

ОТ МЕТАБОЛИЗМА К ИММУНИТЕТУ: АФК И ДРУГИЕ СИГНАЛЫ

Обзор

© 2020 А.Ю. Андреев^{1*}, Ю.Е. Кушнарева², Н.Н. Старкова³, А.А. Старков⁴

¹ *The Scripps Research Institute, 10550 La Jolla, CA 92037, USA; E-mail: alex_andreyev@mitoexperts.com*

² *La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 La Jolla, CA 92037, USA*

³ *State University of New York, Maritime College, New York, NY 10465, USA*

⁴ *Brain and Mind Research Institute, Weill Medical College of Cornell University, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10065, USA*

Поступила в редакцию 11.09.2020

После доработки 13.11.2020

Принята к публикации 17.11.2020

Функционирование иммунных клеток в значительной степени определяется их метаболизмом. Исследование метаболизма иммунной системы по определению является мультидисциплинарным разделом иммунологии, который интегрирует данные о механизмах передачи энергии и биохимических путях. Одним из наиболее важных понятий в области иммунологии является метаболическое переключение – вызванный активацией переход иммунных клеток к преимущественному использованию специфических катаболических путей для получения энергии. Митохондрии участвуют в этом процессе и способствуют метаболической адаптации через активацию различных механизмов, включая изменения продукции АТФ в соответствии с динамически меняющимися метаболическими потребностями, а также служат центрами управления для внутриклеточной передачи сигналов. Последняя функция включает в себя один из наиболее изучаемых митохондриальных процессов – генерацию активных форм кислорода (АФК). Роль митохондриальных АФК в окислительном стрессе хорошо известна, в то время как их участие в иммунном ответе представляет собой активно развивающееся направление. В этом обзоре мы обсуждаем роль сигнальных АФК и иммунометаболизма с точки зрения биоэнергетики. Мы также предлагаем критический взгляд на методологию оценки АФК, описывая современные проблемы в этой области. В заключение, на основе анализа литературных данных, мы полагаем что, в противоположность окислительному стрессу, продукция АФК с целью клеточной регуляции в большей степени контролируется биогенезом митохондрий, чем метаболическим переключением.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммунометаболизм, активные формы кислорода, гликолитическое переключение, макрофаги, Т-клетки, биогенез митохондрий.

DOI: 10.31857/S0320972520120167

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия было опубликовано множество работ, посвященных исследованию активных форм кислорода (АФК) в митохон-

дриях (митоАФК), что подчеркивает важность прооксидантов в исследованиях живых систем. В 2002 г. мы предложили простую модель кинетики генерации АФК как бимолекулярную реакцию между кислородом и митохондриальными

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; митоАФК – АФК, продуцируемые в митохондриях; МРТР – пора, обуславливающая неспецифическую пермеабиллизацию митохондрий (mitochondrial permeability transition pore); ОЭТ – обратный транспорт электронов; СДГ – сукцинатдегидрогеназа; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; ARE – AU-обогащенная последовательность DNA; ATF4 – транскрипционный фактор ATF4, зависимый от циклического AMP; BMDM – макрофаги из костного мозга; CAD – декарбоксилаза *cis*-аконитата; с-Мус – протоонкоген MYC; DAMP – молекулярный паттерн, связанный с повреждениями; ERK – внеклеточные сигнал-регулируемые киназы; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; G-3P – глицеральдегид-3-фосфат; HIF1 – фактор 1, индуцируемый гипоксией; HIF1 α – α -субъединица HIF1; IFN γ – интерферон гамма; LDHA – лактатдегидрогеназа А; LPS – липополисахарид; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; Nrf2 – ядерный фактор (nuclear factor erythroid 2-related factor 2); NAC – N-ацетилцистеин; NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток; NLRP3 – криопирин (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing 3 protein); NO – оксид азота (II); NOX – NADPH-оксидаза; PND – пролилгидроксилаза; PPR – скорость генерации протонов; SHP2 – тирозинфосфатаза 2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2); TCR – рецептор Т-клеток; TLR4 – толл-подобный рецептор 4; TNF α – фактор некроза опухоли; $\Delta\psi$ – мембранный потенциал; ρ_0 -клетки – клетки, неспособные к дыханию из-за дефекта митохондриальной DNA.

* Адресат для корреспонденции.

ми редокс-центрами (АФК-центрами), легко подверженными автоокислению [1]. В соответствии с законом действующих масс скорость этой реакции пропорциональна количеству (концентрациям) обоих реагентов. Данная модель также учитывает динамическую природу АФК-центров, которые постоянно циклически переходят между восстановленной формой, способной к реакции с кислородом, и неакционноспособной, окисленной формой. Таким образом, продукция АФК пропорциональна одновременно общей концентрации АФК-центров и доле активной формы этих центров.

Считается, что основным источником продукции митоАФК в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) является комплекс I в сильно восстановленном состоянии, которое может быть достигнуто с помощью специфичного ингибитора комплекса I, ротенона, и других ингибиторов ЭТЦ или путем создания определенных условий (например, истощением цитохрома *c*). Наоборот, ротенон ингибирует продукцию АФК при обратном электронном транспорте (ОЭТ) в гиперполяризованных митохондриях [2–4]. Этот процесс происходит в клетках, находящихся в патологических состояниях, способствующих избыточному накоплению сукцината и активации проксимальных сайтов продукции АФК. Интересно, что окислительный стресс, индуцируемый ОЭТ, наблюдается при повреждениях, вызванных ишемией/реперфузией [5–7]. Тем не менее, как обсуждается далее, вклад ОЭТ в АФК-опосредованную передачу сигнала в нормальных физиологических условиях кажется маловероятным. Другим каноническим АФК-центром является комплекс III, описанный в новаторских исследованиях в 1972 году [8, 9]. Продукция АФК комплексом III представляет собой устойчивый процесс, который, однако, можно наблюдать только в присутствии специфического ингибитора, антимицина А, который искусственно увеличивает уровень нестабильного семихинона кофермента Q (донора электронов) в части Q-цикла со стороны матрикса митохондрий. Неясно, модифицируется ли комплекс III естественными эффекторами; следовательно, роль этого АФК-центра в физиологических условиях остается под сомнением [2, 4, 10, 11]. Одним из аспектов продукции митоАФК, который в отличие от ЭТЦ не получает заслуженного внимания, являются источники АФК в митохондриальном матриксе. Основываясь на результатах ранних исследований, было предположено, что дегидрогеназы митохондриального матрикса вносят вклад в продукцию АФК в нормальных митохондриях (в отсутствие ингибиторов ЭТЦ).

В частности, основная АФК-продуцирующая активность ассоциирована с дигидролипоамид-дегидрогеназой, являющейся компонентом α -кетоглутаратного и пируватдегидрогеназного комплексов [12, 13].

Традиционно считается, что продукция АФК происходит при окислительном стрессе, который по определению вызывает разнообразные повреждающие эффекты в клетках. Накопленные данные в пользу регуляторной функции АФК привели к сдвигу парадигмы к признанию «умеренных» количеств АФК как важных компонентов передачи сигнала в клетке. Метаболическое репрограммирование активированных иммунных клеток, особенно Т-клеток и макрофагов, требует значительных биоэнергетических перестроек, которые должны влиять как на массу митохондрий, так и на количество и редокс-состояние АФК-центров, т.е. на оба компонента предлагаемой модели продукции АФК [1]. Эти факторы следует учитывать при исследовании АФК-зависимых путей передачи сигнала.

В этом обзоре мы представляем критический взгляд на некоторые метаболические пути АФК-зависимой передачи сигнала. Представив ключевые иммунометаболические концепции, такие как переключение на гликолиз и «размыкание» цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), мы обсуждаем роль иммуномодулирующих метаболитов (иммунометаболитов). Такое обсуждение составляет базис для более углубленного анализа биоэнергетики иммунных клеток и их способности генерировать митоАФК. Мы также описываем возможные механизмы АФК-опосредованной передачи сигнала в иммунном ответе, в частности взаимосвязь между митоАФК и функционированием индуцируемого гипоксией фактора 1 (HIF1). Еще одной темой нашего обзора являются митоАФК как молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP), представляющие собой внутренние медиаторы воспалительного ответа. Мы также кратко рассматриваем вопрос взаимодействия между митоАФК и немитохондриальными АФК (в основном H_2O_2 , продуцированной в NOX-зависимых реакциях в макрофагах). Обзор завершается обсуждением экспериментальных методов, широко используемых в этой области, и возможных ошибок в интерпретации экспериментальных результатов. Заинтересованный читатель может найти более подробное описание затронутых тем в специальных обзорах, процитированных в соответствующих разделах.

Основными выводами из анализа концепций, представленных в обзоре являются: 1) передача регуляторных сигналов с участием митоАФК, скорее всего, включает в себя умеренные

изменения, связанные с биогенезом митохондрий, а не резкие изменения в метаболическом состоянии митохондрий, наблюдаемые при окислительном стрессе; 2) метаболические изменения в иммунной системе в целом способствуют увеличению преобразования энергии путем наиболее эффективного механизма — окислительного фосфорилирования (а не переключения на гликолиз); 3) классические активированные макрофаги являются исключением, т.к. обладают бактерицидной активностью, которая требует интенсивной продукции химически активных веществ (оксид азота (II) (NO) и H₂O₂), способных повреждать митохондрии.

ИММУНОМЕТАБОЛИЗМ: ОБЩИЕ АСПЕКТЫ

Беспрецедентный интерес к метаболической регуляции врожденного и приобретенного иммунитета, а также развитие методов высокоточного «омикс»-профилирования клеток иммунной системы способствовали возникновению новой междисциплинарной области исследований: *иммунометаболизма*. Так, в серии недавних обзоров, представляющих последние достижения в этой области, основные метаболические пути рассматриваются в контексте специализированных функций иммунных клеток [14–19]. В данной статье мы представляем некоторые недавние концепции метаболизма иммунной системы, уделяя особое внимание гликолитическому переключению и соответствующим изменениям в энергетическом метаболизме митохондрий.

Гликолитическое переключение. Подобно раковым клеткам, демонстрирующим классический эффект Варбурга, нормальные иммунные клетки (в частности, Т-лимфоциты и макрофаги), подвергнувшиеся действию антигенов, цитокинов и других стимулов, демонстрируют быстрый метаболический сдвиг от митохондриального окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу. Хотя подобные метаболические изменения хорошо известны (первые сообщения об увеличении гликолитической активности в стимулированных лимфоцитах относятся к 1960–1970 гг. [20, 21]), необходимость аэробного гликолиза для активации иммунных клеток и эффекторного ответа понятна не до конца. Так как эффекторные функции иммунных клеток, в частности продукция цитокинов лимфоцитами, связаны с увеличенной способностью к пролиферации [22], активация гликолиза, возможно, требуется для осуществления

реакций биосинтеза, необходимых для роста клеток [14, 23–25]. Парадоксально, что отличительной чертой активации иммунных клеток является увеличенная продукция лактата, которая формально предотвращает утилизацию предстоящих метаболитов в синтезе макромолекул [15]. Более того, переключение с эффективной продукции АТФ митохондриями на менее эффективный аэробный гликолиз выглядит несовместимым с энергетическими требованиями клетки для осуществления анаболических реакций и эффекторных функций, а также пролиферации.

Действительно, метаболические фенотипы активированных иммунных клеток и их функциональные подтипы различаются (особенно это заметно для Т-клеток и макрофагов). В то время как гликолитическое переключение в активированных Т-клетках происходит одновременно с быстрой активацией митохондриального дыхания, стимуляция макрофагов приводит к увеличению активности iNOS (индуцируемой синтазы оксида азота) и NO-опосредованному ингибированию ЭТЦ [26] (см. обсуждение этой проблемы ниже, в разделе, посвященном биоэнергетической оценке гликолитического переключения).

