

УДК 577.24::57.052.6

РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ И Nrf2-ОПОСРЕДОВАННОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ: ДВОЙНАЯ РОЛЬ КИНАЗЫ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ 3

Обзор

© 2021 Г.А. Шиловский^{1,2,3*}, Т.С. Путятина², Г.В. Моргунова², А.В. Селиверстов³,
В.В. Ашапкин¹, Е.В. Сорокина², А.В. Марков², В.П. Скулачев¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.07.2020

После доработки 11.01.2021

Принята к публикации 11.01.2021

В обзоре рассматриваются некоторые генетические и молекулярные пути, связывающие циркадный хронометраж с метаболизмом и образующие системы положительной и отрицательной обратной связи – регуляторные петли. Путь Nrf2 (транскрипционного фактора 2 семейства NFE) считается компонентом антивозрастной программы – хранителем периода здоровой жизни и долголетия. Nrf2 обеспечивает адаптацию к стрессу путем положительной регуляции клеточной антиоксидантной защиты и других метаболических процессов, контролируя экспрессию более 200 генов-мишеней при различных видах стресса. Система киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) представляет собой «регулирующий клапан», контролирующей небольшие колебания уровня Nrf2, в отличие от Kearn1, предотвращающего большие колебания уровня Nrf2 в отсутствии окислительного стресса и инактивирующегося при окислительном стрессе. Кроме того, GSK3 модифицирует коровые белки циркадных ритмов (Bmal1, Clock, Per, Cry, Rev-erb α). При этом модификация GSK3 приводит к инактивации и деградации белков, положительно регулирующих биоритмы (Bmal1, Clock), и наоборот, ведет к активации и ядерной транслокации негативно регулирующих биоритмы белков (Per, Rev-erb α). Исключением является Cry, опосредующий, видимо, тонкую настройку биологических часов. Функция GSK3 представляется одним из узловых пунктов перекрестной регуляции циркадных ритмов и антиоксидантной защиты. Обсуждается перекрестное взаимодействие между мощнейшей антиоксидантной защитой клетки (системой Nrf2) и системой биоритмов у млекопитающих (включая влияние сверхэкспрессии/нокаута GSK3 на биоритмы и влияние нокаута/сверхэкспрессии генов циркадных биоритмов на работу системы Nrf2). Понимание механизмов взаимодействия регуляторных каскадов, связывающих программы поддержания гомеостаза и ответа клетки на окислительный стресс, способствует выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе старения и долголетия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: GSK3, Nrf2, окислительный стресс, старение, биологические ритмы, программы старения и антистарения, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0320972521040059

ВВЕДЕНИЕ

Долголетие как таковое не является первоочередной эволюционной «задачей» для живых

организмов. С эволюционной точки зрения первоочередными являются проблемы адаптации к окружающей среде, связанные с нуждами выживания, обеспечения пищей и размноже-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; ТФ – транскрипционный фактор; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); СК – казеинкиназа (casein kinase); Cry – белок криптохром; Cul3 – куллин 3 (cullin); D3T – H3-1,2-дителил-3-тион; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Kearn1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); LPS – липополисахарид; MEF – эмбриональные фибробласты мыши; Nrf1 – транскрипционный фактор 1 семейства NFE (NFE2-related factor 1); Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NFE2-related factor 2); NQO1 – NAD(P)H:хинооксидоредуктаза; Per – белок Period; Rev-erb α – белок Reverse erythroblastosis virus α ; RORE – RAR-related orphan receptor response element; SCN – супрахиазматическое ядро гипоталамуса; β -TrCP – белок, содержащий β -трансдуциновые повторы (β -transducin repeat containing protein), WT – дикий тип.

* Адресат для корреспонденции.

ния. Регуляция поддержания гомеостаза и репарации представляет собой сложную сеть взаимозависимых реакций, а эффективность этих процессов ухудшается с возрастом [1–9]. В ряде случаев старение может иметь адаптивное значение [4, 5].

Важной задачей биogerонтологии является изучение путей пересечения программ старения/антистарения с программами адаптации и поддержания гомеостаза, в том числе через систему регуляции биоритмов. Взаимодействие программ антистарения с противоположными им по действию программами старения определяет форму кривых выживания и их изменение в ходе биологической, а у человека — еще и культурной — эволюции. Радикальные изменения динамики смертности человека произошли в последние 150 лет в связи с научно-технической революцией. Они привели к резкому увеличению продолжительности жизни и приближению кривой выживания к прямоугольной форме, резко отличающей ее от кривых выживания шимпанзе, охотников-собирателей и даже жителей развитых стран Европы в XVIII–XIX вв. [1]. В то же время существуют и внутренние факторы, определяющие продолжительность жизни и ход кривых выживания. К ним относятся программы старения и антистарения, являющиеся, по современным представлениям, совокупностью сигнальных генных каскадов [1–6]. Если долгожительство поддерживается отбором (например, вследствие того, что «гены долголетия», будучи связаны с каким-либо адаптивным признаком, могут благодаря этому закрепляться в популяции), организмы могут вырабатывать специальные защитные и репарационные системы, замедляющие хронический фенотипоз. Поскольку продолжительность жизни является такой же устойчивой видовой характеристикой, как размеры тела или плодовитость, ее длительность (т.е. момент наступления гибели), а также регулирующие ее механизмы должны быть хотя бы частично запрограммированы в геноме [4, 7, 8]. Долгоживущие виды обычно обладают более мощной системой восстановления повреждений, в том числе антиоксидантной защиты. Такие системы, ответственные за репарацию и другие восстановительные процессы, будут способствовать замедлению старения и долголетию. При старении активность работы таких систем в базальных условиях (а также их способность реагировать на повреждения) обычно снижается. Соответственно, системы, снижающие/подавляющие работу систем антистарения, и/или системы, работа которых связана с развитием заболеваний (в том числе возрастных), клеточным старением или клеточной гибелью,

будут относиться к программе старения [1]. Транскрипционный фактор (ТФ) Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, транскрипционный фактор 2 семейства NFE) является, согласно одному из авторов данной статьи (В.П.С.) [1], представителем одной из наиболее явных клеточных программ антистарения (рис. 1). Nrf2 регулирует транскрипцию антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, которые в совокупности представляют собой мощную защитную систему клетки [1–6]. Однако функции Nrf2 этим не ограничиваются, он также является основным регулятором клеточного гомеостаза, который контролирует экспрессию более 1% генов человека, связанных с реакциями биотрансформации, редокс-гомеостазом, энергетическим метаболизмом, репарацией ДНК и протеостазом [2]. Активность Nrf2 оказывает огромное влияние на самые разные физиологические и патологические процессы, поэтому он подвергается строгой регуляции в основном на уровне стабильности белка. Также особо отмечалось, что такие защитные системы могут находиться под контролем регуляторов (ингибиторов, играющих роль представителей программы старения) не только напрямую, но и через регуляцию белков биоритмов (циркадных, ультрадианных и других), т.е. через «*Большие биологические часы*» (рис. 1) [1].

В этом обзоре мы проанализировали данные о молекулярных механизмах взаимодействия защитной системы Nrf2, ингибитора Nrf2 — киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3), а также коровых белков циркадных биоритмов в контексте программ старения и антистарения.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Nrf2

Транскрипционный фактор 2 как представитель программ антистарения. Nrf2 активируется окислительными стрессорами и электрофильными агентами, он обеспечивает адаптацию к стрессу путем положительной регуляции клеточной антиоксидантной защиты и других метаболических процессов, контролируя экспрессию более 200 генов-мишеней при различных видах стресса. Продукты этих генов регулируют множество защитных функций, в том числе — детоксикацию лекарств, пентозофосфатный шунт и аутофагию [3]. Кроме того, Nrf2 непосредственно ингибирует индуцированную экспрессию различных генов, участвующих в воспалении, посредством связывания с их проксимальными регуляторными областями [10]. В клетках мышечной ткани с нокаутом гена, кодирующего Nrf2 (*Nfe2l2*), повышен уровень активных форм кислорода

