клеток.

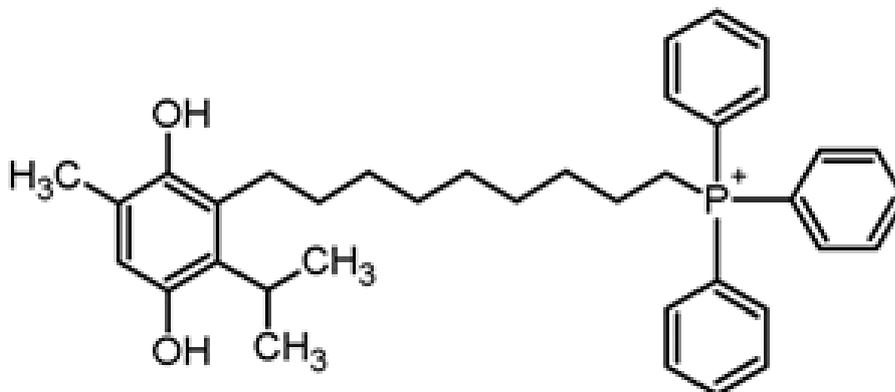


Рис. 7. 10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинолил-6)-децил(трифенил)фосфоний бромид (SkQThy)

Клетки выращивали, как описано ранее. Где указано, клетки инкубировали в течение 1 часа с 250 нМ SkQThy, промывали, добавляли 750 мкМ *t*-ВНР, инкубировали в течение 2х часов, вновь осаждали, промывали и нагружали красителями 5мкг/мл Dihydroethidium (DHE), для детектирования супероксид-анион радикала, и 30 нМ Sytox Green (маркер на клеточную смерть, проникает только в клетки с нарушенной цитоплазматической мембраной). Измерения проводились на цитометре BD FACSCalibur или Beckman Cytoflex.

Выделение митохондрий дрожжей *Y. lipolytica*.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования по методике, разработанной в нашей лаборатории [149]. О качестве выделенных препаратов митохондрий судили по величинам дыхательного контроля, характеризующим степень сопряженности дыхания и фосфорилирования.

Анализ функциональных свойств митохондрий, выделенных из мутантов дрожжей *Y. lipolytica*.

Скорость поглощения кислорода определяли полярографическим методом в ячейке (рабочий объем 1 мл) с закрытым кислородным электродом типа Кларка.

Основная среда инкубации содержала 0,6 М маннит, 2 мМ трис-фосфат, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА.

Об интенсивности работы комплексов дыхательной цепи судили по скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 и действии на нее специфических ингибиторов: комплекса I – ротенона и комплекса III – антимицина А (АА). Основная среда инкубации была дополнена 1 мМ ADP и митохондриями (0.5 мг белка/мл).

Потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране, регистрировали на спектрофотометре Beckman Coulter DU-650 (США), используя двуволновой режим (511–533 нм) с Сафранином О в качестве потенциалзависимого зонда. Основная среда инкубации была дополнена 20 мкМ Сафранином О и митохондриями (0.5 мг белка/мл).

Набухание митохондрий регистрировали спектрофотометрически на спектрофотометре Varian Cary 300 Bio (США) по уменьшению оптической плотности митохондриальной суспензии при 540 нм. Основные среды инкубации были дополнены 40 мМ KCl и митохондриями (0.2 мг белка/мл).

Синтез АТФ митохондриями регистрировали, как описано [305]. Метод основан на небольшом сдвиге рН при превращении ADP в АТФ, поэтому основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом + 5 мМ трис-малатом, 25 мкМ феноловым красным (рН-зависимым красителем), 6 мкМ Ар5А (ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями (0.2 мг белка/мл). Среда инкубации и добавляемые растворы были тщательно доведены до значения рН 7,1. Синтез АТФ, инициированный добавлением 500 мкМ ADP, определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Beckman Coulter DU-650 (США), используя пару длин волн 557 и 618 нм.

Образование пероксида водорода митохондриями определяли флуорометрически путем измерения окисления Amplex Red до резорурфина, сопряженного с ферментативным восстановлением пероксида водорода пероксидазой хрена. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-сукцинатом, 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 М.Е./мл), 6 мМ

аминотриазолом (ингибитором каталазы) и митохондриями (0,2 мг белка/мл). Флуоресценцию резорурфина, продукта окисления Amplex Red, измеряли при комнатной температуре с помощью спектрофлуорофотометра Shimadzu RF 5301 PC (Япония) при 563/587 нм длины волн возбуждения и испускания, соответственно. Сигналы калибровали с помощью 0–5 мкМ H_2O_2 (определено по поглощению при 240 нм).

Содержание белка определяли по методу Брэдфорда [306].

2.4. Статистический анализ.

Если не указано иное, все эксперименты с митохондриями дрожжей проводились не менее трех раз. Для анализа митохондриальной морфологии в каждом эксперименте исследовали не менее пятидесяти клеток. Статистический анализ проводили с использованием одностороннего теста ANOVA с апостериорным тестом Тьюки HSD. Данные были представлены как среднее \pm S.E. не менее чем в трех независимых повторах.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Создание и первичная характеристика дрожжевых моделей, экспрессирующих НВх и Аβ42.

Решена одна из основных научных задач исследования - создана простая и адекватная дрожжевая модель гетерологической экспрессии НВх и Аβ42 на основе мутантов дрожжей *Y. lipolytica*. Эти дрожжи как нельзя лучше подходят для этой задачи: сохраняя все преимущества дрожжей, они обладают рядом уникальных преимуществ (Рис. 8). Использованный в работе штамм P01f сохраняет все преимущества дрожжей *Y. lipolytica*, но, в отличие от дикого штамма, ауксотрофен по урацилу и лейцину и имеет делецию гена *Xpr2*, кодирующего внеклеточную протеазу, что позволяет использовать селективные среды для выращивания мутантов.

Генетические конструкции для трансформации дрожжей были созданы на базе интегративной плазмиды pZexpress++ длиной 5000 п.н., содержащей ген устойчивости к ампициллину для выращивания плазмиды в бактериях, участки рекомбинации Zeta для встраивания целевых генов в геном *Y. lipolytica*. Гены целевых белков были помещены под гибридный квазиконститутивный промотор hp4d. Фактором прототрофности был выбран ген *URA3*, позволяющий дрожжам *Y. lipolytica* P01f расти на средах, не содержащих урацил. Целевые гены были клонированы в вектор методом Golden Gate cloning, подразумевающим объединение в одну стадию реакции рестрикции и лигирования продуктов рестрикции, поскольку липкие концы, оставляемые рестриктазой II типа BpiI были спроектированы так, чтобы при лигировании они отжигались в строго определенном месте (Рис. 9).

Общие преимущества дрожжей

- Достаточно простые эукариотические одноклеточные организмы
- GRAS статус (обычно считаются безопасными)
- Разработанный генетический инструментарий, включая различные модификации геномного редактирования

Уникальные преимущества *Yarrowia lipolytica*

- Полностью компетентная энергозапасующая дыхательная цепь с участием комплекса I
- Способность утилизировать с высокой эффективностью широкий спектр субстратов
- Уникальная способность переносить экстремальные условия (кислотность, щелочность, гиперсоленость, загрязнение тяжелыми металлами и др.)
- Уникальные биосинтетическая и секретирующая способности
- Кроме того, Po1f штамм устойчив к хлорамфениколу

Рис. 8. Преимущества дрожжей *Y. lipolytica* как модельного организма

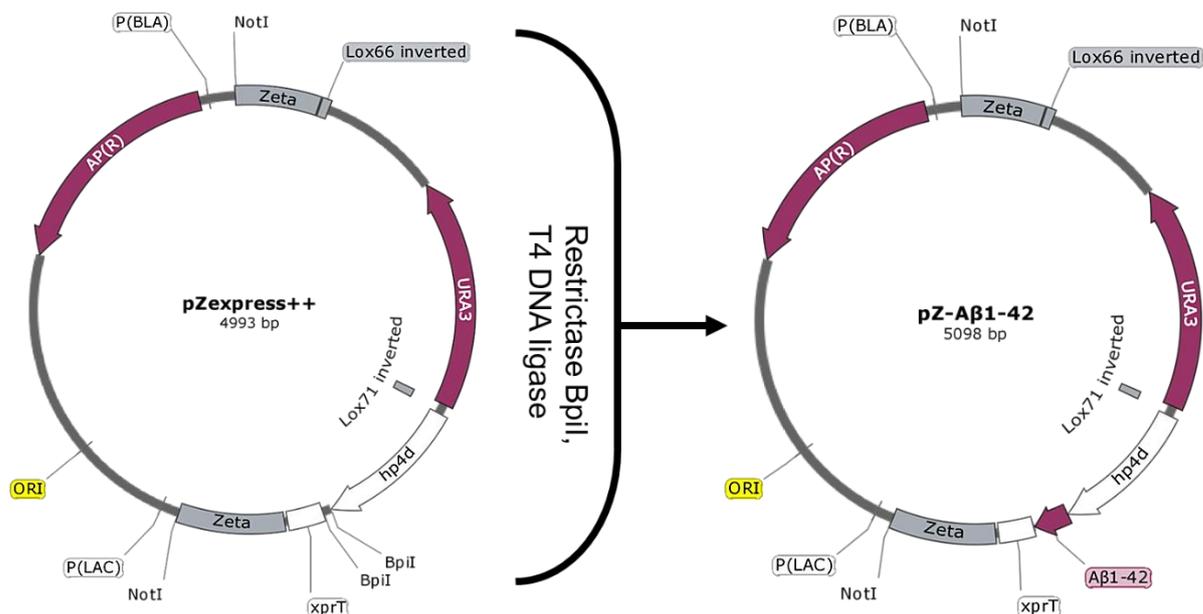


Рис. 9. Схема процесса рестрикции-лигирования продукта ПЦР в вектор pZexpress++

Впервые были созданы генетически модифицированные дрожжи *Y. lipolytica*, способные экспрессировать: A β 42, eGFP-A β 42, A β 40, eGFP-A β 40, пептиды, содержащие 42- и 40- С-концевых аминокислотных остатка бета-амилоида соответственно, а также их fusion-конструкции с зеленым флуоресцентным белком eGFP, слитых с N-концов; HBx, HBx-eGFP, HBx120, HBx120-eGFP, состоящие из последовательности белка вируса гепатита В и его усеченной с С-конца по 120 аминокислоте форме, которая, согласно литературным данным, не имеет прямого митохондриально-направленного действия, а также их fusion-конструкции с зеленым флуоресцентным белком eGFP, слитых с С-концов.

Была исследована активность hr4d-промотора в различных условиях и ее влияние на экспрессию целевых белков. Уровень экспрессии определяли, используя штамм Po1f pZ-eGFP, измеряя интенсивность флуоресценции eGFP методом проточной цитометрии.

Для сравнения скоростей роста разных штаммов был создан контрольный штамм *Y. lipolytica* Po1f pZ-0, не имеющий вставки целевого белка, но несущий интегративную плазмиду pZexpress++, содержащую в качестве фактора прототрофности ген URA3.

Методом вестерн-блоттинга доказана нормальная экспрессия белка HBx в исследуемых мутантах. В связи с недоступностью антитела к HBx, использовали антитела к eGFP, белку слитому с HBx. Показано, что в суммарных белках, выделенных из мутантов pZ-eGFP и pZ-HBx-eGFP, исследуемые белки соответствуют своей ожидаемой молекулярной массе (Рис. 10).

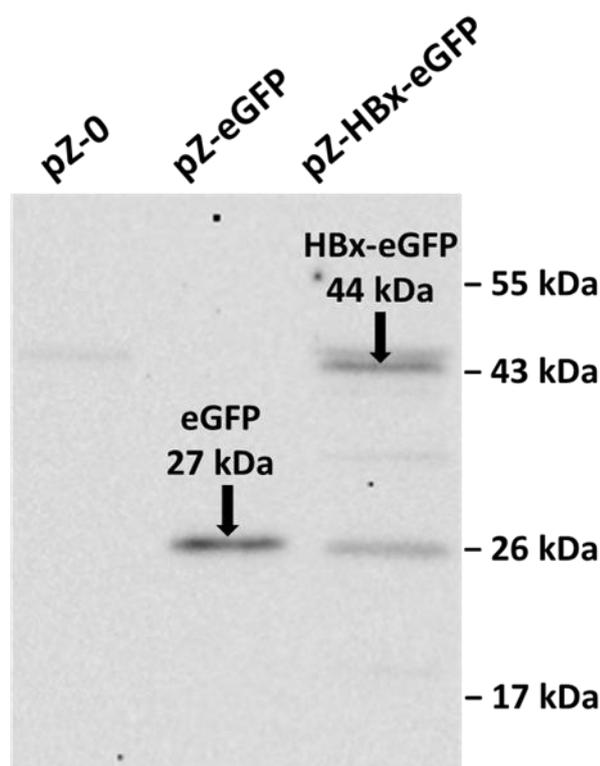


Рис. 10. Вестерн-блот анализ штаммов *Y. lipolytica* pZ-0, pZ-eGFP и pZ-HBx-eGFP. Белки eGFP и HBx-eGFP указаны стрелками. Справа показаны молекулярные массы белков-маркеров

3.2. Морфология митохондрий дрожжевых клеток экспрессирующих HBx.

Для визуализации митохондрий в клетках использовали микроскопию структурированного освещения и широкопольную флуоресцентную микроскопию с улучшенным разрешением.

Клетки контрольного штамма (pZ-0) содержали многочисленные митохондрии, образующие митохондриальный ретикулум (Рис. 11, 12).

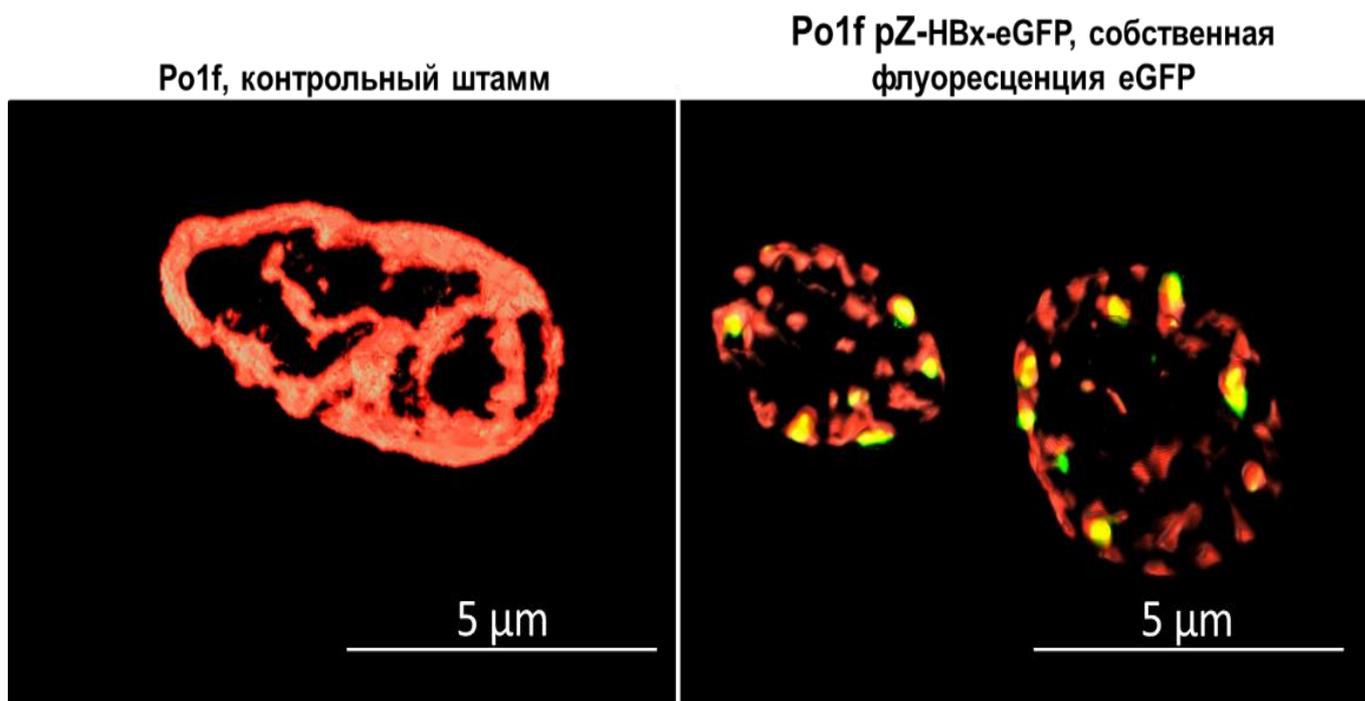


Рис. 11. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих NBx и локализация агрегатов NBx. Микроскопия структурированного освещения. Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmxRos, показаны красным

В мутантах, экспрессирующих eGFP и NBx120-eGFP морфология митохондрий не была изменена, а зеленая флуоресценция распространена в цитозоле диффузно, агрегаты отсутствовали (Рис. 11). Напротив, в мутантах, экспрессирующих NBx-eGFP, агрегаты гетерологических белков имели большие размеры и присутствовали на периферии клеток, где сконцентрированы митохондрии; митохондриальный ретикулум был нарушен, а митохондрии фрагментированы (Рис. 11, 12), что указывает на влияние NBx на структуру митохондрий. В клетках, экспрессирующих NBx-eGFP, инкубация с низкими концентрациями (250 нМ) наиболее эффективного митохондриально-направленного липофильного антиоксиданта SkQThy из семейства SkQ [147] практически полностью восстанавливала митохондриальный ретикулум (Рис. 12).