Ферменты гликолиза контролируют эффекторные функции. Недавние данные об участии гликолитических ферментов и метаболитов в эпигенетической регуляции и пост-транскрипционном контроле эффекторных функций предполагают решающую роль гликолиза в иммунном ответе [27–30]. Например, было показано, что экспрессия интерферона-гамма (IFN γ) в Т-клетках негативно регулируется связыванием mRNA IFN γ глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH); такое ингибирование трансляции устраняется при индукции гликолитического переключения и вовлечении GAPDH в производство энергии в активированных Т-клетках [27]. Обратная зависимость между доступностью GAPDH и уровнем трансляции цитокинов предполагает наличие дополнительной (неферментативной) функции GAPDH как конститутивного ингибитора трансляции в покоящихся (неактивированных) клетках. Недавно было показано, что GAPDH участвует в сходной метаболической регуляции трансляции фактора некроза опухоли (TNF) в воспалительном ответе макрофагов [31]. Эти исследования подтверждают данные более ранней работы, показавшей способность GAPDH связывать AU-обогащенные последовательности (AU-rich elements, ARE) mRNA и влиять на экспрессию генов [32]. Оба субстрата GAPDH — глицеральдегид-3-фосфат (G-3P) и NAD⁺ — вытесняют ARE

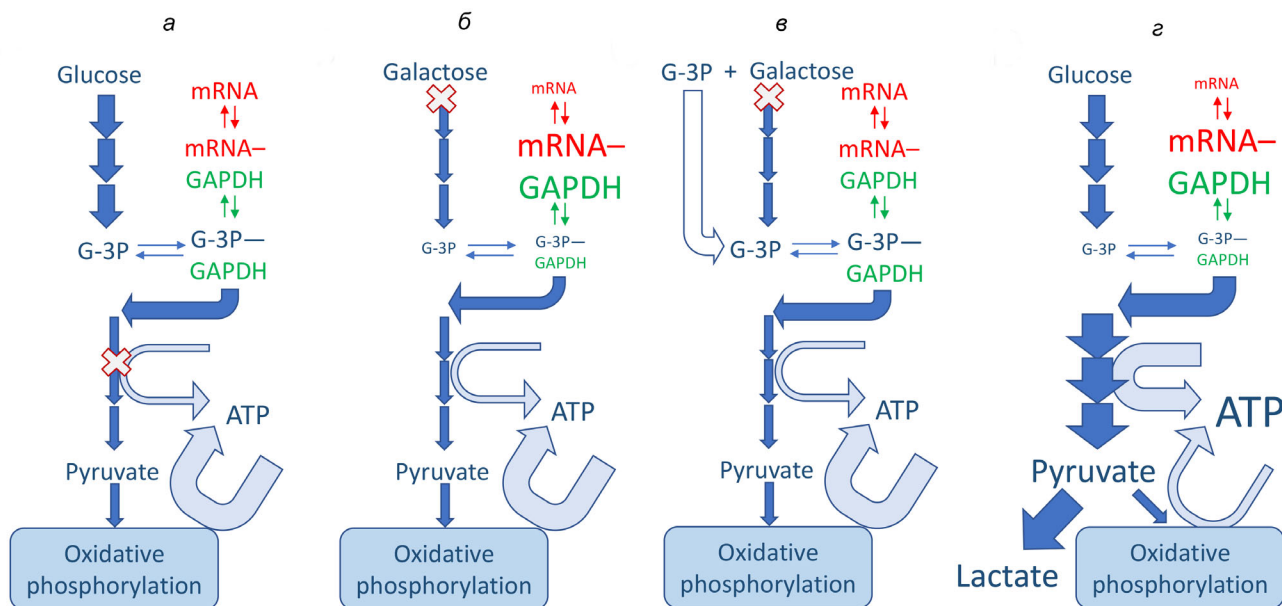


Рис. 1. Регуляция количества ARE–mRNA комплексов гликолитическим потоком. Активности ферментов регулируются опосредованно путем изменений в концентрациях метаболитов. Соответственно, дополнительная mRNA-связывающая функция GAPDH определяется количеством субстратов (G-3P и пиридиновых нуклеотидов). GAPDH, mRNA и основные реакции гликолитического пути показаны зеленым, красным и голубым цветами. Базовые реакции синтеза лактата несут ответственны и не показаны на схеме (а, б). Ширина стрелки соответствует количеству метаболитов. X обозначает точку ограничения метаболического пути. В нормальных условиях (а) точки ограничения представляют собой ATP-продуцирующие ферменты, частично ингибированные из-за конкуренции с митохондриальной продукцией ATP. Галактоза вовлечена в классический гликолитический путь, но поступает в него очень медленно (б, в). Это приводит к связыванию ARE–mRNA (в том числе mRNA IFN γ) GAPDH и снижению ее концентрации (б), а также уменьшению концентрации ARE–mRNA, включая IFN γ (б), что обратимо добавлением экзогенного G-3P (в) [27]. Гипотетическое гликолитическое переключение (г) должно приводить к уменьшению уровня mRNA IFN γ (и белка), что противоречит наблюдаемой продукции IFN γ и нуждается в дополнительном исследовании. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

из связывающего сайта [33, 34]. Соответственно, G-3P усиливает продукцию IFN γ в гликолитически недостаточных Т-клетках, растущих на медленно метаболизируемой галактозе, но не в клетках, культивируемых на глюкозе, которые уже содержат значительные количества G-3P [27] (рис. 1, а–в). Однако следует отметить, что при таком сценарии гликолитический поток ограничен на стадиях предшествующих реакции, катализируемой GAPDH. Если гликолитический поток ограничен на стадиях, следующих за GAPDH, устранение ограничений будет иметь противоположный эффект, и накопление интермедиатов, включая G-3P, должно прекратиться. Гипотетический сценарий «метаболического переключения» с окислительного фосфорилирования (в котором гликолитические ATP-продуцирующие ферменты после GAPDH частично ингибированы из-за конкуренции с митохондриями) на гликолитическую продукцию ATP показан на рис. 1, г.

В рамках этой модели, однако, не находит места факт, что продукт реакции NADH и его структурный аналог ATP в микромолярных кон-

центрациях способны замещать ARE из GAPDH [27]. Так как внутриклеточные концентрации пиридиновых и адениновых нуклеотидов достигают миллимолярных значений, эти соединения должны эффективно конкурировать с ARE в любых условиях. Чтобы разрешить это противоречие, было предположено, что концентрации нуклеотидов в некоторых компартментах клетки (ядре или цитоплазме) могут быть значительно ниже, чем во всей клетке [27], но это допущение нуждается в проверке.

Альтернативный механизм координации гликолитического переключения и биосинтеза цитокинов основан на участии лактатдегидрогеназы А (LDHA), которая катализирует превращение пирувата в лактат. Основываясь на результатах генетических экспериментов по снижению уровня LDHA, было показано, что при аэробном гликолизе экспрессия IFN γ контролируется LDHA через ацетил-КоА-зависимый эпигенетический механизм (ацетилирование гистонов), а не GAPDH-опосредованной регуляцией транскрипции [28]. Проявление обоих механизмов также может зависеть от каноничес-

ких функций этих белков «домашнего хозяйства» (housekeeping proteins), в особенности в парадигме потери активности. Было предсказано, что GAPDH является ещё одним ферментом, определяющим скорость гликолиза (в дополнение к классическим ферментам, регулирующим скорость гликолиза, таким как гексокиназа, фосфофруктокиназа и пируваткиназа) [35], в то время как LDHA определяет конечную реакцию аэробного гликолиза. Таким образом, GAPDH и LDHA являются важными детерминантами в установлении концентраций гликолитических компонентов в устойчивом состоянии реакции, редокс-равновесии $NAD^+/NADH$ и уровне выживания клеток. Исследования применения ингибирования LDHA для подавления эффекта Варбурга в терапии раковых заболеваний показали, что такое ингибирование нарушает биосинтез серина и аспарагиновой кислоты. Однако в раковых клетках этому эффекту противостоит опосредованная ATF4 (транскрипционным фактором из семейства цАМР-зависимых белков) активация экспрессии генов, ответственных за выживание клеток [36]. Аналогично пролиферация и эффекторные функции активированных Th1-клеток, включают в себя ATF4-зависимый транскрипционный ответ, в особенности в условиях дефицита аминокислот [37]. Кроме того, лактат *per se* напрямую модулирует функционирование иммунных клеток [38–40] и в высоких концентрациях способствует снижению продукции цитокинов. Недавние исследования обнаружили новый лактат-зависимый эпигенетический механизм (модификация лактатом остатков лизина в гистонах), который связан с метаболическим репрограммированием макрофагов после контакта с бактериальными патогенами. Митохондриальный ингибитор ротенон увеличивал уровень данной модификации, что свидетельствует о взаимосвязи между активностью окислительно-фосфорилирования в митохондриях и регуляцией транскрипции. Действительно, количество лактата обратно зависит от утилизации пирувата в митохондриях, которая прекращается, когда пул пиридиновых нуклеотидов полностью восстанавливается в присутствии ротенона. [29]. LDHA-зависимая эпигенетическая модуляция экспрессии цитокинов напрямую связана с метаболизмом митохондрий, особенно с биосинтезом цитрата в ЦТК. Стимулированные $CD4^+$ Т-клетки с дефицитом активности LDHA характеризуются повышенным митохондриальным дыханием, активностью ЦТК и пониженным уровнем ацетил-КоА [28]. Это предполагает, что в клетках дикого типа гликолитическое переключение предотвращает утилизацию цитрата

митохондриями и способствует его транспорту из этих органелл, таким образом повышая уровень синтеза ацетил-КоА из цитрата, селективного ацетилирования гистонов и транскрипции $IFN\gamma$ [28]. Отметим, что ацетил-КоА используется и в других клеточных процессах, таких как биосинтез жирных кислот и холестерина, а также в ацетилировании гистонов и негистоновых белков [41, 42].

Что касается метаболизма цитрата, одним из потенциально важных регуляторов продукции цитокинов (особенно в макрофагах) и $NADP^+/NADPH$ баланса в клетке является антипортер цитрата/малата (SLC25A1) [43, 44]. Эти и другие недавние исследования сформировали новый раздел в изучении метаболизма иммунных клеток, сфокусированном на роли метаболитов ЦТК (см. ниже, а также обзор Williams и O'Neill [44]).

Концепция «разомкнутого цикла». Основываясь на метаболическом перепрограммировании макрофагов и дендритных клеток, было предположено, что в условиях метаболического переключения и/или нарушения митохондриального дыхания (например, из-за продукции NO-активированными макрофагами) происходит рассогласование ЦТК и ЭТЦ, которое приводит к накоплению иммуномодуляторных интермедиатов, наиболее заметными из которых являются сукцинат и цитрат [44, 45]. Однако следует ожидать, что подавление транспорта электронов в ЭТЦ посредством механизма дыхательного контроля или путем прямого ингибирования вызовет почти полное восстановление NAD^+ до $NADH$. Это приведет к остановке ЦТК из-за дефицита NAD^+ , который является субстратом в четырех реакциях цикла, включая пируватдегидрогеназную реакцию на входе в цикл. В данном случае образования сукцината и цитрата не будет (рис. 2, а–в). Для обеспечения прохождения реакций цикла необходимо удаление избытка восстановительных эквивалентов, который должен быть транспортирован из митохондрий переносчиком малата/сукцината (рис. 2, б) или утилизирован каким-либо еще образом [46]. Вопрос, достаточно ли этих активностей для перезапуска ЦТК должен быть решен экспериментально.

Иммунометаболиты: «строительные» блоки анаболизма или регуляторные молекулы? Метаболиты могут играть роль предшественников строительных блоков (аминокислот или жирных кислот) при пролиферации клеток и биосинтезе белков и/или регуляторных молекул. При рассмотрении анаболических процессов необходимо принимать во внимание два соображения. Во-первых, маловероятно, что клетки пожерт-

вуют энергетической эффективностью ради преимуществ анаболизма как «большого блага», как предполагает концепция гликолитического переключения. С точки зрения биохимии, иммунный ответ является исключительно энергетически затратным механизмом, в котором энергия расходуется на синтез белка (пролиферация и дифференцировка клеток, продукция цитокинов и антител), работы моторных белков цитоскелета (морфологические изменения клеток), а также функционирование ионных насосов (ионотропная передача сигнала). Большинство клеток, включая иммунные, обладают избыточной дыхательной ёмкостью, т.е. превышением емкости ЦТК над общими энергетическими потребностями, что может быть использовано для биосинтеза без необходимости подавления биоэнергетических процессов. Во-вторых, клетки организма, как правило, получают большую часть строительных блоков (аминокислот, жирных кислот, холестерина) с пищей. Возможность организма добавить что-либо к этому источнику весьма ограничена. Из двадцати аминокислот десять являются незаменимыми и еще две синтезируются из незаменимых аминокислот. Все полиненасыщенные жирные кислоты являются незаменимыми или синтезируются из таковых. Способность синтезировать пальмитат из цитрата или серина и глицина (из 3-фосфоглицерата), которая часто рассматривается в

сценариях метаболического репрограммирования, может служить в лучшем случае для умеренной коррекции пищевого имбаланса (за исключением печени и жировой ткани, специализирующихся в липогенезе [47]). Это также означает, что в экспериментах *in vitro* стандартная среда для культивации клеток должна пополняться определёнными питательными веществами, если они становятся компонентами, лимитирующими рост клеток.

