

УДК 576

ПОИСК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СЕНСОРОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ КАК ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

Обзор

© 2019 Е.А. Климанова^{1*,**}, С.В. Сидоренко¹, А.М. Тверской^{1**}, А.А. Шиян¹,
Л.В. Смольянинова^{1**}, Л.В. Капильевич², С.В. Гусакова³,
Г.В. Максимов¹, О.Д. Лопина^{1**}, С.Н. Орлов^{1,2,3}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 634050 Томск, Россия

Поступила в редакцию 03.06.2019

После доработки 15.07.2019

Принята к публикации 16.07.2019

Поддержание неравновесного распределения Na^+ и K^+ между цитоплазмой и внеклеточной средой предполагает наличие сенсоров, реагирующих конформационными переходами в ответ на изменение внутриклеточной концентрации этих одновалентных катионов. Молекулярная природа сенсоров одновалентных катионов была установлена при изучении структуры Na,K-АТФазы, рецепторов, сопряженных с GTP-связывающими белками, и белков теплового шока. В последнее время было обнаружено, что изменение внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ является ключевым фактором регуляции транскрипции и трансляции соответственно. В данном обзоре мы суммируем основные результаты этих исследований, а также физиологическое и патофизиологическое значение Na^+ , K^+ -чувствительного механизма регуляции экспрессии генов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: натрий, калий, транскрипция, трансляция.

DOI: 10.1134/S032097251911006X

В своих работах, которые привели к получению Нобелевской премии, Earl Wilbur Sutherland Jr. сформулировал концепцию, согласно которой любая молекула может рассматриваться в качестве посредника в процессе передачи внеклеточных сигналов внутрь клетки, если она удовлетворяет трем основным критериям. (i) Изменение внутриклеточной концентрации молекулы-кандидата в ответ на воздействие

внешнего стимула предшествует формированию функционального ответа клетки и нормализуется после окончания действия данного стимула. (ii) В отсутствие внешнего стимула изменение внутриклеточной концентрации посредника является достаточным условием для формирования ответа клетки. (iii) Функциональный ответ клетки опосредован взаимодействием посредника с его высокоселективными внутриклеточными

Принятые сокращения: AMPK – AMP-чувствительная протеинкиназа; CaMK – Ca^{2+} /кальмодулин-чувствительная протеинкиназа; COX-2 – циклооксигеназа 2-го типа; CREB (cyclic AMP response element-binding protein) – белок, связывающий cAMP и регулирующий транскрипцию генов; EPS (electrical pulse stimulation) – электрическая пульсовая стимуляция; ERG (early response genes) – гены раннего ответа; GPCRs (G-protein-coupled receptors) – рецепторы, сопряженные с G-белками; HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1; HRE (HIF response element) – HIF-чувствительный элемент; HSP – белок теплового шока; NaRE – Na-чувствительный элемент, регулирующий транскрипцию генов; NaREB – неидентифицированный сенсор изменения $[\text{Na}^+]_i$, активирующий NaRE; NBD – нуклеотидсвязывающий домен; NFAT (nuclear factor of activated T-cells) – ядерный фактор активированных T-клеток; NFkB (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) – ядерный фактор «каппа-би» активированных B-клеток; NMDA – N-метил-D-аспаратат; SBD – субстратсвязывающий домен; SERCA (skeletal-muscle sarcoplasmic-/endoplasmic-reticulum Ca-ATPase) – Ca-АТФаза саркоплазматического/эндоплазматического ретикула скелетной мускулатуры; UTR – нетранслируемые участки мРНК; ГМК – гладкомышечные клетки, КТС – кардиотонические стероиды.

* Адресат для корреспонденции.

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

сенсорами [1]. Последующие работы показали, что этим требованиям удовлетворяют такие низкомолекулярные соединения, как циклические нуклеотиды (сАМР, сГМР), продукты катаболизма фосфолипидов (диацилглицерол, инозитол-1,4,5-трисфосфат), а также ионы Ca^{2+} [2–5].

Как и в случае перечисленных выше канонических посредников, внутриклеточное содержание моновалентных ионов временно изменяется в ответ на действие целого ряда стимулов. Так, например, активация $\text{Na}_o^+/\text{H}_i^+$ обмена и, как следствие этого, увеличение $[\text{Na}^+]_i$ отмечено при действии ростовых факторов во всех изучавшихся на этот предмет типах клеток [6–11]. В эритроцитах млекопитающих, мембранный потенциал которых близок к равновесному хлорному потенциалу ($E_m = E_{\text{Cl}} \sim -(8-12)$ мВ), активация Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов приводит к $(5-8) \times$ уменьшению $[\text{K}^+]_i$ [12], что в свою очередь сопровождается сжатием клеток и эритроцитозом — особой формой программируемой смерти эритроцитов [13]. В нейронах и астроцитах короткие периоды синаптической активности приводят к увеличению локальной концентрации $[\text{Na}^+]_i$, от ~ 10 до $50-100$ мМ, что объясняют входом Na^+ через ионотропные глутаматные рецепторы или сопряженные с переносом Na_o^+ транспортеры нейромедиаторов [14, 15]. Гипоксия клеток гладкой мускулатуры приводит к $(2-3) \times$ увеличению $[\text{Na}^+]_i$, что наряду с приростом содержания фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией (HIF-1), является причиной изменения экспрессии генов [16, 17]. В скелетной мускулатуре физические нагрузки сопровождаются диссипацией трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ , что приводит к $(5-10) \times$ увеличению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [18]. Эти данные, а также результаты селективного влияния Na^+ , K^+ , Cl^- и HCO_3^- на активность ферментов и экспрессию генов позволили в 2006-м году Orlov и Hamet [19] сформулировать гипотезу, рассматривающую одновалентные ионы как вторичные посредники. Задачей данного обзора является рассмотрение новых сведений по этому вопросу с особым вниманием к работам, посвященным идентификации внутриклеточных сенсоров одновалентных катионов. Сведения о вовлечении одновалентных анионов в процессы внутриклеточной сигнализации рассмотрены в недавних обзорах [20, 21].

ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ СЕНСОРЫ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

Наиболее изученные мембранные транспортеры, активность которых регулируется натрием

и/или калием в диапазоне, соответствующем диапазону изменения их внутриклеточных концентраций (что, по-видимому, следует рассматривать как первое указание на наличие белков, содержащих высокоселективные участки связывания этих катионов), приведены на рис. 1. Наряду с мембранными транспортерами были обнаружены и другие белки, активность которых изменялась при варьировании концентрации одновалентных катионов [22, 23]. В этой части нашего обзора мы суммируем сведения, полученные при изучении структуры участков связывания одновалентных катионов.

Na,K-АТРаза. Несмотря на 70 лет, прошедших с момента идентификации первых селективных транспортеров Na^+ и K^+ , молекулярная структура участков связывания этих катионов наиболее полно изучена только в случае Na,K-АТРаза.

В каталитическом цикле Na,K-АТРаза попеременно существует в двух конформационных состояниях, одно из которых имеет высокое сродство к ионам Na^+ (E1), а другое — к ионам K^+ (E2). Сопоставление 3D структуры фермента в двух конформациях позволило получить информацию о центрах связывания этих катионов (рис. 2). Согласно данным рентгеноструктурного анализа в конформации E1 [24], участки связывания Na^+ (всего их три: I, II и III) располагаются внутри трансмембранной части α -субъединицы (между трансмембранными α -спиралями M4, M5, M6 и M8) на глубине $\sim 1/3$ от толщины мембраны и ближе к ее цитоплазматической поверхности. В формировании участков связывания Na^+ основное участие принимают следующие аминокислоты α -субъединицы фермента: Ala323, Glu779, Asp804, Asp808, Thr772, Ser775, Asn776 (участок I); Val322, Ala323, Val325, Glu327, Asp804 (участок II) и Tyr771, Thr772, Thr774, Ser775, Asp808, Gln923, Asp926 (участок III). Участок I локализован в том же положении, что и один из участков связывания K^+ , участок II — на $5 \text{ \AA}$ ближе к цитоплазматической поверхности мембраны. Участки I и II находятся вблизи цитоплазматической части трансмембранной спирали M5 и разделены боковой цепью Ser775. Участок III стерически ограничен (вдоль M5) и слишком мал для иона K^+ .

Расстояние между участками I и II для Na^+ составляет $3,2-3,6 \text{ \AA}$, что меньше, чем расстояние между двумя участками связывания K^+ . Этой длины, по-видимому, достаточно для смежного размещения двух ионов натрия (ионный радиус $0,95 \text{ \AA}$), но не двух ионов калия (ионный радиус катиона $1,33 \text{ \AA}$). Было предположено, что связывание Na^+ специфично, поскольку для связывания этого катиона достаточ-

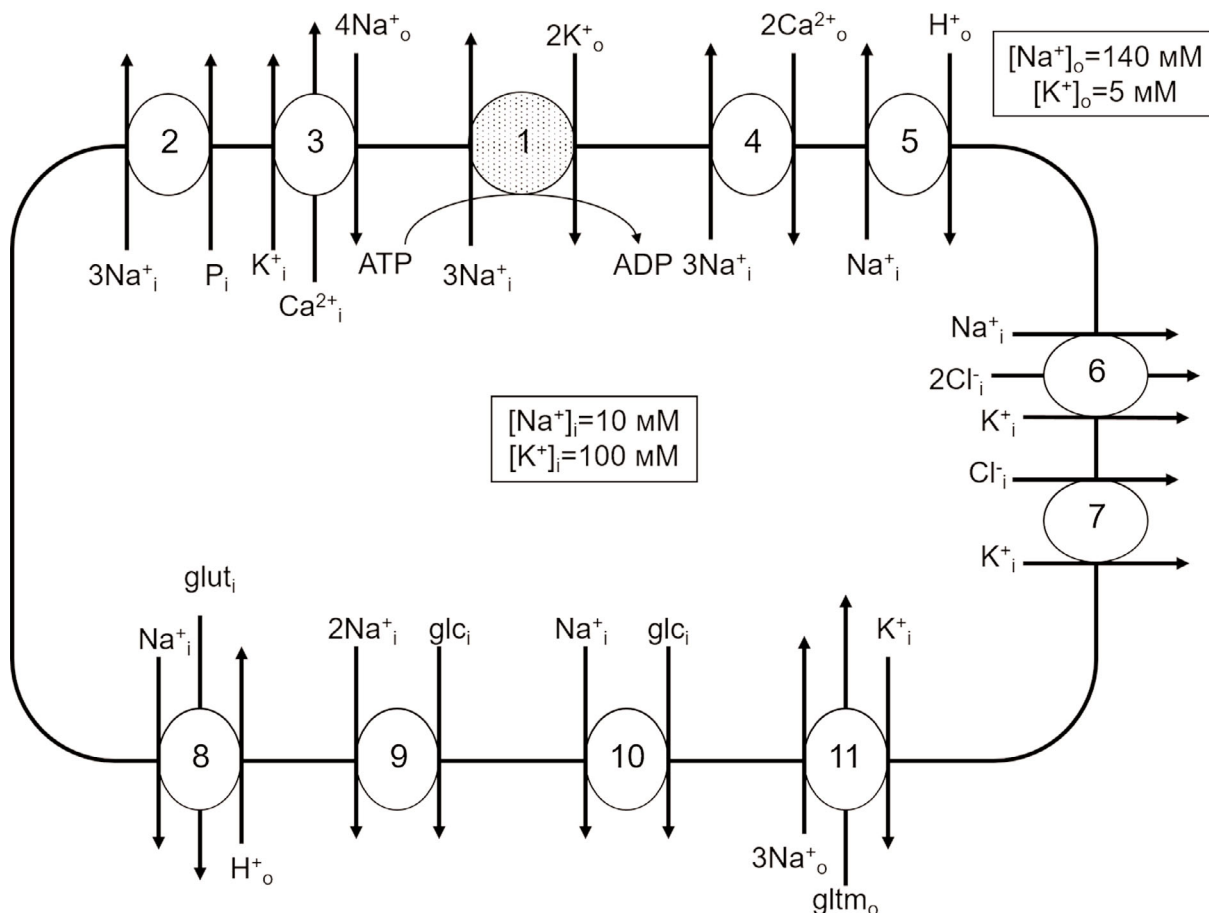


Рис. 1. Мембранные транспортеры, активность которых регулируется внутриклеточным натрием (1, 2, 4–6, 8–10) и калием (3, 6, 7, 11). 1 – Na,K-АТРаза; 2 – 3Na^+ -фосфат котранспорт; 3 – K^+ -зависимый $4\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен (KNCX); 4 – $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен (NCX); 5 – Na^+/H^+ обмен; 6 – $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорт (NKCC); 7 – K^+, Cl^- котранспорт (KCC); 8 – H^+ -зависимый Na^+ , глутамин котранспорт (SNAT3); 9 – 2Na^+ , глюкоза котранспорт (SLC5A1); 10 – Na^+ , глюкоза котранспорт (SLC5A2); 11 – K^+ -зависимый 3Na^+ , глутамат котранспорт. Представлены только те направления функционирования транспортеров, которые активируются при увеличении внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ . На примере плазмы крови и эритроцитов человека приведены значения концентраций натрия и калия во внеклеточных жидкостях и цитоплазмы покоящейся клетки

но полости с радиусом $2,4 \text{ \AA}$, а для связывания K^+ необходима полость радиусом $2,8 \text{ \AA}$. Именно такого размера полость обнаружена в кристалле Na,K-АТРаза в конформации E2 (конформация с высоким сродством к K^+). Участок I наименее стерически ограничен, по этой причине он, по-видимому, является и K^+ -связывающим центром, поскольку боковые цепи Ser775 и дополнительно Asn776 участвуют в координации как иона Na^+ , так и иона K^+ . Участки II и III в E1-конформации недостаточно велики для связывания иона K^+ . Однако при конформационном переходе E1-E2, по-видимому, происходит увеличение полости участка II, и он становится способным связывать K^+ .