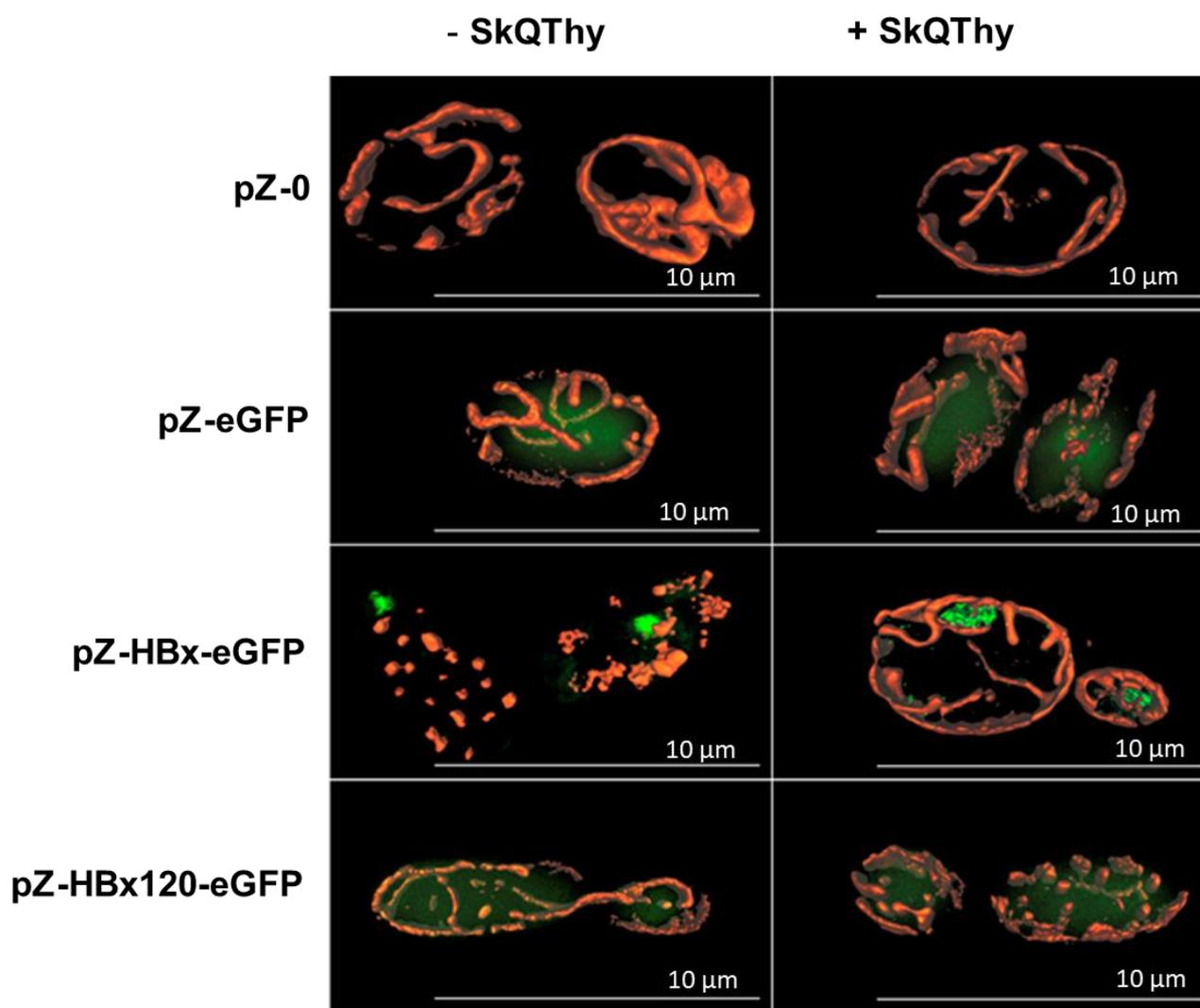


Рис. 12. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих HBx и HBx120. Эффект SkQThy. Широкопольная флуоресцентная микроскопия. Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmrRos, показаны красным

3.3. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжевых клеток экспрессирующих HBx.

При обработке результатов, полученных методом проточной цитометрии с двойным окрашиванием (DHE и Sytox Green для детектирования соответственно супероксид-анион радикала и выживаемости клеток), проанализированные клетки разделялись на три популяции по уровню флуоресценции красителей (Рис. 13 А). Популяция клеток с низким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствует нормальным живым клеткам, не подверженным окислительному

стрессу. Популяция клеток с высоким уровнем флуоресценции DHE и низким уровнем флуоресценции Sytox Green соответствует живым клеткам, испытывающим окислительный стресс.

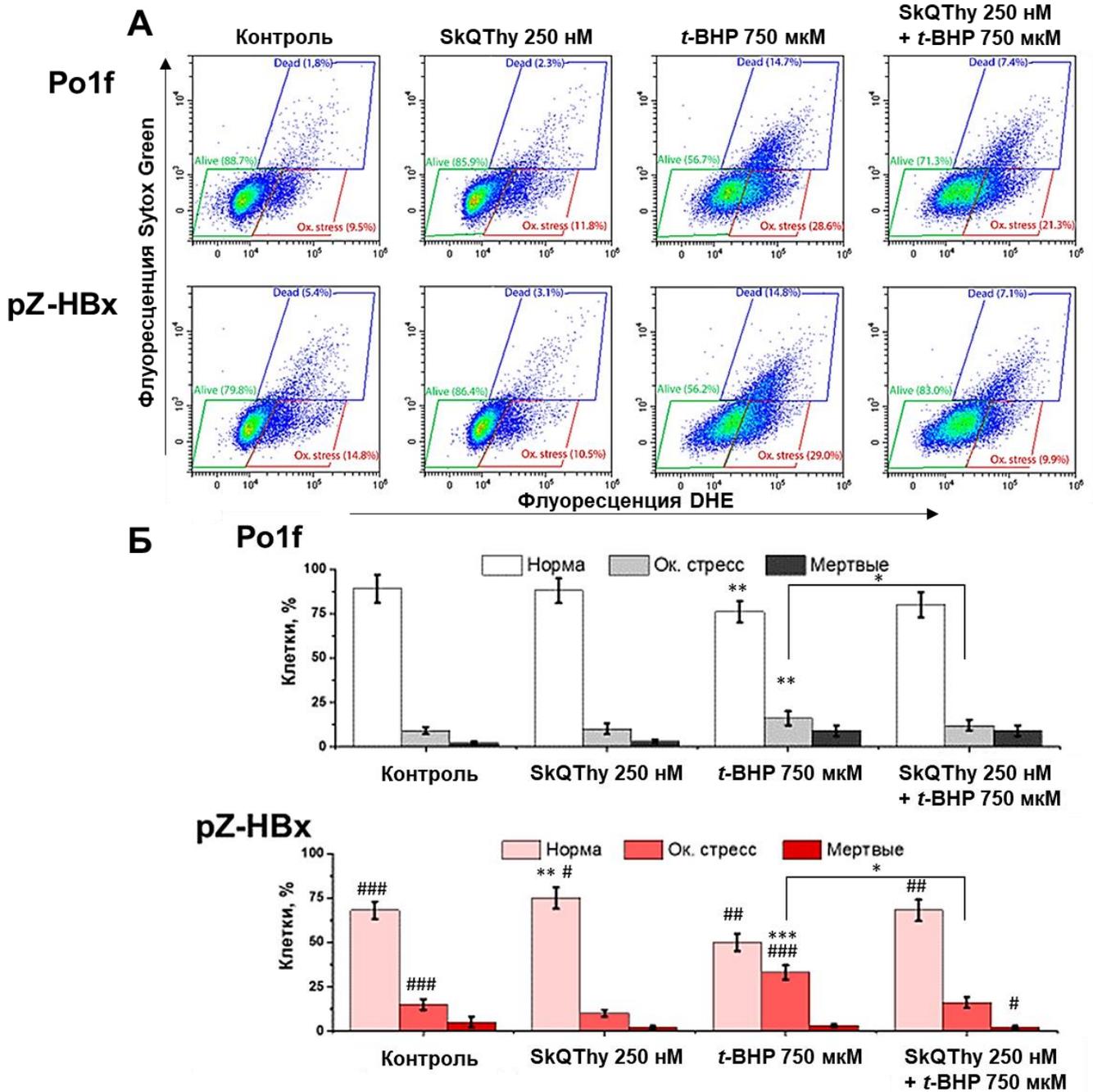


Рис. 13. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-NBx. Влияние SkQThy и t-BHP. (А) Измерения проточной цитометрии, представлены результаты одного типичного эксперимента. (Б) Гистограммы результатов, полученных из трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA.

Обозначения: * отмечены различия между результатами, полученными для штамма Pо1f в разных условиях; *** $p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$; # отмечает различия между образцами Pо1f и pZ- НВх; ### $p < 0,001$, ## $0,001 < p < 0,01$, # $0,01 < p < 0,05$

Популяция с высоким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствует мертвым клеткам. При анализе преобладающего окислительного-восстановительного статуса и жизнеспособности клеток значимыми являлись размеры популяций, то есть отношение числа клеток определенной популяции к общему числу проанализированных клеток. На рисунке 13 Б те же данные представлены в виде гистограмм результатов, полученных из трех независимых экспериментов.

Установлено, что клетки, экспрессирующие НВх, испытывали несколько больший окислительный стресс, чем контрольный штамм (Рис. 13 Б). Однако под действием прооксиданта 750 мкМ *t*-ВНР в течение 2 ч популяции клеток с окислительным стрессом в образце с экспрессией НВх многократно возрастала, в отличие от контрольного штамма, что свидетельствует о меньшей устойчивости клеток, экспрессирующих НВх, к окислительному стрессу.

В целях предотвращения окислительного стресса в клетках дрожжей, экспрессирующих НВх, использовали SkQThy. Предварительная инкубация с 250 нМ SkQThy в течение 1 ч уменьшала популяцию клеток, подверженных окислительному стрессу в дрожжах, экспрессирующих НВх и, более того, предотвращала прооксидантное действие *t*-ВНР. Поскольку SkQThy является митохондриальной-направленным антиоксидантом, эти данные свидетельствуют о том, что исходно окислительный стресс индуцировался, по крайней мере частично, митохондриальными активными формами кислорода.

3.4. Функциональные свойства митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, экспрессирующих НВх.

Поскольку наблюдалось несоответствие между небольшим усилением окислительного стресса и явной фрагментацией митохондрий, наблюдаемой в клетках, экспрессирующих НВх, нашим следующим шагом было изучение биоэнергетики этих клеток на митохондриальном уровне. Ранее было показано, что фрагментация митохондрий индуцируется не только окислительным стрессом, но и в присутствии разобщителя [303]. Митохондрии, выделенные из контрольного штамма *Po1f*, полностью соответствовали критериям физиологической целостности, были прочно сопряжены и не отличались от митохондриальных препаратов, обычно получаемых для этого вида дрожжей (Рис. 14). Напротив, митохондрии из клеток *pZ-НВх* были частично разобщены, с величинами дыхательного контроля в два раза ниже по сравнению с митохондриями из контрольных клеток (Рис. 14).

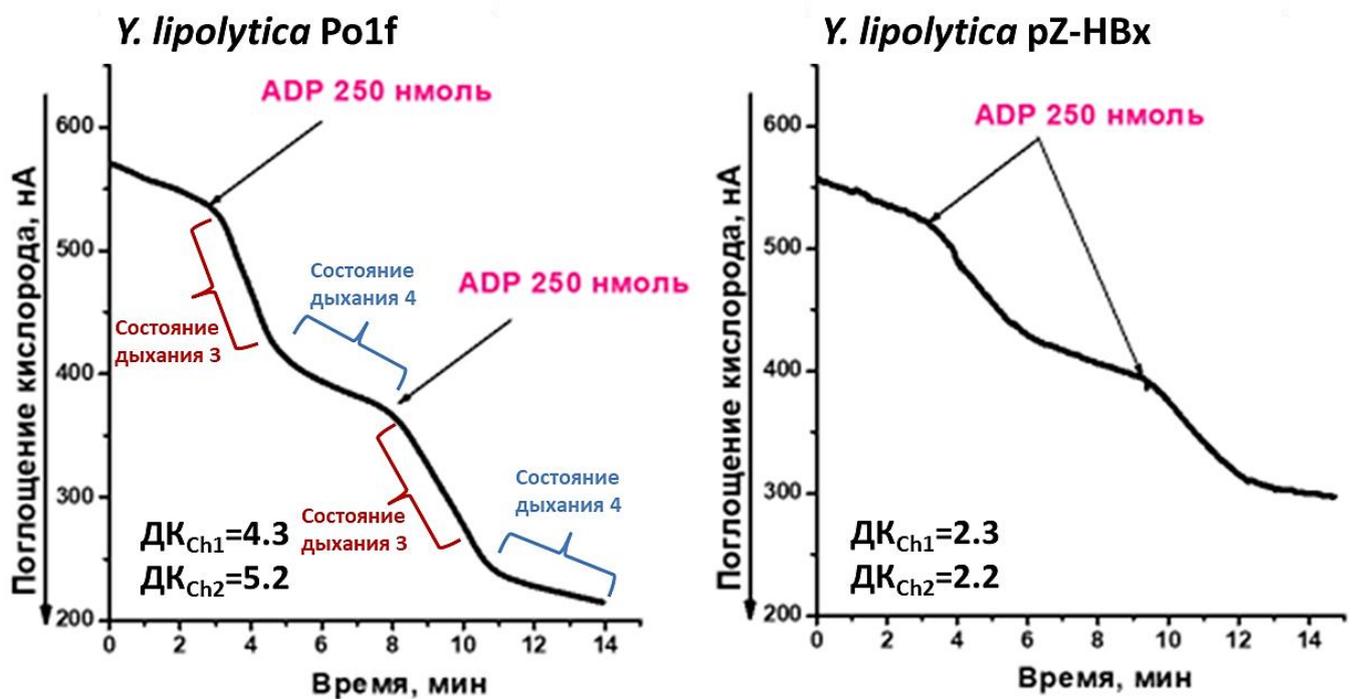


Рис. 14. Амперометрические кривые поглощения кислорода изолированными митохондриями дрожжей *Y. lipolytica Po1f* и *Po1f pZ-НВх*. Величины дыхательного контроля. Основная среда инкубации была дополнена 20 mM трис-пируватом + 5 mM трис-малатом и митохондриями (0,5 мг белка/мл)

Сравнение скоростей дыхания в состояниях 4, 3 (в присутствии ADP) и разобщенном (в присутствии классического разобщителя КЦХФ) митохондрий, выделенных из контрольных клеток и клеток, экспрессирующих НВх (Рис. 15), показал, что митохондрии двух штаммов имели почти одинаковую скорость дыхания в состоянии 4, тогда как скорости дыхания в состояниях 3 и особенно в состоянии разобщения были значительно ниже в препаратах митохондрий из клеток pZ-НВх.

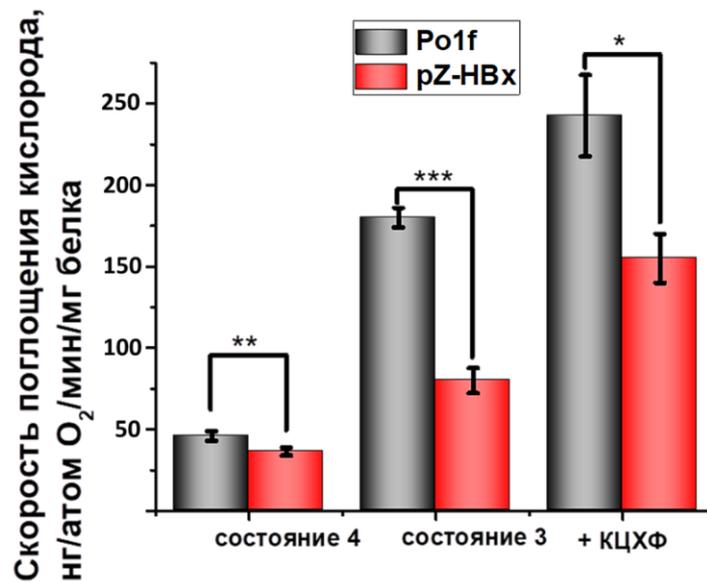


Рис. 15. Скорости дыхания митохондрий *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-НВх в состояниях 4, 3 и разобщенном. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-пируватом + 5 мМ Трис-малатом, и митохондриями (0,5 мг белка/мл). В состоянии 3 среда инкубации дополнительно содержала 1 мМ ADP, а в разобщенном состоянии - 2 мкМ разобщитель КЦХФ. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. ***: $p < 0.001$, **: $0.001 < p < 0.01$, *: $0.01 < p < 0.05$

Эти данные хорошо согласуются с более низкими значениями дыхательного контроля в митохондриях клеток, экспрессирующих НВх, по сравнению с контрольным вариантом.

Контрольные эксперименты показали, что ротенон и антимицин А, соответственно ингибиторы комплексов I и III дыхательной цепи в одинаковой степени ингибировали поглощение кислорода митохондриями контрольного и мутантного штаммов (Рис. 16). Был сделан вывод о том, что экспрессия клеткой НВх не ингибирует комплексы I и III дыхательной цепи.

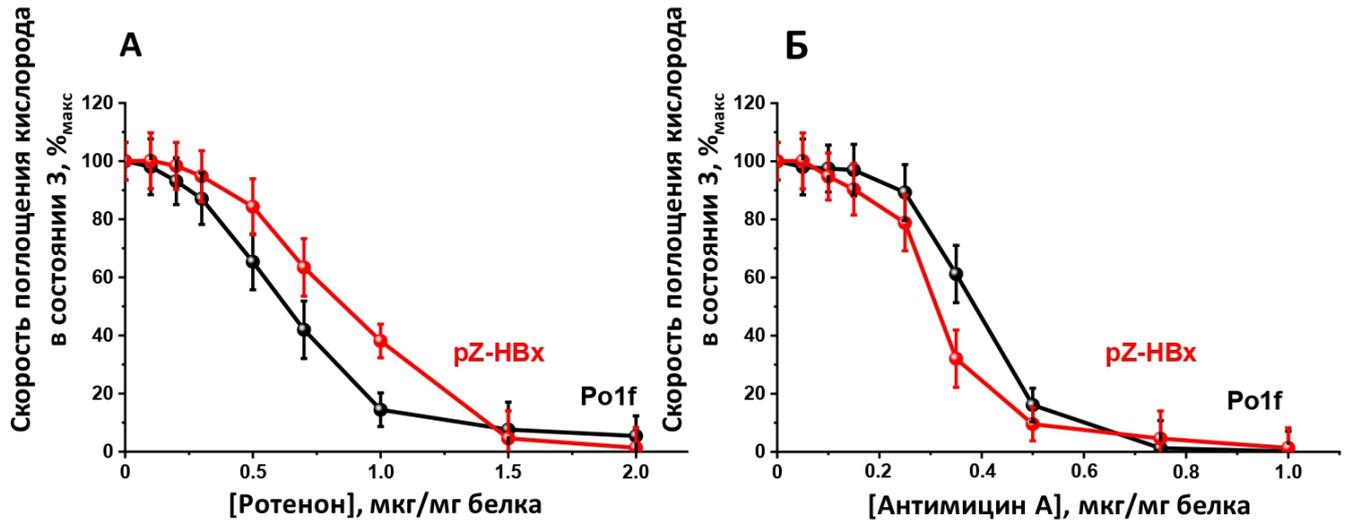


Рис. 16. Скорость поглощения кислорода в состоянии 3 дыхания митохондрий *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-NBx под действием ингибиторов комплексов I и III: ротенон (А) и антимицин А (Б). Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом, 5 мМ Трис-малатом, 1 мМ ADP и митохондриями (0,5 мг белка/мл)

Измерение величины мембранного потенциала с потенциал-зависимым зондом сафранином О в присутствии разбщителя пальмитата (Рис. 17), показало, что митохондрии из мутанта, экспрессирующего НВх, оказались гораздо более чувствительными к снижению мембранного потенциала, чем митохондрии контрольного варианта.