Регуляторные механизмы представляются более значимыми, чем анаболические процессы. Как отмечено выше касательно их регуляторных функций, сукцинат и цитрат участвуют в пост-трансляционной и пост-транскрипционной регуляции. Изменения их уровней (в особенности, в модели «разомкнутого» ЦТК) значительны и достаточны, чтобы вызвать значимый эффект. Количество цитрата в макрофагах костного мозга (bone marrow derived macrophages, BMDM) стимулированных толл-подобным рецептором 4 (TLR-4) увеличивается в 2 раза [48], что может приводить к сходному возрастанию количества ацетил-КоА в цитозоле и повышению скорости реакции ацетилирования гистонов. Кроме того, ацетил-КоА может быть конвертирован в малонил-КоА за счет активности ацетил-КоА карбоксилазы. Было показано, что содержание малонил-КоА действительно увеличивается примерно в 2,5 раза, что

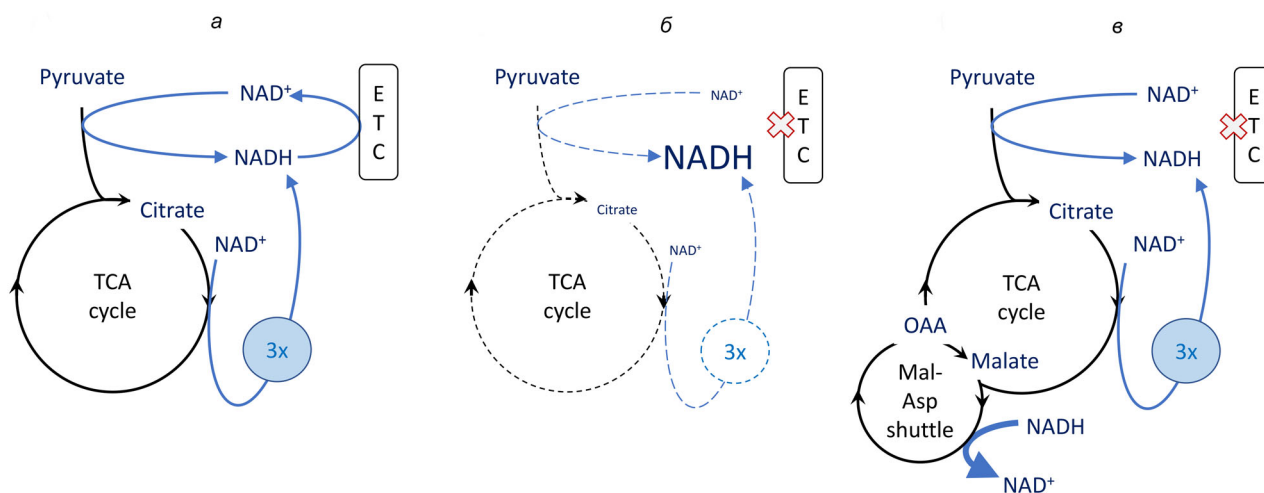


Рис. 2. Подавление и восстановление биосинтетической активности ЦТК доступностью NAD^+ . Биосинтетическая активность показана на примере синтеза цитрата, необходимого для биосинтеза липидов. Реакции пиридиновых нуклеотидов показаны голубыми стрелками; «3x» обозначает 3 молекулы $NADH$, образованных в одном обороте ЦТК. Ширина стрелки соответствует величине потока; размер шрифта соответствует количеству метаболита; **X** обозначает подавление активности ЭТЦ. *а* – Нормальная продукция цитрата при окислительном фосфорилировании. *б* – Низкая продукция цитрата в условиях подавления активности ЭТЦ, в том числе путем дыхательного контроля в условиях гликолитического переключения. *в* – Гипотетическое восстановление синтеза цитрата через обратный малат-аспаратный (Mal-Asp) обмен; окисление $NADH$ оксалоацетатом (OAA). Стрелка, соответствующая превращению $NADH$ в NAD^+ , ассоциирована с символом Mal-Asp обмена (в противоположность конверсии OAA в малат) для простоты схемы. Символы $NADH$ (и/или NAD^+) представляют общий пул $NADH$ (и/или NAD^+)

приводит к малонилированию различных белков, в том числе и GAPDH [49]. Малонилирование лизина 213 (или его замена на глутаминовую кислоту, симулирующая эту модификацию) увеличивает ферментативную активность приблизительно в 3 раза и полностью высвобождает связанный транскрипт TNF α [49]. Таким образом, одна и та же модификация, индуцируемая повышением содержания цитрата, одновременно усиливает энергетические и эффекторные функции.

Содержание сукцината в TLR-4-стимулированных BMDM также повышено в 2 раза [48]. Сукцинат ингибирует пролилгидроксилазу (PHD) с IC₅₀ ~ 0,5 мМ, что находится в пределах его внеклеточной концентрации [50]. Из-за структурной схожести ингибирование имеет конкурентный характер и может быть предотвращено с помощью α -кетоглутарата, который является субстратом фермента [48]. Соответственно, активность PHD должна зависеть от соотношения между этими метаболитами в большей степени, чем от содержания каждого из них. Количество α -кетоглутарата в TLR-4-стимулированных макрофагах RAW 264.7 остается неизменным, в то время как содержание сукцината увеличивается в 3 раза, что сдвигает соотношение в пользу ингибирования [51]. Ингибирование PHD предотвращает дестабилизацию HIF1 α (см. раздел «Митохондриальные АФК и регуляция HIF1») и позволяет транскрипцию многих генов, включая ген провоспалительного цитокина IL-1 β [48].

Общий пул метаболитов ЦТК (в том числе сукцината и цитрата) в активированных макрофагах увеличивается, что предполагает активацию анаплероза [48]. Исследования с использованием стабильных изотопов показали, что наиболее значительный вклад в анаплероз вносит превращение глутамин в α -кетоглутарат через глутамат [48]. Накопление сукцината может осуществляться в результате ингибирования сукцинатдегидрогеназы (СДГ), например итаконатом (см. ниже) [51, 52]. Однако классического пункта перекреста на уровне СДГ нет, т.к. количество интермедиатов пост-СДГ, фумарата и малата, не только не уменьшается, но даже может увеличиваться [48], что свидетельствует о незначительной роли СДГ в аккумуляции сукцината. Эксперименты по изучению метаболических путей с использованием стабильных изотопов исключили возможность биосинтеза сукцината непосредственно из итаконата [51].

Итаконат вполне можно рассматривать как архетипичный метаболит иммунной системы [53]. Хотя итаконат отсутствует в покоящихся макрофагах, его количество экспоненциально

возрастает до миллимолярных концентраций в течение нескольких часов после активации клеток TLR4, что превращает итаконат в наиболее представленный дикарбоксилат в клетке [51, 54]. Такая кинетика сходна с кинетикой других важных регуляторных метаболитов, таких как простагландины [55] и оксид азота [56]. Она отражает кинетику *цис*-аконитатдикарбоксилазы (CAD; также известной как иммуноподавляющий белок гена 1, IRG1), фермента, количество которого сильно (почти в 200 раз) возрастает при индукции и который превращает интермедиат ЦТК аконитат в итаконат [54]. У млекопитающих эта реакция происходит почти исключительно в макрофагах [57]. Хотя остается неясным, что заставляет аконит, связанный в активном центре аконитазы, диссоциировать и вступать в реакцию, катализируемую CAD.

Роль итаконата остается предметом для дискуссий: является ли его действие провоспалительным благодаря ингибированию СДГ и накоплению сукцината [51] или противовоспалительным [50, 58]? Последнее предположение подтверждается фактом, что содержание цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-18 и IL-12 (но не TNF α) в клетках с нокаутированной CAD слегка повышено (на 20–30%), предполагая существование иммунной супрессии итаконатом в клетках дикого типа. Однако уровень транскрипта *hif-1 α* в клетках с нокаутом CAD увеличивается в 10 раз, приводя к увеличению количества белка HIF1 α [52], что само по себе может объяснить умеренный провоспалительный эффект. Благодаря присутствию реактивной двойной связи, сопряженной с карбоксигруппой, итаконовая кислота может участвовать в реакциях присоединения Михаэля с тиолами белков. Было предположено, что итаконат оказывает свое действие через пост-трансляционные модификации Kelch-подобного белка 1 (KEAP1) с образованием аддуктов Михаэля и последующей активацией противовоспалительного ядерного фактора Nrf2 [58]. В целом, однако, учитывая мощный ответ итаконата на стимуляцию, вполне вероятно, что мы пока слабо представляем себе полный потенциал этого метаболита.

Несколько замечаний о передаче сигнала. Значительный интерес в исследовании иммунометаболизма сосредоточен на динамических пост-активационных изменениях в метаболизме липидов, в частности на зависимом от гликолиза *de novo* синтезе жирных кислот (СЖК). Метаболический сдвиг, сопровождаемый переходом от окисления жирных кислот (ОЖК) к СЖК, активируется сигнальными каскадами, ассоциированными с белком-мишенью рапамицина млекопитающих, mTOR (mammalian target of

garamycin), действию которого противостоит активность АМР-активируемой киназы (АМРК), которая, в свою очередь, активирует ОЖК [15, 59]. Сериновая/треониновая киназа mTOR связывает доступность питательных веществ и кислорода с соответствующими транскрипционными программами. Эта регуляторная сеть контролирует различные аспекты врожденного и приобретенного иммунитета, включая поляризацию макрофагов, гликолитическое репрограммирование Т-клеток, клеточную миграцию, функционирование регуляторных Т-клеток (T_{reg}) и продукцию цитокинов различными типами иммунных клеток [15, 59–62]. Одним из плеiotропных эффектов mTOR является усиление биогенеза митохондрий и окислительного метаболизма [62]. Помимо сенсора кислорода HIF-1 α (см. ниже), к необходимым транскрипционным факторам, контролирующим метаболическое репрограммирование, относятся Ca^{2+} /кальциейрин-зависимый ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) [63, 64] и с-Мус (MYC протоонкоген), один из основных регуляторов экспрессии генов, ответственных за выживание клеток [23, 45, 60, 65]. Недавно было показано, что ядерный фактор карра В (NF- κ B), являющийся транскрипционным активатором в воспалительном ответе, играет роль негативного регулятора при избыточном воспалении [66]. Данный механизм включает в себя сложное взаимодействие между избирательной элиминацией поврежденных митохондрий (митофагией) и активацией NLRP3 инфламмосомы [67]. Эти компоненты сигнальной сети являются объектом активных исследований и были подробно описаны в обзорах, посвященных передаче сигнала в клетках [62, 66, 68].

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЛИКОЛИТИЧЕСКОГО ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ

Часто повторяющейся темой в исследовании иммунометаболизма является концепция метаболического переключения, т.е. обязательного перехода клеток к использованию специализированных путей метаболизма для осуществления иммунных функций. В частном случае гликолитического переключения эта концепция включает в себя набор представлений и понятий, таких как переход к аэробному гликолизу, сигнальная активность АФК и/или иммунометаболитов, которые в целом или по отдельности прилагаются к исследованиям различных клеток иммунной системы. Во всей полноте такой механизм был предложен, например для моноцитов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2

[69] и стимулированных липополисахаридами (LPS) макрофагов [70]. В этом разделе обзора мы попытались оценить эти сценарии с точки зрения биохимика. Наш анализ построен прежде всего на данных, полученных в обстоятельном исследовании гликолитического переключения в TLR4-активированных макрофагах [70], которое позволило расшифровать системы метаболических изменений, происходящих при провоспалительной поляризации макрофагов, приводящей в итоге к стабилизации HIF1 α и продукции цитокинов.

Понятие гликолитического переключения предполагает активацию гликолиза, так что уровень продукции АТФ в гликолизе начинает превышать уровень его продукции при окислительном фосфорилировании, что вызывает ингибирование окислительного фосфорилирования за счет дефицита субстрата (ADP). Соответственно, соотношение АТФ к ADP (АТФ/ADP) после перехода клеток на гликолиз должно увеличиваться. Однако в TLR4-стимулированных BMDM соотношение АТФ/ADP снижается примерно на 40%, что соответствует увеличению уровня ADP с 5 до 8% от общего пула нуклеотидов. Хотя такой подъем в уровне ADP должен вызывать активацию дыхания, дыхание клеток снижается примерно на 40%, что подразумевает совершенно иной механизм: активное подавление окислительного фосфорилирования, а не дыхательный контроль (контроль уровней ADP). С наибольшей вероятностью окислительное фосфорилирование подавляется оксидом азота, NO [71]. С 1989 года было известно, что активированные макрофаги производят NO, который вызывает подавление дыхания в клетках-мишенях [72]. NO обратимо ингибирует оксидазу цитохрома *c* (дыхательный комплекс IV), конкурируя с кислородом. NO продуцируется iNOS, экспрессируемой при активации клеток. Так, культивируемые макрофаги способны производить NO в количествах до 1 мкМ, что достаточно для подавления их дыхания [73]. Длительное воздействие NO может вызвать необратимое ингибирование дыхательного комплекса I [74]. NO подавляет активность аконитазы 2 и пируватдегидрогеназы, т.е. стадий, предшествующих дыхательной цепи, что может служить причиной наблюдаемого снижения уровня потребления кислорода дыхательной цепью [75]. Нестабильность NO может объяснить существенные различия в степени ингибирования дыхания, наблюдаемой в разных работах.

Использование платформ для анализа метаболических потоков, разработанных для одновременной оценки потребления кислорода (OCR, oxygen consumption rate) и скорости закисления

внечелочной среды (ECAR, extracellular acidification rate) с развитым анализом данных [76], позволяет количественно оценить относительные вклады окислительного фосфорилирования и гликолиза в общую биоэнергетическую активность клеток иммунной системы. В работе Mils et al. [70] представлены подробные данные для такого анализа, которые включают достаточно редко измеряемую скорость генерации протонов (proton production rate, PPR) (в данном случае измерения ECAR было недостаточно). Наш анализ этих данных основан на суммарных стехиометриях окислительного фосфорилирования и гликолитического пути. В соответствии с последними оценками выход АТФ в окислительном фосфорилировании составляет 30–32 молекулы АТФ на молекулу глюкозы (как следует, например из соотношения АТФ/О₂, приводимых Nichalls и Ferguson [77]) вместо канонических 36 молекул АТФ [78]. Соответственно, мы принимаем, что АТФ/О₂ = 5,45 [79]. Общепринятая стехиометрия гликолиза – продукция одной молекулы АТФ на одну молекулу лактата (АТФ/Н⁺ = 1) [77]. Однако расчёт продукции АТФ в гликолизе, основанный на определении PPR, предоставляет оценку только верхнего предела (максимальных значений) из-за вклада СО₂, производимого митохондриями. Мы конвертировали опубликованные значения PPR и OCR в скорость синтеза АТФ. В состоянии покоя 2 · 10⁵ BMDM продуцируют ~1500 пмоль АТФ в мин; стимуляция TLR4 снижает уровень синтеза АТФ клетками примерно на 40% (до ~900 пмоль/мин). Вклад гликолиза увеличивается с ~3% (покоящиеся клетки) до ~17% (активированные клетки). Такие изменения метаболизма не достигают уровня, позволяющего говорить о «переключении», воспринимаемом как переход к преимущественной опоре на гликолиз для удовлетворения энергетических нужд клеток.