Для объяснения последовательного и кооперативного связывания трех ионов Na^+ возможен следующий сценарий: в E1-конформации раз-

мер полости, достаточной для входа первого иона Na^+ (но не K^+) из цитоплазмы к участку III, будет обеспечен только в том случае, если боковая цепь Ser775 изменяет свое положение. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, можно полагать, что первый ион Na^+ проходит к участку III и связывается с ним, но в момент его прохода участки I и II не должны быть окончательно сформированы (в противном случае Na^+ свяжется с ними). И только после связывания первого иона Na^+ с участком III, а второго – с участком I, образуется участок связывания II.

Известно, что у другой АТРаза Р-типа, а именно у Ca-АТРаза саркоплазматического ретикулума (SERCA, skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum/endoplasmic-reticulum Ca-ATPase, Ca-АТРаза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума скелетных мышц (SERCA))

участки связывания Ca^{2+} формируются в основном теми же аминокислотными остатками, что и в случае катион-связывающих участков Na,K-АТРАЗы [25]. Важное значение для селективности Na,K-АТРАЗы в отношении Na^+ играет ориентация цитоплазматической части трансмембранной спирали М5: если спираль М5 выпрямить так же, как в Са-АТРАзе, то связывание K^+ в участке III (исходя из данных рентгеноструктурного анализа) представляется возможным. Действительно, удаление С-концевых а.о. в α -субъединице Na,K-АТРАЗы, увеличивающих подвижность спирали М5, приводит к уменьшению сродства к Na^+ и к связыванию K^+ в участке III.

Na,K-АТРАза относится к семейству АТРАЗ Р-типа, для которых характерна существенная гомология в первичной последовательности, сходство в третичной структуре каталитических субъединиц, а также в механизме гидролиза АТФ и транспорта ионов. Именно по этой причине Toyoshima et al. [26] подробно обсуждают вопрос, почему Na,K-АТРАза способна связывать K^+ и некоторые другие одновалентные катионы, в то время как SERCA кроме Ca^{2+} связывает только H^+ . На основе данных рентгеноструктурного анализа Na,K-АТРАЗы в Е2-конформации с разрешением 2,4 Å можно сделать выводы, представленные ниже. Во-первых, участки свя-

зывания K^+ , в отличие от участков связывания Ca^{2+} в SERCA, расположены на крайне небольшом расстоянии друг от друга, хотя ионный радиус K^+ гораздо больше, чем у Ca^{2+} (1,353 и 0,99 Å соответственно) (рис. 3). Предполагается, что такое близкое расположение возможно только в случае участков связывания одновалентных катионов и обусловлено тем, что в обоих ферментах для координации катионов используются карбонильные атомы кислорода основной цепи а.о.. Во-вторых, сравнение структур Na,K-АТРАЗы и SERCA показывает, что у них довольно сильно различается координационная геометрия связанных катионов, что свидетельствует о потенциально низком сродстве одновалентных катионов к участкам связывания ионов в SERCA. Кроме того, рассчитанные значения валентности мало различаются между Na^+ и K^+ , свидетельствуя о том, что эти участки связывания не очень селективны по отношению к K^+ . Можно заключить, что эти данные еще раз подтверждают идею о том, что Na,K-АТРАза — это в первую очередь Na^+ -насос. В третьих, положение и конформация боковых цепей а.о. Na,K-АТРАЗы очень похожи на положения Ca^{2+} -связывающих участков SERCA, за исключением Asn783. Этот а.о. Na,K-АТРАЗы формирует водородную связь с Tyr854 на изогнутой части спирали М7, спираль М5 также частично

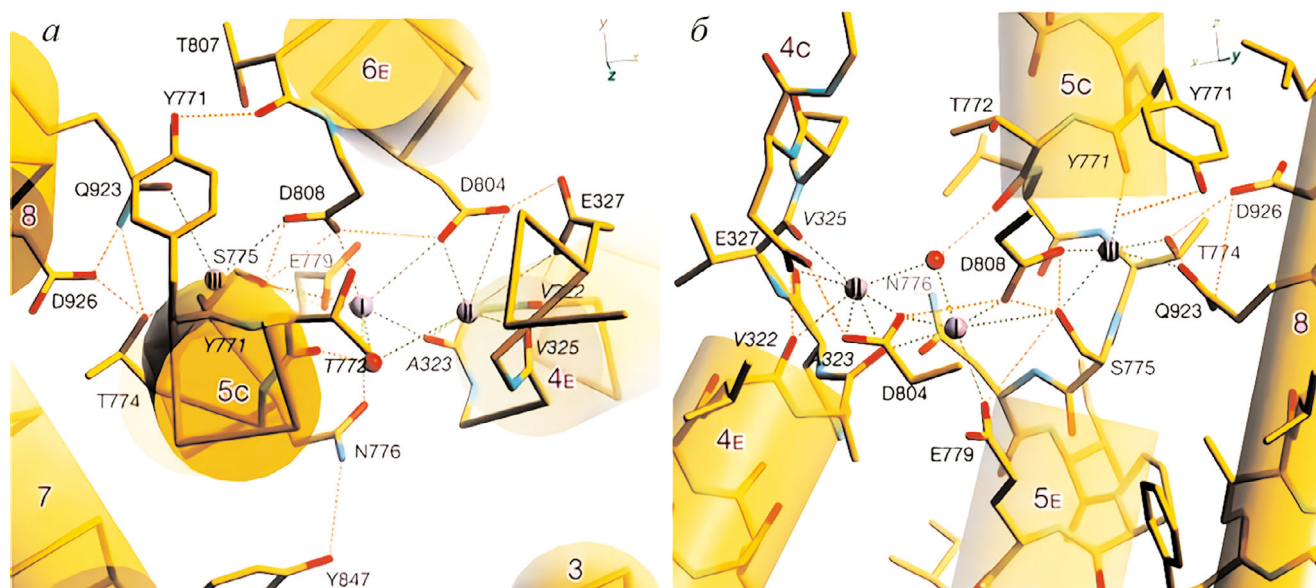


Рис. 2. Атомарная модель Na^+ -связывающих участков Na,K-АТРАЗы, представленная перпендикулярно мембране со стороны цитоплазмы (а) и параллельно мембране со стороны М6-спирали (б). Обозначения аминокислотных остатков курсивом указывают на то, что карбонил главной цепи способствует координации Na^+ . Зеленые пунктирные линии означают вероятную координацию Na^+ , оранжевые линии — потенциальные водородные связи (при условии, что карбоксильные группы протонированы). Использованы данные, представленные в статье Kanai et al. [24].

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

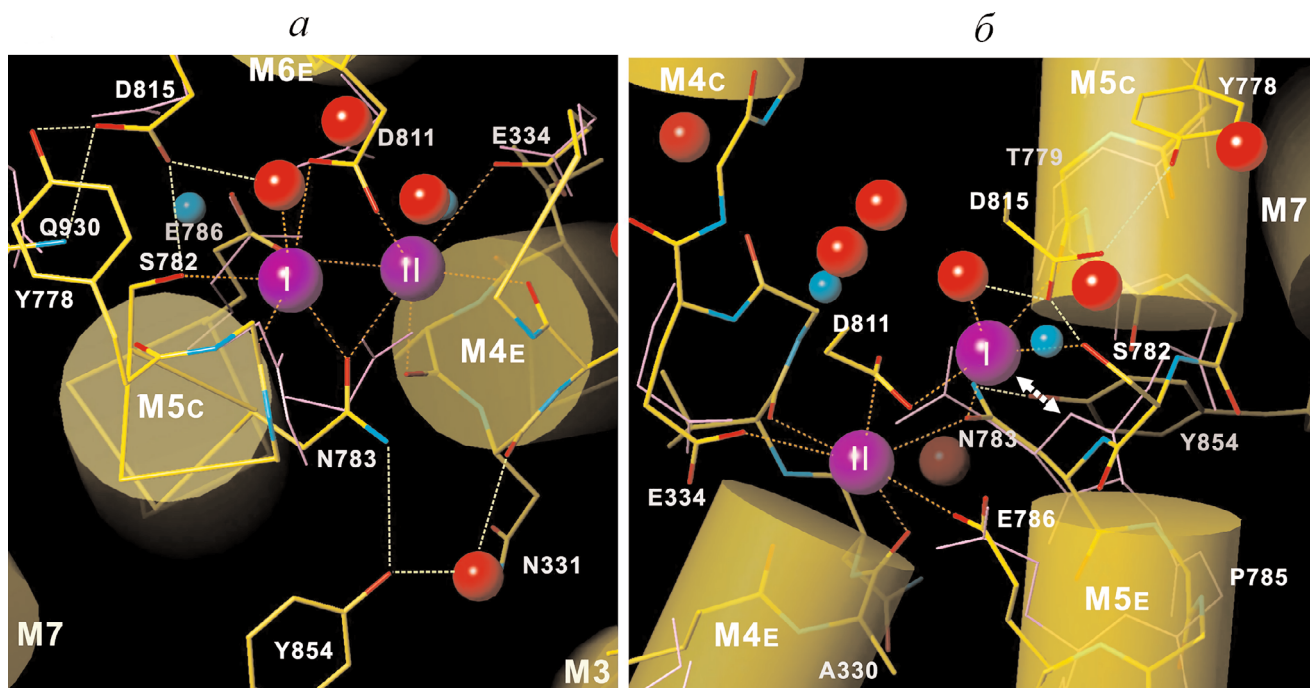


Рис. 3. Атомарная модель K^+ -связывающих участков Na,K-АТФазы, представленная со стороны цитоплазмы вдоль M5-спирали (а) и параллельно мембране (б). Сплошные фиолетовые линии обозначают боковые и основные цепи Ca^{2+} -координирующих аминокислотных остатков SERCA. Фиолетовые сферы обозначают ионы K^+ , красные — молекулы воды. Голубые сферы показывают положения ионов Ca^{2+} , связанного с SERCA. Двусторонняя стрелка на (б) изображает стерическое столкновение, возникающее между участком связывания K^+ I и амидом Asn768 SERCA, которому соответствует Asn783 Na,K-АТФазы. Использованы данные, представленные в статье Toyshima et al. [26].

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

разворачивается и образует изгиб. Этот излом создается благодаря наличию Pro785, который имеет решающее значение для создания пространства и координации K^+ за счет взаимодействия с карбонильным кислородом основной цепи Thr799. В структуре SERCA место Pro785 занимает Gly770, это приводит к меньшей изогнутости спирали M5 и, соответственно, к меньшему размеру свободной полости. В результате амид Asn768 SERCA (аналог Asn783 Na,K-АТФазы) оказывается очень близко к первому участку связывания K^+ и к боковой цепи участка II, что не позволяет ионам K^+ связаться с этими участками SERCA. Все описанное выше показывает, что участки связывания одновалентных катионов формируются хотя и похожими аминокислотными остатками, но они образуются только при формировании третичной структуры белка, и небольшое изменение этой структуры существенно изменяет структуру катион-связывающих центров.