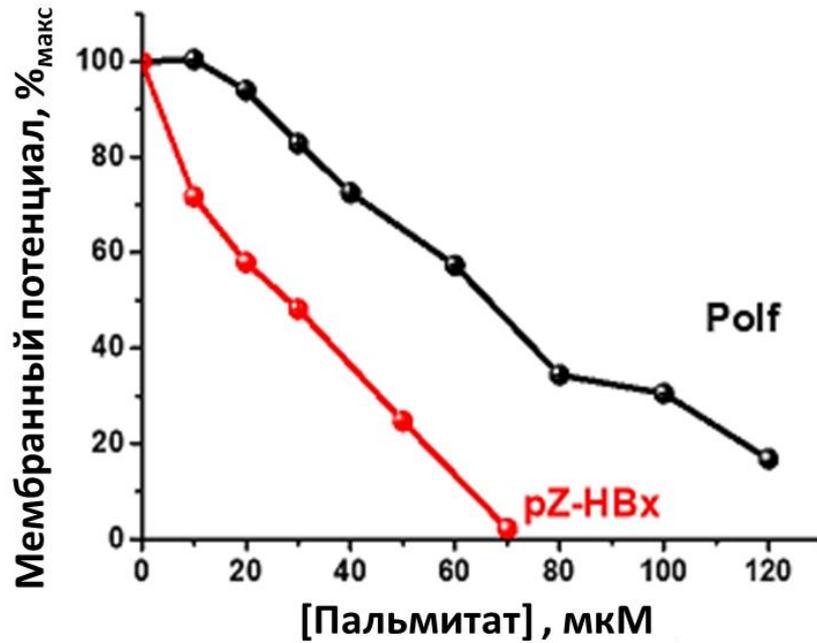


Рис. 17. Мембранный потенциал митохондрий *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-HVx. Действие пальмитиновой кислоты. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ сафринином О и митохондриями (0,5 мг белка/мл)

Экспрессия HVx приводит к высокоамплитудному набуханию митохондрий (Рис. 18). Оптическая плотность суспензии митохондрий (0,5 мг митохондриального белка) мутанта pZ-HVx при 540 нм была на 53% ниже, чем плотность суспензии митохондрий контрольного штамма. Добавление пороформера аламетицина, образующего в мембране поры диаметром 1 нм и вызывающего максимальное набухание митохондрий, снижало ОП до 0,7 для митохондрий из обоих штаммов. Это означает, что митохондрии из клеток, экспрессирующих HVx, изначально были набухшими.

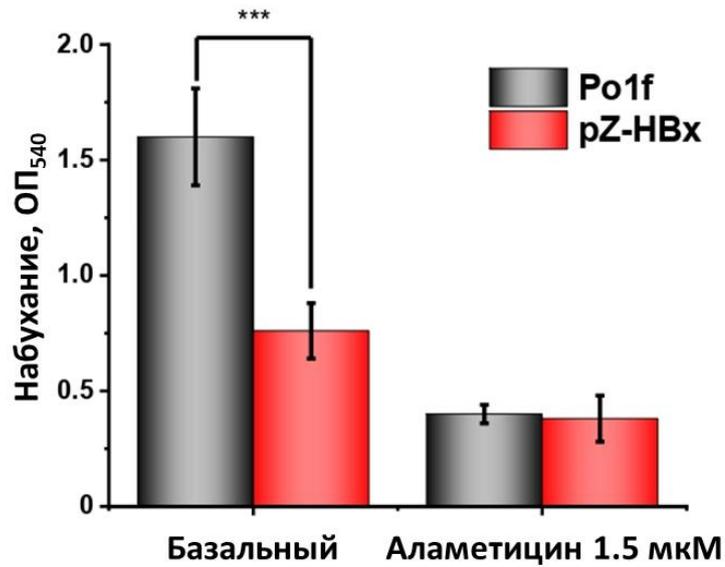


Рис. 18. Набухание митохондрий *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-HBx. Основная среда инкубации была дополнена 40 мМ KCL и митохондриями (0,2 мг белка/мл). Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA.

***: $p < 0,001$

Скорость синтеза АТФ в митохондриях, выделенных из мутанта pZ-HBx была ожидаемо ниже, чем в контрольном штамме (Рис. 19).

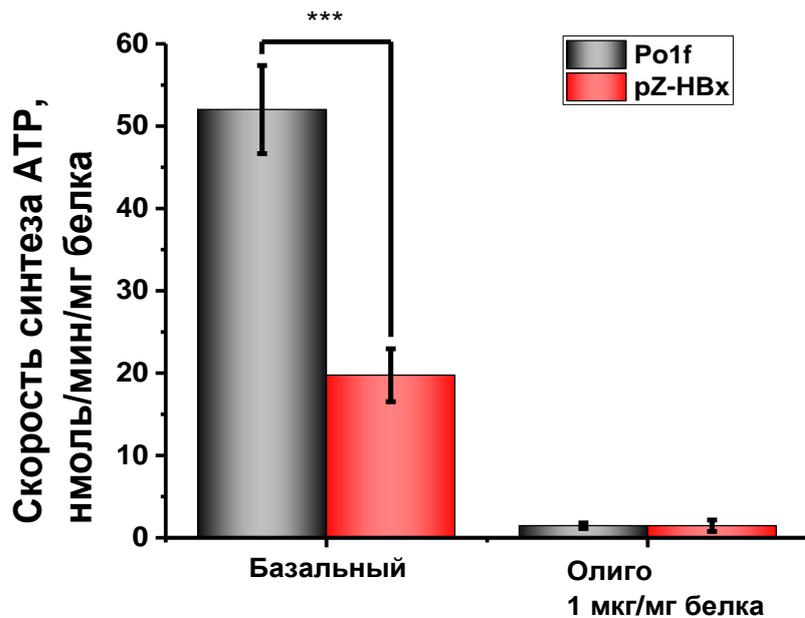


Рис. 19. Синтез АТФ митохондриями *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-HBx. Основная среда инкубации была дополнена 25 мкМ феноловым красным, 6 мкМ Ар5А

(ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями (0.2 мг белка/мл).

Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA.

***: $p < 0,001$

Наконец, была измерена скорость продукции пероксида водорода изолированными митохондриями дрожжей контрольного варианта и экспрессирующего НВх. Наблюдалось лишь незначительное увеличение продукции перекиси водорода митохондриями клеток, экспрессирующих НВх, по сравнению с контрольными клетками (Рис. 20).

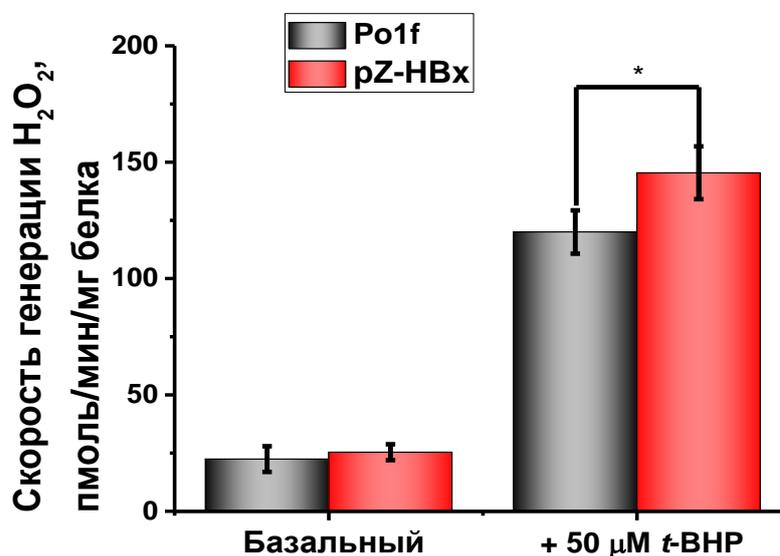


Рис. 20. Образование пероксида водорода митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-НВх. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-сукцинатом, 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 М.Е./мл), 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы) и митохондриями (0,2 мг белка/мл). Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. **: $0.001 < p < 0.01$

$0.001 < p < 0.01$

Эти, казалось бы, неожиданные результаты можно легко объяснить частичным разобщением этих митохондрий, что следует из результатов, представленных на рисунках 14, 15 и 19. Известно, что снижение мембранного

потенциала всего на 10% снижает продукцию АФК на 90% [307]. *t*-ВНР, известный модельный прооксидант, образующий АФК в результате реакции перекисного окисления липидов, усиливал продукцию перекиси водорода митохондриями, при этом митохондрии из клеток, экспрессирующих НВх, были более восприимчивы к действию прооксиданта, чем митохондрии контрольного штамма. Это также хорошо согласуется с данными проточной цитометрии (Рис. 13), где клетки, экспрессирующие НВх, также были менее устойчивы к действию *t*-ВНР.

Таким образом, комплексное изучение функциональных свойств митохондрий, выделенных из дрожжей, экспрессирующих НВх, показало, что НВх индуцирует митохондриальную дисфункцию, прежде всего меньшую степень сопряжения дыхания с фосфорилированием, снижение скорости дыхания и продукции АТФ, а также меньшую устойчивость к индуцированному окислительному стрессу.

3.5. Морфология митохондрий дрожжевых клеток экспрессирующих Аβ42.

Была исследована морфология митохондрий клеток, экспрессирующих Аβ42. Клетки контрольного штамма (pZ-0) содержали многочисленные митохондрии, образующие митохондриальный ретикулум (Рис. 21, 22).

Напротив, митохондриальный ретикулум был нарушен в клетках, экспрессирующих Аβ42 и eGFP-Аβ42, а митохондрии были фрагментированы (Рис. 21). Эти клетки также были отмечены наличием одного или нескольких крупных агрегатов и нескольких мелких агрегатов. Аналогичные результаты были получены при обработке клеток, экспрессирующих Аβ42 антителами к Аβ42 (Рис. 21), что в совокупности указывает на сильное негативное влияние Аβ42 на структуру митохондрий.

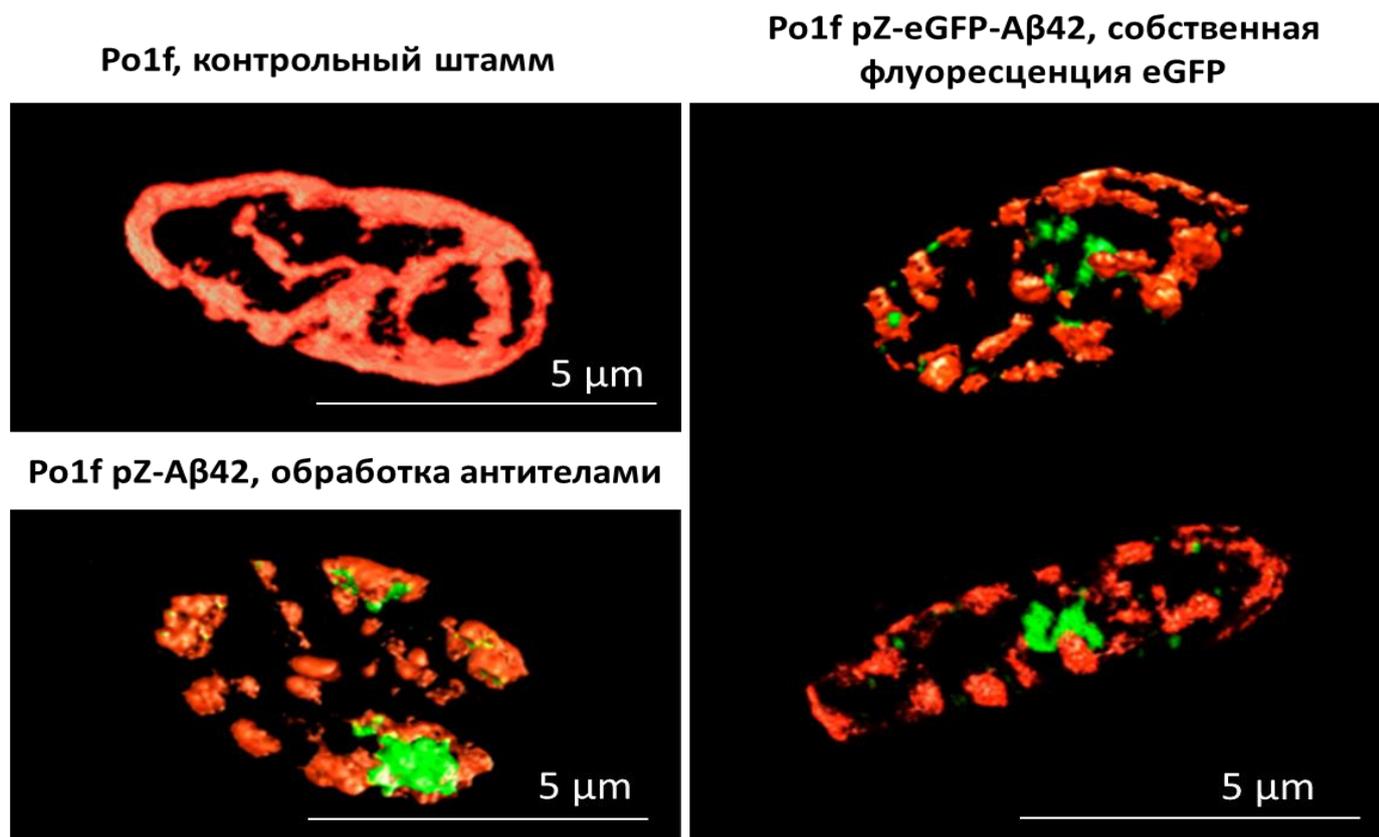


Рис. 21. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих Аβ42 и локализация агрегатов Аβ42. Микроскопия структурированного освещения. Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmrRos, показаны красным

Экспрессия eGFP не изменяла морфологию митохондрий и eGFP был диффузно распределен в цитозоле (Рис. 22). Мутант, экспрессирующий eGFP-Aβ42 характеризовался фрагментированными митохондриями и агрегацией Аβ42 (Рис. 22).

Мутант, экспрессирующий eGFP-Aβ40, имел разветвленный митохондриальный ретикулум и диффузную внутриклеточную флуоресценцию, связанную с eGFP, сходную с контролем pZ-eGFP, что позволяет предположить, что экспрессия eGFP-Aβ40 не оказывала существенного влияния на митохондриальную структуру. Предварительная инкубация клеток с 250 нМ SkQThy в значительной степени восстанавливая митохондриальный ретикулум в клетках, экспрессирующих Аβ42 (Рис. 22).

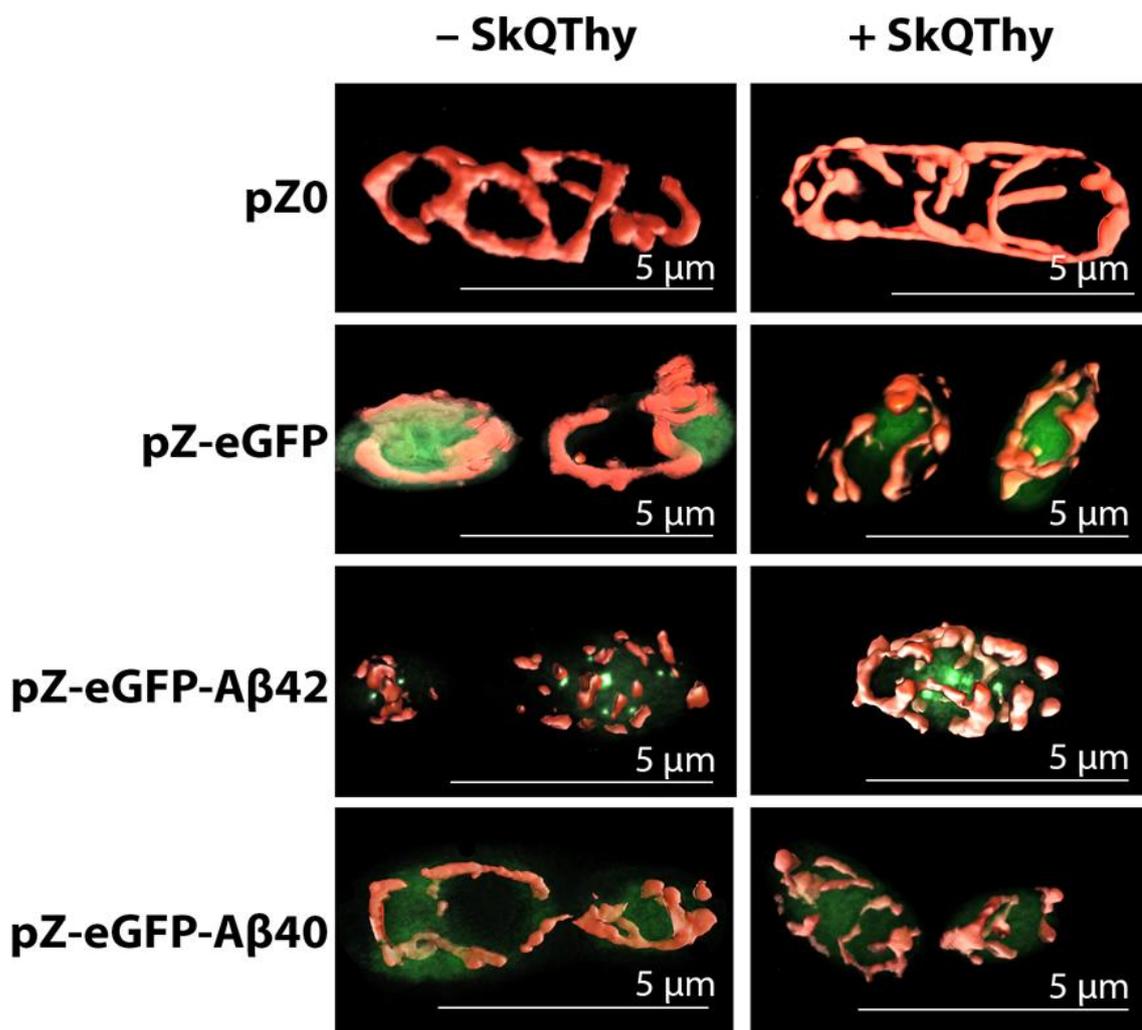


Рис. 22. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих Аβ42 и Аβ40. Эффект SkQThy. Широкопольная флуоресцентная микроскопия. Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmxRos, показаны красным

3.6. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжевых клеток экспрессирующих Аβ42.

С помощью метода проточной цитометрии и двойного окрашивания клеток (DHE и Sytox Green) был определен уровень окислительного стресса и клеточной смерти в мутантах дрожжей *Y. lipolytica*, экспрессирующих Аβ42 (Рис. 23).