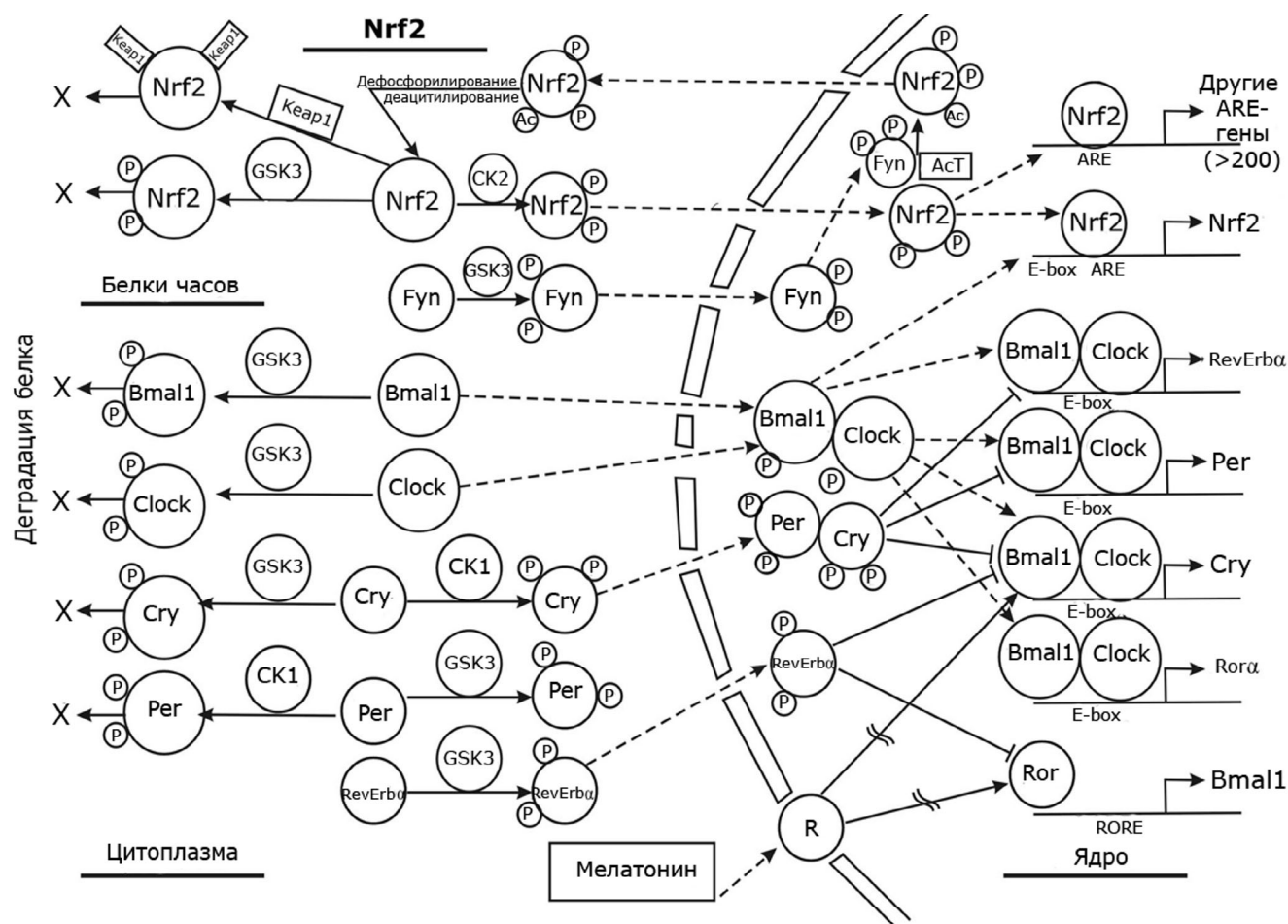


Рис. 2. Молекулярные механизмы циркадных биоритмов и осцилляций «цитоплазма-ядро» транскрипционного фактора Nrf2, управляющего экспрессией цитопротекторных ферментов. Характерной чертой регулируемых Nrf2 генов является наличие последовательности ARE в их промоторе, тогда как для большинства генов белков циркадных биоритмов – последовательности E-box (также есть и в промоторе гена *Nfe2l2*, кодирующего Nrf2). Ген *Bmal1* содержит в промоторе последовательность RORE. Пунктирными линиями со стрелкой обозначено перемещение того или иного белка (в ядро и из ядра), а сплошными линиями – прямое воздействие, включая катализ. Сплошной линией с тупым концом обозначено ингибирующее действие. Сплошной линией с разрывом отмечено опосредованное влияние (например, стимулирующее влияние мелатонина на экспрессию белков биоритмов и Nrf2). Кружочки с буквой p означают присоединение к белку фосфатной группы. Наличие двух таких кружочков после взаимодействия модифицируемого белка с той или иной киназой означает, что реакция идет по механизму двойного фосфорилирования (подробнее см. в тексте). AcT – ацетилтрансфераза; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); Bmal1 – белок brain and muscle ARNT-like 1; Clock – белок Circadian locomotor output cycles kaput; Cry – белок криптохром; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (NFE2-related factor 2); Per – белок Period; Rev-erba – белок Reverse erythroblastosis virus α; RORE – RAR-related orphan receptor response element; β-TrCP – белок, содержащий β-трансдуциновые повторы (β-transducin repeat containing protein)

экспрессии генов суточных ритмов обеспечивают белки Per1 и Per2. Они транслируются в ядро, образуя стабильные комплексы (включающие в себя также белки криптохромы Cry1 и Cry2), подавляющие транскрипцию посредством связывания с позитивными факторами Clock/Bmal1. В результате формируется чередование подъемов и спадов содержания мРНК, а затем и самих белков Per1 и Per2 с фазой, равной приблизительно 24 часа [22, 23], замыкающее

тем самым петлю отрицательной обратной связи [24, 25]. С белками-регуляторами суточных ритмов связаны многие метаболические пути – например, важный системный регулятор обмена веществ AMPK (AMP-активируемая протеинкиназа) [26], которая фосфорилирует белок Cry1, и этим способствует его деградации [27].

Транскрипционный фактор Nrf2 как осциллятор. Регуляция активации Nrf2 в ядре и цитоплазме. Сложность в понимании процессов регуля-

ции биоритмов отчасти связана с существованием у Nrf2, как и у АФК, своих собственных ритмов. Показано, что при действии активаторов Nrf2 стимуляция экспрессии ARE-зависимых генов происходит не за счет стабилизации и общего повышения уровня Nrf2, а в результате повышения частоты и уменьшения амплитуды транслокационных циклов Nrf2 между цитоплазмой и ядром клетки [28]. В предложенной Xue et al. [28] «колебательной модели» GSK3 играет регуляторную роль, обеспечивая инактивацию и расщепление Nrf2. Согласно этой модели, Keap1 и Nrf2 удерживаются вместе за счет протеин-треонинфосфатазы PGAM5 (протеин-треонинфосфатаза 5 из семейства фосфоглицератмутаза), которая связывает Keap1 и Nrf2 с внешней митохондриальной мембраной [29]. В условиях окислительного (а точнее, электрофильного) стресса Nrf2 высвобождается из комплекса с Keap1, фосфорилируется [3] и транслоцируется в ядро с помощью импортинов $\alpha 5$ и $\beta 1$ [30]. В ядре Nrf2 активирует гены-мишени, связываясь с промоторной последовательностью ARE [3, 14]. После этого Nrf2 фосфорилируется Fyn-киназой [16] и ацетируется, а затем удаляется из ядра через экспортный канал ядерной мембраны exportin-1/crm1 [28]. GSK3 β при этом является регулирующим звеном, непосредственно фосфорилирующим Nrf2, вызывая деградацию белка Nrf2 с помощью β -TrCP [3, 31, 32]. Xue et al. [28] также показали, что удержание Nrf2 в ядре клетки с помощью блокады экспортных каналов crm1, лептомицина В, приводит к снижению ARE-зависимой транскрипционной активности с циклической колебательной примерно 2 часа. В модели это объясняется ацетилизацией и инактивацией Nrf2 в ядре (рис. 2). Согласно оценкам Xue et al. [28], Nrf2 совершает 2–3 колебания до деградации в нестимулированных клетках и большее количество — в клетках, подвергнутых окислительному стрессу.

В колебательной модели Nrf2 есть альтернативный регуляторный механизм. Функциональная активность ядерного Nrf2 может регулироваться активностью деацетилаз, циркадным контролем экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего Nrf2, и различными конформациями комплекса Nrf2 с Keap1 [28]. Показано, что в отсутствии окислительного стресса взаимодействие Keap1 и Nrf2 происходит циклически с образованием сначала «открытой» конформации, в которой Nrf2 связывается с одной из двух субъединиц Keap1, и затем — «закрытой» конформации, в которой Nrf2 связывается с обеими субъединицами Keap1 [33]. Колебательная модель основана на активации Nrf2 путем высвобождения

из комплекса с Keap1, поскольку скорость этого процесса влияет на частоту колебаний и цитопротекторный транскрипционный ответ. При действии индукторов Nrf2 (оксидантов и электрофильных агентов) комплексы Nrf2/Keap1 фиксируются в закрытой конформации, из которых Nrf2 не высвобождается. В результате прекращается регенерация свободного Keap1, и вновь синтезируемые молекулы Nrf2 не разрушаются. Также модель предполагает наличие и других способов активации Nrf2, например, деацетилирование Nrf2 ядерными деацетилазами [28].

Перекрестное взаимодействие систем транскрипционного фактора Nrf2 и биоритмов. Экспрессия Nrf2 имеет циркадный ритм с периодом 23,7 часа [34]. Циркадные вариации и гендерные различия в уровнях транскриптов антиоксидантных генов могут влиять на реакцию организма в ответ на окислительный стресс в разное время суток [35]. Early et al. [36] установили, что удаление Bmal1 в макрофагах нарушает активность Nrf2, способствуя накоплению АФК и провоспалительного цитокина IL-1 β . Также они показали, что нокдаун Nrf2 уменьшает индукционный ответ на добавление липополисахарида (LPS) трех основных генов-мишеней Nrf2 — гемоксигеназы (*Hmox1*), глутатионредуктазы (*Gsr*) и NAD(P)H:хинон-оксидоредуктазы 1 (*Nqo1*). При индукции LPS уровень экспрессии этих генов в макрофагах Bmal1^{-/-} ниже, чем в макрофагах Bmal1^{+/+}. Подобно большинству генов, кодирующих коровые белки циркадных биоритмов, ген *Nfe2l2*, кодирующий Nrf2, также содержит последовательность E-box. Гетеродимер Bmal1/Clock связывается с этой последовательностью, активируя транскрипцию Nrf2, и, как следствие, его мишеней — *Hmox1*, *Gsr* и *Nqo1*. Также Early et al. [36] обнаружили, что базальный уровень АФК в перитонеальных миелоидных клетках значительно увеличивается во второй половине дня, что обратно коррелирует с суточным ритмом экспрессии Bmal1 и Nrf2.

По сравнению с Bmal1^{+/+} в макрофагах Bmal1^{-/-} увеличен как базовый, так и индуцированный LPS уровень АФК (таблица). Молекулярные часы контролируют экспрессию Nrf2 и его способность регулировать IL-1 β в миелоидных клетках.

Pekovic-Vaughan et al. [34] выявили, что уровень белка Nrf2 меняется ритмично. Ритмическая экспрессия белка Nrf2 обнаружена также в клеточных лизатах и в ядрах фибробластов Rat1 (таблица). Это доказывает клеточно-автономную устойчивую ритмическую экспрессию Nrf2. Мутация в кор-последовательности E-box в промоторе гена Nrf2 (*Nfe2l2*) полностью устра-

няет его индукцию комплексами Clock/Bmal1. В легких у мышей дикого типа мРНК Nrf2 проявляет четкую ритмическую экспрессию, которой не наблюдается у мышей Clock^{Δ19}. Обнаружено также зависимое от времени связывание Clock/Bmal1 в области E-box промотора гена Nrf2 (*Nfe2l2*). Эти результаты показывают, что ген *Nfe2l2*, кодирующий Nrf2, непосредственно регулируется компонентами ядерных часов

in vitro и *in vivo* через консервативный элемент E-box в его промоторе. Данные, приведенные в таблице, полученные на эмбриональных фибробластах, нокаутированных по *Nfe2l2* мышей, подтверждают непосредственный Nrf2-зависимый ритмический контроль нижестоящих мишеней (таблица).