Рецепторы, сопряженные с GTP-связывающими белками. Рецепторы, сопряженные с GTP-связывающими белками (G-protein-coupled receptors, GPCRs) — самое большое суперсеме-

ство мембранных белков, которые являются мишенями для трети фармакологических препаратов. 826 этих рецепторов, обнаруженных в геноме человека, разделены на 4 семейства (A, B, C и F), первичные структуры представителей этих семейств сильно различаются. В середине 70-х годов Pert et al. [27] обнаружили, что в гомогенатах мозга увеличение $[Na^+]_i$ в диапазоне 10–100 мМ уменьшает связывание агонистов опиоидных рецепторов, относящихся к семейству A, не оказывая существенного влияния на связывание антагонистов этих же рецепторов. Впоследствии это явление было обнаружено и для адренэргических рецепторов, а также рецепторов аденозина, дофамина, брадикинина и ряда других GPCRs [28, 29]. При исследовании мутированных форм рецепторов было установлено, что для появления Na^+ -зависимой регуляции необходимо присутствие аспарагиновой кислоты во втором трансмембранном домене GPCRs. Эти исследования, а также кристаллография высокого разрешения позволили установить структуру высококонсервативного Na^+ -связывающего участка, расположенного внутри центрального кластера трансмембранного доме-

на, состоящего из 7 спиралей (рис. 4). Этот кластер представляет собой часть канала, расположенного между участками связывания лиганда и G-белка, заполненного молекулами воды. В канале имеется два узких «горлышка», в которых ширина канала уменьшается за счет Trp246 и Tyr288 до диаметра чуть меньшего, чем диаметр молекулы воды (2,4 и 2,0 Å соответственно). Связывание лиганда изменяет конформацию рецептора, что приводит к перекрыванию канала в этих участках.

В центральном кластере канала, ограниченном Trp246 и Tyr288 (расстояние между ними 13 Å), находится ион Na^+ и 10 молекул воды, которые целиком заполняют полость кластера. Этот катион координирован пятью атомами кислорода от Asp52, Ser91 и 3-х молекул воды. Кроме того, Na^+ формирует водородные связи с высококонсервативными а.о., включая Asn24, Trp246, Asn280, Asn284 и Tyr288 [30].

Поскольку доступ Na^+ в центральный кластер канала возможен с обеих сторон мембраны, возникает вопрос о том, внеклеточный или внутриклеточный Na^+ необходим для регуляции активности рецептора. Аллостерическое влияние Na^+ на связывание лигандов известно по результатам многих работ. Следует, однако, отметить, что в большинстве изученных GPCRs Na^+ ингибирует связывание агонистов с $\text{IC}_{50} \sim 50 \text{ mM}$ [29, 31, 32]. Исходя из этих наблюдений, а также того факта, что значение $[\text{Na}^+]_o = 140 \text{ mM}$, роль внеклеточного Na^+ в регуляции активности GPCRs представляется проблематичной. Вопрос о вкладе внутриклеточного Na^+ в функционирование GPCRs остается нерешенным.

Белки теплового шока. Члены семейства белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (Hsp70) консервативны почти во всех живых организмах и вовлечены в регуляцию многих внутриклеточных процессов, включая правильное сворачивание синтезирующихся и/или денатурированных белков для предотвращения их агрегации. Hsp70 обладает АТФ-зависимой шаперонной активностью. Было установлено, что АТФазная активность Hsp70 резко возрастает в ответ на увеличение концентрации K^+ в диапазоне 20–100 мМ, в то время как Na^+ , Li^+ и Cs^+ не оказывают существенного влияния на АТФазную активность [33].

Hsp70 состоит из N-концевого, нуклеотид-связывающего домена (NBD), и C-концевого, субстрат-связывающего домена (SBD). Данные кристаллической структуры NBD Hsp70 *Escherichia coli*, связанного с ADP, показали, что K^+ -связывающий участок располагается в этом домене. При связывании ион K^+ координируется β -фосфатной группой ADP, боковой цепью

Asp10 и основной цепью Tyr15 (рис. 5). Кроме того, было установлено, что при замене K^+ на Na^+ последний также координируется ADP, Asp10, Tyr15 и находится в том же положении, что и K^+ [34].

Приведенные данные показывают принципиальное различие структурной организации участков связывания одновалентных катионов и Ca^{2+} . В самом деле, Ca^{2+} -связывающие участки

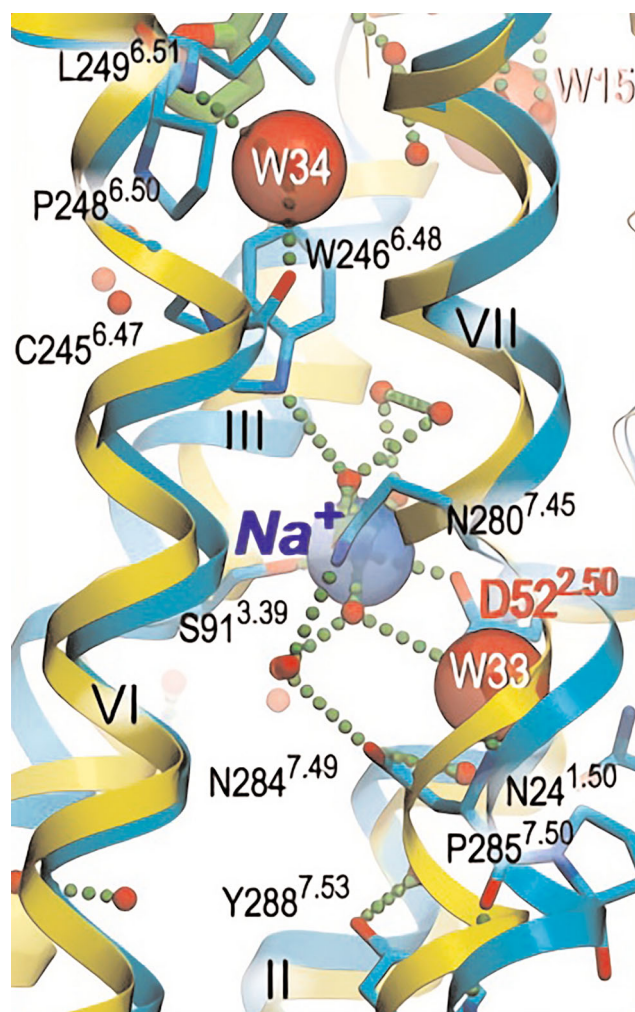


Рис. 4. Центральный кластер трансмембранного домена, состоящего из 7 спиралей (они отмечены римскими цифрами), рецептора, сопряженного с GTP-связывающими белками. Структура, связанная с антагонистом, показана синим цветом, структура активного состояния, связанная с агонистом, — желтым цветом. Молекулы воды представлены в виде красных сфер, а солевые мостики и водородные связи — в виде маленьких зеленых сфер. Ион Na^+ обозначен голубой прозрачной сферой, молекулы воды W33 и W34, стабилизирующие изломы в спиральях VI и VII, — красными полупрозрачными сферами. Использованы данные, представленные в статье Liu et al. [30].

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

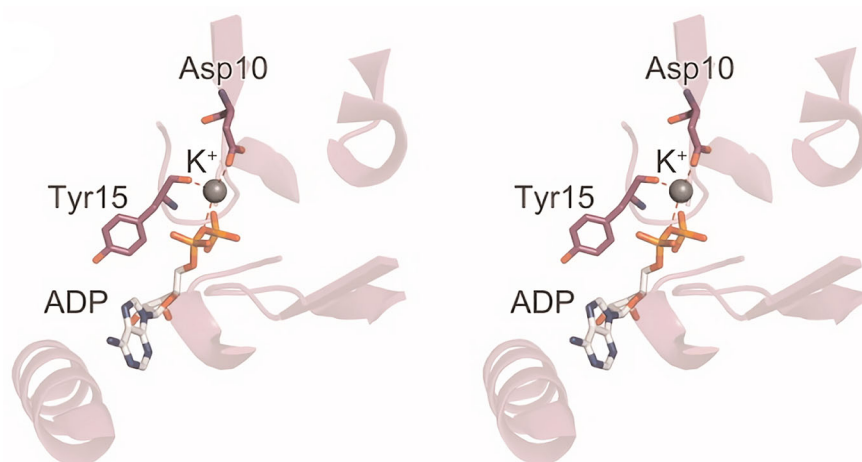


Рис. 5. Взаимодействие между нуклеотид-связывающим доменом (NBD) Hsp70 (*E. coli*) и ADP при отсутствии иона Mg^{2+} . Ион K^+ представлен в виде серой сферы, координационные связи отмечены красными пунктирными линиями. Использованы данные, представленные в статье Arakawa et al. [34]. С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

парвальбумина, кальмодулина, тропонина С, кальбиндина и ряда других белков содержат так называемый «EF-hand» мотив, организованный последовательностью из 14 аминокислот [35, 36]. Приведенные выше примеры показывают, что участки связывания одновалентных катионов образованы далеко отстоящими друг от друга аминокислотами, геометрия которых контролируется третичной структурой белков. Эта особенность не позволяет провести прямое сканирование библиотек кДНК с целью выявления потенциальных сенсоров Na^+ и K^+ , что было успешно использовано для выявления набора Ca^{2+} -связывающих белков [37]. Следует также отметить, что в отличие от белков, содержащих «EF-hand» мотив и насыщающихся при $[Ca^{2+}] \sim 1$ мкМ, сродство участков связывания одновалентных катионов изменяется в пределах 10–100 мМ, что затрудняет использование радиоактивных изотопов для идентификации белков, связывающих одновалентные катионы в лизатах клеток.

НАТРИЙ КАК РЕГУЛЯТОР ТРАНСКРИПЦИИ

Сжатие и набухание клеток рассматриваются как универсальные маркеры двух различных типов клеточной смерти — апоптоза и некроза соответственно [38, 39]. Для выяснения механизма апоптоза мы сопоставили влияние ингибиторов ион-транспортирующих систем на изменения объема и жизнеспособность клеток. К своему удивлению мы обнаружили, что длительная инкубация гладкомышечных клеток (ГМК)

аорты крысы при ингибировании Na,K -АТФазы как убаином, так и отсутствием в среде инкубации K^+ , сопровождается замедлением апоптоза, вызванного устранением ростовых факторов [40]. Антиапоптотическое действие ингибиторов Na,K -АТФазы было также продемонстрировано на культуре клеток эпителия проксимального отдела нефрона [41], нейронов головного мозга [42] и эндотелия сосудов [43]. В дальнейших экспериментах мы обнаружили, что ингибирование Na,K -АТФазы в ГМК сопровождается резким усилением синтеза РНК [44] и появлением большего количества вновь синтезированных белков [45–47], что предполагало экспрессию генов раннего ответа (early response genes, *ERG*). В самом деле, обработка клеток убаином приводила к резкому увеличению экспрессии *c-Fos* и *c-Jun* — одних из наиболее изученных представителей семейства *ERG* [47]. Так как защита от апоптоза ингибиторами Na,K -АТФазы устранялась в присутствии блокаторов синтеза РНК (актиномицина D) и белка (циклогексимида) [48], мы предположили, что этот эффект опосредован регуляцией транскрипции и/или трансляции.

Данные, полученные в последние два десятилетия, показали, что убаин и другие кардиотонические стероиды (КТС) способны генерировать внутриклеточные сигналы независимо от ингибирования Na,K -АТФазы [49, 50]. Учитывая это обстоятельство, мы использовали технологию Affymetrix и сравнили действие убаина и бескальевой среды (как двух независимых подходов ингибирования Na,K -АТФазы) на транскриптом ГМК, а также клетки эндотелия чело-

века (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) и линии HeLa [51]. При действии ингибитора убаина или при отсутствии K^+ , активатора Na,K -АТФазы, изменялась экспрессия ≥ 500 генов с высоко достоверной положительной корреляцией, что указывало на диссипацию ионных градиентов и увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ как универсальный механизм регуляции транскрипции. Было установлено, что 80 Na^+/K^+ -чувствительных транскриптов генов являются общими как для этих 3-х типов клеток [51], так и для нейронов головного мозга крысы и культуры миотубул мыши C2C12 [52], причем в списке этих универсальных Na^+/K^+ -чувствительных генов много *ERG*, включая *Fos*, *FosB*, *Jun*, *JunB*, *Atf3* и *Egr-1*.