Парадоксально, что в TLR4-стимулированных макрофагах митохондриальная функция ингибирована, в то время как вклад гликолиза является малозначительным и не обеспечивающим энергетических потребностей клетки. Это приводит к снижению синтеза АТФ и соотношения АТФ/ADP, неизбежно вызывая подавление АТФ-потребляющих процессов, которые в покоящихся клетках представляются собой, по большей части, процессы «домашнего хозяйства», абсолютно необходимые для выживания. Однако в более широком биологическом смысле для провоспалительных макрофагов задача выживания вполне может не стоять как существенная.

Введение ингибитора гликолиза, 2-дезоксиглюкозы, подавляет иммунный ответ макро-

фагов (продукцию цитокинов) и значительно снижает смертность животных в моделях бактериальной инфекции и/или гипервоспаления [48, 80, 81]. Эти результаты подчеркивают существование точной настройки энергетических требований в иммунном ответе, которая сохраняется, несмотря на существующий энергетический дефицит, но при этом существенно зависит от остаточного обеспечения энергией за счет метаболизма глюкозы. Последний, очевидно, не ограничен гликолизом и включает в себя окислительный метаболизм гликолитически продуцированного пирувата в митохондриях. Остается вопрос, насколько другие митохондриальные субстраты могут замещать пируват.

Следует заметить, что, несмотря на активацию гликолиза, подавление окислительного фосфорилирования в альтернативно активированных макрофагах (например, в ответ на IL-4) отсутствует. Наоборот, в таких клетках происходит опосредованный транскрипционным активатором PGC-1 β биогенез митохондрий, который приводит к увеличению их способности к окислительному метаболизму [82, 83], соответствующему повышенным энергетическим требованиям клеток [71, 84, 85]. Сходные изменения происходят в биоэнергетике T-клеток в ответ на стимуляцию рецепторов T-клеток, когда активируются одновременно гликолиз и окислительное фосфорилирование [27, 86]. Таким образом, даже если усиление гликолиза является характерным ответом иммунных клеток на различные стимулы, гликолитическое переключение имеет ограниченное значение.

Обратный электронный транспорт и АФК. Дополнительного обсуждения в данном контексте заслуживает роль продукции АФК, опосредованной обратным электронным транспортом. Вполне вероятно, что гликолитическое переключение могло бы приводить к активации ОЭТ при соблюдении определенных условий. Эксперименты на изолированных митохондриях показали, что данный механизм исключительно чувствителен к любой деполяризации митохондриальной мембраны, поскольку он движим мембранным потенциалом ($\Delta\psi$) «в горку», т.е. против редокс-потенциала переносчиков [87, 88]. Для работы этого механизма митохондрии должны быть в, по существу, нефосфорилирующем состоянии (состояние 4, гиперполяризация). Этого не происходит в митохондриях, стимулированных BMDM, которые сохраняют более чем половину нормальной АТФ-синтетической активности (см. выше). Прямые измерения выявили, что, хотя сигнал $\Delta\psi$ -чувствительного зонда TMPM увеличивается при стимуляции клеток, он не достигает уровня, наблюдае-

мого в состоянии 4, индуцированном олигомицином [70]. Кроме того, такое изменение пропорционально увеличению флуоресценции $\Delta\Psi$ -нечувствительного митохондриального зонда MitoTracker Green, что, скорее всего, предполагает ответ на увеличение объема матрикса митохондрий, а не на изменение $\Delta\Psi$. Также, в исходном определении ОЭТ является транспортом электронов с сукцината на NAD^+ и проявляется в высоко восстановленном состоянии NAD^+/NADH . Однако в активированных BMDM 90% пиридиновых нуклеотидов окислены. В целом, по нашему мнению, стимулированные BMDM не обладают необходимыми условиями для ОЭТ и ОЭТ-опосредованной продукции АФК. Также при изучении ингибиторных свойств АФК митохондриальные ингибиторы, способные эффективно блокировать ОЭТ, добавлялись за 3 часа до стимуляции клеток [70], что оставляло достаточно времени для проявления множественных альтернативных эффектов. Хотя вполне возможно, что определяющим механизмом все же является АФК-зависимая передача сигнала, осуществляемая через стабилизацию $\text{NIF1}\alpha$, происхождение АФК в данном случае остаётся непонятным. Упомянутое выше увеличение сигнала MitoTracker Green [70] согласуется с предположением об увеличении массы митохондрий, что также поддерживается синтезом дополнительных молекул митохондриальной DNA в активированных макрофагах [89]. Это предполагает биогенез с одновременным увеличением количества митохондриальных редокс-переносчиков, в том числе АФК-продуцирующих центров. Само по себе это может быть достаточным для увеличения общей продукции АФК, которая к тому же может дополнительно усиливаться в слегка восстановленной среде (изменение уровня восстановления NADH с ~ 8 до $\sim 13\%$ [70]), предположительно за счет частичного блокирования дыхательной цепи.

Сукцинат и продукция АФК. Классические эксперименты на изолированных митохондриях используют окисление экзогенного сукцината как источник ОЭТ-зависимой генерации АФК, равно как и продукции АФК комплексом III. Однако сукцинат неизбежно присутствует в интактных клетках как метаболит, поэтому потребность в экзогенном сукцинате трудно объяснить, если только не происходит значительного истощения метаболитов ЦТК. В последнем же случае любой анаплеротический интермедиат способен заменить сукцинат. Так, гораздо легче обеспечить доставку глутамин (предшественника α -кетоглутарата), чем сукцината, который не проникает через плазматическую мембрану. Полу-

чение сукцината из алкилированного производного (например, диэтилсукцината) зависит от его расщепления неспецифическими внутриклеточными эстеразами неизвестной природы. Эти активности достаточны для захвата и удержания в клетках различных зондов и/или ингибиторов. Однако способность расщеплять достаточное количество молекул метаболитов ЦТК для поддержания нормального метаболического потока пока не была доказана. В частности, из упомянутой выше работы Mils et al. [70] очевидно, что диэтилсукцинат (называемый в этой работе просто сукцинатом) не способен увеличить внутриклеточный пул сукцината. Тем не менее он вызывает характерный ряд биологических эффектов, таких как стимуляция TLR4-зависимой провоспалительной передачи сигнала (продукции $\text{IL-1}\beta$) и подавление противовоспалительного сигнала (IL-10 и IL-1RA), не влияя при этом на $\text{TNF}\alpha$. Удивительно, что диэтиловый эфир бутилмалоната (ингибитор переносчика дикарбоксилата) проявляет сходные биологические свойства, хотя известно, что он подавляет окисление сукцината в изолированных митохондриях путем предотвращения его доступа к СДГ. Это несоответствие предполагает, что оба диэтиловых эфира могут оказывать сходный побочный эффект. Кроме того, диэтилсукцинат *per se* вызывает очень незначительную продукцию АФК ($\sim 40\%$ при концентрации 5 мМ) по сравнению с 4-кратным увеличением генерации АФК лигандом TLR4, LPS. К сожалению, ответы АФК на комбинацию этих двух эффекторов, вызывающих упомянутый выше характерный ряд биологических эффектов, не известны. В отличие от диэтилсукцината, эффект LPS на повышение клеточного уровня сукцината (в отсутствии экзогенных источников) в 3 раза превышает эффект ингибитора СДГ, малоната. Это предполагает, что TLR4-зависимые метаболические изменения не заканчиваются перераспределением в общем пуле интермедиатов ЦТК и могут увеличивать этот пул примерно до 10 раз (анаплероз). Такое увеличение полностью совместимо с предполагаемым ростом митохондриальной массы (см. выше).

Клетки ρ_0 как модель гликолитического переключения. Клетки с индуцируемым дыхательным дефицитом (ρ_0), полученные путем экспрессии доминантно-негативной DNA-полимеразы γ и описанные нами ранее [90], использовались для моделирования «метаболического переключения» и исследования влияния внутриклеточных сигналов, продуцируемых митохондриями [91, 92]. В митохондриях этих клеток отсутствует дыхательная цепь, что нарушает их способность окислять образованный в ЦТК NADH и

поддерживать функционирование ЦТК. Это приводит к снижению биосинтеза цитрата и его продукта, ацетил-КоА, и, как следствие, к уменьшению ацетилирования гистонов. Несколько специфических сайтов теряют ацетилирование гистонов в ρ_0 -клетках, что подразумевает потенциальное подавление экспрессии генов [91]. Было показано, что деацетилирование гистонов обратимо за счет экспрессии альтернативной дыхательной цепи, состоящей из оксидоредуктазы NDI1 и митохондриальной оксидазы АОХ, что было интерпретировано как реактивация ЦТК путем окисления NADH. Однако соотношение NAD^+/NADH в клетках с фенотипом ρ_0 осталось неизменным [91], предполагая существование иных механизмов деацетилирования гистонов. Совместное действие NDI1 и АОХ не способно приводить к генерации АТФ, следовательно, экспрессия этих белков не восстанавливает пролиферацию ρ_0 -клеток [91], что указывает на исключительную важность биоэнергетических (а не биосинтетических) функций. Способность ρ_0 -клеток к пролиферации может быть незначительно (на 10–15%) восстановлена нормализацией $\Delta\Psi$. Эти результаты, параллельно с данными об ответе индикатора CellROX, позволили предположить механизм АФК-зависимой передачи сигнала по NIF1-опосредованному пути [91]. Однако регуляция образования АФК посредством $\Delta\Psi$ осуществляется через гипертрофированное состояние митохондрий, которое может быть детектировано по гипертрофированности пары NAD^+/NADH , но не наблюдается в ρ_0 -клетках [91]. Как альтернативное объяснение можно предположить, что $\Delta\Psi$ необходим для импорта белков в митохондрии, в том числе компонентов биосинтетических систем, критически необходимых для пролиферации клеток и функционирования основного АФК-продуцирующего фермента, дигидролипоамиддегидрогеназы [12, 13]. В целом модель, использующая ρ_0 -клетки, подчеркивает важность биоэнергетики для функционирования клеток, в то время как роль гликолитического переключения представляется спорной. Данная модель не объясняет механизм образования АФК, и, принимая во внимание наличие поврежденной дыхательной цепи, значение этой модели остается неясным.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ АФК КАК СИГНАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИММУННОГО ОТВЕТА

В последнее время увеличивается количество статей, посвященных регуляторной роли ми-

тохондриальных АФК, отличающейся от их широко известных проапоптотических функций и других повреждающих клетку активностей, индуцируемых при нарушении работы митохондрий в различных патологических состояниях. МитоАФК, функционирующие как сигнальные молекулы, вовлечены в автофагию, митофагию, биогенез митохондрий, клеточный цикл и другие клеточные процессы, контролируемые редокс-зависимой передачей сигнала и транскрипционными факторами. Белки, функционирование которых регулируется АФК, перечислены во многих обзорах. Список белков-мишеней АФК включает ATF4, ядерный фактор карра В (NF- κ B), митоген-активируемые киназы (MAPK), внеклеточные сигнал-регулируемые киназы (ERKs), p38 MAPK, c-Jun N-терминальные киназы (JNKs) [93]; тирозинфосфатазы и p53 [10, 94–103]. Тем не менее механизм образования АФК и АФК-зависимой передачи сигнала в контексте иммунометаболического регулирования требует дальнейших исследований и вероятного переосмысления существующих концепций.

Т-клетки: основные моменты. Множественные данные позволяют предположить, что митоАФК являются потенциально незаменимыми факторами для активации Т-клеток, их эффекторных функций и дифференциации [42, 49, 96, 102, 104–108]. Раннее исследование TCR-активированных клеток описывает немедленное действие TCR-зависимой продукции АФК на сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и выживание Т-клеток [109]. Удивительно, что разные АФК оказывали разное действие на клетки: перекись водорода активировала передачу пролиферационного сигнала в ERK-зависимом каскаде, в то время как супероксид анион индуцировал клеточную смерть (через экспрессию лигандов FAS). При этом ряд эффектов, включая активацию NFAT и экспрессию IL-2, не зависели от АФК [109]. Хотя авторы исследования не указали место генерации АФК, представляется вероятным участие митоАФК в описанных эффектах. На основе результатов химической и генетической инактивации компонентов ЭТЦ другие авторы связали Т-клеточные ответы с сигнальной функцией митоАФК, образованных в ЭТЦ [104, 110]. Так, CD4⁺ Т-клетки с дефицитом железо-серного белка Rieske (функционально обеспечивающего классический АФК-генерирующий центр в комплексе III) демонстрировали нарушения в Ca²⁺-зависимом NFAT–IL-2 сигнальном каскаде, в то время как остальные редокс-зависимые пути (например, активность ERK) не были затронуты дефицитом белка Rieske. Данные экспе-

риментов по обращению этого эффекта с использованием экзогенной H_2O_2 поддерживают роль АФК-зависимого фактора в индукции IL-2. Интересно, что в этих условиях гликолиз не был необходим для активации Т-клеток и продукции IL-2 [104]. В другой работе было обнаружено, что продукция IL-2 и IL-4 активированными Т-клетками существенно снижалась антиоксидантом N-ацетилцистеином (NAC). Продукция интерлейкинов в клетках, дефицитных по комплексу I дыхательной цепи, также была снижена. Авторы предположили, что именно комплекс I является источником регуляторных АФК [110]. Индуцированная TCR экспрессия цитокинов и продукция H_2O_2 ингибировалась ротеноном (в концентрациях, значительно превышающих специфические для ингибирования комплекса I), что вызывает вопрос – действительно ли сигнал АФК приходит из комплекса I. Менее инвазивный метод (по отношению к функционированию дыхательной цепи) заключается в использовании классических антиоксидантов и антиоксидантов, специфичных для митохондрий. Хотя такой подход и недостаточен для идентификации молекулярных механизмов и участников АФК-опосредованной передачи сигнала (таких как сайт генерации АФК и белков-мишеней), он обеспечивает необходимые для подтверждения концепции результаты, доказывающие участие АФК в разнообразных сигнальных путях. В разделе «Инструменты» мы обсудим преимущества и недостатки наиболее часто применяемых систем для защиты от АФК.