У мышей дикого типа (WT) индукция Nrf2 с помощью D3T (H3-1,2-дителиол-3-тион) приво-

Взаимовлияние генетической и химической активации систем биоритмов и Nrf2

Цель	Воздействие	Объект	Эффект	Ссылка
А. РИТМЫ Nrf2 И ДРУГИХ МАРКЕРОВ РЕАКЦИИ НА СТРЕСС				
БР	БР	печень мыши	экспрессия индуцируемых Nrf2 генов выше днем, чем ночью; пик Nrf2, Nqo1 и Dbp – ранним вечером; пик Keap1, Gclc и Rev-erba – ближе к середине дня	[35]
Ритм АФК	БР	макрофаги	базальный уровень АФК увеличен на ~25% ($p \leq 0,05$, <i>t</i> -тест) во второй половине дня (по сравнению со временем перед утром) и отрицательно коррелирует с суточным ритмом экспрессии Bmal1 и Nrf2	[36]
Ритм Nrf2	БР	мышь	пик белка Nrf2 – в циркадное время 3–7 (CT3–CT7), провал происходит в CT15–CT19	[34]
Ритм Nrf2	БР	фибробласты Rat1	ритм экспрессии белка Nrf2 обнаружен в клеточных линиях ($p < 0,01$, односторонний ANOVA для оценки эффекта времени) и в ядрах ($p < 0,001$, <i>t</i> -тест)	[34]
БР	H ₂ O ₂ , D3T	MEF	H ₂ O ₂ (100 мкМ) и D3T(100 мкМ) увеличивают амплитуду (соответственно в ~2,5 и в ~5 раз, <i>t</i> -тест, $p < 0,05$), но не продолжительность периода	[37]
Б. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ СИСТЕМЫ БИОРИТМОВ И Nrf2				
Ритм Nrf2	нокаун БР	мышь	экспрессия мРНК Nrf2 в легких мышей WT (но не в Clock ^{Δ19}) имеет четкий ритм ($p < 0,05$, односторонний ANOVA); нокаун Bmal1 снижает уровень мРНК Nrf2 ($p < 0,05$)	[34]
Уровень АФК	нокаут гена БР	макрофаги	в макрофагах Bmal1 ^{-/-} выше по сравнению с Bmal1 ^{+/+} уровень АФК – как базовый (в 4 раза, $p \leq 0,01$), так и индуцированный LPS (в ~2,3 раза, $p \leq 0,05$)	[36]
Уровень Nrf2	нокаут гена БР	MEF	у синхронизированных MEF мышей Cry1 ^{-/-} /Cry2 ^{-/-} повышены уровни экспрессии Nrf2 и его генов-мишеней	[34]
БР	нокаут Nrf2	MEF	нокаут Nrf2 в MEF снижает амплитуду ритма и продолжительность периода (соответственно в ~5 раз и на ~15%, <i>t</i> -тест, $p < 0,05$)	[37]
БР	сверхэкспрессия Nrf2	гепатоциты мыши MMH-D3	сверхэкспрессия Nrf2 уменьшает амплитуду ритма (в ~2 раза) и продолжительность периода (на ~2%, <i>t</i> -тест, $p < 0,05$) по сравнению с WT	[37]
Экспрессия гена БР	нокаут Nrf2	MEF	в Nrf2 ^{-/-} MEF пик накопления белка Rev-erba был отсрочен (но не исчез) на 4 ч относительно WT; нокаун Nrf2 в MEF снижает уровень экспрессии Rev-erba на ~45–50%	[37]

Примечание: БР – биоритмы; Dbp – Albumin site D-binding protein; D3T – H3-1,2-дителиол-3-тион; Gclc – каталитическая субъединица глутамат-цистеинлигазы; LPS – липополисахарид; MEF – эмбриональные фибробласты мыши; Nqo1 – NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза; WT – дикий тип.

дит к активации E-box- и D-box-содержащих часовых генов (*Rev-ErbA*, *Rev-ErbB*, *Dbp*, *Per3*) [37]. Полная активация этих генов требует наличия сигнального пути Keap1/Nrf2, так как у мышей Nrf2^{-/-} она значительно ослаблена. Потеря Nrf2 приводит к нарушению циркадного ритма в эмбриональных фибробластах мышей Nrf2^{-/-}, это является прямым эффектом и указывает на роль Nrf2 в регуляции амплитуды ритма и продолжительности периода (таблица) [37]. Таким образом, Nrf2 регулирует экспрессию коровых белков и стабилизирует циркадные циклы часов, связывает редокс-потенциал и определение времени [37]. Нокаут гена, кодирующего Nrf2 (*Nfe2l2*), в печени мышей приводит к изменению длины циркадного периода. Эти эффекты Nrf2 реализуются, вероятно, через регуляцию экспрессии Crg2 и Rev-erba. По-видимому, Nrf2 и белки биоритмов образуют блокирующую петлю, которая интегрирует клеточные редокс-сигналы в циркадный ритм [37]. Nrf2 входит в группу CncC (семейство ТФ Cap'n'collar). В исследовании Spiers et al. [38] было показано, что конститутивная сверхэкспрессия CncC у *Drosophila* положительно влияет на функцию нейронов через модификацию синаптических механизмов, а подавление экспрессии Keap1, являющегося ингибитором CncC, улучшает синаптическую функцию и увеличивает продолжительность жизни. Результаты исследования Hansen et al. [39] свидетельствуют, что соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH/GSSG) контролирует Nrf2 исключительно в цитоплазматическом компартменте, но не регулирует связывание Nrf2 с ARE в ядре. И наоборот, так как избыточная экспрессия тиоредоксина 1 (Trx-1) не влияет на диссоциацию Nrf2 и его перемещение в ядро, предполагается, что ядерный Trx-1 ответственен за регуляцию Nrf2 не в цитоплазматических событиях (диссоциация/ядерная транслокация), а именно на уровне взаимодействия Nrf2 с ДНК [39].

КИНАЗА ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ 3

Далее мы перейдем к рассмотрению протеинкиназы GSK3 β , ее роли как ингибитора Nrf2 и других белков, механизмам ее действия и участия в регуляции клеточных функций.

GSK3 (ATP:protein phosphotransferase, EC 2.7.1.37) – внутриклеточная серин/треониновая протеинкиназа с молекулярной массой 47 кДа, синтезируемая во всех тканях организма [40, 41], представлена двумя паралогами (α и β), обычно называемыми в литературе изоформа-

ми (хотя с точки зрения биохимии более точным было бы обозначение «изоферменты»). Кроме обычной, GSK3 β 1, у GSK3 β известна удлинённая GSK3 β 2-форма с высоким уровнем экспрессии при развитии мозга [42].

Уникальное положение GSK3 β в регуляции клеточных функций связано с тем, что данный фермент влияет на активность более чем 100 белков и сам, в свою очередь, зависит от большого количества стимулов. Например, активация Akt1 фосфорилирует и ингибирует GSK3 β [43].

GSK3 влияет на большинство клеточных процессов, включая рост, дифференцировку и смерть, и модулирует ответ на гормональные, пищевые и стрессовые стимулы. Вызванная стрессом транслокация GSK3 β может приводить к взаимодействию с митохондриальными белками, включая PI3K-Akt, PGC-1 α , НК II, РКСе, компоненты дыхательной цепи и субъединицы mPTP. Митохондриальный пул GSK3 β оказывает регуляторное влияние на биогенез, энергетику, проницаемость и подвижность митохондрий, а также на апоптоз [44]. Важной функцией GSK3 β является ингибирование белка β -катенина и участие в сигнальном пути Wnt, играющем важную роль в процессах эмбриогенеза, роста и дифференцировки клеток [41], а также процессов нейрогенеза и синаптической пластичности [45]. GSK3 β регулирует клеточный цикл, ингибируя циклин D1, необходимый для вступления клетки в S-фазу [46]. Она также принимает участие в регуляции обмена глюкозы, ингибируя белки IRS и кинезины [47].

Фосфорилирование GSK3 по серину-9 (S9), вероятно, наиболее подвержено колебаниям. Эти колебания могут быть быстрыми, как при деполяризации/реполяризации нейронов, или медленными, как при изменении уровней циркулирующих гормонов, регулирующих GSK3, и циркадных ритмов в супрахиазматическом ядре (SCN) и печени [48].

GSK3 β конститутивно активируется путем аутофосфорилирования по Y216 и инактивируется путем фосфорилирования по S9. Активная GSK3 β с фосфорилированием по Y216 составляет не менее половины общей GSK3 β в культивируемых клетках [49]. В мозге мышей GSK3 β присутствует в основном в активной форме, тогда как доля неактивной (с фосфорилированием по S9) невелика [50]. Фосфорилирование в положении Y216, необходимое для активации фермента, может обеспечиваться киназами Ryk2 и Fyn либо в результате аутокаталитического процесса [51]. Фосфорилирование по S9 ингибирует активность GSK3 β , это является основным механизмом ее регуляции. Большое ко-

личество киназ фосфорилирует GSK3 β в этом положении: протеинкиназы A, B и C, киназы PrkG1, ILK, p70S6K и p90SRK; а дефосфорилирует — протеинфосфатаза 2A (PP2A) [52]. Однако в мозге основным путем регуляции GSK3 β , видимо, является ингибирование при фосфорилировании митоген-активируемой протеинкиназой p38 по S389 [53].

GSK3 как представитель программы старения.

Косвенное подтверждение роли GSK3 β в программе старения можно найти в работе Krishnankutty et al. [49], в которой изучались три фракции GSK3 β в нейронах и мозге мыши: фосфорилированная по Y216 (активная форма фермента), фосфорилированная по S9 и Y216 и нефосфорилированная (две последние формы неактивны). И хотя в гиппокампе общий уровень GSK3 β с возрастом не изменялся, доля неактивного фосфорилированного по S9 фермента при старении снижалась и была вдвое ниже у самок в возрасте 1,5 года, чем у трехнедельных особей [49].

GSK3 β и клеточное старение. Показано, что в стационарной культуре первичных нейронов коры головного мозга мыши при практически неизменном общем уровне GSK3 β заметно изменяется соотношение ее изоформ. Доля фосфорилированной по S9 (т.е. неактивной) формы GSK3 β была максимальной (более 30%) через 3 дня культивирования без пересева, а затем постепенно снижалась, достигая 15% через 12 дней культивирования. Активность GSK3 β , фосфорилированной по Y216, наоборот, постепенно увеличивалась «с возрастом» [49]. «Старые» фибробласты человека WI-38 (число удвоений клеточной популяции (УКП) в диапазоне 58–64), в отличие от клеток «среднего возраста» (диапазон УКП — 38–41) и «молодых» (диапазон УКП — 26–30), проявляют типичные для старения признаки, включая увеличенный размер, уплощенную форму и повышенный уровень активности, ассоциированной со старением β -галактозидазы. Также в ядрах «старых» клеток повышен уровень белков GSK3 α и GSK3 β .



Рис. 3. Негативные эффекты активации GSK3

Ингибитор GSK3, литий, снижает ее активность и возрастное накопление p53, связанное с сенесцентным состоянием, а также заставляет клетки переходить в обратимое состояние покоя. Эти результаты показывают, что часть клеточного пула p53, которая активируется в стареющих клетках, модулируется ассоциацией с GSK3 β в ядре, способствующей активности p53 и клеточному старению [54]. Аналогично, базальный уровень фосфорилированного (т.е. неактивного) белка GSK3 у старых (18 мес.) сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) намного ниже, чем у молодых (1–3 мес.) [55]. У старых хомячков литий не влияет на период ритма двигательной активности и уровень фосфорилированной GSK3, в отличие от его эффекта у более молодых животных [55]. Все вышеперечисленное косвенно подтверждает предложенную роль GSK3 β как *bona fide* представителя программы старения.

GSK3 β и возрастные патологии. Еще одним подтверждением участия GSK3 β в программе старения можно считать изменение ее активности при возрастных заболеваниях (рис. 3). В нейронах она избирательно фосфорилирует ассоциированный с микротрубочками тау-белок в участках, которые являются гиперфосфорилированными в мозге при болезни Альцгеймера (БА) [56]. Такой гиперфосфорилированный тау-белок имеет сниженную аффинность к микротрубочкам и накапливается в виде спиральных филаментов, являющихся главным компонентом нейрофибриллярных клубков и нитей в мозге при БА. Нейрофибриллярные клубки обнаруживаются при таких заболеваниях, как боковой амиотрофический склероз, паркинсонизм, деменция, корково-базальная дегенерация, травматическое повреждение мозга, синдром Дауна, постэнцефалитический паркинсонизм и болезнь Ниманна–Пика. В ткани мозга пациентов с БА уровень белка GSK3 β повышен на 50% [56]. Ингибирование GSK3 β уменьшает когнитивные дефициты, ассоциированные с БА и другими вышеупомянутыми заболеваниями. Активность GSK3 β увеличена в клеточной (при депривации ростовых факторов) и животной (церебральная ишемия) моделях нейродегенерации [57]. Провоспалительный эффект GSK3 β обусловлен стимуляцией продукции IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-12 и подавлением синтеза IL-10 [48] через Toll-like рецепторы моноцитов [58].