Уже в первых экспериментах мы установили, что защита от апоптоза убаином сохраняется в среде с повышенным содержанием K^+ , но устраняется при выравнивании трансмембранного градиента Na^+ [40, 53]. Эти результаты указывают, что антиапоптотическое действие убаина обусловлено приростом Na^+ , а не потерей K^+ . Вывод о ведущей роли увеличения Na^+ согласуется с данными по сравнению кинетики действия убаина на экспрессию *ERG* и содержание Na^+ и K^+ в ГМК [47]. В самом деле, 4× снижение содержания мРНК *c-Fos* было обнаружено через 30 мин после добавления убаина, когда содержание внутриклеточного Na^+ возросло 5×, а содержание K^+ уменьшалось на 10–15% (рис. 6).

Доказательство Ca^{2+} -независимого механизма проведения сигнала. В многочисленных работах было обнаружено, что увеличение концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) сопровождается активацией нескольких сигнальных систем, лежащих в основе механизма, получившего название excitation-transcription coupling [54–57]. Во-первых, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к активации ряда изоформ Ca^{2+} /кальмодулин-чувствительной протеинкиназы (CaMK), фосфорилированию ингибитора I κ B и транслокации NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) из цитоплазмы в ядро за счет высвобождения фосфо-I κ B. Во-вторых, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ сопровождается дефосфорилированием (Ca^{2+} -кальмодулин)-зависимой фосфатазы (кальцинейрин), ядерного фактора активированных Т-клеток (nuclear factor of activated T-cells, NFAT) и его транслокацией в ядро. В-третьих, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к фосфорилированию регулятора транскрипции CREB (cyclic AMP response element-binding protein). Транслоцированные в ядро NF κ B, NFAT и CREB взаимодействуют с соответствующими участками связывания, локализованными в

5'-нетранслируемом участке промотора (5'-UTR) гена.

В ряде типов клеток долговременное ингибирование Na,K -АТФазы сопровождается приростом $[Ca^{2+}]_i$ вследствие активации Na^+/Ca^{2+} обмена и и/или деполяризации мембраны и входа Ca^{2+} через потенциал-зависимые Са-каналы. Так, например, в нашей лаборатории было установлено, что добавление убаина сопровождается активацией Na^+/Ca^{2+} обмена в фибробластах легких человека [58] и потенциал-зависимых Са-каналов L-типа в ГМК аорты крысы [59]. В этой связи можно было бы предположить, что изменения транскриптома в ответ на увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ связаны с приростом $[Ca^{2+}]_i$ и активацией перечисленных выше Ca^{2+} -зависимых механизмов регуляции транскрипции. Эта гипотеза, однако, противоречит данным, полученным с использованием хелаторов кальция. В самом деле, хелаторы внеклеточного Ca^{2+} и внутриклеточного Ca^{2+} (EGTA и ВАРТА-АМ соответственно) не оказывали влияния на прирост содержания *c-Fos* в ГМК, вызванный добавлением убаина [47]. Более того,

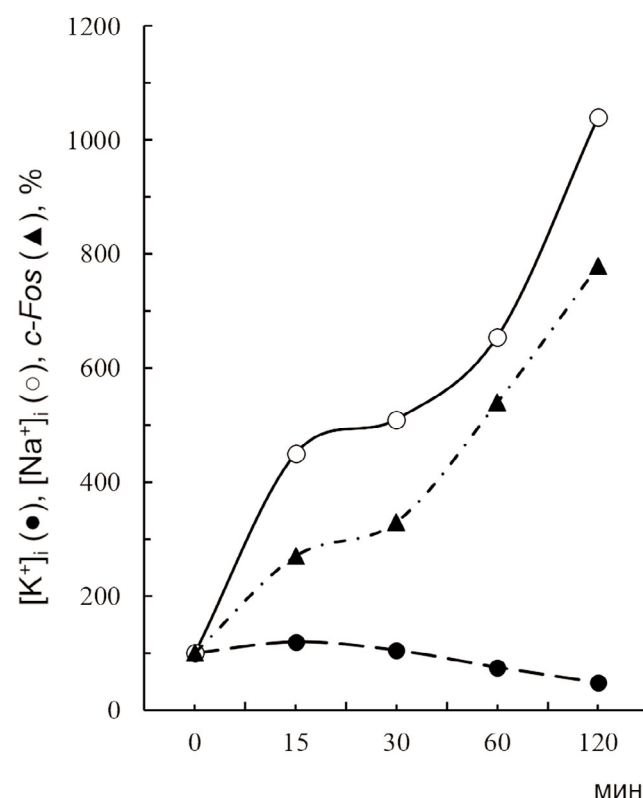


Рис. 6. Кинетика изменения содержания внутриклеточного калия ($[K^+]_i$), натрия ($[Na^+]_i$) и мРНК *c-Fos* в клетках гладкой мускулатуры аорты в ответ на добавление 1 мМ убаина. Используются данные, представленные в статье Taurinet al. [47]

было обнаружено, что нагрузка клеток хелато-рами кальция увеличивает, а не уменьшает число генов, экспрессия которых изменяется в ответ на ингибирование Na,K-АТФазы [51]. Среди универсальных Na^+/K^+ -чувствительных генов, чья экспрессия изменялась более чем $3\times$ в присутствии Ca^{2+} хелаторов во всех исследовавшихся на этот предмет клетках, были идентифицированы транскрипционные факторы (*Fos*, *Jun*, *Hes1*, *Nfkb1a*), интерлейкин-6 (*Il-6*) и циклооксигеназа 2-го типа (*COX-2* или *Ptgs2*).

При анализе этих данных необходимо отметить, что хелаторы кальция могут влиять на функционирование клеток независимо от их обеднения кальцием. Так, например, мы обнаружили, что добавление EGTA к ГМК приводит к возрастанию проницаемости сарколеммы для одновалентных катионов [60] и $\sim 10\times$ увеличению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [59]. В этой связи не удивителен тот факт, что содержание 2071 транскриптов в ответ на ингибирование Na,K-АТФазы изменялось с высокой степенью достоверности ($R^2 > 0,51$; $p < 10^{-12}$) и в ответ на добавление Ca^{2+} -хелаторов [61]. Кроме изменения проницаемости плазматической мембраны

Ca^{2+} -хелаторы могут оказывать влияние на транскрипцию генов через связывание поливалентных катионов, поскольку сродство EGTA и ВАРТА к Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$ на несколько порядков выше, чем к Ca^{2+} . По этой причине хелатирование ионов кальция сопровождается изменением активности ряда ферментов, регулируемых поливалентными катионами, в том числе многочисленных факторов регуляции транскрипции, содержащих Zn^{2+} -связывающие домены [62]. Дополнительным фактом, свидетельствующим о непрямом влиянии хелаторов Ca^{2+} на метаболизм клетки, в 1981 г. явилась работа Krishtal et al. [63], в которой показано резкое возрастание проводимости кальциевых каналов при хелатировании Ca^{2+} .

В поисках альтернативных подходов для выяснения механизма регуляции транскрипции Na^+ -чувствительных генов мы использовали ингибиторы Ca^{2+} -чувствительных сигнальных систем. В этих работах было установлено, что увеличение экспрессии *Egr1* и *Atf3* в ГМК, обработанных убаином, не зависит от присутствия ингибиторов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена, а также антагонистов

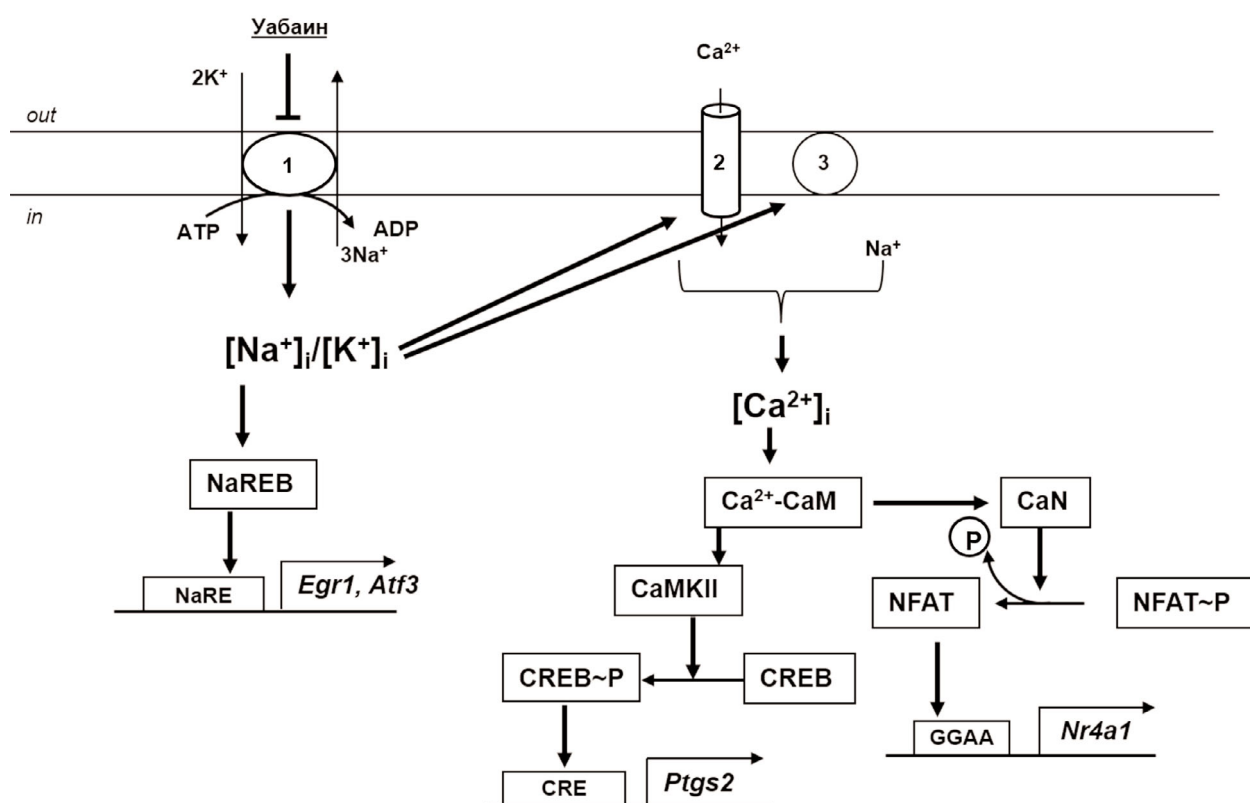


Рис. 7. Механизмы вовлечения одновалентных катионов и кальция в регуляцию транскрипции *Egr1*, *Atf3*, *Ptgs2* и *Nr4a1* в клетках гладкой мускулатуры аорты крысы. 1 – Na,K-АТФаза; 2 – потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы; 3 – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник; CaM – кальмодулин; CaN – кальцинейрин; NaRE – идентифицированный Na^+ -чувствительный элемент, регулирующий транскрипцию генов; и NaREB – не идентифицированный сенсор изменения $[\text{Na}^+]_i$, активирующий NaRE. Остальные сокращения приведены в тексте

кальмодулина и ингибиторов Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ и фосфатаз, в то время как увеличение экспрессии *Ptgs2* и *Nr4a1* уменьшалось в присутствии ингибиторов Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы (CaMKII) и фосфатазы (кальценейрин) соответственно (рис. 7) [59]. Совокупность данных, рассмотренных в этом разделе, свидетельствует об участии Ca_i^{2+} -независимого механизма в регуляции транскрипции генов, экспрессия которых изменяется при ингибировании Na,K-АТФазы и действии других стимулов, приводящих к увеличению $[\text{Na}^+]_i$.