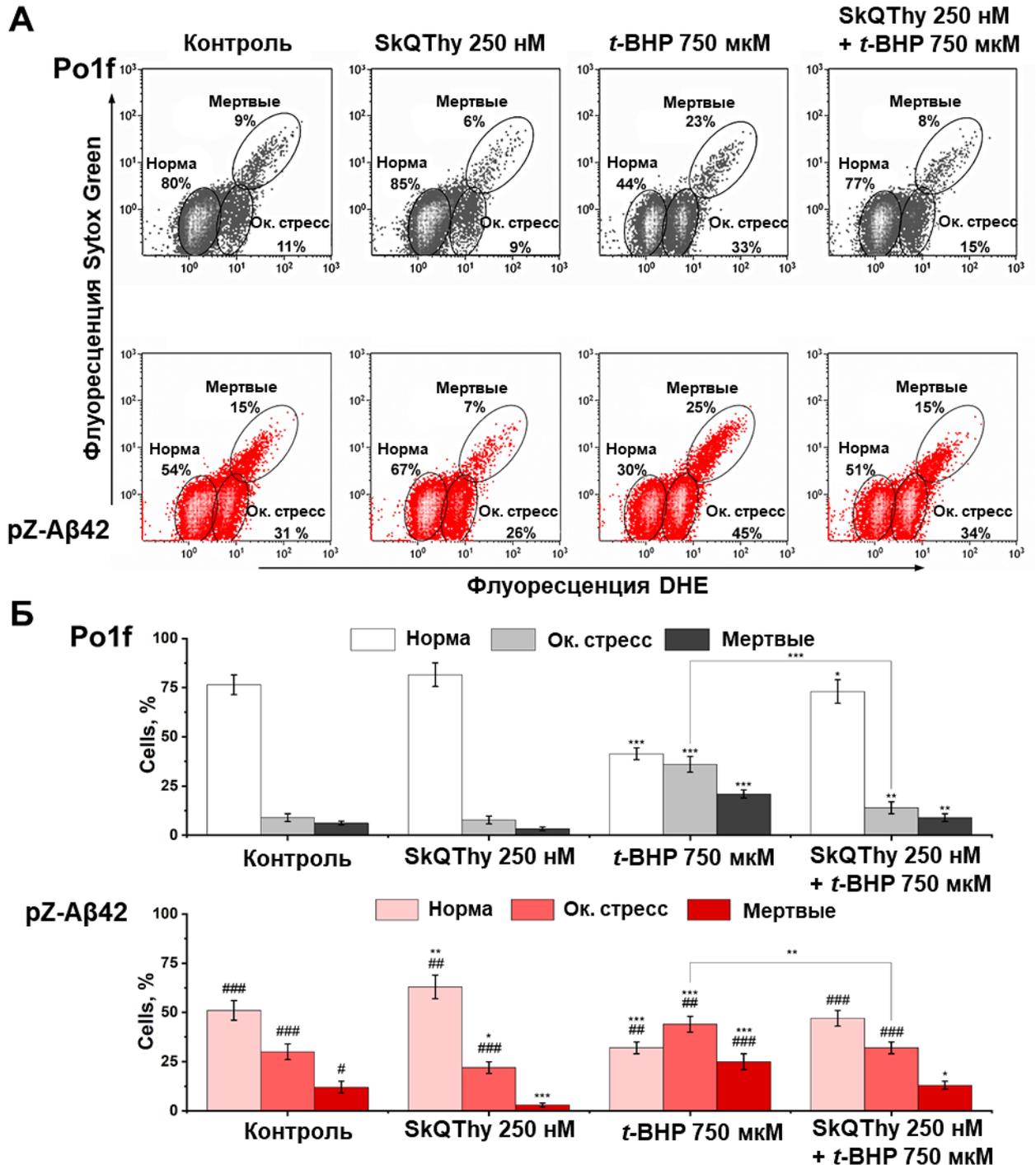


Рис. 23. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ- Aβ42. Влияние SkQThy и t-BHP. (А) Измерения проточной цитометрии. Представлены результаты одного показательного эксперимента. (Б) Гистограммы результатов, полученных с помощью измерений проточной цитометрии из трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. Обозначения: * отмечены различия между результатами, полученными для штамма Po1f в разных условиях;

*** $p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$; # отмечает различия между образцами P01f и pZ-A β 42; ### $p < 0,001$, ## $0,001 < p < 0,01$, # $0,01 < p < 0,05$

Установлено, что уже в исходном состоянии клетки, экспрессирующие A β 42, были подвержены значительно большим уровням окислительного стресса и клеточной смерти, чем контрольный штамм (Рис. 23). Под действием прооксиданта 750 мкМ *t*-ВНР в течение 2 ч популяции клеток с окислительным стрессом и клеточной смертью в образце с экспрессией A β 42 многократно возрастала, причем более значительно по сравнению с контролем в тех же условиях. Это свидетельствует о меньшей устойчивости клеток, экспрессирующих A β 42, к окислительному стрессу. Предварительная инкубация с 250 нМ SkQThy в течение 1 ч значительно уменьшала популяцию клеток, подверженных окислительному стрессу и клеточной смерти в дрожжах, экспрессирующих A β 42 и почти полностью предотвращала действие прооксиданта *t*-ВНР, что также хорошо согласуется с данными о восстановлении митохондриального ретикулума под действием SkQThy (Рис. 22).

3.7. Функциональные свойства митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, экспрессирующих A β 42.

Для лучшего понимания влияния экспрессии A β 42 на биоэнергетику клеток были сравнены энергетические параметры митохондриальных препаратов, выделенных из контрольного штамма P01f и клеток pZ-A β 42 (Рис. 24). Митохондрии из контрольных клеток были прочно сопряжены и не отличались от митохондриальных препаратов, обычно получаемых в предыдущих исследованиях. Напротив, митохондриальные препараты из клеток pZ-A β 42 были слабо связаны (частично разобщены), как следует из пониженных величин дыхательного контроля.

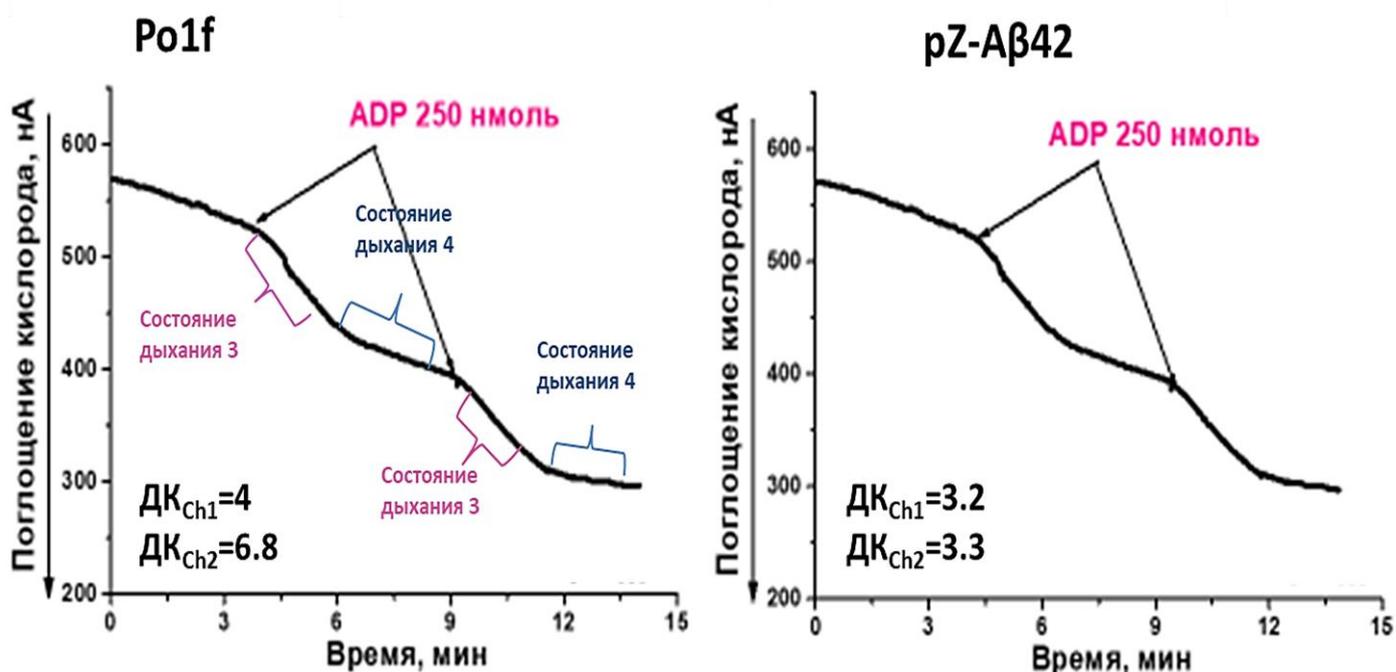


Рис. 24. Амперометрические кривые поглощения кислорода изолированными митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-Aβ42. Величины дыхательного контроля. В основную среду инкубации, содержащую 0,6 М маннит, 2 мМ Трис-фосфат, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, добавляли 20 мМ Трис-пируват + 5 мМ Трис-малат и митохондрии (0,5 мг белка/мл). Где указано, добавляли 250 нмоль ADP

Было исследовано действие классического разобщителя КЦХФ на дыхание митохондрий в состоянии 4 (Рис. 25). Для контрольного штамма наблюдалось увеличение скорости дыхания в 6 раз по сравнению с исходным состоянием 4, а для дрожжей, экспрессирующих Аβ42, в 3,4 раза. Различия в действии одного и того же разобщителя может свидетельствовать либо об изначальной разобщенности митохондрий, либо об ингибировании комплексов дыхательной цепи.

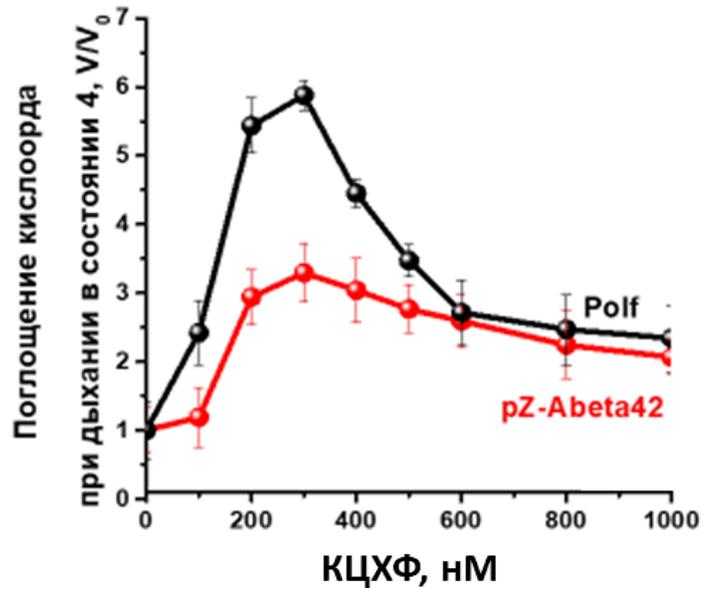


Рис. 25. Скорость поглощения кислорода изолированными митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-Aβ42 при дыхании в состоянии 4. В инкубационную среду добавляли 20 мМ Трис-пируват + 5 мМ Трис-малат и митохондрии (0,2 мг белка/мл)

Поскольку контрольные эксперименты показали, что ротенон и антимицин А, соответственно ингибиторы комплексов I и III дыхательной цепи в одинаковой степени ингибировали поглощение кислорода митохондриями контрольного и мутантного штаммов (Рис. 26), был сделан вывод о том, что экспрессия клеткой Аβ42 приводит к частичному разобщению митохондрий.

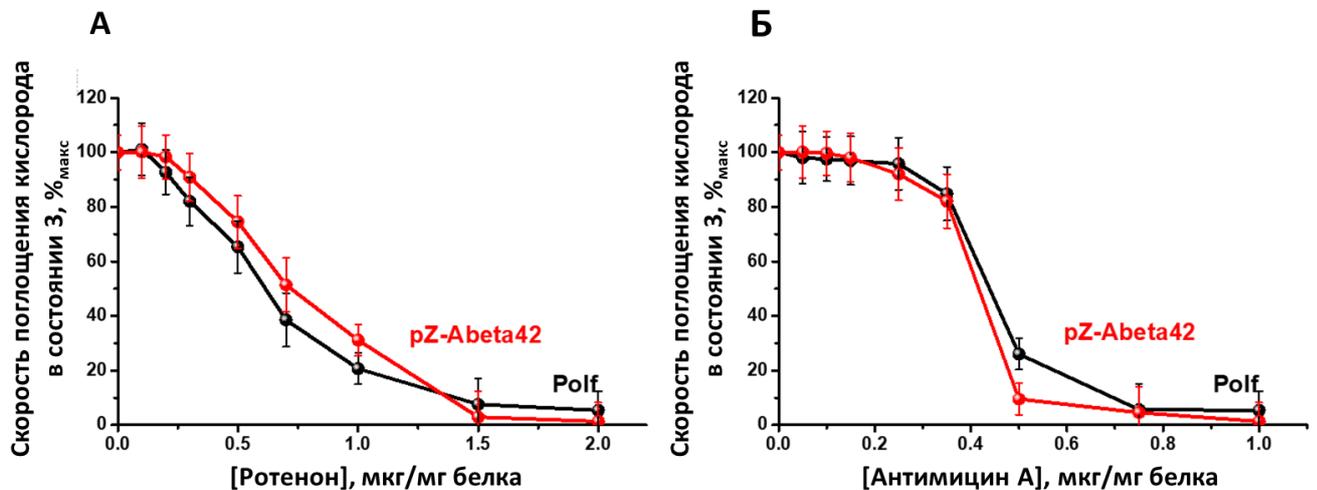


Рис. 26. Скорость поглощения кислорода в состоянии 3 дыхания митохондрий *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-Aβ42 под действием ингибиторов комплексов I и

III: ротенон (А) и антимицин А (Б). Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом, 5 мМ Трис-малатом, 1 мМ ADP и митохондриями (0,5 мг белка/мл)

Показано (Рис. 27), что пальмитиновая кислота производит более сильный деполяризующий эффект (полумаксимальный эффект при концентрации 58 мкМ) на митохондрии клеток контрольного штамма, чем на митохондрии клеток, экспрессирующих Аβ42. Поскольку абсолютные величины мембранного потенциала неизвестны, можно предположить, что разница в рассматриваемых эффектах жирной кислоты связана с изначальной разобоченностью митохондрий клеток, экспрессирующих Аβ42, и, таким образом, с более низким изначальным уровнем мембранного потенциала.

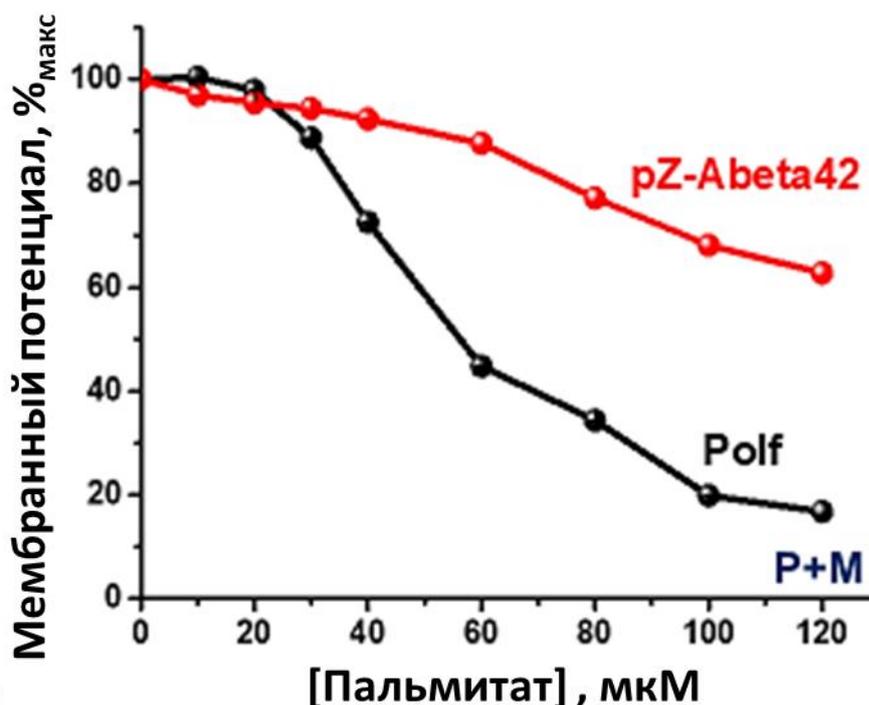


Рис. 27. Мембранный потенциал митохондрий *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-Aβ42. Действие пальмитиновой кислоты. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ сафринином O и митохондриями (0,5 мг белка/мл)

Продукция АТФ митохондриями клеток, экспрессирующих Аβ42, была в среднем на 25% ниже, чем у контрольного штамма (Рис. 28). В качестве контроля использовали олигомицин, специфический ингибитор АТФ-синтазы. Различия между двумя штаммами были небольшими, но достоверными. В митохондриях контрольного штамма олигомицин почти полностью ингибировал синтез АТФ, тогда как в митохондриях клеток, экспрессирующих Аβ42, степень ингибирования была достоверно ниже, что еще раз свидетельствовало о частичном разобщении этих митохондрий.

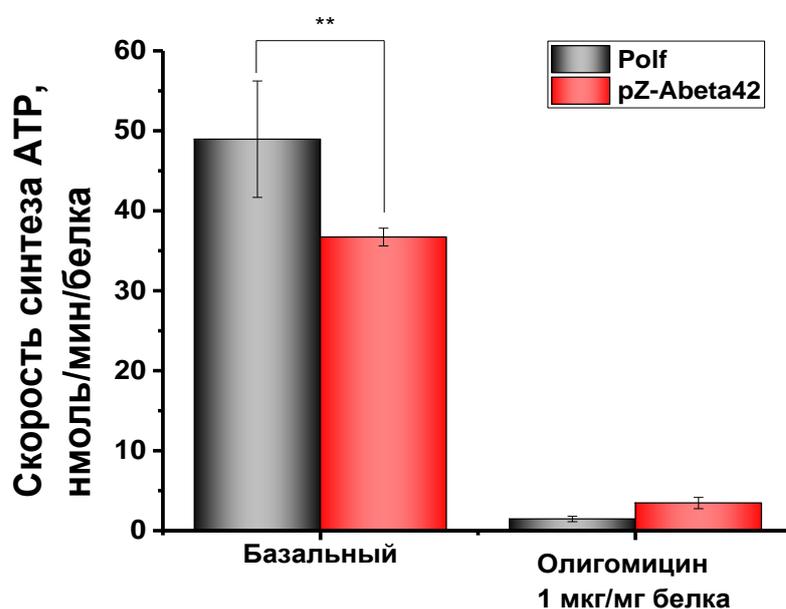


Рис. 28. Синтез АТФ митохондриями *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-Аβ42.

Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом + 5 мМ трис-малатом, 25 мкМ феноловым красным, 6 мкМ Ар5А (ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями (0.2 мг белка/мл). Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. ** $0,001 < p < 0,01$

Наконец, флуорометрически измеряли продукцию пероксида водорода митохондриальными препаратами, выделенными из контрольного штамма и клеток, экспрессирующих Аβ42. Для достижения максимального образования перекиси водорода митохондриальную каталазу (разлагающую перекись водорода) ингибировали аминотриазолом. Было обнаружено, что в митохондриях

клеток, экспрессирующих Аβ42, скорость продукции перекиси водорода была выше, чем в контроле (Рис. 29). Прооксидант *t*-ВНР усиливал образование пероксида водорода митохондриями обоих штаммов, при этом митохондрии клеток, экспрессирующих Аβ42, были более чувствительны к прооксиданту, чем митохондрии контрольного штамма.

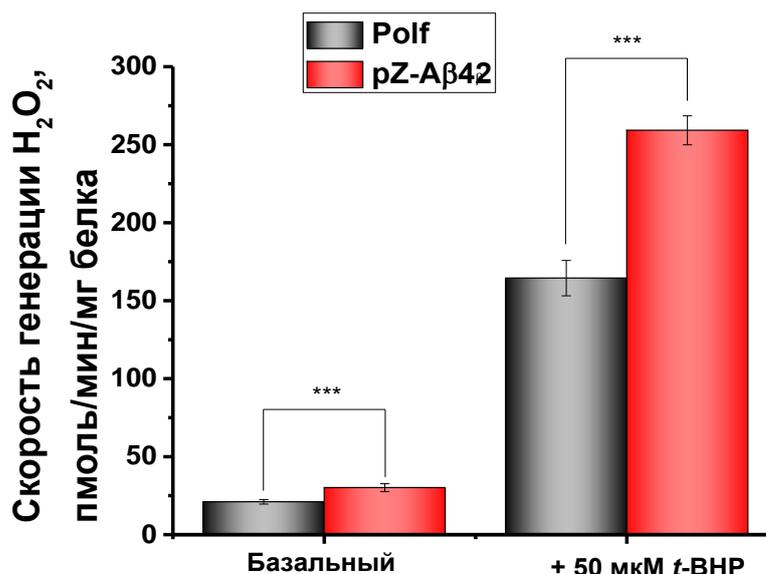


Рис. 29. Образование пероксида водорода митохондриями *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-Aβ42. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-сукцинатом, 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы), 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 М.Е./мл) и митохондриями (0,2 мг белка/мл).