Механизмы действия GSK3. Предварительное фосфорилирование и GSK3. Фосфорилирование, осуществляемое GSK3, требует предварительного фосфорилирования субстрата другой киназой в положении +4 по отношению к сайту фос-

фосфорилирования GSK3, что соответствует часто встречающемуся (но не универсальному) консенсусу (S/TXXXXS/T) для GSK3 [50, 59, 60]. Зачастую такая двойная модификация приводит к последующему убиквитинированию и опосредуемой соответствующими адаптерами (например, белками F-box) протеасомной деградации.

Деградация белков: фосфорилирование и убиквитинирование. Белки F-box ответственны за распознавание субстрата, причем каждый такой белок распознает отдельную группу субстратов [61]. В зависимости от структуры субстрат-ассоциированной области белки F-box подразделяются на 3 категории: с повторами WD40 (Fbxw); с богатыми лейцином повторами (Fbxl) и с другими доменами (Fbxo). Считается, что Fbxl3 отвечает за убиквитин-зависимую деградацию белка биоритмов Cry; мутация Fbxl3 у мышей приводит к удлинению циркадного периода примерно до 26 часов [62, 63]. β -TrCP (также известный как Fbxw1) узнает белок биоритмов Per после фосфорилирования киназой 1 (CK1) (но не GSK3) [64]. Мишени β -TrCP часто содержат мотив разрушения DSGXXS; фосфорилирование обоих серинов в этой последовательности значительно увеличивает узнавание β -TrCP [65]. Поскольку эта последовательность напоминает консенсус-мишень GSK3 (SXXXX(X)S), то много субстратов GSK3 являются β -TrCP-связывающими белками. Такую последовательность содержат, например β -катенин и Nrf2 [60].

Далее мы рассмотрим более подробно роль и последствия модификации протеинкиназой GSK3 белков циркадных биоритмов и Nrf2.

Регуляция активности Nrf2 с помощью GSK3. GSK3 фосфорилирует специфические остатки серина в Neh6-домене Nrf2 для создания домена деградации, который затем распознается адаптером убиквитинлигазы β -TrCP и убиквитинируется с последующей деградацией протеасомным комплексом с участием кулина-1 (Cul1) и белка RING-box 1 (Rbx1). В альтернативном сценарии GSK3 β репрессирует Nrf2 посредством активации тирозинкиназ (независимо от β -TrCP). GSK3 β фосфорилирует киназу Fyn по Y213. Активированная Fyn накапливается в ядре, где фосфорилирует Nrf2 (у мышей и крыс по Y568, а у человека — по Y576), что приводит к экспорту и деградации Nrf2 [16] (рис. 2).

Cuadrado [3] предложил модель, называемую «двойной регулятор потока», чтобы объяснить, как Keap1 и β -TrCP координируют стабильность Nrf2. В условиях окислительного стресса или под воздействием соединений, реагирующих с тиолом, уровень Nrf2 в ядре увеличивается, стимулируя экспрессию содержащих эле-

мент антиоксидантного ответа (ARE) генов. В отсутствие стресса убиквитинирование Nrf2 преимущественно осуществляется с помощью кулина-3 (Cul3) с использованием Keap1 в качестве субстратного адапторного белка для комплекса лигазы E3 и белка Rbx1 (Rbx1/E3/Cul3) [3] (рис. 2). Обнаружено, что домен Neh6 Nrf2 содержит две связывающие β -TrCP последовательности [31]. Фосфорилирование GSK3 по S338 (и S342) в домене Neh6 усиливает связывание с β -TrCP [31, 32]. Предварительное фосфорилирование Nrf2, по-видимому, опосредуется киназами семейства CMGC (CDK/MAPK/GSK3/CLK), в которых гибкая часть полипептида, называемая Т-петлей, блокирует каталитический сайт, когда он не фосфорилирован сигнальной киназой. Однако, в отличие от большинства CMGC-киназ, GSK3 в основном фосфорилируется по своей Т-петле в положениях Y279 (GSK3 α) или Y216 (GSK3 β). В результате GSK3 способна к катализу в базальных условиях, т.е. при отсутствии сигнального стимула [50, 66, 67]. Это обеспечивает дополнительную регуляторную точку для контроля стабильности Nrf2 [15, 31]. Согласно другим данным, предварительно фосфорилировать Nrf2 может киназа DYRK [68]. Ингибирование как GSK3, так и осуществляющей предварительное фосфорилирование киназы, стабилизирует Nrf2 [68]. Интересно, что родственный Nrf2 ТФ, Nrf1, также деградируется протеасомой β -TrCP-зависимым образом через мотив DSGLS, но в этом случае мотив распознавания фосфорилируется CK2, а не GSK3 [68]. β -Катенин имеет ту же самую предварительно фосфорилирующую киназу, что и гликогенсинтаза [68]. Таким образом, скорость убиквитинирования и деградации каждого из этих субстратов частично определяется регуляцией их специфических предварительно фосфорилирующих киназ и GSK3/CK2 (рис. 2).

В опухолевых клетках, в которых Keap1 (и, следовательно, убиквитинлигазный комплекс Rbx1/E3/Cul3) не способен взаимодействовать с Nrf2, GSK3 сохраняет способность подавлять активность Nrf2. В этом случае и в эмбриональных фибробластах мыши Keap1^{-/-} ингибирование GSK3 с помощью ST99021 увеличивает активность Nrf2 [31].

GSK3 и биоритмы. Циркадный ритм представляет собой консервативную систему хронометрирования, которая адаптирует поведенческие и физиологические процессы к 24-часовым циклам окружающей среды [25, 69]. Регуляторное воздействие со стороны циркадного осциллятора супрахиазматического ядра осуществляется посредством нейрональных

связей с гонадолиберинэргическими нейронами, а также гуморальным путем — посредством гормона эпифиза, мелатонина [69, 70]. Секрецию мелатонина эпифизом стимулирует свет [71]. Известно, что система восприятия света, ведущая к SCN, различается у различных представителей семейства землекоповых (Bathyergidae) (характеризующихся замедленным старением и высоким коэффициентом долголетия) в зависимости от продолжительности жизни и степени социальности [72].

Действие мелатонина опосредуется через его мембранные рецепторы (MT1 и MT2) или через независимые от рецепторов механизмы, включая Nrf2 [73, 74]. Мелатонин связывается не только с мембранными рецепторами, но и с белками-рецепторами на поверхности ядра, а также действует на уровне хроматина, непосредственно влияя на синтез белков. Показано, что гены ядерных рецепторов Ror α , Ror β , Ror γ (так называемых орфанных ядерных ретиноидных рецепторов Ror/Rzr) экспрессируются в разных органах и тканях, включая SCN гипоталамуса, сетчатку глаза и эпифиз [75]. Их лигандами являются холестерин и его производные, но не мелатонин [75]. Мелатонин стимулирует экспрессию генов биоритмов через RORE-элементы гена *Bmal1* [25] и экспрессию Nrf2 — через цепочку промежуточных звеньев [74, 75] (отмечено на рис. 2 линией, содержащей разрыв). Не подвергается сомнению и существование ядерных рецепторов мелатонина [75]. Например, показано, что мелатонин является лигандом ядерного рецептора витамина D (VDR) с $K_d = 21,2 \pm 1,9$ мкМ [76].

GSK3 α и GSK3 β экспрессируются в SCN гипоталамуса [48], при этом уровень мРНК GSK3 α в SCN мыши выше, чем уровень мРНК GSK3 β [77]. GSK3 обеспечивает обратную связь, влияющую на функцию молекулярных часов в нейронах SCN [78]. При этом экспрессия в SCN белка GSK3 α и фосфорилированной формы GSK3 β имеет суточный ритм [77].

С наступлением ночи активность GSK в нейронах SCN крысы падает (увеличивается количество клеток, окрашиваемых иммуногистохимически как фосфорилированная, неактивная форма GSK3 β , достигая максимума в течение 4 часов). Ближе к рассвету активность GSK β , наоборот, возрастает. Иммунофлуоресцентное окрашивание SCN мышей показало, что свет значительно увеличивает активность GSK3 (т.е. снижает уровень фосфорилированной GSK3 β) уже через 30–60 мин после светового импульса [79]. В контроле поздней ночью содержание фосфорилированной формы GSK3 снижается (а ее активность, соответственно, возрастает). В опытной группе такого снижения

не происходит (т.е. содержание активной формы GSK3 не увеличивается). Таким образом, световой импульс подавляет активность GSK3, в результате чего происходит сглаживание ее колебаний [80]. Даже у мышей, содержащихся в постоянной темноте в течение, по меньшей мере, двух недель, в экстрактах гиппокампа наблюдается выраженный эндогенный циркадный ритм в фосфорилировании GSK3 β , но не GSK3 α [81]. У дрозофилы активность Sgg (гомолог GSK3) в малых вентральных боковых нейронах (доминирующих в регуляции общей ритмической двигательной активности взрослых особей) играет критическую роль в поддержании нормальной ритмичности [82].

Субстраты GSK3, связанные с циркадными ритмами. GSK3 взаимодействует с Per2 *in vitro* и *in vivo*, фосфорилирует Per2 *in vitro* и способствует его перемещению в ядро (рис. 2), но вызывает протеасомную деградацию его партнера, Cry2 [48, 83, 84], фосфорилируя вместе с другой сериновой киназой, DYRK1A, белок Cry2 соответственно по S557 и S553 [24, 85]. Также GSK3 фосфорилирует Bmal1 (S17/T21), что приводит к его последующему убиквитинированию и деградации [86] и Clock (S427/S431) [87] (рис. 2). С помощью тестов на активацию/ингибирование киназной активности GSK3 показано, что эта киназа регулирует фосфорилирование/деградацию Clock через особый кластер остатков серина (фосфодегрон) [87].

При оценке фосфорилирования GSK3 β по S9 (такое фосфорилирование, как уже упоминалось, подавляет активность киназы), активность GSK3 β максимальна с поздней ночи до раннего утра, при этом она повышает уровень фосфорилирования Cry2 по S557, тем самым способствуя ритмической деградации белка Cry2 [87]. Кроме того, GSK3 фосфорилирует Rev-erb α (белок, подавляющий экспрессию Bmal1, и, соответственно, индуцируемую им экспрессию генов биоритмов), однако эта модификация приводит не к деградации, а к активации белка Rev-erb α и его транслокации в ядро [88].