АФК как «SOS» сигналы. Молекулярные фрагменты, ассоциированные с патогенами (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) или повреждениями (DAMPs), узнаются рецепторами иммунных клеток как сигналы опасности и запускают острый иммунный ответ, приводящий к элиминации патогена и регенерации поврежденной ткани. Иммунный ответ на DAMP часто называют стерильным воспалением, т.к. его причиной являются внутриклеточные (а не внешние) агенты [111]. Изучение распознавания сигналов опасности макрофагами позволило идентифицировать сигнальные пути, ведущие к активации NLRP3 инфламмосомы, которая служит молекулярной платформой для интеграции прокаспазы I и процессинга провоспалительных цитокинов при стрессе [67, 89, 112–115]. Активирующие инфламмосому DAMP включают в себя молекулы, образованные в митохондриях, такие как АФК, кардиолипин и митохондриальная DNA [67, 89, 113, 116]. Высвобожденная митохондриальная DNA также участвует в антивирусном врожденном иммунитете, запуская cGAS-STING сигнальный кас-

кад и реакции, опосредованные интерфероном типа I [117–119]. Это раскрывает еще одну важную роль митохондрий в иммунитете, которая дополняет их функцию по обеспечению клетки АТФ и классическую передачу сигнала в апоптозе через высвобождение цитохрома c [120, 121]. Для того, чтобы эмитировать такие «SOS» сигналы, митохондрии должны быть избирательно пермеабилizadas или в какой-то степени повреждены, хотя точные пути для высвобождения DAMP пока не известны. Как кандидаты в структуры, участвующие в высвобождении DNA и АФК и последующей активации NLRP3, были предложены компоненты митохондриальной апоптотической поры. Пермеабилзация митохондрий при апоптозе включает два хорошо изученных механизма: формирование неселективной поры во внутренней мембране митохондрий (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) и формирование Bax/Bak-зависимой поры во внешней мембране митохондрий (mitochondrial outer membrane permeabilization поры, MOMP) [122]. Последний механизм не нарушает целостность внутренней митохондриальной мембраны. Считается, что он не участвует в иммунном ответе, хотя было показано, что активация эффекторных киназ после индукции MOMP белками Bax/Bak способствует NLRP3-зависимой продукции IL-1 β [123]. Неселективная MPTP может пропускать DNA [124, 125]. Так, недавно было предположено, что TDP-43-зависимое воспаление опосредовано транслокацией митохондриальной DNA через MPTP. Однако это предположение было сделано на основе наблюдаемых эффектов ингибитора MPTP, циклоспорина А, примененного в дозе примерно в 10 раз превышающей необходимую для специфической активности [126]. Не было исключено, что в данном случае наблюдаемые эффекты были результатом действия на альтернативную мишень – кальцинейрин. Кроме того, формирование MPTP обычно приводит к полной потере функции митохондрий, и понадобился бы какой-то дополнительный механизм для предотвращения этого. В недавнем исследовании был описан регуляторный механизм, который включает в себя взаимодействие между тирозинфосфатазой 2 (SHP2) и транслоказой адениновых нуклеотидов 1 (ANT1), одним из предполагаемых компонентов MPTP. Было предположено, что SHP2-опосредованное ингибирование ANT1 ограничивает высвобождение DAMP и предотвращает избыточную активацию инфламмосомы [127]. Так как преобладающим АФК является H_2O_2 , которая свободно проникает через мембраны, логично предположить, что сигнал митоАФК, вызывающий активацию

инфламмосомы, связан с незначительными изменениями в митохондриях и не требует катастрофического увеличения проницаемости митохондрий, вызываемого открытием МРТР. В этом отношении обратимое состояние МРТР и состояние с низкой проводимостью [10, 128, 129] заслуживают особое внимание, т.к. могут быть связаны с АФК-зависимой передачей сигнала от функционально интактных митохондрий.

В активации инфламмосомы NLRP3 участвуют митоАФК, производимые комплексами I и III (но, ожидаемо, не комплексом II) [113]. Интересно, что продукция АФК и последующий воспалительный иммунный ответ ингибировались подавлением активности потенциал-зависимых анионных каналов (voltage-dependent anion channels, VDACs), что может связывать АФК-зависимую передачу сигнала и транспорт метаболитов [113]. МитоАФК также передает сигнал о повреждениях через окисление митохондриальной DNA, т.к. только окисленная DNA связывается с NLRP3 и активирует ее [89, 114]. В другом исследовании была выявлена ключевая роль паркин-опосредованной митофагии в NF- κ B-зависимом контроле избыточной активации NLRP3 инфламмосомы [67]. Это и другие исследования [130] подчеркивают важность систем контроля качества в митохондриях, интегрирующих митофагию, динамику митохондрий и биогенез этих органелл в развитии врожденного иммунного ответа и воспаления.

МИТОАФК И РЕГУЛЯЦИЯ HIF1

Хотя транскрипционный фактор HIF1 широко вовлечен в ряд адаптивных процессов, включая иммунный ответ, идея об участии АФК в регуляции его критически важной субъединицы HIF1 α возникла при изучении адаптации клеток к физиологической гипоксии (0,3–3% кислорода). Было предположено, что в таких условиях стабилизация HIF1 α критически зависит от сигнальных митоАФК, таким образом приписывая митохондриям роль сенсоров кислорода [131]. Субъединица HIF1 α нестабильна при нормальном содержании кислорода в клетке из-за быстрой деградации, инициируемой белком PDH из семейства α -кетоглутарат-зависимых оксигеназ. Гидроксилирование повышает в 1000 раз аффинность HIF1 α к убиквитин-лигазному комплексу, содержащему опухолевый супрессор pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor) как распознающий компонент. HIF1 α подвергается быстрому убиквитинированию и направляется для деградации протеасомой [132]. Белки PDH являются хорошими сенсора-

ми кислорода, т.к. значения K_m только слегка превышают концентрацию кислорода в водной среде (230–250 мкМ) [133]. Следовательно, активность этих белков должна почти линейно зависеть от парциального давления кислорода в условиях гипоксии. Существование любого другого механизма для оценки количества кислорода предполагает, что фундаментальный контроль в соответствии с законом действия масс каким-либо образом утерян, и активность ферментов остается высокой, несмотря на практическое отсутствие одного из субстратов (кислорода). Разработка и доказательство существования подобного сценария может стать благородной задачей для будущих энзимологов.

Аргументом в пользу митоАФК-опосредованного механизма является повышенный ответ АФК-чувствительных зондов при гипоксии [92, 131, 134]. Эти результаты следует интерпретировать с осторожностью, особенно в отсутствие кинетических данных [92, 134]. Например, наблюдаемые *обратимые* изменения в флуоресценции дихлорофлуоресцеина [131] трудно объяснить. Ответ сайтов продукции АФК на изменения парциального давления кислорода был исследован в такой простой системе, как изолированные митохондрии. Результаты этих исследований варьировали, но ни в одной из работ не была обнаружена повышенная продукция АФК в условиях гипоксии [135–137]. Было сделано заключение, что ответы АФК на гипоксию в клетках не являются внутренне присущим свойством митохондрий [136], и их происхождение остается неизвестным [95]. Экзогенная перекись водорода, возможно, стабилизирует HIF1 α чувствительным к каталазе способом [92], что в некоторой степени поддерживает идею о том, что в данный процесс могут быть вовлечены немитохондриальные АФК. Тем не менее базовый вопрос о механизме подавления гидроксилирования HIF1 α АФК остается открытым.

НЕМИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ АФК В ИММУНИТЕТЕ

Основной темой этого обзора являются митоАФК, однако обсуждение АФК-зависимой передачи сигнала было бы неполным без упоминания других (иногда более значительных) источников АФК. В ответ на вторжение патогена, фагоцитирующие клетки секретируют огромные количества АФК. Этот процесс называется дыхательным взрывом и катализируется ферментами из семейства NADPH-оксидаз (NOX) (см. обзор [138], описывающий семь известных белков этого семейства). Основная NADPH-ок-

сидаза иммунного ответа, NOX2, представляет собой мультисубъединичный белковый комплекс, который формируется на плазматической мембране клеток в строго регулируемом процессе в ответ на внеклеточные сигналы. Фермент использует внутриклеточные восстановительные эквиваленты в виде NADPH для восстановления кислорода до супероксид-аниона (который, в свою очередь, дисмутирует в перекись водорода) с выбросом АФК во внеклеточную среду [138, 139]. В фагоцитирующих клетках (макрофагах и нейтрофилах) NOX2-продуцируемые АФК играют основную роль в уничтожении инвазивных патогенов. Эти же АФК могут участвовать в сигналах обратной связи. К примеру, они подавляют ответ Т-клеток на активацию TCR в смешанных культурах нейтрофилов и Т-клеток [140]. В отсутствие фагоцитов внутриклеточные NOX-генерируемые АФК могут играть роль в индуцированной активацией смерти Т-клеток [106]. Вдобавок к этим иммуносупрессорным механизмам АФК могут участвовать в активации Т-клеток. Активация TCR вызывает внеклеточную генерацию супероксида, скорее всего, при участии NOX2. Удивительно, что этот процесс не требуется для активации Т-клеток, их пролиферации и продукции цитокинов [141]. На основе этих и других данных было сделано заключение, что NOX2 необходим для правильной дифференцировки в Th2 клетки и ухода от Th17 фенотипа, но не для активации Т-клеток. Анализ действия антиоксидантов привел к гипотезе, что реально действующими молекулами при активации Т-клеток являются растворимые в липидах продукты перекисного окисления или их ферментативно образованные аналоги (лейкотриены), но не АФК как таковые [106].

АФК, образующиеся при функционировании NOX, также могут участвовать в активации инфламмосомы NLRP3 в макрофагах [142], что было подтверждено несколькими линиями доказательств. Даже если специфичность ингибиторов NOX можно подвергнуть сомнению [143], сложность NOX-опосредованных ответов, включающих транслокацию и сборку множественных субъединиц, предоставляет свидетельства в пользу предложенной модели, как было показано в генетических экспериментах и исследовании по локализации белковых компонентов [142]. Активация инфламмосомы в ответ на частицы также соответствует модели фагоцитоз-индуцируемой активации NOX и продукции АФК, сходной с дыхательным взрывом [144]. Таким образом, NOX представляется вполне вероятной альтернативой митохондриям в качестве источника АФК в клетках. Не существует очевидной причины, почему сигнал АФК, проду-

цированный NOX, должен как-либо отличаться от сигнала, возникшего в митохондриях, т.к. наиболее вероятно, что в обоих случаях такой АФК будет относительно стабильная перекись водорода, H₂O₂, способная свободно проникать через мембрану. Относительный вклад этих двух источников был недавно оценен в фагоцитирующих клетках (миоцитах). Хотя нет причины ожидать, что эти клетки обладают повышенной активностью NOX, вклад этого фермента в продукцию АФК был значителен (~40%) [145]. Сходный анализ источников АФК в различных типах иммунных клеток позволит существенно расширить наши знания о роли АФК-зависимой передачи сигнала в иммунитете.

И наоборот, митохондрии могут вносить вклад в окислительный взрыв и бактерицидную активность, как было показано для макрофагов [146] и нейтрофилов [147]. Важно отметить, что при этом митохондрии специально привлекаются к сайтам бактерицидной активности в NOX2-содержащих фагосомах [146]. Возможно также существование положительной обратной связи между митохондриальной и NOX-зависимой продукцией АФК, что может приводить к усилению бактерицидного действия [147–149].

ИНСТРУМЕНТЫ

Любые результаты хороши настолько, насколько хороши использованные в исследованиях методы. Ниже мы приводим примеры некоторых ключевых методов, применяемых в изучении АФК и метаболических сигнальных процессов.

АФК зонды. Некоторые из методов оценки скорости продукции и конечных уровней АФК, их недостатки и потенциальные ошибки уже обсуждались в нашем предыдущем обзоре, посвященном АФК и использованию дихлорофлуоресцеина и его эфирного аналога (H₂-DCF-DA или DCF-DA) [11]. Однако в последние годы широкое признание получило положительно заряженное производное дигидроэтидия, полученное его конъюгацией с трифенилфосфонием (MitoSOX), которое используются как специфический сенсор супероксида в митохондриях. Следует отметить, что такие зонды подвержены таким же ограничениям, как и остальные ΔΨ-зависимые флуоресцентные индикаторы [150, 151]. Флуоресценция MitoSOX зависит не только от активности АФК, но и от обратимой компарментализации в митохондриальном матриксе, цитозоле и внеклеточной среде, которая определяется ΔΨ на митохондриальной и плазматической мембранах. Любые изменения в

$\Delta\psi$ приведут к изменениям в концентрации и флуоресценции зонда в матриксе и цитозоле. Другим фактором может быть разное связывание зонда с ядерной и митохондриальной DNA [151] (связывание MitoSOX с DNA многократно увеличивает его флуоресценцию). Кроме того, зонд может разобщать митохондрии и ингибировать оксидазу цитохрома *c* (комплекс IV) в очень низких концентрациях [152], что делает необходимым контроль и учет этих параметров при интерпретации экспериментальных данных. Существование более чем одного флуоресцентного продукта превращает количественную оценку АФК с использованием зонда в качественную, если только продукты реакции не анализируются методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [153]. Хотя абсолютно надежных зондов для измерения АФК не существует, MitoSOX представляется одним из наиболее сложных в использовании зондов.