Статистический анализ проводился с помощью одностороннего теста ANOVA.

*** $p < 0,001$.

Таким образом, комплексное сравнительное изучение функциональных свойств митохондрий, выделенных из клеток контрольного штамма, и клеток, экспрессирующих Аβ42, показало, что экспрессия Аβ42 индуцирует митохондриальную дисфункцию, о чем свидетельствуют частичное разобщение дыхания и фосфорилирования, снижение скорости продукции АТФ и повышение восприимчивости к индуцированному окислительному стрессу.

ВЫВОДЫ

- 1) Впервые созданы мутанты дрожжей *Y. lipolytica*, способные экспрессировать НВх, НВх120, Аβ42, Аβ40 и варианты, слитые с eGFP.
- 2) Митохондрии в клетках дрожжей, экспрессирующих НВх и Аβ42 фрагментированы, а экспрессируемые белки образуют агрегаты.
- 3) Дрожжевые клетки, экспрессирующие НВх и Аβ42, отличались повышенным уровнем окислительного стресса и клеточной смерти, а также пониженной устойчивостью к индуцированному окислительному стрессу.
- 4) Митохондрии, выделенные из дрожжей, экспрессирующих НВх и Аβ42, характеризовались разобщением дыхания и фосфорилирования, сниженной продукцией АТФ, избыточной продукцией H_2O_2 и повышенной чувствительностью к индуцированному окислительному стрессу.
- 5) Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично обращал фрагментацию митохондрий, значительно снижал уровни окислительного стресса и клеточной смерти, а также увеличивал устойчивость клеток к индуцированному окислительному стрессу. SkQThy может быть рекомендован как перспективное терапевтическое соединение при дальнейших исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы были созданы адекватные жизнеспособные модели гетерологической экспрессии белка H_Vx и A β 42 на основе дрожжей аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*. На всех этапах исследования были выявлены комплексные нарушения морфологии и функций митохондрий. При этом факт обнаружения этих нарушений в дрожжевой модели, практически полностью исключает комплексные меж- и внутриклеточные взаимодействия, свойственные более сложным моделям и организмам, свидетельствует о прямом и специфическом воздействии H_Vx и A β 42 на митохондрии. Этот факт также подтверждается агрегацией экспрессируемых белков в непосредственной близости с митохондриями клеток, а также эффективным предотвращением части описанных патологических эффектов митохондриально-направленным антиоксидантом SkQThy.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Danylovyh H. V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence // Ukr Biochem J. – 2016. – Vol. 88, № 1. – P. 31-43.
2. Srinivasan S., Guha M., Kashina A., Avadhani N. G. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection // Biochim Biophys Acta Bioenerg. – 2017. – Vol. 1858, № 8. – P. 602-614.
3. de Brito O. M., Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria // Nature. – 2008. – Vol. 456, № 7222. – P. 605-610.
4. Walsh C. M., Chvanov M., Haynes L. P., Petersen O. H., Tepikin A. V., Burgoyne R. D. Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry // Biochem J. – 2009. – Vol. 425, № 1. – P. 159-168.
5. Yun J., Finkel T. Mitohormesis // Cell Metab. – 2014. – Vol. 19, № 5. – P. 757-766.
6. Zhu X., Wei Y., Yang B., Yin X., Guo X. The mitohormetic response as part of the cytoprotection mechanism of berberine : Berberine induces mitohormesis and mechanisms // Mol Med. – 2020. – Vol. 26, № 1. – P. 10.
7. Pinegin B., Vorobjeva N., Pashenkov M., Chernyak B. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity // J Cell Physiol. – 2018. – Vol. 233, № 5. – P. 3745-3754.
8. Collins S., Pi J., Yehuda-Shnaidman E. Uncoupling and reactive oxygen species (ROS)--a double-edged sword for β -cell function? "Moderation in all things" // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2012. – Vol. 26, № 6. – P. 753-758.
9. Hamanaka R. B., Chandel N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes // Trends Biochem Sci. – 2010. – Vol. 35, № 9. – P. 505-513.
10. Elkholi R., Renault T. T., Serasinghe M. N., Chipuk J. E. Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? // Cancer Metab. – 2014. – Vol. 2. – P. 16.

11. Fisher J. J., Bartho L. A., Perkins A. V., Holland O. J. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2020. – Vol. 47, № 1. – P. 176-184.
12. Manczak M., Kandimalla R., Yin X., Reddy P. H. Mitochondrial division inhibitor 1 reduces dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission activity // *Hum Mol Genet.* – 2019. – Vol. 28, № 2. – P. 177-199.
13. Tan S., Kennedy B., Wong E. Chapter 2 - Mitochondrial biogenesis and mitophagy // *Mitochondrial Physiology and Vegetal Molecules / de Oliveira M. R.* Academic Press, 2021. -- P. 35-90.
14. Malka F., Guillery O., Cifuentes-Diaz C., Guillou E., Belenguer P., Lombès A., Rojo M. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes // *EMBO Rep.* – 2005. – Vol. 6, № 9. – P. 853-859.
15. Chen H., Detmer S. A., Ewald A. J., Griffin E. E., Fraser S. E., Chan D. C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development // *J Cell Biol.* – 2003. – Vol. 160, № 2. – P. 189-200.
16. Ishihara N., Fujita Y., Oka T., Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1 // *Embo j.* – 2006. – Vol. 25, № 13. – P. 2966-2977.
17. Otera H., Wang C., Cleland M. M., Setoguchi K., Yokota S., Youle R. J., Mihara K. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells // *J Cell Biol.* – 2010. – Vol. 191, № 6. – P. 1141-1158.
18. Chan D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development // *Cell.* – 2006. – Vol. 125, № 7. – P. 1241-1252.
19. Miwa S., Kashyap S., Chini E., von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging // *J Clin Invest.* – 2022. – Vol. 132, № 13.
20. Bhatti J. S., Bhatti G. K., Reddy P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2017. – Vol. 1863, № 5. – P. 1066-1077.
21. Grimm A., Eckert A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view // *J Neurochem.* – 2017. – Vol. 143, № 4. – P. 418-431.

22. Antico Arciuch V. G., Elguero M. E., Poderoso J. J., Carreras M. C. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – Vol. 16, № 10. – P. 1150-1180.
23. Sassetti E., Clausen M. H., Laraia L. Small-Molecule Inhibitors of Reactive Oxygen Species Production // *J Med Chem.* – 2021. – Vol. 64, № 9. – P. 5252-5275.
24. Moreno P. R., Sanz J., Fuster V. Atherosclerosis // *Curr Mol Med.* – 2006. – Vol. 6, № 5. – P. 437-438.
25. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol Rev.* – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47-95.
26. Mittler R. ROS Are Good // *Trends Plant Sci.* – 2017. – Vol. 22, № 1. – P. 11-19.
27. Zhang T. Y., Chen H. Y., Cao J. L., Xiong H. L., Mo X. B., Li T. L., Kang X. Z., Zhao J.H., Yin B., Zhao X., Huang C. H., Yuan Q., Xue D., Xia N. S., Yuan Y. A. Structural and functional analyses of hepatitis B virus X protein BH3-like domain and Bcl-xL interaction // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 3192.
28. Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y., Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 4350965.
29. Bárcena C., Mayoral P., Quirós P. M. Mitohormesis, an Antiaging Paradigm // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2018. – Vol. 340. – P. 35-77.
30. Sies H., Jones D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2020. – Vol. 21, № 7. – P. 363-383.
31. Khacho M., Harris R., Slack R. S. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function // *Nat Rev Neurosci.* – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 34-48.
32. Kluge M. A., Fetterman J. L., Vita J. A. Mitochondria and endothelial function // *Circ Res.* – 2013. – Vol. 112, № 8. – P. 1171-1188.
33. Rice C. M., Davies L. C., Subleski J. J., Maio N., Gonzalez-Cotto M., Andrews C., Patel N. L., Palmieri E. M., Weiss J. M., Lee J. M., Annunziata C. M., Rouault T. A., Durum S. K., McVicar D. W. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 5099.

34. Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease // *Faseb j.* – 2003. – Vol. 17, № 10. – P. 1195-1214.
35. Liu Z., Zhou T., Ziegler A. C., Dimitrion P., Zuo L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 2525967.
36. Tan B. L., Norhaizan M. E., Huynh K., Heshu S. R., Yeap S. K., Hazilawati H., Roselina K. Water extract of brewers' rice induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activation of caspase-3 and caspase-8 and downregulates the Wnt/ β -catenin downstream signaling pathway in brewers' rice-treated rats with azoxymethane-induced colon carcinogenesis // *BMC Complement Altern Med.* – 2015. – Vol. 15. – P. 205.
37. Radi E., Formichi P., Battisti C., Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *J Alzheimers Dis.* – 2014. – Vol. 42 Suppl 3. – P. S125-152.
38. Feniouk B. A., Skulachev V. P. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Mitochondria-Targeted Antioxidants // *Curr Aging Sci.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 41-48.
39. Georgieva E., Ivanova D., Zhelev Z., Bakalova R., Gulubova M., Aoki I. Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of "Free Radical Diseases" // *Anticancer Res.* – 2017. – Vol. 37, № 10. – P. 5373-5381.
40. Leuner K., Schütt T., Kurz C., Eckert S. H., Schiller C., Occhipinti A., Mai S., Jendrach M., Eckert G. P., Kruse S. E., Palmiter R. D., Brandt U., Dröse S., Wittig I., Willem M., Haass C., Reichert A. S., Müller W. E. Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – Vol. 16, № 12. – P. 1421-1433.
41. Ahn B., Smith N., Saunders D., Ranjit R., Kneis P., Towner R. A., Van Remmen H. Using MRI to measure in vivo free radical production and perfusion dynamics in a mouse model of elevated oxidative stress and neurogenic atrophy // *Redox Biol.* – 2019. – Vol. 26. – P. 101308.

42. Fetisova E., Chernyak B., Korshunova G., Muntyan M., Skulachev V. Mitochondria-targeted Antioxidants as a Prospective Therapeutic Strategy for Multiple Sclerosis // *Curr Med Chem.* – 2017. – Vol. 24, № 19. – P. 2086-2114.
43. Demyanenko I. A., Zakharova V. V., Ilyinskaya O. P., Vasilieva T. V., Fedorov A. V., Manskikh V. N., Zinovkin R. A., Pletjushkina O. Y., Chernyak B. V., Skulachev V. P., Popova E. N. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Improves Dermal Wound Healing in Genetically Diabetic Mice // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 6408278.
44. Lefranc C., Friederich-Persson M., Palacios-Ramirez R., Nguyen Dinh Cat A. Mitochondrial oxidative stress in obesity: role of the mineralocorticoid receptor // *J Endocrinol.* – 2018. – Vol. 238, № 3. – P. R143-r159.
45. Shabalina I. G., Vyssokikh M. Y., Gibanova N., Csikasz R. I., Edgar D., Hallden-Waldemarson A., Rozhdestvenskaya Z., Bakeeva L. E., Vays V. B., Pustovidko A. V., Skulachev M. V., Cannon B., Skulachev V. P., Nedergaard J. Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1 // *Aging (Albany NY).* – 2017. – Vol. 9, № 2. – P. 315-339.
46. Angelova P. R., Abramov A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration // *FEBS Lett.* – 2018. – Vol. 592, № 5. – P. 692-702.
47. Ekoue D. N., He C., Diamond A. M., Bonini M. G. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis // *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* – 2017. – Vol. 1858, № 8. – P. 628-632.
48. Barbouti A., Vasileiou P. V. S., Evangelou K., Vlasis K. G., Papoudou-Bai A., Gorgoulis V. G., Kanavaros P. Implications of Oxidative Stress and Cellular Senescence in Age-Related Thymus Involution // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 7986071.
49. Benfeito S., Oliveira C., Fernandes C., Cagide F., Teixeira J., Amorim R., Garrido J., Martins C., Sarmiento B., Silva R., Remião F., Uriarte E., Oliveira P. J., Borges F. Fine-tuning the neuroprotective and blood-brain barrier permeability profile of multi-

target agents designed to prevent progressive mitochondrial dysfunction // *Eur J Med Chem.* – 2019. – Vol. 167. – P. 525-545.

50. Ding Y., Jiang Z., Xia B., Zhang L., Zhang C., Leng J. Mitochondria-targeted antioxidant therapy for an animal model of PCOS-IR // *Int J Mol Med.* – 2019. – Vol. 43, № 1. – P. 316-324.

51. Du K., Ramachandran A., Weemhoff J. L., Woolbright B. L., Jaeschke A. H., Chao X., Ding W. X., Jaeschke H. Mito-tempo protects against acute liver injury but induces limited secondary apoptosis during the late phase of acetaminophen hepatotoxicity // *Arch Toxicol.* – 2019. – Vol. 93, № 1. – P. 163-178.

52. Liu Y., Wang Y., Ding W., Wang Y. Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 5828120.

53. Nam H. Y., Hong J. A., Choi J., Shin S., Cho S. K., Seo J., Lee J. Mitochondria-Targeting Peptoids // *Bioconjug Chem.* – 2018. – Vol. 29, № 5. – P. 1669-1676.

54. Plotnikov E. Y., Zorov D. B. Pros and Cons of Use of Mitochondria-Targeted Antioxidants // *Antioxidants (Basel).* – 2019. – Vol. 8, № 8.

55. Shetty S., Kumar R., Bharati S. Mito-TEMPO, a mitochondria-targeted antioxidant, prevents N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice // *Free Radic Biol Med.* – 2019. – Vol. 136. – P. 76-86.

56. Szeto H. H., Liu S. Cardiolipin-targeted peptides rejuvenate mitochondrial function, remodel mitochondria, and promote tissue regeneration during aging // *Arch Biochem Biophys.* – 2018. – Vol. 660. – P. 137-148.

57. Yang S. G., Park H. J., Kim J. W., Jung J. M., Kim M. J., Jegal H. G., Kim I. S., Kang M. J., Wee G., Yang H. Y., Lee Y. H., Seo J. H., Kim S. U., Koo D. B. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 10130.

58. Zinovkin R. A., Zamyatnin A. A. Mitochondria-Targeted Drugs // *Curr Mol Pharmacol.* – 2019. – Vol. 12, № 3. – P. 202-214.

59. Ajith T. A. Role of mitochondria and mitochondria-targeted agents in non-alcoholic fatty liver disease // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2018. – Vol. 45, № 5. – P. 413-421.

60. Anderson R. G., Ghiraldeli L. P., Pardee T. S. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. – 2018. – Vol. 1870, № 1. – P. 96-102.
61. Liberman E. A., Topaly V. P., Tsofina L. M., Jasaitis A. A., Skulachev V. P. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria // *Nature*. – 1969. – Vol. 222, № 5198. – P. 1076-1078.
62. Green D. E. The electromechanochemical model for energy coupling in mitochondria // *Biochim Biophys Acta*. – 1974. – Vol. 346, № 1. – P. 27-78.
63. Modica-Napolitano J. S., Aprile J. R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2001. – Vol. 49, № 1-2. – P. 63-70.
64. Huang C., Liu W., Zhao X., Zhao L., Wang F. Downregulation of HBx Restrains Proliferation, Migration, and Invasion of HepG2 Cells // *Anal Cell Pathol (Amst)*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6615979.
65. Li Y., Fu Y., Hu X., Sun L., Tang D., Li N., Peng F., Fan X. G. The HBx-CTTN interaction promotes cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma via CREB1 // *Cell Death Dis*. – 2019. – Vol. 10, № 6. – P. 405.
66. Sivasudhan E., Blake N., Lu Z., Meng J., Rong R. Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 4.
67. Xu Q., Gu S., Liang J., Lin Z., Zheng S., Yan J. The Biological Function of Hepatitis B Virus X Protein in Hepatocellular Carcinoma // *Oncol Res*. – 2019. – Vol. 27, № 4. – P. 509-514.
68. Chen Z., Yu W., Zhou Q., Zhang J., Jiang H., Hao D., Wang J., Zhou Z., He C., Xiao Z. A Novel lncRNA IHS Promotes Tumor Proliferation and Metastasis in HCC by Regulating the ERK- and AKT/GSK-3 β -Signaling Pathways // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2019. – Vol. 16. – P. 707-720.
69. Giraud J., Chalopin D., Blanc J. F., Saleh M. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 655697.

70. Hu Z., Huang P., Yan Y., Zhou Z., Wang J., Wu G. Hepatitis B virus X protein related lncRNA WEE2-AS1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and invasion // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2019. – Vol. 508, № 1. – P. 79-86.
71. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma // *N Engl J Med.* – 2019. – Vol. 380, № 15. – P. 1450-1462.
72. Zheng Y., Ming P., Zhu C., Si Y., Xu S., Chen A., Wang J., Zhang B. Hepatitis B virus X protein-induced SH2 domain-containing 5 (SH2D5) expression promotes hepatoma cell growth via an SH2D5-transketolase interaction // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294, № 13. – P. 4815-4827.
73. Chou R. H., Lee C. Y., Chong L. W., Chang K. H., Lin C. L., Yan K. S., Tsou C., Hsu Y. C. HBV infection increases the risk of macular degeneration: the roles of HBx-mediated sensitization of retinal pigment epithelial cells to UV and blue light irradiation // *J Transl Med.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 221.
74. Oura K., Morishita A., Tani J., Masaki T. Tumor Immune Microenvironment and Immunosuppressive Therapy in Hepatocellular Carcinoma: A Review // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 11.
75. Wu C. C., Wu D. W., Lin Y. Y., Lin P. L., Lee H. Hepatitis B virus X protein represses LKB1 expression to promote tumor progression and poor postoperative outcome in hepatocellular carcinoma // *Surgery.* – 2018. – Vol. 163, № 5. – P. 1040-1046.
76. Wu D., Liang H., Wang H., Duan C., Yazdani H., Zhou J., Pan Y., Shan B., Su Z., Wei J., Cui T., Tai S. Hepatitis B virus-X protein regulates high mobility group box 1 to promote the formation of hepatocellular carcinoma // *Oncol Lett.* – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. 4418-4426.
77. Yu L. X., Ling Y., Wang H. Y. Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression // *NPJ Precis Oncol.* – 2018. – Vol. 2, № 1. – P. 6.
78. Njei B., Rotman Y., Ditah I., Lim J. K. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality // *Hepatology.* – 2015. – Vol. 61, № 1. – P. 191-199.