Среди подавляющих экспрессию циркадных белков выделяются Cry2 и Per2. Iitaka et al. [48] обнаружили, что GSK3 β взаимодействует с Per2 *in vitro* и *in vivo* и может фосфорилировать Per2 *in vitro*, что не приводит к деградации Per2, но способствует ядерной транслокации (в отличие от фосфорилирования казеинкиназой) (рис. 2). Сверхэкспрессия GSK3 β вызывает сдвиг фаз Per2, которые изменяют период примерно на 15% (3–4 часа) или приводят к полной потере циркадных ритмов, способствуя появлению экстремальных фенотипов. Существует также

несколько дополнительных молекулярных механизмов, регулирующих циклическую экспрессию генов *Per1* и *Per2* [23]. Уровень белков *Per* регулируется несколькими факторами, обеспечивающими его стабильность и, по всей видимости, способность проникать в ядро. С другой стороны, фосфорилирование *Per* SKIε обеспечивает цитоплазматическую деградацию *Per*, не связанного с *Cry* (в отличие от фосфорилирования с помощью GSK3), предотвращая преждевременное накопление *Per* в цитоплазме. Белок *Per* менее стабилен при отсутствии *Cry* и может легко подвергаться убиквитинированию и протеасомной деградации [22].

Ортолог GSK3 у *Drosophila*, Shaggy (Sgg), играет центральную роль в определении длины циркадного периода у мух. Его мутация у дрозофилы вызывает удлинение периода циркадных часов, тогда как сверхэкспрессия — сокращает его [89]. Sgg фосфорилирует Tim (Timeless, аналог белка *Cry* у дрозофилы) и регулирует ядерную транслокацию гетеродимера *Per*/Tim [89]. Однако следует отметить, что и Tim, и mCry2 являются партнерами димеризации белков *Per* в часовых структурах мухи и мыши соответственно, и, вполне возможно, GSK3 вносит свой вклад в часовую механизм путем регулирования компонентов, которые действуют вместе с белками *Per* [24]. GSK3 фосфорилирует и регулирует стабильность основных (коровых) белков циркадного ритма (*Bmal1*, *Clock*, *Per*, *Cry*, *Rev-erbα*) у млекопитающих [25] (рис. 2).

Консервативность белков биоритмов и GSK3 на эволюционном древе. Используя базу данных Ensembl 100, мы проверили наличие ортологов у позвоночных, а также у дрозофилы *Drosophila melanogaster* и нематоды *Caenorhabditis elegans* для генов *GSK3A* (ENSG00000105723), *GSK3B* (ENSG00000082701), *CLOCK* (ENSG00000134852), *CRY1* (ENSG00000008405), *CRY2* (ENSG00000121671), а также *BHLHE41* (*DEC2*) (ENSG00000123095) и *NPAS1* (Neuronal PAS domain-containing) (ENSG00000130751) (в круглых скобках указан идентификатор гена у человека, согласно базе данных Ensembl). Эти гены кодируют белки, связанные с регуляцией биоритмов. Ген *GSK3B* весьма консервативен даже у беспозвоночных (при сравнении человека и нематоды идентичны 71,27% позиций), и он практически полностью идентичен у человека и макаки. Ген *GSK3A* не имеет ортологов у птиц, а также у некоторых рептилий и у химеры *Callorhinchus milii*. В частности, ортологичный для *GSK3A* ген не обнаружен у черепах *Chelydra serpentina* (каймановая черепаха), *Terrapene carolina triunguis* (каролинская коробчатая черепаха), *Gopherus agassizii* (пустынный западный гофер) и *Gopherus*

evgoodei (черепаха Гуда). Ортологичный для *NPAS1* ген не обнаружен у всех птиц и некоторых рептилий: змей *Laticauda laticaudata* (кольчатый плоскохвост), *Notechis scutatus* (тигровая змея) и *Pseudonaja textilis* (восточная коричневая змея); крокодила *Crocodylus porosus* (гребнистый крокодил); ящериц *Anolis carolinensis* (североамериканский красногорлый анолис), *Podarcis muralis* (обыкновенная стенная ящерица), *Pogona vitticeps* (бородатая агама), *Salvator merianae* (аргентинский чёрно-белый тегу) и *Varanus komodoensis* (комодский варан); черепах *Chelydra serpentina* (каймановая черепаха), *Gopherus evgoodei* (черепаха Гуда), *Pelodiscus sinensis* (дальневосточная черепаха) и *Terrapene carolina triunguis* (каролинская коробчатая черепаха). Также ортолог *NPAS1* не найден у шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis*.

Гены *GSK3B*, *CLOCK*, *CRY1*, *CRY2* и *DEC2* имеют ортологи у большинства позвоночных. Даже у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* найдены два гена, ортологичные гену *GSK3B*, но не были найдены ортологи для остальных рассмотренных генов. У нематоды *C. elegans* не обнаружены ортологи для генов *CRY1*, *CRY2* и *DEC2*, а у плодовой мушки *D. melanogaster* — для генов *CRY1* и *CRY2*. Белок *Clock* сравнительно плохо выравнивается против белков нематоды *C. elegans* и плодовой мушки *D. melanogaster* (идентичны 10–20% позиций). Таким образом, можно предположить, что основную функцию в регуляции суточных (циркадных) ритмов играет не GSK3α, которая отсутствует у большого числа видов (например, у птиц и многих рептилий), и нокаут которой не приводит к тяжелым нарушениям фенотипа, а GSK3β, которая с небольшими различиями присутствует у животных на всех ступенях эволюционной лестницы, и нокаут которой приводит к эмбриональной летальности. Поскольку регуляция биоритмов имеется у всех животных (в том числе рептилий и птиц), далее речь пойдет в основном о функции GSK3β.

Препараты — ингибиторы GSK3. Литий. Показано, что ионы лития удлиняют период циркадных ритмов у многих видов, включая одноклеточные организмы, насекомых, мышей и людей [77, 90, 91]. Литий (в концентрации 1–10 мМ) ингибирует GSK3β *in vitro* и *in vivo* у всех изученных видов [92–95]. Он снижает активность GSK3β/Sgg и удлиняет период двигательной активности мух даже в постоянной темноте (без внешних световых активаторов) [96]. Литий в низких концентрациях (~1 мМ) действует в основном на амплитуду (предположительно, через GSK3β), тогда как в более высоких концентрациях (~10 мМ) он способствует удлинению периода [97].

SB415286. Аналогичное дневное подавление наблюдали с другим ингибитором GSK3 (SB415286; 1 мМ), который уменьшает частоту спонтанных спайковых разрядов нейронов на 66% по сравнению с контролем [98].

Бензофуран-3-ил-(индол-3-ил)малеимиды. В настоящее время разработаны ингибиторы GSK3β нового поколения (бензофуран-3-ил-(индол-3-ил)малеимиды), которые имеют значения IC_{50} в диапазоне 4–680 нМ в отношении GSK3β человека. Один из них (с IC_{50} , равной 67 ± 6 нМ) обладает приемлемой селективностью и растворимостью в дозе 10–29 мкг/кг. В экспериментах на мышах такие ингибиторы обладают антипсихотической активностью, аналогично литию и вальпроату, при лечении биполярного расстройства и других маниакально-депрессивных состояний [99].

Генетическая активация/инактивация GSK3. Ингибирующее фосфорилирование GSK3α и GSK3β в SCN меняется с 24-часовой периодичностью. У трансгенных мышей с мутациями по обоим формам GSK3α/β (GSK3α^{21A/21A}/β^{9A/9A}), приводящим к их перманентной активации, нарушена ритмичность поведения, в том числе значительно снижена амплитуда ритма, удлинен активный период и увеличены периоды активности днем [100]. Сверхэкспрессия GSK3 ускоряет наступление пика экспрессии гена *mPER2* примерно на 2 часа [48]. Генетическая инактивация обоих аллелей GSK3β в сочетании с делецией одного аллеля GSK3α в синхронно-осциллирующих эмбриональных фибробластах мыши (3/4 GSK3α/β KO MEF), наоборот, приводит к значительной задержке в периодичности эндогенного часового механизма, особенно в отношении циклической экспрессии *Per2* [83]. Lavoie et al. [101] показали, что период циркадной двигательной активности у GSK3β^{+/-} мышей удлинен ($23,83 \pm 0,05$ ч) по сравнению с мышами WT ($23,54 \pm 0,10$ ч). SB216763 (ингибитор GSK3α/GSK3β) сокращает период на 1,8 ч в концентрации 10 мкМ и на 7,3 ч – в концентрации 40 мкМ [102]. Подавление экспрессии GSK3β с помощью малой интерферирующей РНК (siRNA) или ингибиторами GSK3 (CHIR 99021 и 1-азакенпауллон) укорачивают период циркадного ритма [103]. Другой ингибитор GSK3 (кенпауллон, 25 мкМ) вызывает фазовую задержку транскрипции *Per2* [83].

У трансгенных мышей *synRas* с конститутивно активированным V12-Ha-Ras в нейронах повышен уровень экспрессии GSK3β и снижено ингибирующее фосфорилирование GSK3β (по S9) в SCN. Наоборот, подавление активности Ras путем блокирования его функции антителами в осциллирующих клеточных культурах

карциномы мочевого пузыря человека линии T-24 снижает уровень белка GSK3β, увеличивает фосфорилирование GSK3β и удлиняет период активности промотора *Bmal1* [104].

Активность GSK3β является основной для поддержания циркадного двигательного поведения, необходимого для правильной организации сна и бодрствования. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией GSK3β при неизменной общей продолжительности суточных периодов бодрствования, медленного (non-rapid eye movement, NREM) и быстрого (rapid eye movement, REM) сна увеличивалось число эпизодов каждого из этих периодов, т.е. циклы бодрствования и сна становились более фрагментарными [105]. Известно, что структура сна важна для адаптации и имеет большое эволюционное значение. Так, например, сон человека более эффективен по длине, глубине сна и числу быстрых фаз сна (REM) по сравнению со сном других приматов [106]. В целом обнаруженные изменения структурной организации циклов сна и бодрствования при суперэкспрессии GSK3β сходны с нарушениями, наблюдаемыми при маниакально-депрессивных и некоторых нейродегенеративных заболеваниях. По-видимому, успешное использование лития у маниакально-депрессивных больных основано именно на его ингибирующем действии в отношении GSK3β. Не исключено также, что эпизоды гиперактивности у таких больных объясняются влиянием GSK3β на дофамин- и серотонинергические системы мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгоживущие виды обычно обладают более совершенной/большой/мощной системой восстановления повреждений, в том числе антиоксидантной защиты. Еще Frolkis [107] предлагал системы, ответственные за репарацию и другие восстановительные процессы, называть системами антистарения (витаукта), так как они способствуют долголетию. При старении активность работы таких систем в базальных условиях (а также их способность реагировать на повреждение) обычно снижается. Соответственно, системы, снижающие/подавляющие работу систем антистарения, и/или системы, работа которых связана с развитием заболеваний (в том числе возрастных), клеточным старением или клеточной гибелью, будут относиться к программе старения [1, 108]. На основе антагонистической плеiotропии постулируется наличие генов, усиливающих репродуктивный успех в молодом возрасте, несмотря на их отсроченные не-

гативные эффекты в старости [108]. С возрастом активность таких систем может не только не снижаться, но даже увеличиваться. В частности, для упоминаемых в данной работе обеспечивающих убиквитин-зависимую протеасомную деградацию Nrf2 белков GSK3 и Keap1 показано увеличение их активности с возрастом [2], в то время как активность Nrf2 снижается. В совокупности, экспериментальные данные, рассмотренные в обзоре, показывают, что Nrf2 и GSK3 являются компонентами антагонистических и тесно взаимодействующих программ антистарения и старения соответственно [1].