Канонические 5'-UTR промоторы не вовлечены в регуляцию транскрипции Na^+ -чувствительных генов. К настоящему времени наиболее изучен механизм регуляции экспрессии генов, опосредованный взаимодействием ERG и других факторов регуляции транскрипции с участками связывания, локализованными в нетранслируемой 5'-UTR последовательности. Исходя из этого, мы предприняли попытку идентифицировать Na^+ -чувствительный элемент регуляции транскрипции (Na^+ response element, NaRE) в последовательности 5'-UTR Na^+ -чувствительного гена *c-Fos*. Правомочность такого подхода подкреплялась данными об отсутствии влияния убаина на содержание мРНК *c-Fos* человека, который был трансфицирован в фибробласты мыши NIH 3T3 после удаления участка (–222)–(–70), входящего в структуру 5'-UTR этого гена [64]. Учитывая результаты этих исследований, мы трансфицировали клетки HeLa люциферазой под контролем протяженного участка 5'-UTR *c-Fos*, который ограничен основанием (–650) и содержит все наиболее изученные элементы промотора, активируемые ростовыми факторами и другими каноническими регуляторами транскрипции (рис. 8). В качестве положительного контроля мы использовали клетки, обработанные набором ростовых факторов, содержащихся в сыворотке. Как и в случае гладкомышечных клеток [47], ингибирование Na,K-АТФазы в клетках HeLa как убаином, так и отсутствием внеклеточного K^+ сопровождается приростом экспрессии *c-Fos* (рис. 8, а). Тем не менее в отличие от эндогенного *c-Fos* экспрессия люциферазы не регулировалась убаином, но увеличивалась при добавлении ростовых факторов сыворотки (рис. 8, б) [65]. Полученные результаты указывают на то, что прирост содержания *c-Fos* мРНК в ответ на ингибирование Na,K-АТФазы не опосредован участком 5'-UTR, взаимодействующим с классическими регуляторами транскрипции. Альтернативные Ca^{2+} -независимые механизмы регуляции Na^+ -чувствительного транскрипта рассмотрены в следующем разделе.

Поиск сенсора, вовлеченного в регуляцию транскрипции Na^+ -чувствительных генов. Рассмотренные выше негативные результаты могут быть объяснены следующими альтернативными механизмами, изложенными ниже. (i) Было обнаружено, что при относительно низких значениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (~100 нМ), Na^+ взаимодействует с Ca^{2+} -связывающими центрами кальпаина, вызывая полумаксимальную активацию этого фермента при $[\text{Na}^+]_i = 15$ мМ [66]. Роль Ca^{2+} -связывающих белков в регуляции транскрипции за счет их взаимодействия с одновалентными катионами остается неизученной. (ii) Фрагмент 5'-UTR, ответственный за Na^+ -опосредованную регуляцию транскрипции *c-Fos*, находится на отдаленном от канонического промотора участке. В самом деле, установлено, что реорганизация хроматина влияет на *c-Fos* через участок, граничащий с основанием (–1900) 5'-UTR [67]. В ряде генов выявлены и более отдаленно локализованные тканеспецифичные альтернативные промоторы (сложные промоторы, состоящие из двух или более независимо функционирующих частей, которые расположены перед одним или разными экзонами гена и обеспечивают образование на одном гене молекул мРНК разных размеров). Так, в случае коактиватора рецептора активаторов пролиферации пероксисом *Ppargc1a* (*Ppargc1a*) в скелетных мышцах и нервной ткани обнаружены альтернативные промоторы, которые расположены еще дальше – на 14-й и 587-й тысячах пар нуклеотидов выше канонического промотора соответственно [68, 69]. (iii) Наряду с 5'-UTR транскрипция может регулироваться последовательностями, расположенными в интронах или 3'-UTR. Такого рода возможности установлены и при изучении транскрипции *c-Fos* [70, 71]. В этой связи в нашей лаборатории проводится скрининг генов, транскрипция которых изменяется на начальных этапах диссипации трансмембранного градиента одновалентных катионов. Мы надеемся, что этот подход позволит нам идентифицировать их общие Na^+ -чувствительные участки (NaRE) и на основании этих данных установить природу Na^+ -чувствительных белков (NaREB), взаимодействующих с этими участками. (iv) К настоящему времени накоплено большое количество данных о регуляции экспрессии генов при изменении их расположения внутри ядра (т.н. трехмерная модель регуляции транскрипции) [72]. В самом деле, на стадии интерфазы наиболее конденсированная часть хроматина (гетерохроматин) находится на периферии ядра, в то время как менее конденсированная часть хроматина (эухроматин) локализована внутри ядра [73]. Именно внутри эухроматина находит-

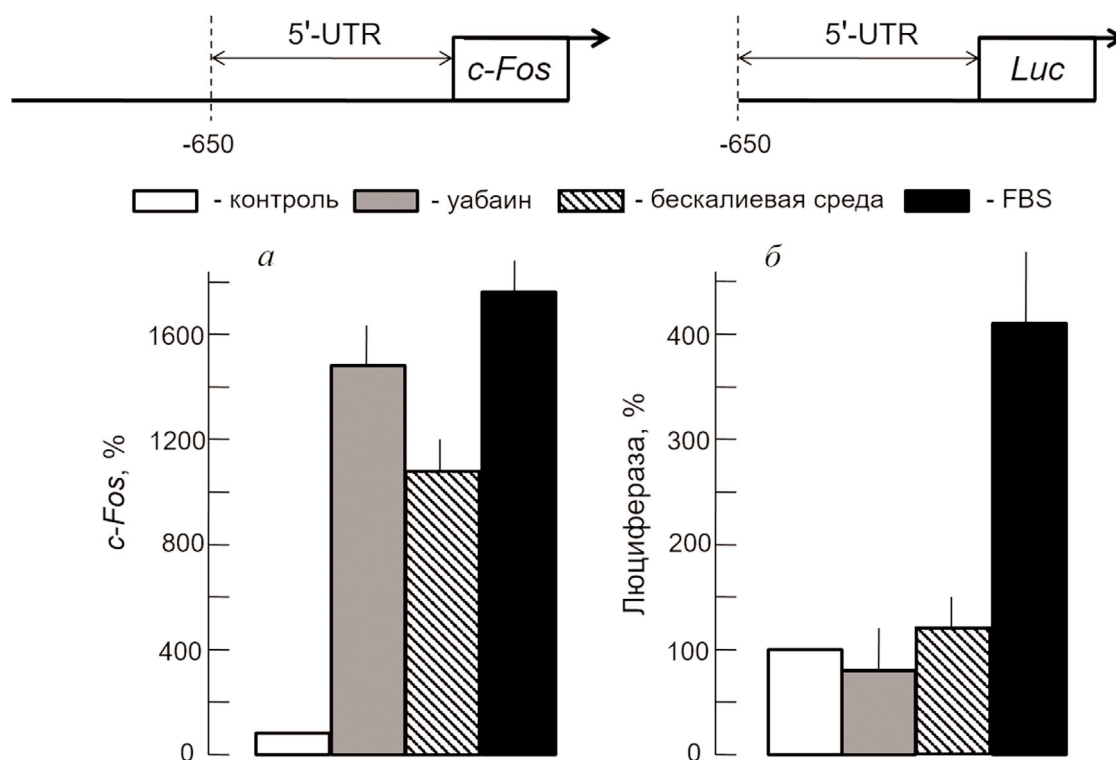


Рис. 8. Изменение содержания в клетках HeLa мРНК эндогенного *c-Fos* (а) и трансфицированной плазмиды с люциферазой под контролем промотора 5'-UTR *c-Fos* (б) при добавлении ростовых факторов (FBS) и ингибировании Na,K-АТФазы уабаином (ouabain) и в среде, не содержащей калия (K^+ -free). Значения, полученные в отсутствии указанных стимулов, приняты за 100%. Использованы данные, приведенные в статье Haloui et al. [65]

ся основное количество «фабрик транскрипции» (transcription factories), которые визуализируются по включению меченного флуоресцентной меткой уридин-5'-трифосфата [74]. Перегруппировка гетеро- и эухроматина контролируется такими эпигенетическими факторами как метилирование ДНК и метилирование и ацетилирование хроматина. Роль увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в регуляции пространственной организации гетеро- и эухроматина остается недостаточно исследованной. Однако в последнее время появилась информация о том, что ионы K^+ и Na^+ по-разному стабилизируют четырехспиральные, богатые гуанином структуры, так называемые G-квадруплексы. G4-квадруплексы специфически связывают ионы одно- и двухвалентных металлов внутри полости, образованной карбонильными группами остатков гуанина, при этом катионы теряют свою гидратную оболочку. Максимальный стабилизирующий эффект наблюдается для K^+ , а Na^+ оказывает менее выраженное стабилизирующее действие. Характерно, что G-квадруплексы часто встречаются в промоторах. Дальнейшие исследования позволят установить, связано ли изменение стабильности таких G-квадруплексов, вызванное

увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, с изменением экспрессии генов [75].

КАЛИЙ КАК РЕГУЛЯТОР ТРАНСЛЯЦИИ

50 лет назад было установлено, что синтез белка в экстрактах клеток прокариот снижается при уменьшении концентрации K^+ [76]. Позднее этот факт был обнаружен в клетках эукариот животного и растительного царства (см. обзор Orlov и Hamet [19]). В этой связи неудивительно, что в большинстве изученных типов клеток, включая фибробласты [77], клетки эпителия [78] и ретикулоциты [79], ингибирование Na,K-АТФазы сопровождается уменьшением синтеза белков без воздействия на трансмембранный перенос меченых аминокислот, внутриклеточное содержание АТФ и сборку рибосом. На примере лизатов ретикулоцитов было установлено, что полумаксимальное увеличение синтеза глобина в средах, содержащих 60, 90 и 125 мМ Na^+ , наблюдается при $[K^+] = 15, 25$ и 40 мМ соответственно [79]. В связи с этим можно предположить, что Na^+ (в отличие от K^+) не активирует процесс синтеза белка, но конкурирует с K^+ за

места связывания с сенсором, вовлеченным в регуляцию трансляции. В самом деле, было обнаружено, что в отличие от K^+ и Rb^+ , Na^+ , Li^+ и Cs^+ не оказывают достоверного влияния на активность очищенной тирозил-тРНК синтетазы человека [80].

Следует обратить внимание и на тот факт, что обнаруженное в интактных клетках подавление синтеза белка в ответ на уменьшение $[K^+]_i$ может быть отчасти компенсировано за счет увеличения $[Na^+]_i$ и активации рассмотренного выше Na^+ -зависимого механизма регуляции транскрипции генов, в том числе генов, вовлеченных в процессы элонгации при трансляции [81, 82]. Так, например, мы установили, что ингибирование Na, K -АТФазы кардиотоническими стероидами в клетках эндотелия человека сопровождается $3\times$ уменьшением содержания мРНК фактора элонгации трансляции EIF5 [83]. Следует также отметить, что относительный вклад K^+ -чувствительного механизма трансляции в регуляцию экспрессии генов носит тканеспецифический характер. Действительно, при отсутствии ростовых факторов не обнаружено достоверного влияния 24-часового ингибирования Na, K -АТФазы убаином на включение $[^3H]$ -лейцина во фракцию белков

ГМК аорты крысы, что контрастировало с $(7-8)\times$ увеличением синтеза РНК, измеренного по включению $[^3H]$ -уридина (рис. 9). В присутствии ростовых факторов наблюдалось $10\times$ и $2\times$ увеличение синтеза РНК и белка соответственно. В этом случае убаин вызывал $2\times$ снижение синтеза белка на фоне $2\times$ увеличения синтеза РНК [44].

Для объяснения этого явления могут быть предложены 3 гипотезы. (i) Содержание K^+ -чувствительного сенсора, вовлеченного в регуляцию трансляции, тканеспецифично и снижено в клетках гладкой мускулатуры. В самом деле, в отличие от тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих K^+ не оказывает существенного влияния на активность этого фермента, изолированного из бактерий [84, 85]. (ii) K^+ -чувствительный механизм регуляции трансляции ограничен определенным набором генов [86]. (iii) Ингибирование трансляции гена, вызванное падением $[K^+]_i$, может быть компенсировано за счет рассмотренного выше механизма Na^+ -зависимой активации транскрипции как самого этого гена, так и ERG, вовлеченных в регуляцию его транскрипции. В настоящее время мы проводим экспериментальную проверку этих гипотез.