79. Bautista W. W., Osiowy C., Klein J., Minuk G. Y. Hepatitis B Virus Infection of Normal Hepatic Stem/Progenitor Cells // *J Clin Exp Hepatol.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 34-42.
80. Tian J. H., Liu W. D., Zhang Z. Y., Tang L. H., Li D., Tian Z. J., Lin S. W., Li Y. J. Influence of miR-520e-mediated MAPK signalling pathway on HBV replication and regulation of hepatocellular carcinoma cells via targeting EphA2 // *J Viral Hepat.* – 2019. – Vol. 26, № 4. – P. 496-505.
81. Ruan P., Dai X., Sun J., He C., Huang C., Zhou R., Cao Z., Ye L. Different types of viral-host junction found in HBV integration breakpoints in HBV-infected patients // *Mol Med Rep.* – 2019. – Vol. 19, № 2. – P. 1410-1416.
82. An P., Xu J., Yu Y., Winkler C. A. Host and Viral Genetic Variation in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma // *Front Genet.* – 2018. – Vol. 9. – P. 261.
83. Tu W., Gong J., Tian D., Wang Z. Hepatitis B Virus X Protein Induces SATB1 Expression Through Activation of ERK and p38MAPK Pathways to Suppress Anoikis // *Dig Dis Sci.* – 2019. – Vol. 64, № 11. – P. 3203-3214.
84. Al-Sadeq D. W., Taleb S. A., Zaied R. E., Fahad S. M., Smatti M. K., Rizeq B. R., Al Thani A. A., Yassine H. M., Nasrallah G. K. Hepatitis B Virus Molecular Epidemiology, Host-Virus Interaction, Coinfection, and Laboratory Diagnosis in the MENA Region: An Update // *Pathogens.* – 2019. – Vol. 8, № 2.
85. Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127, № 5 Suppl 1. – P. S56-61.
86. Cao J., Luo S., Xiong Y. The Variability of Amino Acid Sequences in Hepatitis B Virus // *Virol Sin.* – 2019. – Vol. 34, № 1. – P. 42-49.
87. Yuan H., Zhao L., Yuan Y., Yun H., Zheng W., Geng Y., Yang G., Wang Y., Zhao M., Zhang X. HBx represses WDR77 to enhance HBV replication by DDB1-mediated WDR77 degradation in the liver // *Theranostics.* – 2021. – Vol. 11, № 17. – P. 8362-8378.
88. Chaturvedi V. K., Singh A., Dubey S. K., Hetta H. F., John J., Singh M. P. Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma // *Microb Pathog.* – 2019. – Vol. 128. – P. 184-194.

89. Salpini R., Surdo M., Cortese M. F., Palumbo G. A., Carioti L., Cappiello G., Spanò A., Trimoulet P., Fleury H., Vecchiet J., Pasquazzi C., Mirabelli C., Scutari R., Sacco A., Alkhatib M., Missale G., Francioso S., Sarmati L., Andreoni M., Angelico M., Ceccherini-Silberstein F., Levrero M., Perno C. F., Belloni L., Svicher V. The novel HBx mutation F30V correlates with hepatocellular carcinoma in vivo, reduces hepatitis B virus replicative efficiency and enhances anti-apoptotic activity of HBx N terminus in vitro // *Clin Microbiol Infect.* – 2019. – Vol. 25, № 7. – P. 906.e901-906.e907.
90. Ma N. F., Lau S. H., Hu L., Xie D., Wu J., Yang J., Wang Y., Wu M. C., Fung J., Bai X., Tzang C. H., Fu L., Yang M., Su Y. A., Guan X. Y. COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, № 16. – P. 5061-5068.
91. Jung S. Y., Kim Y. J. C-terminal region of HBx is crucial for mitochondrial DNA damage // *Cancer Lett.* – 2013. – Vol. 331, № 1. – P. 76-83.
92. Gu C., Tao S., Hu K., Ming L., Luo M., Guo H., Su Y., Liu J., Xie Y. Establishment of an in vitro reporter system for screening HBx-targeting molecules // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2019. – Vol. 51, № 4. – P. 431-440.
93. Wang Q., Zhang W., Liu Q., Zhang X., Lv N., Ye L., Zhang X. A mutant of hepatitis B virus X protein (HBxDelta127) promotes cell growth through a positive feedback loop involving 5-lipoxygenase and fatty acid synthase // *Neoplasia.* – 2010. – Vol. 12, № 2. – P. 103-115.
94. Wang L. H., Wu C. F., Rajasekaran N., Shin Y. K. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – Vol. 51, № 6. – P. 2647-2693.
95. Sartorius K., An P., Winkler C., Chuturgoon A., Li X., Makarova J., Kramvis A. The Epigenetic Modulation of Cancer and Immune Pathways in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma: The Influence of HBx and miRNA Dysregulation // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 661204.
96. Wang L., Sun Y., Song X., Wang Z., Zhang Y., Zhao Y., Peng X., Zhang X., Li C., Gao C., Li N., Gao L., Liang X., Wu Z., Ma C. Hepatitis B virus evades immune

recognition via RNA adenosine deaminase ADAR1-mediated viral RNA editing in hepatocytes // *Cell Mol Immunol.* – 2021. – Vol. 18, № 8. – P. 1871-1882.

97. Salimi-Jeda A., Badrzadeh F., Esghaei M., Abdoli A. The role of telomerase and viruses interaction in cancer development, and telomerase-dependent therapeutic approaches // *Cancer Treat Res Commun.* – 2021. – Vol. 27. – P. 100323.

98. Xie L., Huang Y. Antagonism of RIP1 using necrostatin-1 (Nec-1) ameliorated damage and inflammation of HBV X protein (HBx) in human normal hepatocytes // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* – 2019. – Vol. 47, № 1. – P. 1194-1199.

99. Meirson T., Gil-Henn H., Samson A. O. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer // *Oncogene.* – 2020. – Vol. 39, № 9. – P. 2024-2026.

100. You H., Yuan D., Bi Y., Zhang N., Li Q., Tu T., Wei X., Lian Q., Yu T., Kong D., Yang X., Liu X., Liu X., Kong F., Zheng K., Tang R. Hepatitis B virus X protein promotes vimentin expression via LIM and SH3 domain protein 1 to facilitate epithelial-mesenchymal transition and hepatocarcinogenesis // *Cell Commun Signal.* – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 33.

101. Sanz-Cameno P., Martín-Vílchez S., Lara-Pezzi E., Borque M. J., Salmerón J., Muñoz de Rueda P., Solís J. A., López-Cabrera M., Moreno-Otero R. Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein // *Am J Pathol.* – 2006. – Vol. 169, № 4. – P. 1215-1222.

102. Ahodantin J., Bou-Nader M., Cordier C., Mégret J., Soussan P., Desdouets C., Kremsdorf D. Hepatitis B virus X protein promotes DNA damage propagation through disruption of liver polyploidization and enhances hepatocellular carcinoma initiation // *Oncogene.* – 2019. – Vol. 38, № 14. – P. 2645-2657.

103. Bock C. T., Toan N. L., Koeberlein B., Song le H., Chin R., Zentgraf H., Kandolf R., Torresi J. Subcellular mislocalization of mutant hepatitis B X proteins contributes to modulation of STAT/SOCS signaling in hepatocellular carcinoma // *Intervirology.* – 2008. – Vol. 51, № 6. – P. 432-443.

104. Henkler F., Hoare J., Waseem N., Goldin R. D., McGarvey M. J., Koshy R., King I. A. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein // *J Gen Virol.* – 2001. – Vol. 82, № Pt 4. – P. 871-882.

105. Keasler V. V., Hodgson A. J., Madden C. R., Slagle B. L. Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cells and in vivo in hydrodynamically-injected mice // *Virology*. – 2009. – Vol. 390, № 1. – P. 122-129.
106. Rahmani Z., Huh K. W., Lasher R., Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74, № 6. – P. 2840-2846.
107. Kim S., Kim H. Y., Lee S., Kim S. W., Sohn S., Kim K., Cho H. Hepatitis B virus x protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule- and Dynein-dependent manners // *J Virol*. – 2007. – Vol. 81, № 4. – P. 1714-1726.
108. Malmassari S. L., Deng Q., Fontaine H., Houitte D., Rimlinger F., Thiers V., Maillere B., Pol S., Michel M. L. Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 45, № 5. – P. 1199-1209.
109. Cho I. R., Oh M., Koh S. S., Malilas W., Srisuttee R., Jhun B. H., Pellegrini S., Fuchs S. Y., Chung Y. H. Hepatitis B virus X protein inhibits extracellular IFN- α -mediated signal transduction by downregulation of type I IFN receptor // *Int J Mol Med*. – 2012. – Vol. 29, № 4. – P. 581-586.
110. Zou L. Y., Zheng B. Y., Fang X. F., Li D., Huang Y. H., Chen Z. X., Zhou L. Y., Wang X. Z. HBx co-localizes with COXIII in HL-7702 cells to upregulate mitochondrial function and ROS generation // *Oncol Rep*. – 2015. – Vol. 33, № 5. – P. 2461-2467.
111. Wang M. D., Wu H., Huang S., Zhang H. L., Qin C. J., Zhao L. H., Fu G. B., Zhou X., Wang X. M., Tang L., Wen W., Yang W., Tang S. H., Cao D., Guo L. N., Zeng M., Wu M. C., Yan H. X., Wang H. Y. HBx regulates fatty acid oxidation to promote hepatocellular carcinoma survival during metabolic stress // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 6711-6726.

112. Tian Y., Yang W., Song J., Wu Y., Ni B. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis // *Mol Cell Biol.* – 2013. – Vol. 33, № 15. – P. 2810-2816.
113. Kgatle M. M., Spearman C. W., Kalla A. A., Hairwadzi H. N. DNA Oncogenic Virus-Induced Oxidative Stress, Genomic Damage, and Aberrant Epigenetic Alterations // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 3179421.
114. Min J. Y., Lim S. O., Jung G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584, № 11. – P. 2427-2432.
115. Lim S. O., Gu J. M., Kim M. S., Kim H. S., Park Y. N., Park C. K., Cho J. W., Park Y. M., Jung G. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 135, № 6. – P. 2128-2140, 2140.e2121-2128.
116. Kim S. J., Khan M., Quan J., Till A., Subramani S., Siddiqui A. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9, № 12. – P. e1003722.
117. Marra M., Sordelli I. M., Lombardi A., Lamberti M., Tarantino L., Giudice A., Stiuso P., Abbruzzese A., Sperlongano R., Accardo M., Agresti M., Caraglia M., Sperlongano P. Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview // *J Transl Med.* – 2011. – Vol. 9. – P. 171.
118. Lee Y. I., Hwang J. M., Im J. H., Lee Y. I., Kim N. S., Kim D. G., Yu D. Y., Moon H. B., Park S. K. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 15. – P. 15460-15471.
119. Konzack A., Jakupovic M., Kubaichuk K., Görlach A., Dombrowski F., Miinalainen I., Sormunen R., Kietzmann T. Mitochondrial Dysfunction Due to Lack of Manganese Superoxide Dismutase Promotes Hepatocarcinogenesis // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – Vol. 23, № 14. – P. 1059-1075.
120. Chin R., Earnest-Silveira L., Koeberlein B., Franz S., Zentgraf H., Dong X., Gowans E., Bock C. T., Torresi J. Modulation of MAPK pathways and cell cycle by

replicating hepatitis B virus: factors contributing to hepatocarcinogenesis // *J Hepatol.* – 2007. – Vol. 47, № 3. – P. 325-337.

121. Liu L. J., Xie S. X., Chen Y. T., Xue J. L., Zhang C. J., Zhu F. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 22, № 33. – P. 7486-7499.

122. Chen X., Bode A. M., Dong Z., Cao Y. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is regulated by oncoviruses in cancer // *Faseb j.* – 2016. – Vol. 30, № 9. – P. 3001-3010.

123. Wu S., Kanda T., Nakamoto S., Jiang X., Nakamura M., Sasaki R., Haga Y., Shirasawa H., Yokosuka O. Cooperative effects of hepatitis B virus and TNF may play important roles in the activation of metabolic pathways through the activation of NF- κ B // *Int J Mol Med.* – 2016. – Vol. 38, № 2. – P. 475-481.

124. Kastl L., Sauer S. W., Ruppert T., Beissbarth T., Becker M. S., Süß D., Krammer P. H., Gülow K. TNF- α mediates mitochondrial uncoupling and enhances ROS-dependent cell migration via NF- κ B activation in liver cells // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol. 588, № 1. – P. 175-183.

125. Shagieva G., Domnina L., Makarevich O., Chernyak B., Skulachev V., Dugina V. Depletion of mitochondrial reactive oxygen species downregulates epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer cells // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 3. – P. 4901-4913.

126. Lee A. R., Lim K. H., Park E. S., Kim D. H., Park Y. K., Park S., Kim D. S., Shin G. C., Kang H. S., Won J., Sim H., Ha Y. N., Jae B., Choi S. I., Kim K. H. Multiple Functions of Cellular FLIP Are Essential for Replication of Hepatitis B Virus // *J Virol.* – 2018. – Vol. 92, № 16.

127. Xu Y., Qi Y., Luo J., Yang J., Xie Q., Deng C., Su N., Wei W., Shi D., Xu F., Li X., Xu P. Hepatitis B Virus X Protein Stimulates Proliferation, Wound Closure and Inhibits Apoptosis of HuH-7 Cells via CDC42 // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 3.

128. Zhang Y., Yan Q., Gong L., Xu H., Liu B., Fang X., Yu D., Li L., Wei T., Wang Y., Wong C. N., Lyu Z., Tang Y., Sham P. C., Guan X. Y. Correction: C-terminal truncated HBx initiates hepatocarcinogenesis by downregulating TXNIP and

reprogramming glucose metabolism // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40, № 35. – P. 5451-5453.

129. Gao W. Y., Li D., Cai D. E., Huang X. Y., Zheng B. Y., Huang Y. H., Chen Z. X., Wang X. Z. Hepatitis B virus X protein sensitizes HL-7702 cells to oxidative stress-induced apoptosis through modulation of the mitochondrial permeability transition pore // *Oncol Rep*. – 2017. – Vol. 37, № 1. – P. 48-56.

130. Kornyejev D., Ramakrishnan D., Voitenleitner C., Livingston C. M., Xing W., Hung M., Kwon H. J., Fletcher S. P., Beran R. K. Spatiotemporal Analysis of Hepatitis B Virus X Protein in Primary Human Hepatocytes // *J Virol*. – 2019. – Vol. 93, № 16.

131. Zhang J., Ma J., Wang H., Guo L., Li J. Serum microRNA-30c levels are correlated with disease progression in Xinjiang Uygur patients with chronic hepatitis B // *Braz J Med Biol Res*. – 2017. – Vol. 50, № 6. – P. e6050.

132. Al-Anazi M. R., Nazir N., Colak D., Al-Ahdal M. N., Al-Qahtani A. A. Deletion and Functional Analysis of Hepatitis B Virus X Protein: Evidence for an Effect on Cell Cycle Regulators // *Cell Physiol Biochem*. – 2018. – Vol. 49, № 5. – P. 1987-1998.

133. Zha Y., Yao Q., Liu J. S., Wang Y. Y., Sun W. M. Hepatitis B virus X protein promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 by targeting HMGA2 // *Oncol Lett*. – 2018. – Vol. 16, № 5. – P. 5709-5714.

134. Huang X. Y., Li D., Chen Z. X., Huang Y. H., Gao W. Y., Zheng B. Y., Wang X. Z. Hepatitis B Virus X protein elevates Parkin-mediated mitophagy through Lon Peptidase in starvation // *Exp Cell Res*. – 2018. – Vol. 368, № 1. – P. 75-83.

135. Tse A. P., Sze K. M., Shea Q. T., Chiu E. Y., Tsang F. H., Chiu D. K., Zhang M. S., Lee D., Xu I. M., Chan C. Y., Koh H. Y., Wong C. M., Zheng Y. P., Ng I. O., Wong C. C. Hepatitis transactivator protein X promotes extracellular matrix modification through HIF/LOX pathway in liver cancer // *Oncogenesis*. – 2018. – Vol. 7, № 5. – P. 44.

136. Duan L., Wu R., Zhang X., Wang D., You Y., Zhang Y., Zhou L., Chen W. HBx-induced S100A9 in NF- κ B dependent manner promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells // *Cell Death Dis*. – 2018. – Vol. 9, № 6. – P. 629.

137. Kang H. J., Chung D. H., Sung C. O., Yoo S. H., Yu E., Kim N., Lee S. H., Song J. Y., Kim C. J., Choi J. SHP2 is induced by the HBx-NF- κ B pathway and contributes to fibrosis during human early hepatocellular carcinoma development // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 16. – P. 27263-27276.
138. Yen C. J., Yang S. T., Chen R. Y., Huang W., Chayama K., Lee M. H., Yang S. J., Lai H. S., Yen H. Y., Hsiao Y. W., Wang J. M., Lin Y. J., Hung L. Y. Hepatitis B virus X protein (HBx) enhances centrosomal P4.1-associated protein (CPAP) expression to promote hepatocarcinogenesis // *J Biomed Sci*. – 2019. – Vol. 26, № 1. – P. 44.
139. He Z., Yu Y., Nong Y., Du L., Liu C., Cao Y., Bai L., Tang H. Hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via upregulating thioredoxin interacting protein // *Oncol Lett*. – 2017. – Vol. 14, № 2. – P. 1323-1332.
140. Peantum J., Kunanopparat A., Hirankarn N., Tangkijvanich P., Kimkong I. Autophagy Related-Protein 16-1 Up-Regulated in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma and Impaired Apoptosis // *Gastroenterology Res*. – 2018. – Vol. 11, № 6. – P. 404-410.
141. Botstein D., Fink G. R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology // *Genetics*. – 2011. – Vol. 189, № 3. – P. 695-704.
142. Laurent J. M., Garge R. K., Teufel A. I., Wilke C. O., Kachroo A. H., Marcotte E. M. Humanization of yeast genes with multiple human orthologs reveals functional divergence between paralogs // *PLoS Biol*. – 2020. – Vol. 18, № 5. – P. e3000627.
143. Garge R. K., Laurent J. M., Kachroo A. H., Marcotte E. M. Systematic Humanization of the Yeast Cytoskeleton Discerns Functionally Replaceable from Divergent Human Genes // *Genetics*. – 2020. – Vol. 215, № 4. – P. 1153-1169.
144. Laurent J. M., Young J. H., Kachroo A. H., Marcotte E. M. Efforts to make and apply humanized yeast // *Brief Funct Genomics*. – 2016. – Vol. 15, № 2. – P. 155-163.
145. Coronas-Serna J. M., Valenti M., Del Val E., Fernández-Acero T., Rodríguez-Escudero I., Mingo J., Luna S., Torices L., Pulido R., Molina M., Cid V. J. Modeling human disease in yeast: recreating the PI3K-PTEN-Akt signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Int Microbiol*. – 2020. – Vol. 23, № 1. – P. 75-87.