Определенным устойчивым, но пластичным ритмом циркадной активности характеризуются не только белки, ответственные за биоритмы (в большинстве своем ТФ), но и регулирующая их GSK3, а также антиоксидантная система, индуцируемая Nrf2, «дирижирующего» транскрипцией огромного количества белков, ответственных за антиоксидантную защиту клетки. Молекулярные часы обеспечивают регуляторный механизм, позволяющий организму готовиться и реагировать на ежедневные изменения внешней среды. Система Nrf2 индуцируется окислителями (электрофилами). При этом запускается синтез антиоксидантных/детоксифицирующих ферментов, защищающих клетку от повреждения. Однако гормон биоритмов, мелатонин, несмотря на то что сам обладает антиоксидантными свойствами, также индуцирует активацию Nrf2 [74], но не напрямую, а опосредованно. Это косвенно поддерживает представление о системе циркадных биоритмов как способствующей адаптации.

В случае Nrf2 ситуация осложняется существованием не только циркадных ритмов активности (т.е. колебаний во времени), но и пространственных, а именно осциллирующих ядерных и цитоплазматических пулов Nrf2. Более того, в качестве «дирижера» системы антиоксидантной защиты Nrf2 опосредует противодействие эффекту токсичных веществ и окислителей, влияя тем самым на упомянутую пластичность экспрессии циркадных белков (таблица).

GSK3, видимо, может считаться характерным представителем программ старения, так как, в отличие от Nrf2, активность GSK3 растет с возрастом как *in vivo*, так и *in vitro*, а также при патологиях. GSK3 участвует в самых разных метаболических путях, в том числе ассоциированных с возрастными болезнями (сахарный диабет второго типа, рак), а также нейродегенеративными патологиями. Кроме того, GSK3 участвует в клеточной гибели и воспалении. Ингибиторы GSK3 в настоящее время представляются перспективными терапевтическими целями для борьбы с этими заболеваниями.

Интерес к этой киназе в рамках нашей статьи продиктован ее регуляторным влиянием на Nrf2, осуществляемым, по меньшей мере, тремя способами: i) GSK3 напрямую связана с деградацией Nrf2, способствуя его убиквитинированию и протеасомной деградации (а не просто инактивации, как другие киназы); ii) GSK3 фосфорилирует Fyn-киназу, которая перемещается в ядро, модифицирует там Nrf2, после чего Nrf2 удаляется из ядра; и iii) GSK3 фосфорилирует белки положительной ветви регуляции циркадных биоритмов Bmal1 и Clock, также вызывая их протеасомную деградацию, что снижает экспрессию Nrf2 (следует отметить, что в промоторах как генов негативных регуляторов биоритмов *CRY1*, *CRY2* и *Rev-erba*, так и в самом гене *Nfe2l2*, кодирующем Nrf2, содержится E-box, вследствие чего их транскрипция позитивно регулируется комплексом Clock/Bmal1 [23, 36]). Таким образом, система, работа которой подробно рассматривается в этой статье, опосредуемая GSK3 и β -TrCP, представляет собой «регулирующий клапан», который контролирует небольшие колебания уровня Nrf2, обеспечивая тонкую настройку ультрадианной и циркадной (Bmal1-опосредованной) регуляции Nrf2 [3, 36]. Вместе с данными о циркадной и Bmal1-опосредованной регуляции Nrf2 это показывает, что Nrf2 и часовые гены образуют регуляторную петлю, которая интегрирует клеточные редокс-сигналы в циркадный ритм [37].

Эффекты фосфорилирования протеинкиназой GSK3 различных субстратов весьма разнообразны: изменение активности ферментов, локализации белков, взаимодействия между белками, а также стабильность белков [60]. Фосфорилирование белков GSK3 часто приводит к их последующему убиквитинированию и протеасомной деградации. Распознавание убиквитинированного белка протеасомой в случае с Nrf2, Cry2, Clock и Bmal1 происходит с помощью белка-адаптера, например β -TrCP [60]. Этому предшествует фосфорилирование того же самого белка другой киназой. Фосфорилирование белков с помощью GSK3 не всегда приводит к последующему расщеплению. Например, для негативных белков-регуляторов биоритмов *Rev-erba* и *Per2* фосфорилирование GSK3, наоборот, приводит к повышению стабильности. Сгу является единственным из негативных регуляторов циркадных биоритмов, фосфорилирование которого GSK3 приводит не к перемещению в ядро (как для *Rev-erba* и *Per*), а к деградации (как для белков позитивной регуляции циркадных биоритмов Bmal1 и Clock). Существует предположение, что белок Cry опосредует подстройку биологических часов под внешний

ритм освещенности, кроме всего прочего, являясь ингибитором транскрипции *Per* и регулируя уровень белка *Per* [22]. Таким образом, GSK3 взаимодействует с разными эффектами практически со всеми коровыми белками биоритмов (*Bmal1*, *Clock*, *Per*, *Cry*, *Rev-erb α*), влияя на длительность той или иной фазы, а также с *Nrf2*, регулируя антиоксидантный статус клетки [3, 15, 18, 25, 29–32, 36, 37, 89].

Генетические и молекулярные исследования показывают важность цепей обратной связи, регулируя тем самым уровень экспрессии генов. Через метаболизм NAD^+ биоритмы связаны и с биоэнергетикой клетки. Показано, что NAD^+ -зависимая деацетилаза *SIRT1* с циркадной периодичностью связывается с комплексом *Clock/Bmal1* и регулирует циркадные транскрипционные программы посредством деацетилирования основных белков часов (*Bmal1*, *Per2*) и хроматин-ассоциированных белков [109, 110]. Окислительный стресс может вызывать перезапуск молекулярных часов [111]. Также изменяют ритмическое поведение и тканевые часы модуляции пентозофосфатного пути [112].

Изучение белков, находящихся на пересечении сигнальных и регуляторных путей, и сравнение их биохимическими и биоинформатическими методами у коротко- и долгоживущих видов позволяет выявлять молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов и явлений, регулирующих тайминг онтогенеза (включая белки часов [20–25, 37, 113] и гормон эпифиза мелатонин, его предшественники и производные [69–75, 114]) и определяющих долголетие (включая острый и хронический феноптоз, неотению и т.д.) [7–9, 115], в том числе и потен-

циально возможное подавление «цитокинового шторма» при COVID-19 [116, 117].

Длительность периода клеточных часов точно настраивается с помощью сети передачи сигналов фосфорилирования, опосредованной множественными протеинкиназами, из которых наиболее универсальной, по крайней мере по количеству субстратов, является GSK3. Именно поэтому функция GSK3 представляется узловым пунктом перекрестной регуляции циркадных ритмов и антиоксидантной защиты, что и является основной темой этой статьи. Попытки воздействия на два пути (идущие от «*Больших биологических часов*» к системе *Nrf2* на рис. 1) одновременно представлены, например, получением препарата, являющегося гибридом сульфорафана (известного активатора *Nrf2*) и мелатонина (регулятора суточных биоритмов) [118, 119], а также веществ, являющихся одновременно ингибиторами GSK3 и активаторами *Nrf2* (2,4-дигидропирано[2,3-с]пиразолов) [120]. Можно предположить, что подобные препараты в перспективе могут быть использованы не только для лечения нейродегенеративных патологий, но и для увеличения продолжительности здоровой жизни и долголетия.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-13037).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., et al. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566–5584, doi: 10.18632/aging.102981.
2. Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., and Buffenstein, R. (2015) Regulation of *Nrf2* signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722–3727, doi: 10.1073/pnas.1417566112.
3. Cuadrado, A. (2015) Structural and functional characterization of *Nrf2* degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 147–157, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029.
4. Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95–109, doi: 10.2174/1874609808666150422122401.
5. Galimov, E. R., Lohr, J. N., and Gems, D. (2019) When and how can death be an adaptation? *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433–1437, doi: 10.1134/S0006297919120010.
6. Duan, W. S., Zhang, R. Y., Guo, Y. S., Jiang, Y. F., Huang, Y. L., et al. (2009) *Nrf2* activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **45**, 388–397, doi: 10.1007/s11626-009-9194-5.
7. Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to “naked apes” (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699–720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
8. Skulachev, V. P. (2019) Phenoptosis as a phenomenon widespread among many groups of living organisms including mammals [Commentary to the paper by E. R. Galimov, J. N. Lohr, and D. Gems (2019), *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433–1437], *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1438–1441, doi: 10.1134/S0006297919120022.
9. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., et al. (2020) Mild depolarization