Антиоксиданты. *N*-ацетилцистеин. Хотя NAC широко применяется как общий антиоксидант, его, скорее всего, следует считать восстановителем и умеренным протектором сульфгидрильных групп. NAC также участвует в пополнении пула глутатиона, но только в условиях его значительного истощения [154, 155]. Механизм нейтрализации АФК этим антиоксидантом находится под вопросом, учитывая низкую константу скорости реакции с супероксидом [156–158]. NAC слабо реагирует с H_2O_2 и супероксидом [157]. Взаимодействие NAC с супероксидом представляет собой цепную реакцию, в которой супероксид регенерируется. Реакция завершается с превращением всего супероксида в другую разновидность АФК, H_2O_2 [157]. Метаболические реакции, приводящие к образованию более восстанавливающих низкомолекулярных соединений серы описаны в работе Ezerina et al. [158], но их значение для детоксикации АФК нуждается в подтверждении.

SkQ и MitoQ. Хинон MitoQ и в меньшей степени его близкий структурный аналог, SkQ [159, 160], способные специфически аккумулироваться митохондриями, широко используются как специфические антиоксиданты для внутримитохондриальных АФК [159]. Следует отметить, что пространственная селективность этих компонентов постулируется на основании соображений их близкого расположения к источникам митохондриальных АФК и компартиментализации [161]. С другой стороны, SkQ and MitoQ являются эффективными нейтрализаторами (scavengers) свободных радикалов в мембранах, включая те, которые генерируются из экзогенного пероксида [162]. Принимая во внимание, что большинство клеточных АФК представлено

перекисью водорода, которая легко проникает через мембраны, факт защиты клеток с помощью этих антиоксидантов является весьма спорным указателем происхождения АФК. Оба соединения были разработаны как каталитические антиоксиданты [159, 160], т.к. являются структурными аналогами природного редокс-переносчика кофермента Q, который подвергается циклическому окислению/восстановлению в дыхательной цепи. MitoQ больше похож на кофермент Q, в то время как структура SkQ была оптимизирована для повышения реактивности и способности проникать через мембрану [160, 161]. Способность SkQ восстанавливаться комплексами I и II и таким образом регенерировать была показана в статье Skulachev [160]. Нужно отметить, что как MitoQ, так и SkQ в микромолярных концентрациях являются сильными прооксидантами [160], поэтому необходимо тщательно подбирать условия, чтобы избежать перегрузки митохондрий этими соединениями. В субмикромолярных концентрациях MitoQ и SkQ проявляют антиоксидантные свойства, и терапевтический диапазон концентраций SkQ шире такового для MitoQ [160]. В целом SkQ представляется более перспективным соединением, чем MitoQ, и, по нашему мнению, ему следует отдавать предпочтение при выборе зондов для изучения окислительного стресса и АФК-зависимой передачи сигнала. С другой стороны, любые выводы об источнике происхождения АФК, сделанные на основе действия этих оксидантов, будут, в лучшем случае, спорными.

Эфиры метаболитов. Так как многие иммунометаболиты не способны проникать через плазматическую мембрану, в исследованиях метаболизма иммунной системы обычно используются их алкилированные производные [70, 163]. Однако не следует забывать, что эти производные являются самостоятельными соединениями с уникальными химическими свойствами, а не просто предшественниками исследуемых метаболитов. Например, диметилитаконат и диметилфумарат гораздо легче формируют аддукты Михаэля с белками, чем итаконат и фумарат соответственно [58]. С другой стороны, диметилитаконат не конвертируется в итаконат при попадании в клетку, так что его использование теряют смысл [164]. Было предложено использовать 4-октилитаконат [58], но это соединение оказывает совершенно другое действие на индуцируемый частицами иммунный ответ макрофагов костного мозга, чем итаконат. Авторы отметили существенную разницу между действием эндогенного итаконата и экзогенного 4-октил-эфира [163]. Добавление диметилсукцината к BMDM не вызывало увеличения количества сукцината

в этих клетках [70]. Отметим, что использование эфиров в случае макрофагов может быть не нужным, т.к. концентрация итаконата в этих клетках может быть повышена до миллимолярных значений путем их длительной инкубации с немодифицированным соединением [51]. Кроме того, благодаря фагоцитарным свойствам макрофагов возможна эффективная доставка в клетку таких канонических непроникающих молекул, как кофермент А и карбоксиатрактилозид [84]. Очевидно, работа с Т-клетками и другими иммунными клетками может потребовать использования иных стратегий. В целом следовало бы следить за изменениями в уровнях требуемых метаболитов при использовании их производных и контролировать эффекты отщепляемых групп (которые конвертируются в метанол или этанол в случае метил- и этил- производных метаболитов соответственно). Полезной стратегией являлось бы использование негидролизуемых аналогов в качестве контроля, как это делается для различия энзиматических и не энзиматических эффектов АТР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принципиальная разница между АФК-зависимой передачей сигнала и окислительным стрессом является большей частью количественной: «умеренная» продукция АФК участвует в регуляции сигнальных путей, в то время как избыточная генерация АФК переполняет емкости систем антиоксидантной защиты и повреждает клетки. На некотором промежуточном уровне АФК могут инициировать механизмы, приводящие к самодеструкции клетки в результате апоптоза.

Крутая зависимость продукции АФК от редокс-статуса переносчиков в ЭТЦ указывает на ее прямую связь с метаболическим состоянием клеток. Это соображение побудило нас вклю-

чить обсуждение биоэнергетических аспектов метаболизма иммунной системы в предлагаемый обзор об АФК-зависимой передаче сигнала. Представляется, что наиболее безопасным способом АФК-зависимой передачи сигнала, предотвращающим развитие окислительного стресса, является фоновая генерация АФК. При стимуляции она усиливается за счет биогенеза митохондрий, а не за счет быстрого метаболического переключения. Соответственно, биоэнергетические процессы в клетке поддерживаются на том же уровне или активируются для осуществления энергозатратных функций, например таких, как пролиферация. Тем не менее, когда макрофаги (клетки-«часовые») обнаруживают патоген-«нарушитель», производство цитотоксических молекул (NO и H_2O_2) становится более важным, чем обеспечение энергетической эффективности клеток, что приводит к их повреждению и подавлению биоэнергетики.

В данном обзоре мы постарали осветить некоторые спорные механизмы (например, ОЭТ) не столько с целью критики, сколько для того, чтобы привлечь интерес читателей к этим вопросам. Рассмотренная область исследований, на перекрестке метаболизма и сигналов АФК, полна загадок и ошеломительных парадоксов. Она представляет собой поле непаханое для исследователей, готовых посвятить себя раскрытию деталей невероятно запутанных и чрезвычайно важных механизмов иммунитета.

Финансирование. Эта работа была частично поддержана National Institute of Health (P01AG014930/AG/NIA NIH HSS).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания исследований, проводимых авторами с участием людей или животных моделей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kushnareva, Y., Murphy, A. N., and Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)^+ oxidation-reduction state, *Biochem. J.*, **368**, 545-553, doi: 10.1042/BJ20021121.
2. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., and Starkov, A. A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 200-214, doi: 10.1007/s10541-005-0102-7.
3. Scialo, F., Fernandez-Ayala, D. J., and Sanz, A. (2017) Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease, *Front. Physiol.*, **8**, 428, doi: 10.3389/fphys.2017.00428.
4. Brand, M. D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Exp. Gerontol.*, **45**, 466-472, doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003.
5. Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S. Y., et al. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature*, **515**, 431-435, doi: 10.1038/nature13909.
6. Niatsetsckaya, Z. V., Sosunov, S. A., Matsiukevich, D., Utkina-Sosunova, I. V., Ratner, V. I., Starkov, A. A., and Ten, V. S. (2012) The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice, *J. Neurosci.*, **32**, 3235-3244, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6303-11.2012.

7. Sahni, P. V., Zhang, J., Sosunov, S., Galkin, A., Niatsetskaya, Z., Starkov, A., Brookes, P. S., and Ten, V. S. (2018) Krebs cycle metabolites and preferential succinate oxidation following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice, *Pediatr. Res.*, **83**, 491-497, doi: 10.1038/pr.2017.277.
8. Boveris, A., and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen, *Biochem. J.*, **134**, 707-716, doi: 10.1042/bj1340707.
9. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, **128**, 617-630, doi: 10.1042/bj1280617.
10. Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.*, **94**, 909-950, doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
11. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Murphy, A. N., and Starkov, A. A. (2015) Mitochondrial ROS metabolism: 10 years later, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 517-531, doi: 10.1134/S0006297915050028.
12. Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., and Beal, M. F. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species, *J. Neurosci.*, **24**, 7779-7788, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004.
13. Kareyeva, A. V., Grivennikova, V. G., Cecchini, G., and Vinogradov, A. D. (2011) Molecular identification of the enzyme responsible for the mitochondrial NADH-supported ammonium-dependent hydrogen peroxide production, *FEBS Lett.*, **585**, 385-389, doi: 10.1016/j.febslet.2010.12.019.
14. Buck, M. D., O'Sullivan, D., and Pearce, E. L. (2015) T cell metabolism drives immunity, *J. Exp. Med.*, **212**, 1345-1360, doi: 10.1084/jem.20151159.
15. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L., and Sparwasser, T. (2016) Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation, *Semin. Immunol.*, **28**, 514-524, doi: 10.1016/j.smim.2016.10.009.
16. Diskin, C., and Palsson-McDermott, E. M. (2018) Metabolic modulation in macrophage effector function, *Front. Immunol.*, **9**, 270, doi: 10.3389/fimmu.2018.00270.
17. O'Neill, L. A., Kishton, R. J., and Rathmell, J. (2016) A guide to immunometabolism for immunologists, *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 553-565, doi: 10.1038/nri.2016.70.
18. Ramalho, R., Rao, M., Zhang, C., Agrati, C., Ippolito, G., Wang, F. S., Zumla, A., and Maeurer, M. (2020) Immunometabolism: new insights and lessons from antigen-directed cellular immune responses, *Semin. Immunopathol.*, **42**, 279-313, doi: 10.1007/s00281-020-00798-w.
19. Escoll, P., and Buchrieser, C. (2018) Metabolic reprogramming of host cells upon bacterial infection: why shift to a Warburg-like metabolism? *FEBS J.*, **285**, 2146-2160, doi: 10.1111/febs.14446.
20. Wang, T., Marquardt, C., and Foker, J. (1976) Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation, *Nature*, **261**, 702-705, doi: 10.1038/261702a0.
21. Bennett, W. E., and Cohn, Z. A. (1966) The isolation and selected properties of blood monocytes, *J. Exp. Med.*, **123**, 145-160, doi: 10.1084/jem.123.1.145.
22. Gudmundsdottir, H., Wells, A. D., and Turka, L. A. (1999) Dynamics and requirements of T cell clonal expansion *in vivo* at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity, *J. Immunol.*, **162**, 5212-5223.
23. Delmastro-Greenwood, M. M., and Piganelli, J. D. (2013) Changing the energy of an immune response, *Am. J. Clin. Exp. Immunol.*, **2**, 30-54.
24. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, **324**, 1029-1033, doi: 10.1126/science.1160809.
25. Hume, D. A., Radik, J. L., Ferber, E., and Weidemann, M. J. (1978) Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation, *Biochem. J.*, **174**, 703-709, doi: 10.1042/bj1740703.
26. Wang, A., Luan, H. H., and Medzhitov, R. (2019) An evolutionary perspective on immunometabolism, *Science*, **363**, doi: 10.1126/science.aar3932.
27. Chang, C. H., Curtis, J. D., Maggi, L. B., Jr., Faubert, B., Villarino, A. V., et al. (2013) Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis, *Cell*, **153**, 1239-1251, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.016.
28. Peng, M., Yin, N., Chhangawala, S., Xu, K., Leslie, C. S., and Li, M. O. (2016) Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism, *Science*, **354**, 481-484, doi: 10.1126/science.aaf6284.
29. Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., et al. (2019) Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation, *Nature*, **574**, 575-580, doi: 10.1038/s41586-019-1678-1.
30. Phan, A. T., Goldrath, A. W., and Glass, C. K. (2017) Metabolic and epigenetic coordination of T cell and macrophage immunity, *Immunity*, **46**, 714-729, doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.016.
31. Millet, P., Vachharajani, V., McPhail, L., Yoza, B., and McCall, C. E. (2016) GAPDH binding to TNF-alpha mRNA contributes to posttranscriptional repression in monocytes: a novel mechanism of communication between inflammation and metabolism, *J. Immunol.*, **196**, 2541-2551, doi: 10.4049/jimmunol.1501345.
32. Colell, A., Green, D. R., and Ricci, J. E. (2009) Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis, *Cell Death Differ.*, **16**, 1573-1581, doi: 10.1038/cdd.2009.137.
33. Nagy, E., and Rigby, W. F. (1995) Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD⁺-binding region (Rossmann fold), *J. Biol. Chem.*, **270**, 2755-2763, doi: 10.1074/jbc.270.6.2755.
34. Rodriguez-Pascual, F., Redondo-Horcajo, M., Magan-Marchal, N., Lagares, D., Martinez-Ruiz, A., Kleinert, H., and Lamas, S. (2008) Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 7139-7155, doi: 10.1128/MCB.01145-08.
35. Liberti, M. V., Dai, Z., Wardell, S. E., Baccile, J. A., Liu, X., et al. (2017) A predictive model for selective targeting of the Warburg effect through GAPDH inhibition with a natural product, *Cell Metab.*, **26**, 648-659 e648, doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.017.
36. Pathria, G., Scott, D. A., Feng, Y., Sang Lee, J., Fujita, Y., et al. (2018) Targeting the Warburg effect via LDHA inhibition engages ATF4 signaling for cancer cell survival, *EMBO J.*, **37**, doi: 10.15252/embj.201899735.
37. Yang, X., Xia, R., Yue, C., Zhai, W., Du, W., et al. (2018) ATF4 regulates CD4⁺ T cell immune responses through metabolic reprogramming, *Cell Rep.*, **23**, 1754-1766, doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.032.
38. Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., et al. (2010) Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes, *J. Immunol.*, **184**, 1200-1209, doi: 10.4049/jimmunol.0902584.
39. Haas, R., Cucchi, D., Smith, J., Pucino, V., Macdougall, C. E., and Mauro, C. (2016) Intermediates of metabolism: from bystanders to signalling molecules, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 460-471, doi: 10.1016/j.tibs.2016.02.003.
40. Haas, R., Smith, J., Rocher-Ros, V., Nadkarni, S., Montero-Melendez, T., et al. (2015) Lactate regulates

- metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions, *PLoS Biol.*, **13**, e1002202, doi: 10.1371/journal.pbio.1002202.
41. Metallo, C. M., and Vander Heiden, M. G. (2010) Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling, *Genes Dev.*, **24**, 2717-2722, doi: 10.1101/gad.2010510.
 42. Weinberg, S. E., Sena, L. A., and Chandel, N. S. (2015) Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity, *Immunity*, **42**, 406-417, doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.
 43. Palmieri, E. M., Spera, I., Menga, A., Infantino, V., Porcelli, V., et al. (2015) Acetylation of human mitochondrial citrate carrier modulates mitochondrial citrate/malate exchange activity to sustain NADPH production during macrophage activation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 729-738, doi: 10.1016/j.bbabi.2015.04.009.
 44. Williams, N. C., and O'Neill, L. A. J. (2018) A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation, *Front. Immunol.*, **9**, 141, doi: 10.3389/fimmu.2018.00141.
 45. Loftus, R. M., and Finlay, D. K. (2016) Immunometabolism: cellular metabolism turns immune regulator, *J. Biol. Chem.*, **291**, 1-10, doi: 10.1074/jbc.R115.693903.
 46. Chinopoulos, C. (2020) Acute sources of mitochondrial NAD⁺ during respiratory chain dysfunction, *Exp. Neurol.*, **327**, 113218, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113218.
 47. Hillgartner, F. B., Salati, L. M., and Goodridge, A. G. (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis, *Physiol. Rev.*, **75**, 47-76, doi: 10.1152/physrev.1995.75.1.47.
 48. Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., et al. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α , *Nature*, **496**, 238-242, doi: 10.1038/nature11986.
 49. Gill, T., and Levine, A. D. (2013) Mitochondria-derived hydrogen peroxide selectively enhances T cell receptor-initiated signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **288**, 26246-26255, doi: 10.1074/jbc.M113.476895.
 50. Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., et al. (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase, *Cancer Cell*, **7**, 77-85, doi: 10.1016/j.ccr.2004.11.022.
 51. Cordes, T., Wallace, M., Michelucci, A., Divakaruni, A. S., Sapcariu, S. C., et al. (2016) Immunoresponsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels, *J. Biol. Chem.*, **291**, 14274-14284, doi: 10.1074/jbc.M115.685792.
 52. Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E. E., et al. (2016) Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation, *Cell Metab.*, **24**, 158-166, doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.004.
 53. O'Neill, L. A. J., and Artyomov, M. N. (2019) Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function, *Nat. Rev. Immunol.*, **19**, 273-281, doi: 10.1038/s41577-019-0128-5.
 54. Michelucci, A., Cordes, T., Ghelfi, J., Pailot, A., Reiling, N., et al. (2013) Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7820-7825, doi: 10.1073/pnas.1218599110.
 55. Dennis, E. A., Deems, R. A., Harkewicz, R., Quehenberger, O., Brown, H. A., et al. (2010) A mouse macrophage lipidome, *J. Biol. Chem.*, **285**, 39976-39985, doi: 10.1074/jbc.M110.182915.
 56. Salkowski, C. A., Detore, G., McNally, R., van Rooijen, N., and Vogel, S. N. (1997) Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide *in vivo*: the roles of macrophages, endogenous IFN- γ , and TNF receptor-1-mediated signaling, *J. Immunol.*, **158**, 905-912.
 57. Strelko, C. L., Lu, W., Dufort, F. J., Seyfried, T. N., Chiles, T. C., Rabinowitz, J. D., and Roberts, M. F. (2011) Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 16386-16389, doi: 10.1021/ja2070889.
 58. Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., et al. (2018) Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1, *Nature*, **556**, 113-117, doi: 10.1038/nature25986.
 59. Newton, R., Priyadharshini, B., and Turka, L. A. (2016) Immunometabolism of regulatory T cells, *Nat. Immunol.*, **17**, 618-625, doi: 10.1038/ni.3466.
 60. Lindsten, T., June, C. H., and Thompson, C. B. (1988) Multiple mechanisms regulate c-myc gene expression during normal T cell activation, *EMBO J.*, **7**, 2787-2794.
 61. Weichhart, T., Hengstschlager, M., and Linke, M. (2015) Regulation of innate immune cell function by mTOR, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 599-614, doi: 10.1038/nri3901.
 62. Saravia, J., Raynor, J. L., Chapman, N. M., Lim, S. A., and Chi, H. (2020) Signaling networks in immunometabolism, *Cell Res.*, **30**, 328-342, doi: 10.1038/s41422-020-0301-1.
 63. Muller, M. R., and Rao, A. (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age, *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 645-656, doi: 10.1038/nri2818.
 64. Seo, H., Chen, J., Gonzalez-Avalos, E., Samaniego-Castruita, D., Das, A., et al. (2019) TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 12410-12415, doi: 10.1073/pnas.1905675116.
 65. Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., et al. (2011) The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation, *Immunity*, **35**, 871-882, doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.021.
 66. Afonina, I. S., Zhong, Z., Karin, M., and Beyaert, R. (2017) Limiting inflammation—the negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome, *Nat. Immunol.*, **18**, 861-869, doi: 10.1038/ni.3772.
 67. Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapour, S., et al. (2016) NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria, *Cell*, **164**, 896-910, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.057.
 68. Jones, R. G., and Pearce, E. J. (2017) MenTORing immunity: mTOR signaling in the development and function of tissue-resident immune cells, *Immunity*, **46**, 730-742, doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.028.
 69. Codo, A. C., Davanzo, G. G., Monteiro, L. B., de Souza, G. F., Muraro, S. P., et al. (2020) Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis, *Cell Metab.*, **32**, 437-446 e435, doi: 10.1016/j.cmet.2020.07.007.
 70. Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., et al. (2016) Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages, *Cell*, **167**, 457-470 e413, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.064.
 71. Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N. A., van der Velden, S., Neele, A. E., et al. (2016) Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages, *Cell Rep.*, **17**, 684-696, doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.008.

72. Stuehr, D. J., and Nathan, C. F. (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J. Exp. Med.*, **169**, 1543-1555, doi: 10.1084/jem.169.5.1543.
73. Brown, G. C., and Borutaite, V. (1999) Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria, *Biochem. Soc. Symp.*, **66**, 17-25, doi: 10.1042/bss0660017.
74. Clementi, E., Brown, G. C., Feelisch, M., and Moncada, S. (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7631-7636, doi: 10.1073/pnas.95.13.7631.
75. Palmieri, E. M., Gonzalez-Cotto, M., Baseler, W. A., Davies, L. C., Ghesquiere, B., et al. (2020) Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase, *Nat. Commun.*, **11**, 698, doi: 10.1038/s41467-020-14433-7.
76. Mookerjee, S. A., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G., and Brand, M. D. (2017) Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements, *J. Biol. Chem.*, **292**, 7189-7207, doi: 10.1074/jbc.M116.774471.
77. Nicholls, D. G., Ferguson, S. J. (2001) *Bioenergetics 3*, Academic Press, San-Diego.
78. Lehninger, A. L. (1976) *Biochemistry, 2nd edition*, Worth Publishers Inc., New York, N.Y.
79. Divakaruni, A. S., Wallace, M., Buren, C., Martyniuk, K., Andreyev, A. Y., et al. (2017) Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death, *J. Cell Biol.*, **216**, 1091-1105, doi: 10.1083/jcb.201612067.
80. Wang, A., Huen, S. C., Luan, H. H., Yu, S., Zhang, C., Gallezot, J. D., Booth, C. J., and Medzhitov, R. (2016) Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation, *Cell*, **166**, 1512-1525.e1512, doi: 10.1016/j.cell.2016.07.026.
81. Wang, A., Pope, S. D., Weinstein, J. S., Yu, S., Zhang, C., Booth, C. J., and Medzhitov, R. (2019) Specific sequences of infectious challenge lead to secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis-like disease in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2200-2209, doi: 10.1073/pnas.1820704116.
82. Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J. I., Zhang, L., Smith, K. L., et al. (2006) Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation, *Cell Metab.*, **4**, 13-24, doi: 10.1016/j.cmet.2006.05.011.
83. Huang, S. C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., et al. (2014) Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages, *Nat. Immunol.*, **15**, 846-855, doi: 10.1038/ni.2956.
84. Divakaruni, A. S., Hsieh, W. Y., Minarrieta, L., Duong, T. N., Kim, K. K. O., et al. (2018) Etomoxir inhibits macrophage polarization by disrupting CoA homeostasis, *Cell Metab.*, **28**, 490-503.e497, doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.001.
85. Tan, Z., Xie, N., Cui, H., Moellering, D. R., Abraham, E., Thannickal, V. J., and Liu, G. (2015) Pyruvate dehydrogenase kinase 1 participates in macrophage polarization via regulating glucose metabolism, *J. Immunol.*, **194**, 6082-6089, doi: 10.4049/jimmunol.1402469.
86. Faris, R., Fan, Y. Y., De Angulo, A., Chapkin, R. S., deGraffenried, L. A., and Jolly, C. A. (2014) Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential for murine CD4⁺ T cell metabolic activation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 1475-1482, doi: 10.1016/j.bbali.2014.07.009.
87. Loschen, G., Flohe, L., and Chance, B. (1971) Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria, *FEBS Lett.*, **18**, 261-264, doi: 10.1016/0014-5793(71)80459-3.
88. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01159-9.
89. Zhong, Z., Liang, S., Sanchez-Lopez, E., He, F., Shalapour, S., et al. (2018) New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation, *Nature*, **560**, 198-203, doi: 10.1038/s41586-018-0372-z.
90. Jazayeri, M., Andreyev, A., Will, Y., Ward, M., Anderson, C. M., and Clevenger, W. (2003) Inducible expression of a dominant negative DNA polymerase- γ depletes mitochondrial DNA and produces a rho0 phenotype, *J. Biol. Chem.*, **278**, 9823-9830, doi: 10.1074/jbc.m211730200.
91. Martinez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., et al. (2016) TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions, *Mol. Cell*, **61**, 199-209, doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.002.
92. Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Moraes, C. T., Murphy, M. P., Budinger, G. R., and Chandel, N. S. (2007) The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production, *J. Cell Biol.*, **177**, 1029-1036, doi: 10.1083/jcb.200609074.
93. Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., and Pae, H. O. (2013) Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases, *Methods Enzymol.*, **528**, 27-48, doi: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1.
94. Dard, L., Blanchard, W., Hubert, C., Lacombe, D., and Rossignol, R. (2020) Mitochondrial functions and rare diseases, *Mol. Aspects Med.*, **71**, 100842, doi: 10.1016/j.mam.2019.100842.
95. Sena, L. A., and Chandel, N. S. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species, *Mol. Cell*, **48**, 158-167, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
96. Franchina, D. G., Dostert, C., and Brenner, D. (2018) Reactive oxygen species: involvement in T cell signaling and metabolism, *Trends Immunol.*, **39**, 489-502, doi: 10.1016/j.it.2018.01.005.
97. Flohe, L., Brigelius-Flohe, R., Saliou, C., Traber, M. G., and Packer, L. (1997) Redox regulation of NF- κ B activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 1115-1126, doi: 10.1016/s0891-5849(96)00501-1.
98. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S. C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2**, doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
99. Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., and Pae, H. O. (2011) Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? *J. Signal Transduct.*, **2011**, 792639, doi: 10.1155/2011/792639.
100. Chandel, N. S., Vander Heiden, M. G., Thompson, C. B., and Schumacker, P. T. (2000) Redox regulation of p53 during hypoxia, *Oncogene*, **19**, 3840-3848, doi: 10.1038/sj.onc.1203727.
101. Liu, B., Chen, Y., and St Clair, D. K. (2008) ROS and p53: a versatile partnership, *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 1529-1535, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.
102. Nathan, C., and Cunningham-Bussel, A. (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species, *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 349-361, doi: 10.1038/nri3423.
103. Zhang, H., Wang, L., and Chu, Y. (2019) Reactive oxygen species: the signal regulator of B cell, *Free Radic. Biol.*