146. Sampaio-Marques B., Burhans W. C., Ludovico P. Yeast at the Forefront of Research on Ageing and Age-Related Diseases // *Prog Mol Subcell Biol.* – 2019. – Vol. 58. – P. 217-242.
147. Goleva T. N., Rogov A. G., Korshunova G. A., Trendeleva T. A., Mamaev D. V., Aliverdieva D. A., Zvyagilskaya R. A. SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant // *Mitochondrion.* – 2019. – Vol. 49. – P. 206-216.
148. Trendeleva T., Sukhanova E., Ural'skaya L., Saris N. E., Zvyagilskaya R. Effect of prooxidants on yeast mitochondria // *J Bioenerg Biomembr.* – 2011. – Vol. 43, № 6. – P. 633-644.
149. Trendeleva T. A., Sukhanova E. I., Rogov A. G., Zvyagilskaya R. A., Seveina, II, Ilyasova T. M., Cherepanov D. A., Skulachev V. P. Role of charge screening and delocalization for lipophilic cation permeability of model and mitochondrial membranes // *Mitochondrion.* – 2013. – Vol. 13, № 5. – P. 500-506.
150. Zvyagilskaya R., Parchomenko O., Abramova N., Allard P., Panaretakis T., Pattison-Granberg J., Persson B. L. Proton- and sodium-coupled phosphate transport systems and energy status of *Yarrowia lipolytica* cells grown in acidic and alkaline conditions // *J Membr Biol.* – 2001. – Vol. 183, № 1. – P. 39-50.
151. Mamaev D., Zvyagilskaya R. *Yarrowia lipolytica*: a multitalented yeast species of ecological significance // *FEMS Yeast Res.* – 2021. – Vol. 21, № 2.
152. Alzheimer A., Stelzmann R. A., Schnitzlein H. N., Murtagh F. R. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde" // *Clin Anat.* – 1995. – Vol. 8, № 6. – P. 429-431.
153. Harris L. D., Jasem S., Licchesi J. D. F. The Ubiquitin System in Alzheimer's Disease // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – Vol. 1233. – P. 195-221.
154. Kaur D., Behl T., Sehgal A., Singh S., Sharma N., Chigurupati S., Alhowail A., Abdeen A., Ibrahim S. F., Vargas-De-La-Cruz C., Sachdeva M., Bhatia S., Al-Harrasi A., Bungau S. Decrypting the potential role of α -lipoic acid in Alzheimer's disease // *Life Sci.* – 2021. – Vol. 284. – P. 119899.
155. Luo R., Su L. Y., Li G., Yang J., Liu Q., Yang L. X., Zhang D. F., Zhou H., Xu M., Fan Y., Li J., Yao Y. G. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces

Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model // *Autophagy*. – 2020. – Vol. 16, № 1. – P. 52-69.

156. Morton H., Kshirsagar S., Orlov E., Bunquin L. E., Sawant N., Boleng L., George M., Basu T., Ramasubramanian B., Pradeepkiran J. A., Kumar S., Vijayan M., Reddy A. P., Reddy P. H. Defective mitophagy and synaptic degeneration in Alzheimer's disease: Focus on aging, mitochondria and synapse // *Free Radic Biol Med*. – 2021. – Vol. 172. – P. 652-667.

157. Conway M. E. Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system // *Biogerontology*. – 2020. – Vol. 21, № 3. – P. 257-274.

158. James B. D., Bennett D. A. Causes and Patterns of Dementia: An Update in the Era of Redefining Alzheimer's Disease // *Annu Rev Public Health*. – 2019. – Vol. 40. – P. 65-84.

159. Pritam P., Deka R., Bhardwaj A., Srivastava R., Kumar D., Jha A. K., Jha N. K., Villa C., Jha S. K. Antioxidants in Alzheimer's Disease: Current Therapeutic Significance and Future Prospects // *Biology (Basel)*. – 2022. – Vol. 11, № 2.

160. Walia V., Kaushik D., Mittal V., Kumar K., Verma R., Parashar J., Akter R., Rahman M. H., Bhatia S., Al-Harrasi A., Karthika C., Bhattacharya T., Chopra H., Ashraf G. M. Delineation of Neuroprotective Effects and Possible Benefits of Antioxidants Therapy for the Treatment of Alzheimer's Diseases by Targeting Mitochondrial-Derived Reactive Oxygen Species: Bench to Bedside // *Mol Neurobiol*. – 2022. – Vol. 59, № 1. – P. 657-680.

161. Gabandé-Rodríguez E., Keane L., Capasso M. Microglial phagocytosis in aging and Alzheimer's disease // *J Neurosci Res*. – 2020. – Vol. 98, № 2. – P. 284-298.

162. Agarwal M., Khan S. Plasma Lipids as Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Systematic Review // *Cureus*. – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. e12008.

163. Montagne A., Nation D. A., Sagare A. P., Barisano G., Sweeney M. D., Chakhoyan A., Pachicano M., Joe E., Nelson A. R., D'Orazio L. M., Buennagel D. P., Harrington M. G., Benzinger T. L. S., Fagan A. M., Ringman J. M., Schneider L. S., Morris J. C., Reiman E. M., Caselli R. J., Chui H. C., Tcw J., Chen Y., Pa J., Conti P. S., Law M., Toga A. W., Zlokovic B. V. APOE4 leads to blood-brain barrier

- dysfunction predicting cognitive decline // *Nature*. – 2020. – Vol. 581, № 7806. – P. 71-76.
164. Narayan P., Sienski G., Bonner J. M., Lin Y. T., Seo J., Baru V., Haque A., Milo B., Akay L. A., Graziosi A., Freyzon Y., Landgraf D., Hesse W. R., Valastyan J., Barrasa M. I., Tsai L. H., Lindquist S. PICALM Rescues Endocytic Defects Caused by the Alzheimer's Disease Risk Factor APOE4 // *Cell Rep*. – 2020. – Vol. 33, № 1. – P. 108224.
165. Nation D. A., Sweeney M. D., Montagne A., Sagare A. P., D'Orazio L. M., Pachicano M., Seppehrband F., Nelson A. R., Buennagel D. P., Harrington M. G., Benzinger T. L. S., Fagan A. M., Ringman J. M., Schneider L. S., Morris J. C., Chui H. C., Law M., Toga A. W., Zlokovic B. V. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction // *Nat Med*. – 2019. – Vol. 25, № 2. – P. 270-276.
166. Osorio C., Kanukuntla T., Diaz E., Jafri N., Cummings M., Sfera A. The Post-amyloid Era in Alzheimer's Disease: Trust Your Gut Feeling // *Front Aging Neurosci*. – 2019. – Vol. 11. – P. 143.
167. Sweeney M. D., Zhao Z., Montagne A., Nelson A. R., Zlokovic B. V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back // *Physiol Rev*. – 2019. – Vol. 99, № 1. – P. 21-78.
168. Rosenberg A., Mangialasche F., Ngandu T., Solomon A., Kivipelto M. Multidomain Interventions to Prevent Cognitive Impairment, Alzheimer's Disease, and Dementia: From FINGER to World-Wide FINGERS // *J Prev Alzheimers Dis*. – 2020. – Vol. 7, № 1. – P. 29-36.
169. Kao Y. C., Ho P. C., Tu Y. K., Jou I. M., Tsai K. J. Lipids and Alzheimer's Disease // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21, № 4.
170. Butterfield D. A., Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease // *Nat Rev Neurosci*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 148-160.
171. Zhang L., Young J. I., Gomez L., Silva T. C., Schmidt M. A., Cai J., Chen X., Martin E. R., Wang L. Sex-specific DNA methylation differences in Alzheimer's disease pathology // *Acta Neuropathol Commun*. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 77.

172. Ekundayo T. C., Olasehinde T. A., Okaiyeto K., Okoh A. I. Microbial Pathogenesis and Pathophysiology of Alzheimer's Disease: A Systematic Assessment of Microorganisms' Implications in the Neurodegenerative Disease // *Front Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – P. 648484.
173. Caruso A., Nicoletti F., Gaetano A., Scaccianoce S. Risk Factors for Alzheimer's Disease: Focus on Stress // *Front Pharmacol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 976.
174. Cohen A. D., Landau S. M., Snitz B. E., Klunk W. E., Blennow K., Zetterberg H. Fluid and PET biomarkers for amyloid pathology in Alzheimer's disease // *Mol Cell Neurosci.* – 2019. – Vol. 97. – P. 3-17.
175. Jack C. R., Jr., Bennett D. A., Blennow K., Carrillo M. C., Dunn B., Haeberlein S. B., Holtzman D. M., Jagust W., Jessen F., Karlawish J., Liu E., Molinuevo J. L., Montine T., Phelps C., Rankin K. P., Rowe C. C., Scheltens P., Siemers E., Snyder H. M., Sperling R. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease // *Alzheimers Dement.* – 2018. – Vol. 14, № 4. – P. 535-562.
176. Leuzy A., Mattsson-Carlsson N., Palmqvist S., Janelidze S., Dage J. L., Hansson O. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease // *EMBO Mol Med.* – 2022. – Vol. 14, № 1. – P. e14408.
177. Chrem Mendez P., Surace E., Bérnago Y., Calandri I., Vázquez S., Sevlever G., Allegri R. F. Biomarkers for Alzheimer's disease. Where we stand and where we are headed // *Medicina (B Aires).* – 2019. – Vol. 79, № Spec 6/1. – P. 546-551.
178. Dallé E., Mabandla M. V., Daniels W. M. U. Dielectric Constant and Conductivity of Blood Plasma: Possible Novel Biomarkers for Alzheimer's Disease // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 5756382.
179. Dhiman K., Blennow K., Zetterberg H., Martins R. N., Gupta V. B. Cerebrospinal fluid biomarkers for understanding multiple aspects of Alzheimer's disease pathogenesis // *Cell Mol Life Sci.* – 2019. – Vol. 76, № 10. – P. 1833-1863.
180. Paolacci L., Giannandrea D., Mecocci P., Parnetti L. Biomarkers for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease in the Oldest Old: Yes or No? // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Vol. 58, № 2. – P. 323-335.

181. Colom-Cadena M., Spires-Jones T., Zetterberg H., Blennow K., Caggiano A., DeKosky S. T., Fillit H., Harrison J. E., Schneider L. S., Scheltens P., de Haan W., Grundman M., van Dyck C. H., Izzo N. J., Catalano S. M. The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease // *Alzheimers Res Ther.* – 2020. – Vol. 12, № 1. – P. 21.
182. Angelopoulou E., Paudel Y. N., Shaikh M. F., Piperi C. Flotillin: A Promising Biomarker for Alzheimer's Disease // *J Pers Med.* – 2020. – Vol. 10, № 2.
183. Gleeurup H. S., Hasselbalch S. G., Simonsen A. H. Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: A Systematic Review // *Dis Markers.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 4761054.
184. Singh A. K., Verma S. Use of ocular biomarkers as a potential tool for early diagnosis of Alzheimer's disease // *Indian J Ophthalmol.* – 2020. – Vol. 68, № 4. – P. 555-561.
185. Teunissen C. E., Verberk I. M. W., Thijssen E. H., Vermunt L., Hansson O., Zetterberg H., van der Flier W. M., Mielke M. M., Del Campo M. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation // *Lancet Neurol.* – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 66-77.
186. Turkez H., Arslan M. E., Barboza J. N., Kahraman C. Y., de Sousa D. P., Mardinoğlu A. Therapeutic Potential of Ferulic Acid in Alzheimer's Disease // *Curr Drug Deliv.* – 2022. – Vol. 19, № 8. – P. 860-873.
187. Zetterberg H., Burnham S. C. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease // *Mol Brain.* – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 26.
188. Seynaeve D., Vecchio M. D., Fruhmann G., Verelst J., Cools M., Beckers J., Mulvihill D. P., Winderickx J., Franssens V. Recent Insights on Alzheimer's Disease Originating from Yeast Models // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 7.
189. Akama K. T., Albanese C., Pestell R. G., Van Eldik L. J. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95, № 10. – P. 5795-5800.

190. Heppner F. L., Ransohoff R. M., Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease // *Nat Rev Neurosci.* – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 358-372.
191. Valerio A., Boroni F., Benarese M., Sarnico I., Ghisi V., Bresciani L. G., Ferrario M., Borsani G., Spano P., Pizzi M. NF-kappaB pathway: a target for preventing beta-amyloid (A β)-induced neuronal damage and A β 42 production // *Eur J Neurosci.* – 2006. – Vol. 23, № 7. – P. 1711-1720.
192. Bell K. A., O'Riordan K. J., Sweatt J. D., Dineley K. T. MAPK recruitment by beta-amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time // *J Neurochem.* – 2004. – Vol. 91, № 2. – P. 349-361.
193. Jha S. K., Jha N. K., Kumar D., Ambasta R. K., Kumar P. Linking mitochondrial dysfunction, metabolic syndrome and stress signaling in Neurodegeneration // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2017. – Vol. 1863, № 5. – P. 1132-1146.
194. Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism during normal aging // *Aging (Milano).* – 1990. – Vol. 2, № 3. – P. 245-258.
195. Wang H., Hong X., Li S., Wang Y. Oxygen Supplementation Improves Protein Milieu Supportive of Protein Synthesis and Antioxidant Function in the Cortex of Alzheimer's Disease Model Mice-a Quantitative Proteomic Study // *J Mol Neurosci.* – 2017. – Vol. 63, № 2. – P. 243-253.
196. Frej A. D., Clark J., Le Roy C. I., Lilla S., Thomason P. A., Otto G. P., Churchill G., Insall R. H., Claus S. P., Hawkins P., Stephens L., Williams R. S. The Inositol-3-Phosphate Synthase Biosynthetic Enzyme Has Distinct Catalytic and Metabolic Roles // *Mol Cell Biol.* – 2016. – Vol. 36, № 10. – P. 1464-1479.
197. Kaddurah-Daouk R., Zhu H., Sharma S., Bogdanov M., Rozen S. G., Matson W., Oki N. O., Motsinger-Reif A. A., Churchill E., Lei Z., Appleby D., Kling M. A., Trojanowski J. Q., Doraiswamy P. M., Arnold S. E. Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease // *Transl Psychiatry.* – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. e244.

198. Korber M., Klein I., Daum G. Steryl ester synthesis, storage and hydrolysis: A contribution to sterol homeostasis // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. – 2017. – Vol. 1862, № 12. – P. 1534-1545.
199. Spincemaille P., Cammue B. P., Thevissen K. Sphingolipids and mitochondrial function, lessons learned from yeast // *Microb Cell*. – 2014. – Vol. 1, № 7. – P. 210-224.
200. Kennedy M. A., Gable K., Niewola-Staszewska K., Abreu S., Johnston A., Harris L. J., Reggiori F., Loewith R., Dunn T., Bennett S. A., Baetz K. A neurotoxic glycerophosphocholine impacts PtdIns-4, 5-bisphosphate and TORC2 signaling by altering ceramide biosynthesis in yeast // *PLoS Genet*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. e1004010.
201. Behzadfar L., Abdollahi M., Sabzevari O., Hosseini R., Salimi A., Naserzadeh P., Sharifzadeh M., Pourahmad J. Potentiating role of copper on spatial memory deficit induced by beta amyloid and evaluation of mitochondrial function markers in the hippocampus of rats // *Metallomics*. – 2017. – Vol. 9, № 7. – P. 969-980.
202. Bleackley M. R., Macgillivray R. T. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease // *Biometals*. – 2011. – Vol. 24, № 5. – P. 785-809.
203. Cavallaro R. A., Nicolia V., Fiorenza M. T., Scarpa S., Fusco A. S-Adenosylmethionine and Superoxide Dismutase 1 Synergistically Counteract Alzheimer's Disease Features Progression in TgCRND8 Mice // *Antioxidants (Basel)*. – 2017. – Vol. 6, № 4.
204. Rafii M. S. Tau PET Imaging for Staging of Alzheimer's Disease in Down Syndrome // *Dev Neurobiol*. – 2019. – Vol. 79, № 7. – P. 711-715.
205. Janowicz P. W., Leinenga G., Götz J., Nisbet R. M. Ultrasound-mediated blood-brain barrier opening enhances delivery of therapeutically relevant formats of a tau-specific antibody // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 9255.
206. Rösler T. W., Höglinger G. U. Tau links developmental to neurodegenerative diseases // *Neurosci Biobehav Rev*. – 2019. – Vol. 104. – P. 26-27.
207. Fichou Y., Lin Y., Rauch J. N., Vigers M., Zeng Z., Srivastava M., Keller T. J., Freed J. H., Kosik K. S., Han S. Cofactors are essential constituents of stable and

- seeding-active tau fibrils // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018. – Vol. 115, № 52. – P. 13234-13239.
208. Heinisch J. J., Brandt R. Signaling pathways and posttranslational modifications of tau in Alzheimer's disease: the humanization of yeast cells // *Microb Cell.* – 2016. – Vol. 3, № 4. – P. 135-146.
209. Zhang X., Wang W. A., Jiang L. X., Liu H. Y., Zhang B. Z., Lim N., Li Q. Y., Huang F. D. Downregulation of RBO-PI4KIII α Facilitates A β (42) Secretion and Ameliorates Neural Deficits in A β (42)-Expressing *Drosophila* // *J Neurosci.* – 2017. – Vol. 37, № 19. – P. 4928-4941.
210. Kubo A., Ueda S., Yamane A., Wada-Kakuda S., Narita M., Matsuyama M., Nomori A., Takashima A., Kato T., Onodera O., Goto M., Ito M., Tomiyama T., Mori H., Murayama S., Ihara Y., Misonou H., Miyasaka T. Ectopic Expression Induces Abnormal Somatodendritic Distribution of Tau in the Mouse Brain // *J Neurosci.* – 2019. – Vol. 39, № 34. – P. 6781-6797.
211. Reznik E., Miller M. L., Şenbabaoğlu Y., Riaz N., Sarungbam J., Tickoo S. K., Al-Ahmadie H. A., Lee W., Seshan V. E., Hakimi A. A., Sander C. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers // *Elife.* – 2016. – Vol. 5.
212. Stocco A., Siciliano G., Migliore L., Coppedè F. Decreased Methylation of the Mitochondrial D-Loop Region in Late-Onset Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Vol. 59, № 2. – P. 559-564.
213. Paroni G., Bisceglia P., Seripa D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis.* – 2019. – Vol. 68, № 2. – P. 493-510.
214. Tolar M., Abushakra S., Sabbagh M. The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis // *Alzheimers Dement.* – 2020. – Vol. 16, № 11. – P. 1553-1560.
215. Ramesh M., Gopinath P., Govindaraju T. Role of Post-translational Modifications in Alzheimer's Disease // *Chembiochem.* – 2020. – Vol. 21, № 8. – P. 1052-1079.
216. Reddy P. H., Tripathi R., Troung Q., Tirumala K., Reddy T. P., Anekonda V., Shirendeb U. P., Calkins M. J., Reddy A. P., Mao P., Manczak M. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's

- disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1822, № 5. – P. 639-649.
217. Nguyen T. T., Ta Q. T. H., Nguyen T. K. O., Nguyen T. T. D., Vo V. G. Role of Body-Fluid Biomarkers in Alzheimer's Disease Diagnosis // *Diagnostics (Basel)*. – 2020. – Vol. 10, № 5.
218. Albensi B. C. Dysfunction of mitochondria: Implications for Alzheimer's disease // *Int Rev Neurobiol*. – 2019. – Vol. 145. – P. 13-27.
219. Cubinkova V., Valachova B., Uhrinova I., Brezovakova V., Smolek T., Jadhav S., Zilka N. Alternative hypotheses related to Alzheimer's disease // *Bratisl Lek Listy*. – 2018. – Vol. 119, № 4. – P. 210-216.
220. Pradeepkiran J. A., Reddy P. H. Defective mitophagy in Alzheimer's disease // *Ageing Res Rev*. – 2020. – Vol. 64. – P. 101191.
221. Visioli F., Rodríguez-Pérez M., Gómez-Torres Ó., Pintado-Losa C., Burgos-Ramos E. Hydroxytyrosol improves mitochondrial energetics of a cellular model of Alzheimer's disease // *Nutr Neurosci*. – 2022. – Vol. 25, № 5. – P. 990-1000.
222. Kozlov S., Afonin A., Evsyukov I., Bondarenko A. Alzheimer's disease: as it was in the beginning // *Rev Neurosci*. – 2017. – Vol. 28, № 8. – P. 825-843.
223. Harris J. J., Jolivet R., Attwell D. Synaptic energy use and supply // *Neuron*. – 2012. – Vol. 75, № 5. – P. 762-777.
224. Kim D. I., Lee K. H., Oh J. Y., Kim J. S., Han H. J. Relationship Between β -Amyloid and Mitochondrial Dynamics // *Cell Mol Neurobiol*. – 2017. – Vol. 37, № 6. – P. 955-968.
225. Lin M. Y., Sheng Z. H. Regulation of mitochondrial transport in neurons // *Exp Cell Res*. – 2015. – Vol. 334, № 1. – P. 35-44.
226. Obashi K., Okabe S. Regulation of mitochondrial dynamics and distribution by synapse position and neuronal activity in the axon // *Eur J Neurosci*. – 2013. – Vol. 38, № 3. – P. 2350-2363.
227. Pernas L., Scorrano L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function // *Annu Rev Physiol*. – 2016. – Vol. 78. – P. 505-531.