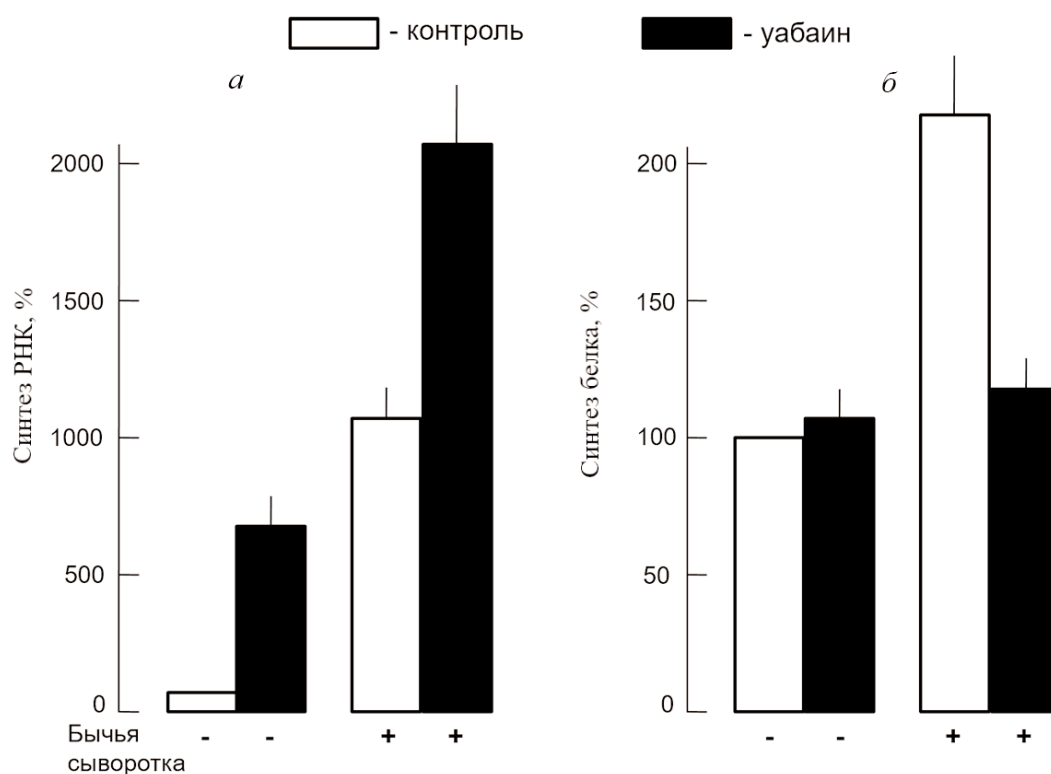


Рис. 9. Влияние убаина (1 мМ, 24 ч) на синтез РНК (а) и белка (б) в клетках гладкой мускулатуры аорты крысы. В части экспериментов среда инкубации содержала 1% сыворотку быка (CS). Использованы данные, приведенные в статье Orlov et al. [44]

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ Na^+ , K^+ -ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

В этом разделе мы ограничимся только несколькими примерами, демонстрирующими значение Na^+ , K^+ -чувствительного механизма регуляции экспрессии генов в формировании функционального ответа клеток.

Секреция миокинов. В 2000-х гг. было установлено, что скелетные мышцы функционируют как эндокринный орган, продуцирующий по мере увеличения физической нагрузки цитокины и другие низкомолекулярные белки, получившие название миокинов. Предполагается, что в основе этого явления лежат 3 механизма [57]. (i) Возбуждение скелетной мускулатуры сопровождается активацией Ca^{2+} каналов L-типа, увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и изменениями транскрипции генов по механизмам, рассмотренным в разделе «Доказательство Ca^{2+} -независимого механизма проведения сигнала». (ii) Физическая нагрузка приводит к увеличению соотношения АМР/АТР и активации АМРК, вовлеченной в регуляцию транскрипции генов. (iii) Интенсивная физическая нагрузка сопровождается локальным снижением парциального давления кислорода ($p\text{O}_2$), увеличением содержания индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α и активацией гетеродимером HIF-1 α /HIF-1 β элемента HRE, обнаруженного в 5'-UTR промотора ряда $p\text{O}_2$ -чувствительных генов [18, 87]. В нашей работе были получены данные о существовании альтернативного сигнального механизма, реализуемого через активацию транскрипции в ответ на увеличение $[\text{Na}^+]_i$.

Культивируемые клетки скелетной мускулатуры, подвергнутые импульсной электростимуляции (electrical pulse stimulation, EPS), рассматриваются как наиболее адекватная *in vitro* модель сокращающей скелетной мускулатуры [88]. В нашей лаборатории было установлено, что, как и в экспериментах *in vivo* [89], 4-х часовая электростимуляция миотубул мыши линии C2C12 приводит к ~5× увеличению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [90]. Учитывая отсутствие гипоксии в такого рода экспериментах, мы исследовали роль Ca^{2+} - и АМРК-зависимой сигнальной системы в изменениях транскриптома клеток C2C12 [91]. Было установлено, что наряду с накоплением Na^+ и потерей K^+ , EPS сопровождается ритмическими осцилляциями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и изменением содержания 3215 транскриптов. Добавление никардипина, блокатора Ca^{2+} каналов L-типа, устраняло осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$, не влияя на соотношение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Было уста-

новлено, что изменения транскрипции 1018 генов, вызванные EPS, сохранялись в присутствии никардипина. В отличие от изменений ионного баланса EPS не оказывала влияния на фосфорилирование ацетил-СоА карбоксилазы и фактора Unc-51, используемых в качестве маркеров активации АМРК. Среди EPS-чувствительных генов было выявлено ~300 транскриптов, чье содержание также изменялось при добавлении убаина в концентрациях, вызывающих увеличение $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в диапазоне, который соответствовал выявленному в клетках, подвергнутых электростимуляции. Совокупность полученных данных указывает на участие Na^+ -чувствительного, Ca^{2+} - и АМРК-независимого механизма сопряжения возбуждения и транскрипции в регуляции экспрессии генов в клетках скелетной мускулатуры.

Формирование клеточной памяти. В конце прошлого и начале нынешнего столетия было показано, что при возбуждении нейронов головного мозга резко возрастает содержание мРНК *Erg1* и *c-Fos* [92–94], которые при сравнении действия убаина и бескальевой среды на клетки ГМК и электрически невозбудимых тканей были классифицированы как Na^+ , K^+ -чувствительные гены раннего ответа [51, 52]. В опытах на *Egr1*^{+/–} мышах было обнаружено резкое ухудшение их способности к обучению [95], что указывало на ключевую роль изменений транскриптома нейронов, опосредованных этим геном, в формировании долгосрочной памяти (см. обзор Thiel et al. [96]). Было установлено, что увеличение транскрипции *Egr1* и других ERG при возбуждении нейронов по крайней мере частично опосредовано активацией рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA). Так как активация NMDA рецепторов сопровождается увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$, была сформулирована гипотеза о решающей роли Ca^{2+} -опосредованных сигнальных систем в формировании долгосрочной памяти нейронов [97].

Следует, однако, отметить, что проницаемость NMDA рецепторов для одновалентных катионов выше, чем для Ca^{2+} ($P_{\text{Na}} \sim P_{\text{K}} \gg P_{\text{Ca}}$), и их активация может приводить к увеличению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Действительно, увеличение $[\text{Na}^+]_i$ отмечено как при электрическом [98], так и при фармакологическом [99] возбуждении нейронов головного мозга. С использованием селективных флуоресцентных индикаторов внутриклеточного Na^+ и Ca^{2+} было показано, что при возбуждении пирамидальных нейронов вход Na^+ предшествует увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Было также установлено, что в отличие от быстрой нормализации $[\text{Ca}^{2+}]_i$, увеличение $[\text{Na}^+]_i$, вызванное возбуждением нейронов, нор-

мализуется в более длительном временном диапазоне [100].

В последних работах мы сопоставили действие убаина на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и транскриптом культивируемых нейронов головного мозга крысы [101]. Среди $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных регуляторов транскрипции мы обнаружили увеличение экспрессии *Npas4*, *Fos*, *Junb*, *Crem*, *Atf3*, *Klf4* и *Crebzf*. Ранее активация транскрипции этих ERG была выявлена в нейронах, как при их электростимуляции, так и при воздействии нейротрансмиттеров [93, 94, 102–104]. В ряде работ было также продемонстрировано участие этих генов в процессах обучения и формирования пластичности синапсов [105, 106]. В настоящее время в нашей лаборатории проводится изучение относительной роли Ca^{2+} -опосредованных и Ca^{2+} -независимых сигнальных систем, активирующихся при диссипации трансмембранных градиентов одновалентных катионов в нейронах головного мозга и вовлеченных в изменения транскриптома в ответ на электрическую и фармакологическую стимуляцию.

Гипоксия. Как уже отмечалось выше, снижение деградации HIF-1 в ответ на уменьшение pO_2 и взаимодействие HIF-1 с чувствительным к гипоксии HRE рассматривается как основной механизм регуляции транскрипции в условиях гипоксии целого ряда генов, среди которых наиболее изучены *Vegfa*, *Edn1*, *Klf10* и *Nr4a1* [107, 108]. Следует отметить, что 5'-UTR ряда pO_2 -чувствительных генов, включая *Egr1*, *Atf3*, *Ptgs2*, *Il6*, *Ppp1r5*, *Hes1*, *Nfkbiz*, *Txnip*, *Adamts1*, *Egr 3*, *Cxcl2* и *Hsp70*, не содержит HRE (см статью Koltsova et al. [51]). В этой связи мы обратили внимание на то, что *Egr1*, *Atf3*, *Ptgs2*, *Il6*, *Ppp1r5*, *Hes1*, *Nfkbiz* и *Txnip* попадают в разряд генов, чья транскрипция в гладкомышечных клетках возрастает в ответ на увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ [51]. С целью дальнейшего изучения механизма этого явления мы сопоставили действие на транскриптом ГМК ингибиторов Na,K -АТФазы и гипоксии в сочетании с глюкозным голоданием. В этих условиях гипоксия сопровождалась 3× увеличением $[Na^+]_i$ и 2× увеличением $[K^+]_i$. Как ингибирование Na,K -АТФазы, так и гипоксия приводили к однонаправленному изменению транскрипции десятков генов, включая *Cyp1a1*, *Fos*, *Atf3*, *Klf10*, *Ptgs2*, *Nr4a1*, *Per2* и *Hes1*. Устранение трансмембранного градиента одновалентных катионов в среде со сниженным содержанием Na^+ и увеличенным содержанием K^+ устраняло действие убаина как на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, так и на экспрессию перечисленных выше генов. Аналогичная процедура также полностью устраняла

действие гипоксии на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и транскрипцию *Fos*, *Atf3*, *Ptgs2* и *Per2* и резко снижала прирост содержания *Klf10*, *Edn1*, *Nr4a1* и *Hes1*. Трансфекция гладкомышечных клеток *Hif-1a* siRNA уменьшала прирост содержания мРНК *Vegfa*, *Edn1*, *Klf10* и *Nr4a1*, регистрируемого в условиях гипоксии, но не влияла на экспрессию *Fos*, *Atf3*, *Ptgs2* и *Per2* [16, 17]. Эти результаты свидетельствуют, что Na^+/K^+ -опосредованный, Hif-1 α -независимый механизм регуляции транскрипции вносит существенный вклад в регуляцию экспрессии генов в условиях гипоксии.

Данные, изложенные в нашем обзоре, показывают, что активность ряда ферментов, а также процессы транскрипции и трансляции регулируются при изменении концентрации внутриклеточного Na^+ и K^+ в физиологически существующем диапазоне, что позволяет рассматривать одновалентные катионы в качестве вторичных посредников. Следует, однако, отметить, что в отличие от Ca^{2+} и других вторичных посредников, молекулярная организация участков связывания Na^+ и K^+ , образованных третичной структурой белка, изучена только для ограниченного числа сенсоров, рассмотренных в разделе «Идентифицированные сенсоры одновалентных катионов». Наряду с очевидным фундаментальным значением продолжение этих исследований может иметь и существенные практические приложения. Так, например, было обнаружено, что процесс дифференцировки миофибробластов, который активируется при добавлении к культуре фибробластов легких человека ростового фактора (tumour transforming growth factor TGFb1), трансформирующего опухоль, подавляется КТС [58]. Инъекция КТС также ингибировала процесс накопления миофибробластов в легких экспериментальных животных, рассматриваемых в качестве адекватной модели идиопатического фиброза легких человека [109]. Было установлено, что это действие КТС опосредовано ингибированием Na,K -АТФазы, увеличением $[Na^+]_i$ и последующей активацией транскрипции *Ptgs2*, кодирующего циклооксигеназу второго типа (COX-2) [58], на фоне подавления транскрипции субъединицы TGFBR2 [58]. Как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* было также показано, что КТС ингибирует репликацию вируса гриппа за счет уменьшения $[K^+]_i$ и подавления K^+ -чувствительного звена трансляции [78]. Следует, однако, отметить, что фармакологическое использование КТС в дозах, увеличивающих соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, затруднено ввиду их токсического действия [110]. В этой связи представляется перспективным

разработка лекарственных препаратов, обеспечивающих тканеспецифическое воздействие на активность сенсоров одновалентных катионов, вовлеченных в регуляцию транскрипции и трансляции.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10026-п, раздел «Физиологическое и патофизиологическое значение Na^+ , K^+ -чувствительного механизма регуляции экспрессии генов») и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-

00063, разделы «Идентифицированные сенсоры одновалентных катионов», «Натрий как регулятор транскрипции» и «Калий как регулятор трансляции»).