- Med.*, **142**, 16-22, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.004.
104. Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., et al. (2013) Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling, *Immunity*, **38**, 225-236, doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.020.
 105. Rashida Gnanaprakasam, J. N., Wu, R., and Wang, R. (2018) Metabolic reprogramming in modulating T cell reactive oxygen species generation and antioxidant capacity, *Front. Immunol.*, **9**, 1075, doi: 10.3389/fimmu.2018.01075.
 106. Belikov, A. V., Schraven, B., and Simeoni, L. (2015) T cells and reactive oxygen species, *J. Biomed. Sci.*, **22**, 85, doi: 10.1186/s12929-015-0194-3.
 107. Previte, D. M., O'Connor, E. C., Novak, E. A., Martins, C. P., Mollen, K. P., and Piganelli, J. D. (2017) Reactive oxygen species are required for driving efficient and sustained aerobic glycolysis during CD4⁺ T cell activation, *PLoS One*, **12**, e0175549, doi: 10.1371/journal.pone.0175549.
 108. Reth, M. (2002) Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation, *Nat. Immunol.*, **3**, 1129-1134, doi: 10.1038/ni1202-1129.
 109. Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S. G., Oberley, L., and Williams, M. S. (2002) Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression, *J. Exp. Med.*, **195**, 59-70, doi: 10.1084/jem.20010659.
 110. Kaminski, M. M., Sauer, S. W., Klemke, C. D., Suss, D., Okun, J. G., Krammer, P. H., and Gulow, K. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression, *J. Immunol.*, **184**, 4827-4841, doi: 10.4049/jimmunol.0901662.
 111. Gong, T., Liu, L., Jiang, W., and Zhou, R. (2020) DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 95-112, doi: 10.1038/s41577-019-0215-7.
 112. Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response, *Nature*, **442**, 39-44, doi: 10.1038/nature04946.
 113. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation, *Nature*, **469**, 221-225, doi: 10.1038/nature09663.
 114. Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., et al. (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis, *Immunity*, **36**, 401-414, doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.009.
 115. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., et al. M. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome, *Nat. Immunol.*, **12**, 222-230, doi: 10.1038/ni.1980.
 116. Banoth, B., and Cassel, S. L. (2018) Mitochondria in innate immune signaling, *Transl. Res.*, **202**, 52-68, doi: 10.1016/j.trsl.2018.07.014.
 117. West, A. P., Houry-Hanold, W., Staron, M., Tal, M. C., Pineda, C. M., et al. (2015) Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response, *Nature*, **520**, 553-557, doi: 10.1038/nature14156.
 118. White, M. J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R. M., Cambier, J. C., et al. (2014) Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production, *Cell*, **159**, 1549-1562, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.036.
 119. Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C. C., Li, T., West, A. P., et al. (2014) Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA, *Cell*, **159**, 1563-1577, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.037.
 120. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, *Cell*, **86**, 147-157, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80085-9.
 121. Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, **275**, 1132-1136, doi: 10.1126/science.275.5303.1132.
 122. Kushnareva, Y., and Newmeyer, D. D. (2010) Bioenergetics and cell death, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1201**, 50-57, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05633.x.
 123. Vince, J. E., De Nardo, D., Gao, W., Vince, A. J., Hall, C., et al. (2018) The mitochondrial apoptotic effectors BAX/BAK activate caspase-3 and -7 to trigger NLRP3 inflammasome and caspase-8 driven IL-1beta activation, *Cell Rep.*, **25**, 2339-2353.e2334, doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.103.
 124. Zorov, D. B. (1996) Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 10-15, doi: 10.1016/0005-2728(96)00042-4.
 125. Patrushev, M., Kasymov, V., Patrusheva, V., Ushakova, T., Gogvadze, V., and Gaziev, A. (2004) Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 3100-3103, doi: 10.1007/s00018-004-4424-1.
 126. Yu, C. H., Davidson, S., Harapas, C. R., Hilton, J. B., Mlodzianoski, M. J., et al. (2020) TDP-43 triggers mitochondrial DNA release via mPTP to activate cGAS/STING in ALS, *Cell*, **183**, 636-649 e618, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.020.
 127. Guo, W., Liu, W., Chen, Z., Gu, Y., Peng, S., et al. (2017) Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation via ANTI1-dependent mitochondrial homeostasis, *Nat. Commun.*, **8**, 2168, doi: 10.1038/s41467-017-02351-0.
 128. Kushnareva, Y. E., and Sokolove, P. M. (2000) Prooxidants open both the mitochondrial permeability transition pore and a low-conductance channel in the inner mitochondrial membrane, *Arch. Biochem. Biophys.*, **376**, 377-388, doi: 10.1006/abbi.2000.1730.
 129. Ichas, F., Jouaville, L. S., and Mazat, J. P. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals, *Cell*, **89**, 1145-1153, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80301-3.
 130. Xu, Y., Shen, J., and Ran, Z. (2020) Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases, *Autophagy*, **16**, 3-17, doi: 10.1080/1548627.2019.1603547.
 131. Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., and Schumacker, P. T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11715-11720, doi: 10.1073/pnas.95.20.11715.
 132. Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 343-354, doi: 10.1038/nrml366.
 133. Hirsila, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor, *J. Biol. Chem.*, **278**, 30772-30780, doi: 10.1074/jbc.M304982200.
 134. Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Schumacker, P. T., and Chandel, N. S. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 5737-5745, doi: 10.1128/MCB.02265-06.

135. Oshino, N., Jamieson, D., and Chance, B. (1975) The properties of hydrogen peroxide production under hyperoxic and hypoxic conditions of perfused rat liver, *Biochem. J.*, **146**, 53-65, doi: 10.1042/bj1460053.
136. Hoffman, D. L., Salter, J. D., and Brookes, P. S. (2007) Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H101-H108, doi: 10.1152/ajpheart.00699.2006.
137. Stepanova, A., Konrad, C., Manfredi, G., Springett, R., Ten, V., and Galkin, A. (2019) The dependence of brain mitochondria reactive oxygen species production on oxygen level is linear, except when inhibited by antimycin A, *J. Neurochem.*, **148**, 731-745, doi: 10.1111/jnc.14654.
138. Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., and Batra, S. (2015) NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies, *Cell. Mol. Immunol.*, **12**, 5-23, doi: 10.1038/cmi.2014.89.
139. Brown, D. I., and Griendling, K. K. (2009) Nox proteins in signal transduction, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1239-1253, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023.
140. Cemerski, S., Cantagrel, A., Van Meerwijk, J. P., and Romagnoli, P. (2002) Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, **277**, 19585-19593, doi: 10.1074/jbc.M111451200.
141. Belikov, A. V., Schraven, B., and Simeoni, L. (2014) TCR-triggered extracellular superoxide production is not required for T-cell activation, *Cell Commun. Signal.*, **12**, 50, doi: 10.1186/s12964-014-0050-1.
142. Martinon, F. (2010) Signaling by ROS drives inflammatory activation, *Eur. J. Immunol.*, **40**, 616-619, doi: 10.1002/eji.200940168.
143. Aldieri, E., Riganti, C., Polimeni, M., Gazzano, E., Lussiana, C., Campia, I., and Ghigo, D. (2008) Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific, *Curr. Drug Metab.*, **9**, 686-696, doi: 10.2174/138920008786049285.
144. Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J. (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica, *Science*, **320**, 674-677, doi: 10.1126/science.1156995.
145. Wong, H. S., Benoit, B., and Brand, M. D. (2019) Mitochondrial and cytosolic sources of hydrogen peroxide in resting C2C12 myoblasts, *Free Radic. Biol. Med.*, **130**, 140-150, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.448.
146. West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., et al. (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS, *Nature*, **472**, 476-480, doi: 10.1038/nature09973.
147. Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017) Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*, *Eur. J. Cell Biol.*, **96**, 254-265, doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003.
148. Dikalov, S. (2011) Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases, *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 1289-1301, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033.
149. Pinegin, B., Vorobjeva, N., Pashenkov, M., and Chernyak, B. (2018) The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 3745-3754, doi: 10.1002/jcp.26117.
150. Nicholls, D. G. (2012) Fluorescence measurement of mitochondrial membrane potential changes in cultured cells, *Methods Mol. Biol.*, **810**, 119-133, doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_8.
151. Polster, B. M., Nicholls, D. G., Ge, S. X., and Roelofs, B. A. (2014) Use of potentiometric fluorophores in the measurement of mitochondrial reactive oxygen species, *Methods Enzymol.*, **547**, 225-250, doi: 10.1016/B978-0-12-801415-8.00013-8.
152. Roelofs, B. A., Ge, S. X., Studlack, P. E., and Polster, B. M. (2015) Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV, *Free Radic. Biol. Med.*, **86**, 250-258, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.032.
153. Zielonka, J., and Kalyanaraman, B. (2010) Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 983-1001, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028.
154. Parasassi, T., Brunelli, R., Costa, G., De Spirito, M., Krasnowska, E., Lundeberg, T., Pittaluga, E., and Ursini, F. (2010) Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine, *ScientificWorldJournal*, **10**, 1192-1202, doi: 10.1100/tsw.2010.104.
155. Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., and Berk, M. (2013) The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 4117-4129, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.016.
156. Benrahmoune, M., Therond, P., and Abedinzadeh, Z. (2000) The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine, *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 775-782, doi: 10.1016/s0891-5849(00)00380-4.
157. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide, *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 322-328, doi: 10.1016/s0891-5849(99)00051-9.
158. Ezerina, D., Takano, Y., Hanaoka, K., Urano, Y., and Dick, T. P. (2018) N-Acetyl cysteine functions as a fast-acting antioxidant by triggering intracellular H₂S and sulfane sulfur production, *Cell Chem. Biol.*, **25**, 447-459 e444, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.01.011.
159. Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (2001) Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties, *J. Biol. Chem.*, **276**, 4588-4596, doi: 10.1074/jbc.M009093200.
160. Skulachev, V. P. (2007) A biochemical approach to the problem of aging: "megaproject" on membrane-penetrating ions. The first results and prospects, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1385-1396, doi: 10.1134/s0006297907120139.
161. Skulachev, V. P. (2013) Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **441**, 275-279, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.063.
162. Antonenko, Y. N., Roginsky, V. A., Pashkovskaya, A. A., Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A., Zasp, A. A., Chernyak, B. V., and Skulachev, V. P. (2008) Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments, *J. Membr. Biol.*, **222**, 141-149, doi: 10.1007/s00232-008-9108-6.
163. Sun, K. A., Li, Y., Meliton, A. Y., Woods, P. S., Kimmig, L. M., Cetin-Atalay, R., Hamaoka, R. B., and Mutlu, G. M. (2020) Endogenous itaconate is not required for particulate matter-induced NRF2 expression or inflammatory response, *Elife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.54877.
164. ElAzzouny, M., Tom, C. T., Evans, C. R., Olson, L. L., Tanga, M. J., Gallagher, K. A., Martin, B. R., and Burant, C. F. (2017) Dimethyl itaconate is not metabolized into itaconate intracellularly, *J. Biol. Chem.*, **292**, 4766-4769, doi: 10.1074/jbc.C117.775270.

METABOLIC ROS SIGNALING: TO IMMUNITY AND BEYOND**Review****A. Y. Andreyev^{1*}, Y. E. Kushnareva², N. N. Starkova³, and A. A. Starkov⁴**¹ *The Scripps Research Institute, 10550 La Jolla, CA 92037, USA; E-mail: alex_andreyev@mitoexperts.com*² *La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 La Jolla, CA 92037, USA*³ *State University of New York, Maritime College, New York, NY 10465, USA*⁴ *Brain and Mind Research Institute, Weill Medical College of Cornell University,
Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10065, USA*

Received September 11, 2020

Revised November 13, 2020

Accepted November 17, 2020

Metabolism is a critical determinant of immune cell functionality. Immunometabolism, by definition, is a multidisciplinary area of immunology research that integrates the knowledge of energy transduction mechanisms and biochemical pathways. An important concept in the field is metabolic switch, a transition of immune cells upon activation to preferential utilization of select catabolic pathways for their energy needs. Mitochondria are not inert in this process and contribute to the metabolic adaptation by different mechanisms which include increasing ATP production to match dynamic bioenergetic demands and serving as a signaling platform. The latter involves generation of reactive oxygen species (ROS), one of the most intensively studied mitochondrial processes. While the role of mitochondrial ROS in the context of oxidative stress is well established, ROS signaling in immunity is an emerging and quickly changing field. In this review, we discuss ROS signaling and immunometabolism concepts from standpoint of bioenergetics. We also provide a critical insight into the methodology for ROS assessment, outlining current challenges in the field. Finally, based on our analysis of the literature data, we hypothesize that regulatory ROS production, as opposed to oxidative stress, is controlled by mitochondrial biogenesis rather than metabolic switches.

Keywords: immunometabolism, reactive oxygen species, glycolytic switch, macrophages, T cells, mitochondrial biogenesis