228. Onyango I. G., Khan S. M., Bennett J. P., Jr. Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2017. – Vol. 22, № 5. – P. 854-872.
229. Parmar H. S., Houdek Z., Pesta M., Vaclava C., Dvorak P., Hatina J. Protective Effect of Aspirin Against Oligomeric A β 42 Induced Mitochondrial Alterations and Neurotoxicity in Differentiated EC P19 Neuronal Cells // *Curr Alzheimer Res*. – 2017. – Vol. 14, № 8. – P. 810-819.
230. Cabezas-Opazo F. A., Vergara-Pulgar K., Pérez M. J., Jara C., Osorio-Fuentealba C., Quintanilla R. A. Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease // *Oxid Med Cell Longev*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 509654.
231. Guo L., Tian J., Du H. Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Transmission Failure in Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis*. – 2017. – Vol. 57, № 4. – P. 1071-1086.
232. Naia L., Ferreira I. L., Ferreira E., Rego A. C. Mitochondrial Ca(2+) handling in Huntington's and Alzheimer's diseases - Role of ER-mitochondria crosstalk // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2017. – Vol. 483, № 4. – P. 1069-1077.
233. Reddy P. H. Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction // *J Alzheimers Dis*. – 2014. – Vol. 40, № 2. – P. 245-256.
234. Silva D. F., Selfridge J. E., Lu J., E L., Roy N., Hutfles L., Burns J. M., Michaelis E. K., Yan S., Cardoso S. M., Swerdlow R. H. Bioenergetic flux, mitochondrial mass and mitochondrial morphology dynamics in AD and MCI cybrid cell lines // *Hum Mol Genet*. – 2013. – Vol. 22, № 19. – P. 3931-3946.
235. Swerdlow R. H. Bioenergetics and metabolism: a bench to bedside perspective // *J Neurochem*. – 2016. – Vol. 139 Suppl 2, № Suppl 2. – P. 126-135.
236. Völgyi K., Hádén K., Kis V., Gulyássy P., Badics K., Györfly B. A., Simor A., Szabó Z., Janáky T., Drahos L., Dobolyi Á., Penke B., Juhász G., Kékesi K. A. Mitochondrial Proteome Changes Correlating with β -Amyloid Accumulation // *Mol Neurobiol*. – 2017. – Vol. 54, № 3. – P. 2060-2078.

237. Thomas S., Hoxha K., Tran A., Prendergast G. C. Bin1 antibody lowers the expression of phosphorylated Tau in Alzheimer's disease // *J Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 120, № 10. – P. 18320-18331.
238. Denner J., Tanzi R., Jacobson S. Animal Models of Alzheimer's Disease Should Be Controlled for Roseolovirus // *J Alzheimers Dis.* – 2020. – Vol. 77, № 2. – P. 543-545.
239. Kosel F., Pelley J. M. S., Franklin T. B. Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2020. – Vol. 112. – P. 634-647.
240. Nakai T., Yamada K., Mizoguchi H. Alzheimer's Disease Animal Models: Elucidation of Biomarkers and Therapeutic Approaches for Cognitive Impairment // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 11.
241. Ni R. Magnetic Resonance Imaging in Animal Models of Alzheimer's Disease Amyloidosis // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 23.
242. Scheffer S., Hermkens D. M. A., van der Weerd L., de Vries H. E., Daemen M. Vascular Hypothesis of Alzheimer Disease: Topical Review of Mouse Models // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2021. – Vol. 41, № 4. – P. 1265-1283.
243. Caldwell K. A., Willicott C. W., Caldwell G. A. Modeling neurodegeneration in *Caenorhabditiselegans* // *Dis Model Mech.* – 2020. – Vol. 13, № 10.
244. Giong H. K., Subramanian M., Yu K., Lee J. S. Non-Rodent Genetic Animal Models for Studying Tauopathy: Review of *Drosophila*, Zebrafish, and *C. elegans* Models // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 16.
245. Naranjo-Galindo F. J., Ai R., Fang E. F., Nilsen H. L., SenGupta T. *C. elegans* as an Animal Model to Study the Intersection of DNA Repair, Aging and Neurodegeneration // *Front Aging.* – 2022. – Vol. 3. – P. 916118.
246. Kitani-Morii F., Friedland R. P., Yoshida H., Mizuno T. *Drosophila* as a Model for Microbiota Studies of Neurodegeneration // *J Alzheimers Dis.* – 2021. – Vol. 84, № 2. – P. 479-490.
247. Tue N. T., Dat T. Q., Ly L. L., Anh V. D., Yoshida H. Insights from *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer's disease // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2020. – Vol. 25, № 1. – P. 134-146.

248. Lim S., Haque M. M., Kim D., Kim D. J., Kim Y. K. Cell-based Models To Investigate Tau Aggregation // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2014. – Vol. 12, № 20-21. – P. 7-13.
249. Lippens G., Gigant B. Elucidating Tau function and dysfunction in the era of cryo-EM // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294, № 24. – P. 9316-9325.
250. Nizynski B., Dzwolak W., Nieznanski K. Amyloidogenesis of Tau protein // *Protein Sci.* – 2017. – Vol. 26, № 11. – P. 2126-2150.
251. Gamblin T. C., King M. E., Dawson H., Vitek M. P., Kuret J., Berry R. W., Binder L. I. In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, № 20. – P. 6136-6144.
252. Bulic B., Pickhardt M., Khlistunova I., Biernat J., Mandelkow E. M., Mandelkow E., Waldmann H. Rhodanine-based tau aggregation inhibitors in cell models of tauopathy // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2007. – Vol. 46, № 48. – P. 9215-9219.
253. Khlistunova I., Pickhardt M., Biernat J., Wang Y., Mandelkow E. M., Mandelkow E. Inhibition of tau aggregation in cell models of tauopathy // *Curr Alzheimer Res.* – 2007. – Vol. 4, № 5. – P. 544-546.
254. Reilly P., Winston C. N., Baron K. R., Trejo M., Rockenstein E. M., Akers J. C., Kfoury N., Diamond M., Masliah E., Rissman R. A., Yuan S. H. Novel human neuronal tau model exhibiting neurofibrillary tangles and transcellular propagation // *Neurobiol Dis.* – 2017. – Vol. 106. – P. 222-234.
255. Kfoury N., Holmes B. B., Jiang H., Holtzman D. M., Diamond M. I. Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 23. – P. 19440-19451.
256. Tcw J. Human iPSC application in Alzheimer's disease and Tau-related neurodegenerative diseases // *Neurosci Lett.* – 2019. – Vol. 699. – P. 31-40.
257. Raja W. K., Mungenast A. E., Lin Y. T., Ko T., Abdurrob F., Seo J., Tsai L. H. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, № 9. – P. e0161969.

258. Meissner A., Mikkelsen T. S., Gu H., Wernig M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein B. E., Nusbaum C., Jaffe D. B., Gnirke A., Jaenisch R., Lander E. S. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells // *Nature*. – 2008. – Vol. 454, № 7205. – P. 766-770.
259. Rohani L., Johnson A. A., Arnold A., Stolzing A. The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? // *Aging Cell*. – 2014. – Vol. 13, № 1. – P. 2-7.
260. Mertens J., Paquola A. C. M., Ku M., Hatch E., Böhnke L., Ladjevardi S., McGrath S., Campbell B., Lee H., Herdy J. R., Gonçalves J. T., Toda T., Kim Y., Winkler J., Yao J., Hetzer M. W., Gage F. H. Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Vol. 17, № 6. – P. 705-718.
261. Vera E., Bosco N., Studer L. Generating Late-Onset Human iPSC-Based Disease Models by Inducing Neuronal Age-Related Phenotypes through Telomerase Manipulation // *Cell Rep*. – 2016. – Vol. 17, № 4. – P. 1184-1192.
262. Santacruz K., Lewis J., Spires T., Paulson J., Kotilinek L., Ingelsson M., Guimaraes A., DeTure M., Ramsden M., McGowan E., Forster C., Yue M., Orne J., Janus C., Mariash A., Kuskowski M., Hyman B., Hutton M., Ashe K. H. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function // *Science*. – 2005. – Vol. 309, № 5733. – P. 476-481.
263. Polydoro M., Dzhala V. I., Pooler A. M., Nicholls S. B., McKinney A. P., Sanchez L., Pitstick R., Carlson G. A., Staley K. J., Spires-Jones T. L., Hyman B. T. Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model // *Acta Neuropathol*. – 2014. – Vol. 127, № 2. – P. 257-270.
264. Boluda S., Iba M., Zhang B., Raible K. M., Lee V. M., Trojanowski J. Q. Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains // *Acta Neuropathol*. – 2015. – Vol. 129, № 2. – P. 221-237.
265. Narasimhan S., Lee V. M. Y. The use of mouse models to study cell-to-cell transmission of pathological tau // *Methods Cell Biol*. – 2017. – Vol. 141. – P. 287-305.

266. Saraceno C., Musardo S., Marcello E., Pelucchi S., Di Luca M. Modeling Alzheimer's disease: from past to future // *Front Pharmacol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 77.
267. Navarrete L. P., Pérez P., Morales I., Maccioni R. B. Novel drugs affecting tau behavior in the treatment of Alzheimer's disease and tauopathies // *Curr Alzheimer Res.* – 2011. – Vol. 8, № 6. – P. 678-685.
268. Hawkins K. E., Duchon M. Modelling mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease using human induced pluripotent stem cells // *World J Stem Cells.* – 2019. – Vol. 11, № 5. – P. 236-253.
269. Bouleau S., Tricoire H. Drosophila models of Alzheimer's disease: advances, limits, and perspectives // *J Alzheimers Dis.* – 2015. – Vol. 45, № 4. – P. 1015-1038.
270. Frost B., Bardai F. H., Feany M. B. Lamin Dysfunction Mediates Neurodegeneration in Tauopathies // *Curr Biol.* – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 129-136.
271. Trotter M. B., Stephens T. D., McGrath J. P., Steinhilb M. L. The Drosophila model system to study tau action // *Methods Cell Biol.* – 2017. – Vol. 141. – P. 259-286.
272. Pham H. M., Xu A., Schriener S. E., Sevrioukov E. A., Jafari M. Cinnamaldehyde Improves Lifespan and Healthspan in Drosophila melanogaster Models for Alzheimer's Disease // *Biomed Res Int.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 3570830.
273. Kim M., Subramanian M., Cho Y. H., Kim G. H., Lee E., Park J. J. Short-term exposure to dim light at night disrupts rhythmic behaviors and causes neurodegeneration in fly models of tauopathy and Alzheimer's disease // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – Vol. 495, № 2. – P. 1722-1729.
274. Bardai F. H., Wang L., Mutreja Y., Yenjerla M., Gamblin T. C., Feany M. B. A Conserved Cytoskeletal Signaling Cascade Mediates Neurotoxicity of FTDP-17 Tau Mutations In Vivo // *J Neurosci.* – 2018. – Vol. 38, № 1. – P. 108-119.
275. Chen K. F., Crowther D. C. Insights into amyloid disease from fly models // *Essays Biochem.* – 2014. – Vol. 56. – P. 69-83.
276. Pir G. J., Choudhary B., Mandelkow E. Caenorhabditis elegans models of tauopathy // *Faseb j.* – 2017. – Vol. 31, № 12. – P. 5137-5148.

277. Griffin E. F., Caldwell K. A., Caldwell G. A. Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans* // *ACS Chem Neurosci*. – 2017. – Vol. 8, № 12. – P. 2596-2606.
278. Wang C., Saar V., Leung K. L., Chen L., Wong G. Human amyloid β peptide and tau co-expression impairs behavior and causes specific gene expression changes in *Caenorhabditis elegans* // *Neurobiol Dis*. – 2018. – Vol. 109, № Pt A. – P. 88-101.
279. Miyasaka T., Shinzaki Y., Yoshimura S., Yoshina S., Kage-Nakadai E., Mitani S., Ihara Y. Imbalanced Expression of Tau and Tubulin Induces Neuronal Dysfunction in *C. elegans* Models of Tauopathy // *Front Neurosci*. – 2018. – Vol. 12. – P. 415.
280. Choudhary B., Mandelkow E., Mandelkow E. M., Pir G. J. Glutamatergic nervous system degeneration in a *C. elegans* Tau(A152T) tauopathy model involves pathways of excitotoxicity and Ca(2+) dysregulation // *Neurobiol Dis*. – 2018. – Vol. 117. – P. 189-202.
281. Fang E. F., Hou Y., Palikaras K., Adriaanse B. A., Kerr J. S., Yang B., Lautrup S., Hasan-Olive M. M., Caponio D., Dan X., Rocktäschel P., Croteau D. L., Akbari M., Greig N. H., Fladby T., Nilsen H., Cader M. Z., Mattson M. P., Tavernarakis N., Bohr V. A. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease // *Nat Neurosci*. – 2019. – Vol. 22, № 3. – P. 401-412.
282. Ciaccioli G., Martins A., Rodrigues C., Vieira H., Calado P. A powerful yeast model to investigate the synergistic interaction of α -synuclein and tau in neurodegeneration // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. e55848.
283. Pimentel C., Batista-Nascimento L., Rodrigues-Pousada C., Menezes R. A. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Oxid Med Cell Longev*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 132146.
284. Porzoor A., Macreadie I. G. Application of yeast to study the tau and amyloid- β abnormalities of Alzheimer's disease // *J Alzheimers Dis*. – 2013. – Vol. 35, № 2. – P. 217-225.
285. Tenreiro S., Munder M. C., Alberti S., Outeiro T. F. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration // *J Neurochem*. – 2013. – Vol. 127, № 4. – P. 438-452.

286. Dhakal S., Macreadie I. Protein Homeostasis Networks and the Use of Yeast to Guide Interventions in Alzheimer's Disease // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 21.
287. Futai E. Advanced Yeast Models of Familial Alzheimer Disease Expressing FAD-Linked Presenilin to Screen Mutations and γ -Secretase Modulators // *Methods Mol Biol.* – 2019. – Vol. 2049. – P. 403-417.
288. Rencus-Lazar S., DeRowe Y., Adsi H., Gazit E., Laor D. Yeast Models for the Study of Amyloid-Associated Disorders and Development of Future Therapy // *Front Mol Biosci.* – 2019. – Vol. 6. – P. 15.
289. Bakota L., Brandt R., Heinisch J. J. Triple mammalian/yeast/bacterial shuttle vectors for single and combined Lentivirus- and Sindbis virus-mediated infections of neurons // *Mol Genet Genomics.* – 2012. – Vol. 287, № 4. – P. 313-324.
290. Caine J., Sankovich S., Antony H., Waddington L., Macreadie P., Varghese J., Macreadie I. Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response // *FEMS Yeast Res.* – 2007. – Vol. 7, № 8. – P. 1230-1236.
291. Hamos J. E., Oblas B., Pulaski-Salo D., Welch W. J., Bole D. G., Drachman D. A. Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease // *Neurology.* – 1991. – Vol. 41, № 3. – P. 345-350.
292. Edbauer D., Winkler E., Regula J. T., Pesold B., Steiner H., Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity // *Nat Cell Biol.* – 2003. – Vol. 5, № 5. – P. 486-488.
293. Yagishita S., Futai E., Ishiura S. In vitro reconstitution of gamma-secretase activity using yeast microsomes // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – Vol. 377, № 1. – P. 141-145.
294. Bagriantsev S. N., Kushnirov V. V., Liebman S. W. Analysis of amyloid aggregates using agarose gel electrophoresis // *Methods Enzymol.* – 2006. – Vol. 412. – P. 33-48.
295. Rajasekhar K., Suresh S. N., Manjithaya R., Govindaraju T. Rationally designed peptidomimetic modulators of a β toxicity in Alzheimer's disease // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 8139.

296. França M. B., Lima K. C., Eleutherio E. C. Oxidative Stress and Amyloid Toxicity: Insights From Yeast // *J Cell Biochem.* – 2017. – Vol. 118, № 6. – P. 1442-1452.
297. Matlack K. E., Tardiff D. F., Narayan P., Hamamichi S., Caldwell K. A., Caldwell G. A., Lindquist S. Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- β (A β) oligomers to restore endocytosis and ameliorate A β toxicity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – Vol. 111, № 11. – P. 4013-4018.
298. Tardiff D. F., Brown L. E., Yan X., Trilles R., Jui N. T., Barrasa M. I., Caldwell K. A., Caldwell G. A., Schaus S. E., Lindquist S. Dihydropyrimidine-Thiones and Clioquinol Synergize To Target β -Amyloid Cellular Pathologies through a Metal-Dependent Mechanism // *ACS Chem Neurosci.* – 2017. – Vol. 8, № 9. – P. 2039-2055.
299. Vanhelmont T., Vandebroek T., De Vos A., Terwel D., Lemaire K., Anandhakumar J., Franssens V., Swinnen E., Van Leuven F., Winderickx J. Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast // *FEMS Yeast Res.* – 2010. – Vol. 10, № 8. – P. 992-1005.
300. Zambrano C. A., Egaña J. T., Núñez M. T., Maccioni R. B., González-Billault C. Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1 // *Free Radic Biol Med.* – 2004. – Vol. 36, № 11. – P. 1393-1402.
301. Vandebroek T., Vanhelmont T., Terwel D., Borghgraef P., Lemaire K., Snauwaert J., Wera S., Van Leuven F., Winderickx J. Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 34. – P. 11466-11475.
302. Rosseels J., Van den Brande J., Violet M., Jacobs D., Grognet P., Lopez J., Huvent I., Caldara M., Swinnen E., Papegaey A., Caillierez R., Buée-Scherrer V., Engelborghs S., Lippens G., Colin M., Buée L., Galas M. C., Vanmechelen E., Winderickx J. Tau monoclonal antibody generation based on humanized yeast models: impact on Tau oligomerization and diagnostics // *J Biol Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 7. – P. 4059-4074.

303. Rogov A. G., Ovchenkova A. P., Goleva T. N., Kireev, II, Zvyagilskaya R. A. New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors // *Anal Biochem.* – 2018. – Vol. 552. – P. 24-29.
304. de Chaumont F., Dallongeville S., Chenouard N., Hervé N., Pop S., Provoost T., Meas-Yedid V., Pankajakshan P., Lecomte T., Le Montagner Y., Lagache T., Dufour A., Olivo-Marin J. C. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research // *Nat Methods.* – 2012. – Vol. 9, № 7. – P. 690-696.
305. Zharova T. V., Vinogradov A. D. Energy-linked binding of Pi is required for continuous steady-state proton-translocating ATP hydrolysis catalyzed by F₀F₁ ATP synthase // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45, № 48. – P. 14552-14558.
306. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
307. Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 416, № 1. – P. 15-18.