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору медицинского колледжа г. Олбани (США) А.А. Монгину за прочтение обзора и сделанные критические замечания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sutherland, E.W. (1972) Studies on the mechanism of hormone action, *Science*, **177**, 401–408.
2. Robison, G.A., Butcher, R.W., and Sutherland, E.W. (1971) *Cyclic AMP*, Academic Press, New York.
3. Lincoln, T.M., and Cornwell, T.L. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins, *FASEB J.*, **7**, 328–338.
4. Carafoli, E. (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1115–1122.
5. Berridge, M.J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling, *Nature*, **361**, 315–325.
6. Grinstein, S., Smith, J.D., Benedict, S.H., and Gelfand, E.W. (1989) Activation of sodium-hydrogen exchange by mitogens, *Curr. Topics Membr. Transport*, **34**, 331–343.
7. Prasad, K.V.S., Severini, A., and Kaplan, J.G. (1987) Sodium ion fluxes in proliferating lymphocytes: an early component of mitogenic signal, *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**, 515–525.
8. Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Poysegur, J. (1997) Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchanger, *Physiol. Rev.*, **77**, 51–74.
9. Marakhova, I.I., Vereninov, A.A., Toropova, F.V., and Vinogradova, T.A. (1998) Na^+/K^+ -ATPase pump in activated human lymphocytes: on the mechanisms of rapid and long-term increase in K^+ influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1368**, 61–72.
10. Burns, C.P., and Rozengurt, E. (1984) Extracellular Na^+ and initiation of DNA synthesis: role of intracellular pH and K^+ , *J. Cell Biol.*, **98**, 1082–1089.
11. Hamet, P., Orlov, S.N., DeBlois, D., Sun, Y., Kren, V., and Tremblay, J. (2004) *Angiotensin as a cytokine implicated in accelerated cellular turnover*, Springer Verlag, N.Y., pp. 71–98.
12. Bennekou, P. and Christophersen, P. (2003) *Ion channels*, Springer, Berlin, pp. 139–152.
13. Schneider, J., Nicolay, J.P., Foller, M., Wieder, T., and Lang, F. (2007) Suicidal erythrocyte death following cellular K^+ loss, *Cell Physiol. Biochem.*, **20**, 35–44.
14. Rose, C.R., and Konnerth, A. (2001) NMDA-receptor-mediated Na^+ signals in spines and dendrites, *J. Neurosci.*, **21**, 4207–4214.
15. Verkhatsky, A., Noda, M., Parpura, V., and Kirischuk, S. (2013) Sodium fluxes and astroglial function, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **961**, 295–305.
16. Koltsova, S.V., Shilov, B., Burulina, J.G., Akimova, O.A., Haloui, M., Kapilevich, L.V., Gusakova, S.V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2014) Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 α -independent, $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **9**, e110597.
17. Orlov, S.N., Birulina, Y.G., Smaglie, L.V., and Gusakova, S.V. (2017) Vascular smooth muscle as an oxygen sensor: role of elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, in *Hypoxia and Human Diseases* (Zheng, J., and Zhou, C., eds.), IntechOpen, Vol. 4, pp. 73–90, doi: 10.5772/65384.
18. Kapilevich, L.V., Kironenko, T.A., Zaharova, A.N., Kotelevtsev, Yu.V., Dulin, N.O., and Orlov, S.N. (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling, *Genes Dis.*, **2**, 328–336.
19. Orlov, S.N., and Hamet, P. (2006) Intracellular monovalent ions as second messengers, *J. Membr. Biol.*, **210**, 161–172.
20. Shekarabi, M., Zhang, J., Khanna, A.R., Ellison, D.H., Delpire, E., and Kahle, K.T. (2017) WNK kinase signaling in ion homeostasis and human disease, *Cell Metab.*, **25**, 285–299.
21. Wilson, C.S., and Mongin, A.A. (2019) The signaling role for chloride in the bidirectional communication between neurons and astrocytes, *Neurosci. Lett.*, **689**, 33–44.
22. Page, M.J., and Di Cera, E. (2006) Role of Na^+ and K^+ in enzyme function, *Physiol. Rev.*, **86**, 1049–1092.
23. Linden, D.J., Smeyne, M., and Connor, J.A. (1993) Induction of cerebellar long-term depression in culture requires postsynaptic action of sodium ions, *Neuron*, **11**, 1093–1100.
24. Kanai, R., Ogawa, H., Vilsen, B., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2013) Crystal structure of Na^+ -bound Na^+/K^+ -ATPase preceding the E1P state, *Nature*, **502**, 201–206.
25. Sweadner, K.J., and Donnet, C. (2001) Structural similarities of Na^+/K^+ -ATPase and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Biochem. J.*, **356**, 685–704, doi: 10.1042/0264-6021:3560685.
26. Toyoshima, C., Kanai, R., and Cornelius, F. (2011) First crystal structure of Na^+/K^+ -ATPase: new light on the oldest ion pump, *Structure*, **19**, 1732–1738, doi: 10.1016/j.str.2011.10.016.
27. Pert, C.B., Pasternak, G., and Snyder, S.H. (1973) Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain, *Science*, **182**, 1359–1361.
28. Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E.E., Roth, B.L., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2014) Allosteric sodium in class A GPCR signaling, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 233–244.
29. Strasser, A., Wittmann, H.-J., Schneider, E.H., and Seifert, R. (2015) Modulation of GPCRs by monovalent cations and anions, *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **388**, 363–380, doi: 10.1007/s00210-014-1073-2.

30. Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., Ijzerman, A.P., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions, *Science*, **337**, 232–236.
31. Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L., and Stevens, R.C. (2014) Molecular control of d-opioid receptor signalling, *Nature*, **506**, 191–196.
32. Gutierrez-de-Teran, H., Massink, A., Rodriguez, D., Liu, W., Han, G.W., Joseph, J.S., Katritch, I., Heitman, L.H., Xia, L., Ijzerman, A.P., Cherezov, V., Katritch, V., and Stevens, R.C. (2013) The role of sodium ion binding site in the allosteric modulation of the A2A adenosine G protein-coupled receptor, *Structure*, **21**, 2175–2185.
33. O'Brien, M.C., and McKay, D.B. (1995) How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. I Potassium is required for optimal ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **270**, 2247–2250.
34. Arakawa, A., Handa, N., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2011) Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP, *Protein Sci.*, **20**, 1367–1379.
35. Орлов С.Н. (1987) Кальмодулин, *Общие проблемы физико-химической биологии. ВИНТИ*, **8**, 5–212.
36. Permyakov, E.A., Uversky, V.N., and Permyakov, S.E. (2017) Parvalbumin as a pleomorphic protein, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **18**, 780–794.
37. Heizmann, C.W., and Hunziker, W. (1991) Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights, *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 98–103.
38. Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., and Morishima, S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD), *J. Physiol.*, **532**, 3–16.
39. Orlov, S.N., Platonova, A.A., Hamet, P., and Grygorczyk, R. (2013) Cell volume and monovalent ion transporters: their role in the triggering and progression of the cell death machinery, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **305**, C361–C372.
40. Orlov, S.N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S.V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16545–16552.
41. Zhou, X., Jiang, G., Zhao, A., Bondeva, T., Hirzel, P., and Balla, T. (2001) Inhibition of $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ activates PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-PK1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 46–51.
42. Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Halle, A., Harms, C., Lautenschlager, M., Weih, M., Dirmagl, U., Victorov, I.V., and Zorov, D.B. (2000) Inhibition of $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$ activity in cultured cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium, *Neurosci. Lett.*, **283**, 41–44.
43. Trevisi, L., Visentin, B., Cusinato, F., Pighin, I., and Luciani, S. (2004) Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 716–721.
44. Orlov, S.N., Taurin, S., Tremblay, J., and Hamet, P. (2001) Inhibition of Na^+/K^+ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio: possible implication in vascular remodeling, *J. Hypertens.*, **19**, 1559–1565.
45. Taurin, S., Seyrantepe, V., Orlov, S.N., Tremblay, T.-L., Thibaut, P., Bennett, M.R., Hamet, P., and Pshezhetsky, A.V. (2002) Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an anti-apoptotic gene induced by elevation of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.*, **91**, 915–922.
46. Orlov, S.N., and Hamet, P. (2004) Apoptosis vs oncosis: role of cell volume and intracellular monovalent cations, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **559**, 219–233.
47. Taurin, S., Dulin, N.O., Pchejetski, D., Grygorczyk, R., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2002) c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism, *J. Physiol.*, **543**, 835–847.
48. Orlov, S.N., Taurin, S., Thorin-Trescases, N., Dulin, N.O., Tremblay, J., and Hamet, P. (2000) Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle cells by induction of RNA synthesis, *Hypertension*, **35**, 1062–1068.
49. Schoner, W., and Scheiner-Bobis, G. (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their role in hypertension, salt metabolism, and cell growth, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **293**, C509–C536.
50. Orlov, S.N., Klimanova, E.A., Tverskoi, A.M., Vladychenskaya, E.A., Smolyaninova, L.V., and Lopina, O.D. (2017) Na^+/K^+ -dependent and -independent signaling triggered by cardiotonic steroids: facts and artifacts, *Molecules*, **22**, E635, doi: 10.3390/molecules22040635.
51. Koltsova, S.V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O.A., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2012) Ubiquitous $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca^{2+} -independent excitation–transcription coupling, *PLoS One*, **7**, e38032.
52. Klimanova, E.A., Sidorenko, S.V., Smolyaninova, L.V., Kapilevich, L.V., Gusakova, S.V., Lopina, O.D., and Orlov, S.N. (2019) Ubiquitous and cell type-specific transcriptomic changes triggered by dissipation of monovalent cation gradients in rodent cells: physiological and pathophysiological implications, *Curr. Top. Membr.*, **83**, 107–149, doi: 10.1016/bs.ctm.2019.01.006.
53. Orlov, S.N., Thorin-Trescases, N., Pchejetski, D., Taurin, S., Farhat, N., Tremblay, J., Thorin, E., and Hamet, P. (2004) Na^+/K^+ pump and endothelial cell survival: $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of $[\text{Na}^+]_i$, *Pflugers Arch.*, **448**, 335–345.
54. Alonso, M.T., and Garcia-Sancho, J. (2011) Nuclear Ca^{2+} signalling, *Cell Calcium*, **49**, 280–289.
55. Taurin, S., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2003) Na/K pump and intracellular monovalent cations: novel mechanism of excitation–transcription coupling involved in inhibition of apoptosis, *Mol. Biol.*, **37**, 371–381.
56. Santana, L.F. (2008) NFAT-dependent excitation–transcription coupling in heart, *Circ. Res.*, **103**, 681–683.
57. Gundersen, K. (2011) Excitation–transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise, *Biol. Rev.*, **86**, 564–600.
58. La, J., Reed, E.B., Koltsova, S.V., Akimova, O.A., Hamanaka, R.B., Mutlu, R.B., Orlov, S.N., and Dulin, N.O. (2016) Regulation of myofibroblast differentiation by cardiac glycosides, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **310**, L815–L823.
59. Smolyaninova, L.V., Koltsova, S.V., Sidorenko, S.V., and Orlov, S.N. (2017) Augmented gene expression triggered by $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$ inhibition: role of Ca^{2+} -mediated and -independent excitation–transcription coupling, *Cell Calcium*, **68**, 5–13.
60. Orlov, S.N., Aksentsev, S.L., and Kotelevtsev, S.V. (2005) Extracellular calcium is required for the maintenance of plasma membrane integrity in nucleated cells, *Cell Calcium*, **38**, 53–57.
61. Koltsova, S.V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2015) Transcriptomic changes in Ca^{2+} -depleted cells: role of elevated intracellular $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio, *Cell Calcium*, **58**, 317–324.