- of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
10. Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., et al. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, **7**, 11624, doi: 10.1038/ncomms11624.
 11. Aw Yeang, H. X., Hamdam, J. M., Al-Huseini, L. M., Sethu, S., Djouhri, L., et al. (2012) Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells, *J. Biol. Chem.*, **287**, 10556-10564, doi: 10.1074/jbc.M111.322420.
 12. He, X., Kan, H., Cai, L., and Ma, Q. (2009) Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46**, 47-58, doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.10.007.
 13. Xu, S. F., Ji, L. L., Wu, Q., Li, J., and Liu, J. (2018) Ontogeny and aging of Nrf2 pathway genes in livers of rats, *Life Sci.*, **203**, 99-104, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.018.
 14. Levy, S., and Forman, H. J. (2010) C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements, *IUBMB Life*, **62**, 237-246, doi: 10.1002/iub.314.
 15. Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., and Dinkova-Kostova, A. T. (2015) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 108-146, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
 16. Jain, A. K., and Jaiswal, A. K. (2007) GSK3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2, *J. Biol. Chem.*, **282**, 16502-16510, doi: 10.1074/jbc.M611336200.
 17. Huang, H. C., Nguyen, T., and Pickett, C. B. (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12475-12480, doi: 10.1073/pnas.220418997.
 18. Tong, K. I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2006) Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism, *Biol. Chem.*, **387**, 1311-1320, doi: 10.1515/BC.2006.164.
 19. Bonaconsa, M., Malpeli, G., Montaruli, A., Carandente, F., Grassi-Zucconi, G., and Bentivoglio, M. (2014) Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice, *Exp. Gerontol.*, **5**, 70-79, doi: 10.1016/j.exger.2014.03.011.
 20. Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenen, C., Radcliffe, L. A., et al. (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals, *Cell*, **103**, 1009-1017, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00205-1.
 21. Wijnen, H., and Young, M. W. (2006) Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms, *Annu. Rev. Genet.*, **40**, 409-448, doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090603.
 22. Okamura, H. (2003) Integration of mammalian circadian clock signals: from molecule to behavior, *J. Endocrinol.*, **177**, 3-6, doi: 10.1677/joe.0.1770003.
 23. Kennaway, D. J. (2005) The role of circadian rhythmicity in reproduction, *Hum. Reprod. Update*, **11**, 91-101, doi: 10.1093/humupd/dmh054.
 24. Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., and Fukada, Y. (2005) Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β , *J. Biol. Chem.*, **280**, 31714-31721, doi: 10.1074/jbc.M506225200.
 25. Alessandro, M. S., Golombek, D. A., and Chiesa, J. J. (2019) Protein kinases in the photic signaling of the mammalian circadian clock, *Yale J. Biol. Med.*, **92**, 241-250.
 26. Morgunova, G. V., and Klebanov, A. A. (2019) Age-related AMP-activated protein kinase alterations: from cellular energetics to longevity, *Cell Biochem. Funct.*, **37**, 169-176, doi: 10.1002/cbf.3384.
 27. Suter, D. M., and Schibler, U. (2009) Physiology. Feeding the clock, *Science*, **326**, 378-379, doi: 10.1126/science.1181278.
 28. Xue, M., Momiji, H., Rabbani, N., Bretschneider, T., Rand, D. A., and Thornalley, P. J. (2015) Frequency modulated translocational oscillations of Nrf2, a transcription factor functioning like a wireless sensor, *Biochem. Soc. Trans.*, **43**, 669-673, doi: 10.1042/BST20150060.
 29. Lo, S. C., and Hannink, M. (2008) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria, *Exp. Cell Res.*, **314**, 1789-1803, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.02.014.
 30. Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S. P., Villalta, F., and Arinze, I. J. (2008) Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8984-8994, doi: 10.1074/jbc.M709040200.
 31. Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., and Hayes, J. D. (2013) Nrf2 is controlled by two distinct beta-TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity, *Oncogene*, **32**, 3765-3781, doi: 10.1038/onc.2012.388.
 32. Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., and Cuadrado, A. (2011) SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 1121-1133, doi: 10.1128/MCB.01204-10.
 33. Baird, L., Llères, D., Swift, S., and Dinkova-Kostova, A. T. (2013) Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 15259-15264, doi: 10.1073/pnas.1305687110.
 34. Pekovic-Vaughan, V., Gibbs, J., Yoshitane, H., Yang, N., Pathirana, D., et al. (2014) The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis, *Genes Dev.*, **28**, 548-560, doi: 10.1101/gad.237081.113.
 35. Xu, Y.Q., Zhang, D., Jin, T., Cai, D. J., Wu, Q., et al. (2012) Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice, *PLoS One*, **7**, e44237, doi: 10.1371/journal.pone.0044237.
 36. Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., et al. (2018) Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 8460-8468, doi: 10.1073/pnas.1800431115.
 37. Wible, R. S., Ramanathan, C., Sutter, C. H., Olesen, K. M., Kensler, T. W., et al. (2018) NRF2 regulates core and stabilizing circadian clock loops, coupling redox and timekeeping in *Mus musculus*, *Elife*, **7**, e31656, doi: 10.7554/eLife.31656.
 38. Spiers, J. G., Breda, C., Robinson, S., Giorgini, F., and Steinert, J. R. (2019) Drosophila Nrf2/Keap1 mediated redox signaling supports synaptic function and longevity and impacts on circadian activity, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 86, doi: 10.3389/fnmol.2019.00086.
 39. Hansen, J. M., Watson, W. H., and Jones, D. P. (2004) Compartmentation of Nrf2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1, *Toxicol. Sci.*, **82**, 308-317, doi: 10.1093/toxsci/kfh231.

40. Embi, N., Rylatt, D. B., and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase, *Eur. J. Biochem.*, **107**, 519-527, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb06059.x.
41. Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase, *J. Cell. Sci.*, **116**, 1175-1186, doi: 10.1242/jcs.00384.
42. Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., and Fujita, S. C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta, *J. Neurochem.*, **81**, 1073-1083, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00918.x.
43. Souder, D. C., and Anderson, R. M. (2019) An expanding GSK3 network: Implications for aging research, *GeroScience*, **41**, 369-382, doi: 10.1007/s11357-019-00085-z.
44. Yang, K., Chen, Z., Gao, J., Shi, W., Li, L., et al. (2017) The key roles of GSK-3beta in regulating mitochondrial activity, *Cell. Physiol. Biochem.*, **44**, 1445-1459, doi: 10.1159/000485580.
45. Jaworski, T., Banach-Kasper, E., and Gralec, K. (2019) GSK-3β at the intersection of neuronal plasticity and neurodegeneration, *Neural Plast.*, **2019**, 4209475, doi: 10.1155/2019/4209475.
46. Alt, J. R. (2000) Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation, *Genes Dev.*, **14**, 3102-3114, doi: 10.1101/gad.854900.
47. Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., and Brady, S. T. (2002) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility, *EMBO J.*, **21**, 281-293, doi: 10.1093/emboj/21.3.281.
48. Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005) A role for glycogen synthase kinase-3β in the mammalian circadian clock, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29397-29402, doi: 10.1074/jbc.M503526200.
49. Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., et al. (2017) *In vivo* regulation of glycogen synthase kinase 3β activity in neurons and brains, *Sci. Rep.*, **7**, 8602, doi: 10.1038/s41598-017-09239-5.
50. Kaidanovich-Beilin, O., and Woodgett, J. R. (2011) GSK3: functional insights from cell biology and animal models, *Front. Mol. Neurosci.*, **4**, 40, doi: 10.3389/fnmol.2011.00040.
51. Lesort, M., Jope, R. S., and Johnson, G. V. (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase, *J. Neurochem.*, **72**, 576-584, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720576.x.
52. Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., et al. (2011) An Akt/β-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior, *Cell*, **122**, 261-273, doi: 10.1016/j.cell.2005.05.012.
53. Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., and Wood, C. D., Aronshtam, A., et al. (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation, *Science*, **320**, 667-670, doi: 10.1126/science.1156037.
54. Zmijewski, J. W., and Jope, R. S. (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts, *Aging Cell*, **3**, 309-317, doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00117.x.
55. Iwahana, E., Hamada, T., Uchida, A., and Shibata, S. (2007) Differential effect of lithium on the circadian oscillator in young and old hamsters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 752-756, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.042.
56. Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., et al. (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2719-2723, doi: 10.1073/pnas.93.7.2719.
57. Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., and Arias, C. (2011) GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration, *Int. J. Alzheimers Dis.*, **11**, 1-12, doi: 10.4061/2011/189728.
58. Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S., and Michalek, S. M. (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3, *Nat. Immunol.*, **6**, 777-784, doi: 10.1038/ni1221.
59. Sutherland, C. (2011) What are the *bona fide* GSK3 substrates? *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 505-607, doi: 10.4061/2011/505607.
60. Robertson, H., Hayes, J. D., and Sutherland, C. A. (2018) A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3, *Biochem. Pharmacol.*, **147**, 77-92, doi: 10.1016/j.bcp.2017.10.016.
61. Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M., and Harper, J. W. (2004) Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins, *Genes Dev.*, **18**, 2573-2580, doi: 10.1101/gad.1255304.
62. Siepka, S. M., Yoo, S. H., Park, J., Song, W., Kumar, V., et al. (2007) Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression, *Cell*, **129**, 1011-1023, doi: 10.1016/j.cell.2007.04.030.
63. Godinho, S. I., Maywood, E. S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A. R., et al. (2007) The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period, *Science*, **316**, 897-900, doi: 10.1126/science.1141138.
64. Shirogane, T., Jin, J., Ang, X. L., and Harper, J. W. (2005) SCFβ-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein, *J. Biol. Chem.*, **280**, 26863-26872, doi: 10.1074/jbc.M502862200.
65. Najumuddin, Fakhar, M., Gul, M., and Rashid, S. (2018) Interactive structural analysis of βTrCP1 and PER2 phosphoswitch binding through dynamics simulation assay, *Arch. Biochem. Biophys.*, **651**, 34-42, doi: 10.1016/j.abb.2018.05.020.
66. Cole, A., Frame, S., and Cohen, P. (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event, *Biochem. J.*, **377**, 249-255, doi: 10.1042/BJ20031259.
67. Beurel, E., Grieco, S. F., and Jope, R. S. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases, *Pharmacol. Ther.*, **148**, 114-131, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
68. Tsuchiya, Y., Taniguchi, H., Ito, Y., Morita, T., Karim, M. R., and Ohtake, N. (2013) The casein kinase 2-NRF1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 3461-3472, doi: 10.1128/MCB.01271-12.
69. Zee, P. C., Attarian, H., and Videnovic, A. (2013) Circadian rhythm abnormalities, *Continuum (Minneap. Minn)*, **19**, 132-147, doi: 10.1212/01.CON.0000427209.21177.aa.
70. Patel, S. A., Velingkaar, N. S., and Kondratov, R. V. (2014) Transcriptional control of antioxidant defense by the circadian clock, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 2997-3006, doi: 10.1089/ars.2013.5671.
71. Golombek, D. A., and Rosenstein, R. E. (2010) Physiology of circadian entrainment, *Physiol. Rev.*, **90**, 1063-1102, doi: 10.1152/physrev.00009.2009.
72. Oosthuizen, M. K., Bennett, N. C., and Cooper, H. M. (2005) Fos expression in the suprachiasmatic nucleus in response to light stimulation in a solitary and social species of African mole-rat (family Bathyergidae), *Neuroscience*, **133**, 555-560, doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.017.

73. Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., and Slominski, A. T. (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **351**, 152-166, doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004.
74. Fang, J., Yan, Y., Teng, X., Wen, X., Li, N., et al. (2018) Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating Nrf2 and inhibiting ER stress, *Aging (Albany NY)*, **10**, 2954-2972, doi: 10.18632/aging.101602.
75. Slominski, A. T., Zmijewski, M. A., and Jetten, A. M. (2016) ROR α is not a receptor for melatonin (response to DOI: 10.1002/bies.201600018), *Bioessays*, **38**, 1193-1194, doi: 10.1002/bies.201600204.
76. Fang, N., Hu, C., Sun, W., Xu, Y., Gu, Y., et al. (2020) Identification of a novel melatonin-binding nuclear receptor: vitamin D receptor, *J. Pineal. Res.*, **68**, e12618, doi: 10.1111/jpi.12618.
77. Iwahana, E., Akiyama, M., Miyakawa, K., Uchida, A., Kasahara, J., et al. (2004) Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei, *Eur. Neurosci.*, **19**, 2281-2287, doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03322.x.
78. Besing, R. C., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Rogers, C. O., Johnson, R. L., et al. (2015) Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus, *Biol. Rhythms*, **30**, 155-160, doi: 10.1177/0748730415573167.
79. Paul, J. R., McKeown, A. S., Davis, J. A., Totsch, S. K., Mintz, E. M., et al. (2017) Glycogen synthase kinase 3 regulates photic signaling in the suprachiasmatic nucleus, *Eur. J. Neurosci.*, **45**, 1102-1110, doi: 10.1111/ejn.13549.
80. Červená, K., Pačesová, D., Spišská, V., and Bendová, Z. (2015) Delayed effect of the light pulse on phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β Kinases in the ventrolateral suprachiasmatic nucleus of rat, *Mol. Neurosci.*, **56**, 371-376, doi: 10.1007/s12031-015-0563-0.
81. Besing, R. C., Rogers, C. O., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Johnson, R. L., et al. (2017) GSK3 activity regulates rhythms in hippocampal clock gene expression and synaptic plasticity, *Hippocampus*, **27**, 890-898, doi: 10.1002/hipo.22739.
82. Top, D., Harms, E., Syed, S., Adams, E. L., and Saez, L. (2016) GSK-3 and CK2 kinases converge on timeless to regulate the master clock, *Cell Rep.*, **16**, 357-367, doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.005.
83. Kaladchibachi, S. A., Doble, B., Anthopoulos, N., Woodgett, J. R., and Manoukian, A. S. (2007) Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium, *J. Circadian Rhythms*, **5**, 3, doi: 10.1186/1740-3391-5-3.
84. Leloup, J. C., and Goldbeter, A. (2011) Modelling the dual role of Per phosphorylation and its effect on the period and phase of the mammalian circadian clock, *IET Syst. Biol.*, **5**, 44, doi: 10.1049/iet-syb.2009.0068.
85. Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., and Fukada, Y. (2010) DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 β , a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1757-1768, doi: 10.1128/MCB.01047-09.
86. Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation, *PLoS One*, **5**, e8561, doi: 10.1371/journal.pone.0008561.
87. Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Schumer, M., and Antoch, M. P. (2009) A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation, *Cell Cycle*, **8**, 4138-4146, doi: 10.4161/cc.8.24.10273.
88. Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., and Lazar, M. A. (2006) Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock, *Science*, **311**, 1002-1005, doi: 10.1126/science.1121613.
89. Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., and Young, M. W. (2001) A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock, *Cell*, **105**, 769-779, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00383-x.
90. Li, J., Lu, W. Q., Beesley, S., Loudon, A. S., and Meng, Q. J. (2012) Lithium impacts on the amplitude and period of the molecular circadian clockwork, *PLoS One*, **7**, e33292, doi: 10.1371/journal.pone.0033292.
91. Sawai, Y., Okamoto, T., Muranaka, Y., Nakamura, R., Matsumura, R., et al. (2019) *In vivo* evaluation of the effect of lithium on peripheral circadian clocks by real-time monitoring of clock gene expression in near-freely moving mice, *Sci. Rep.*, **9**, 10909, doi: 10.1038/s41598-019-47053-3.
92. Jope, R. S. (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 441-443, doi: 10.1016/S0165-6147(03)00206-2.
93. Freland, L., and Beaulieu J. M. (2012) Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks, *Front. Mol. Neurosci.*, **5**, 14, doi: 10.3389/fnmol.2012.00014.
94. Siebel, A. M., Vianna, M. R., and Bonan, C. D. (2014) Pharmacological and toxicological effects of lithium in zebrafish, *ACS Chem. Neurosci.*, **5**, 468-476, doi: 10.1021/cn500046h.79.
95. Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., et al. (2014) Lithium salts – simple but magic, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 740-749, doi: 10.1134/S0006297914080021.
96. Padiath, Q. S., Paranjpe, D., Jain, S., and Sharma, V. K. (2004) Glycogen synthase kinase 3 β as a likely target for the action of lithium on circadian clocks, *Chronobiol. Int.*, **21**, 43-55, doi: 10.1081/cbi-120027981.
97. Wei, H., Landgraf, D., Wang, G., and McCarthy, M. J. (2018) Inositol polyphosphates contribute to cellular circadian rhythms: Implications for understanding lithium's molecular mechanism, *Cell. Signal.*, **44**, 82-91, doi: 10.1016/j.cellsig.2018.01.001.
98. Paul, J. R., DeWoskin, D., McMeekin, L. J., Cowell, R. M., Forger, D. B., and Gamble, K. L. (2016) Regulation of persistent sodium currents by glycogen synthase kinase 3 encodes daily rhythms of neuronal excitability, *Nat. Commun.*, **7**, 13470, doi: 10.1038/ncomms13470.
99. Kozikowski, A. P., Gunosewoyo, H., Guo, S., Gaisina, I. N., Walter, R. L., et al. (2011) Identification of a glycogen synthase kinase-3 β inhibitor that attenuates hyperactivity in CLOCK mutant mice, *ChemMedChem*, **6**, 1593-1602, doi: 10.1002/cmdc.201100188.
100. Paul, J. R., Johnson, R. L., Jope, R. S., and Gamble, K. L. (2012) Disruption of circadian rhythmicity and suprachiasmatic action potential frequency in a mouse model with constitutive activation of glycogen synthase kinase 3, *Neuroscience*, **226**, 1-9, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.047.
101. Lavoie, J., Hébert, M., and Beaulieu, J. M. (2013) Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency lengthens the circadian locomotor activity period in mice, *Behav. Brain Res.*, **253**, 262-265, doi: 10.1016/j.bbr.2013.08.001.
102. Kon, N., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I., and Fukada, Y. (2015) Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations, *Commun. Integr. Biol.*, **8**, e982405, doi: 10.4161/19420889.2014.982405.
103. Hirota, T., Lewis, W. G., Liu, A. C., Lee, J. W., Schultz, P. G., and Kay, S. A. (2008) A chemical biology approach

- reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20746-2075, doi: 10.1073/pnas.0811410106.
104. Serchov, T., Jilg, T., Radtke, I., Stehle, J. H., and Heumann, R. (2016) Ras activity oscillates in the mouse suprachiasmatic nucleus and modulates circadian clock dynamics, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 1843-1855, doi: 10.1007/s12035-015-9135-0.
 105. Ahnaou, A., and Drinkenburg, W. H. (2011) Disruption of glycogen synthase kinase-3- β activity leads to abnormalities in physiological measures in mice, *Behav. Brain Res.*, **221**, 246-252, doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.004.
 106. Samson, D. R., and Nunn, C. L. (2015) Sleep intensity and the evolution of human cognition, *Evol. Anthropol.*, **24**, 225-237, doi: 10.1002/evan.21464.
 107. Frolkis, V. V. (1982) *Aging and Life-Prolonging Processes*, Springer Verlag, Wien, New York.
 108. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, doi: 10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x.
 109. Asher, G., Gattfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., et al. (2008) SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation, *Cell*, **134**, 317-328, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.050.
 110. Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., et al. (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control, *Cell*, **134**, 329-340, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.002.
 111. Tamaru, T., Hattori, M., Ninomiya, Y., Kawamura, G., Varès, G., et al. (2013) ROS stress resets circadian clocks to coordinate pro-survival signals, *PLoS One*, **8**, e82006, doi: 10.1371/journal.pone.0082006.
 112. Rey, G., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Wulund, L., Milev, N. B., et al. (2016) The pentose phosphate pathway regulates the circadian clock, *Cell Metab.*, **24**, 462-473, doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.024.
 113. Young, M. W., and Kay, S. A. (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks, *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 702-715, doi: 10.1038/35088576.
 114. Chaban, A. K., and Voronezhskaya, E. E. (2008) Involvement of transient larval neurons in osmoregulation and neurogenesis in the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis* and *Helisoma trivolvis*, *Acta Biol. Hung.*, **59** (Suppl.), 123-126, doi: 10.1556/ABiol.59.2008.Suppl.20.
 115. Dilman, V. M. (1986) Ontogenetic model of ageing and disease formation and mechanisms of natural selection, *J. Theor. Biol.*, **118**, 73-81, doi: 10.1016/S0022-5193(86)80009-1.
 116. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/s00062920070111.
 117. Cuadrado, A., Pajares, M., Benito, C., Jiménez-Villegas, J., Escoll, M., et al. (2020) Can activation of NRF2 be a strategy against COVID-19? *Trends Pharmacol. Sci.*, **41**, 598-610, doi: 10.1016/j.tips.2020.07.003.
 118. Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., Cuadrado, P., et al. (2015) Melatonin-sulforaphane hybrid ITH12674 induces neuroprotection in oxidative stress conditions by a "drug-prodrug" mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1807-1821, doi: 10.1111/bph.13025.
 119. Cecon, E., Oishi, A., and Jockers, R. (2018) Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 3263-3280, doi: 10.1111/bph.13950.
 120. Gameiro, I., Michalska, P., Tenti, G., Cores, Á., Buendia, I., et al. (2017) Discovery of the first dual GSK3 β inhibitor/Nrf2 inducer. A new multitarget therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Sci. Rep.*, **7**, 45701, doi: 10.1038/srep45701.

A CROSSTALK BETWEEN THE BIORHYTHMS AND GATEKEEPERS OF LONGEVITY: TWO AFFILIATIONS OF GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3

Review

**G. A. Shilovsky^{1,2,3*}, T. S. Putyatina², G. V. Morgunova², A. V. Seliverstov³,
V. V. Ashapkin¹, E. V. Sorokina², A. V. Markov², and V. P. Skulachev¹**

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

³ Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia

This review discusses genetic and molecular pathways that link circadian timing with metabolism, resulting in the emergence of positive and negative regulatory feedback loops. The Nrf2 pathway is believed to be a component of the anti-aging program responsible for the healthspan and longevity. Nrf2 enables stress adaptation by activating cell antioxidant defense and other metabolic processes via control of expression of over 200 target genes in response to various types of stress. The GSK3 system represents a "regulating valve" that controls fine oscillations in the Nrf2 level, unlike Keap1, which prevents significant changes in the Nrf2 content in the absence of oxidative stress and which is inactivated by the oxidative stress. Furthermore, GSK3 modifies core circadian clock proteins (Bmal1, Clock, Per, Cry, and Rev-erba). Phosphorylation by GSK3 leads to the inactivation and degradation of circadian rhythm-activating proteins (Bmal1 and Clock) and *vice versa* to the activation and nuclear translocation of proteins suppressing circadian rhythms (Per and Rev-erba) with the exception of Cry protein, which is likely to be implicated in the fine tuning of biological clock. Functionally, GSK3 appears to be one of the hubs in the cross-regulation of circadian rhythms and antioxidant defense. Here, we present the data on the crosstalk between the most powerful cell antioxidant mechanism, the Nrf2 system, and the biorhythm-regulating system in mammals, including the impact of GSK3 overexpression and knockout on the Nrf2 signaling. Understanding the interactions between the regulatory cascades linking homeostasis maintenance and cell response to oxidative stress will help in elucidating molecular mechanisms that underlie aging and longevity.

Keywords: GSK3, Nrf2, oxidative stress, aging, biological rhythms, aging and antiaging programs, antioxidants