62. Matt, T., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2004) The CBP/p300 XAZ1 domain in its native state is not a binding partner of MDM2, *Biochem. J.*, **381**, 685–691.
63. Krishtal, O.A., Pidoplichko, V.I., and Shakhvalov, Y.A. (1981) Conductance of the calcium channel in the membrane of snail neurones, *J. Physiol.*, **301**, 423–434.
64. Nakagawa, Y., Rivera, V., and Larner, A.C. (1992) A role for Na/K-ATPase in the control of human *c-fos* and *c-jun* transcription, *J. Biol. Chem.*, **267**, 8785–8788.
65. Haloui, M., Taurin, S., Akimova, O.A., Guo, D.-F., Tremblay, J., Dulin, N.O., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2007) Na⁺-induced *c-Fos* expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements, *FEBS J.*, **274**, 3257–3267.
66. Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., Hata, S., Abe, K., and Sorimachi, H. (2010) Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺-dependent protease, *J. Biol. Chem.*, **285**, 22986–22998.
67. Herrera, R.E., Nordheim, A., and Stewart, A.F. (1997) Chromatin structure analysis of the human *c-Fos* promoter reveals a centrally positioned nucleosome, *Chromosoma*, **106**, 284–292.
68. Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S., and Arany, Z. (2009) The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21401–21405.
69. Soyak, S.M., Felder, T.K., Auer, S., Hahne, P., Oberkofler, H., Witting, A., Paulmichl, M., Landwehrmeyer, G.B., Weydt, P., and Patsch, W. (2012) A greatly extended PPARGC1A genomic locus encodes several new brain-specific isoforms and influences Huntington disease age of onset, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 3461–3470.
70. Mechti, N., Piechaczyk, M., Blanchard, J.M., Jeanteur, P., and Lebleu, B. (1991) Sequence requirements for premature transcription arrest within the first intron of the mouse *c-fos* gene, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2832–2841.
71. Coulon, V., Veyrune, J.-L., Tourkine, N., Vie, A., Hipkind, R.A., and Blanchard, J.-M. (1999) A novel calcium signaling pathway targets the *c-fos* intragenic transcriptional pausing site, *J. Biol. Chem.*, **274**, 30439–30446.
72. Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions, *Nature Rev. Genet.*, **8**, 104–115.
73. Trinkle-Mulchany, L., and Lamond, A.I. (2008) Nuclear functions in space and time: Gene expression in a dynamic, constrained environment, *FEBS Lett.*, **582**, 1960–1970.
74. Maharana, S., Sharma, D., Shi, X., and Shivashankar, G.V. (2012) Dynamic organization of transcription compartments is dependent in functional nuclear architecture, *Biophys. J.*, **103**, 851–859.
75. Dolinnaya, N.G., Ogloblina, A.M., and Yakubovskaya, M.G. (2016) Structure, properties, and biological relevance of the DNA and RNA G-quadruplexes: overview 50 years after their discovery, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1602–1649.
76. Lubin, M., and Ennis, H.L. (1964) On the role of intracellular potassium in protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 614–631.
77. Ledbetter, M.L.S., and Lubin, M. (1977) Control of protein synthesis in human fibroblasts by intracellular potassium, *Exp. Cell Res.*, **105**, 223–236.
78. Amarelle, L., Katzen, J., Shigemura, M., Welch, L.C., Cajigas, H., Peteranderl, C., Celli, D., Herold, S., Lecuona, E., and Sznajder, J.L. (2019) Cardiac glycosides decrease influenza virus replication by inhibiting cell protein translation machinery, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **316**, L1094–L1106, doi: 10.1152/ajplung.00173.2018.
79. Cahn, F., and Lubin, M. (1978) Inhibition of elongation steps of protein synthesis at reduced potassium concentrations in reticulocytes and reticulocyte lysate, *J. Biol. Chem.*, **253**, 7798–7803.
80. Austin, J., and First, E.A. (2002) Potassium functionally replaced the second lysine of the KMSKS signature sequence in human tyrosyl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20243–20248.
81. Jennings, M.D., and Pavitt, G.D. (2010) eIF5 is a dual function GAP and GDI for eukaryotic translational control, *Small GTPases*, **1**, 118–123.
82. Cao, J., He, L., Lin, G., Hu, C., Dong, R., Zhang, J., Zhu, H., Hu, Y., Wagner, C.R., He, Q., and Yang, B. (2014) Cap-dependent translation initiation factor, eIF4E, is the target for ouabain-mediated inhibition of HIF-1 α , *Biochem. Pharmacol.*, **89**, 20–30.
83. Klimanova, E.A., Tverskoi, A.M., Koltsova, S.V., Sidorenko, S.V., Lopina, O.D., Tremblay, J., Hamet, P., Kapilevich, L.V., and Orlov, S.N. (2017) Time- and dose-dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na⁺ and K⁺: a comparative analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 45403, doi: 10.1038/srep45403.
84. Fisher, P.A., Goodman, J.G., and Kull, F.L. (1976) Thyroid ribonucleic acid-iodopeptides. Comparison of thyrosyl-complex II and thyrosyl-tRNA, *Biochemistry*, **15**, 4065–4070.
85. Quivy, J.P., and Chroboczek, J. (1988) Tyrosyl-tRNA synthetase from wheat germ, *J. Biol. Chem.*, **263**, 15277–15281.
86. Dever, T.E. (2002) Gene-specific regulation by general translation factors, *Cell*, **108**, 545–556.
87. Pedersen, B.K., and Febbraio, M.A. (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6, *Physiol. Rev.*, **88**, 1379–1406.
88. Nikolic, N., Gordens, S.W., Thoresen, G.H., Aas, V., Eckel, J., and Eckardt, K. (2017) Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for *in vitro* exercise – possibilities and limitations, *Acta Physiol.*, **220**, 310–331.
89. Murphy, K.T., Nielsen, O.B., and Clausen, T. (2008) Analysis of exercise-induced Na⁺-K⁺ exchange in rat skeletal muscle, *Exp. Physiol.*, **93**, 1249–1262.
90. Danilov, K., Sidorenko, S.V., Milovanova, K., Klimanova, E.A., Kapilevich, L.V., and Orlov, S.N. (2017) Electrical pulse stimulation decreases electrochemical Na⁺ and K⁺ gradients in C2C12 myotubes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 875–878.
91. Sidorenko, S.V., Klimanova, E.A., Milovanova, K., Lopina, O.D., Kapilevich, L.V., Chibalin, A.V., and Orlov, S.N. (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of Ca²⁺-mediated and Ca²⁺-independent signaling and elevated [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72–86.
92. Bakowski, D., and Parekh, A.B. (2002) Monovalent cation permeability and Ca²⁺ block of the store-operated Ca²⁺ current ICRAC in rat basophilic leukemia cells, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **443**, 892–902.
93. Hunt, S.P., Pini, A., and Evan, G. (1987) Induction of *c-Fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, **328**, 632–634.
94. Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., and Worley, P.F. (1989) Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation, *Nature*, **340**, 474–476.
95. Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, P.J., Bliss, T.V.P., Garel, S., Charney, P., Bozon, B., Laroche, S., and Davis, S. (2001) A requirement for the immediate

- early response gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories, *Nat. Neurosci.*, **4**, 289–296.
96. Thiel, G., Mayer, S.I., Muller, I., Stefano, L., and Rossler, O.G. (2010) Egr-1 – a Ca^{2+} -regulated transcription factor, *Cell Calcium*, **47**, 397–403.
 97. Alberini, C.A. (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity, *Physiol. Rev.*, **89**, 121–145.
 98. Bennay, M., Langer, J., Meier, S.D., Kafitz, K.W., and Rose, C.R. (2008) Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission, *Glia*, **56**, 1138–1149.
 99. Jaffe, D.B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J.E., Miyakawa, H., and Ross, W.N. (1992) The spread of Na^+ spikes determines the pattern of dendritic Ca^{2+} entry into hippocampal neurones, *Nature*, **357**, 244–246.
 100. Baeza-Lehnert, F., Saab, A.S., Gutierrez, R., Larenas, V., Diaz, E., Horn, M., Vargas, M., Hosli, L., Stobart, J., Hirrlinger, J., Weber, B., and Barros, L.F. (2019) Non-canonical control of neuronal energy status by the Na^+ pump, *Cell Metab.*, **29**, 1–13.
 101. Smolyaninova, L.V., Shiyan, A.A., Kapilevich, L.V., Lopachev, A.V., Fedorova, T. N., Klementieva, T.S., Moskovtsev, A.A., Kubatiev, A.A., and Orlov, S.N. (2019) Transcriptomic changes triggered by ouabain in rat cerebellum granule cells: role of $\alpha 3$ - and $\alpha 1$ -mediated signaling, *PLoS One*, in press.
 102. Coba, M.P., Valor, L.M., Kopanitsa, M.V., Afinowi, N.O., and Grant, S.G. (2008) Kinase networks integrate profiles of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated gene expression in hippocampus, *J. Biol. Chem.*, **283**, 34101–34107.
 103. Barry, D.N., and Commins, S. (2017) Temporal dynamics of immediate early gene expression during cellular consolidation of spatial memory, *Behav. Brain Res.*, **327**, 44–53.
 104. Zhu, S., Tai, C., MacVicar, B.A., Jia, W., and Cynader, M.S. (2009) Glutamatergic stimulation triggers rapid Kruppel-Like factor 4 expression in neurons and the overexpression of KLF4 sensitizes neurons to NMDA-induced caspase-3 activity, *Brain Res.*, **1250**, 49–62.
 105. Flavell, S.W., and Greenberg, M.E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.*, **31**, 563–590.
 106. Malik, A.N., Vierbuchen, T., Hemberg, M., Rubin, A.A., Ling, E., Couch, C.H., Stroud, H., Spiegel, I., Farth, K., Harmin, D.A., and Greenberg, M.E. (2014) Genome-wide identification and characterization of functional activity-dependent enhancers, *Nat. Neurosci.*, **17**, 1330–1339.
 107. Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 721–732.
 108. Wood, I.S., Perez de Heredia, F., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009) Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity, *Proc. Nutr. Soc.*, **68**, 370–377, doi: 10.1017/S0029665109990206.
 109. Orlov, S.N., La, J., Smolyaninova, L.V., and Dulin, N.O. (2019) Na^+, K^+ -ATPase as a target for treatment of tissue fibrosis, *Curr. Med. Chem.*, **26**, doi: 10.2174/0929867324666170619105407.
 110. Akimova, O.A., Tverskoi, A.M., Smolyaninova, L.V., Mongin, A.A., Lopina, O.D., La, J., Dulin, N.O., and Orlov, S.N. (2015) Critical role of the $\alpha 1$ - Na^+, K^+ -ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain, *Apoptosis*, **20**, 1200–1210.

SEARCH FOR INTRACELLULAR SENSORS INVOLVED IN THE FUNCTION OF MONOVALENT CATIONS AS SECONDARY MESSENGERS

Review

E. A. Klimanova^{1*,**}, S. V. Sidorenko¹, A. M. Tverskoy^{1**}, A. A. Shiyan¹, L. V. Smolyaninova^{1**}, L. V. Kapilevich², S. V. Gusakova³, G. V. Maksimov¹, O. D. Lopina^{1**}, and S. N. Orlov^{1,2,3}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: klimanova.ea@yandex.ru

² National Research Tomsk State University, 634050 Tomsk, Russia

³ Siberian State Medical University, 634050 Tomsk, Russia

Received June 3, 2019

Revised July 15, 2019

Accepted July 16, 2019

Maintaining the non-equilibrium distribution of Na^+ and K^+ between the cytoplasm and the extracellular medium suggests the presence of sensors that undergo conformational transitions in response to a change in the intracellular concentration of these monovalent cations. Molecular nature of the sensors of monovalent cations was established studying Na, K -ATPase structure, receptors associated with GTP-binding proteins, and heat shock proteins. Recently, it has been found that changes in Na^+ and K^+ intracellular concentrations are a key factor in the transcription and translation regulation, respectively. This review summarizes main results of these studies with an emphasis on the physiological and pathophysiological value of the Na^+, K^+ -sensitive mechanism of gene expression regulation.

Keywords: sodium, potassium, transcription, translation