

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА p53

© 2022 М.Г. Шарапов*, Р.Г. Гончаров, С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова

*Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: sharapov.mg@yandex.ru*

Поступила в редакцию 11.05.2022

После доработки 22.06.2022

Принята к публикации 22.06.2022

Пероксиредоксин 6 (Prdx6) является важным антиоксидантным ферментом со множеством функций в клетке. Prdx6 нейтрализует широкий спектр гидропероксидов, участвует в метаболизме фосфолипидов и восстановлении мембран клетки, а также в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов. Нарушение нормальной экспрессии Prdx6 в клетке приводит к развитию патологических состояний. Снижение концентрации Prdx6 приводит к росту окислительных повреждений клетки. В то же время гиперпродукция Prdx6 ассоциируется с ростом антиоксидантного статуса, подавлением апоптоза и канцерогенезом. В настоящее время механизмы канцерогенного действия пероксиредоксинов недостаточно изучены. В данной работе установлено, что увеличение в 3–4 раза продукции Prdx6 в клетках эмбриональных фибробластов мыши 3T3 приводит к снижению в 4–5 раз уровня онкосупрессора p53. При этом гиперпродукция Prdx6 приводит к усилению экспрессии *RELA* и *HIF1A*, оказывающих онкогенный эффект. Рост внутриклеточного Prdx6 в 3–4 раза повышает интенсивность пролиферации клеток на 20–30%, способствует росту антиоксидантной активности на 30–50%, а также увеличивает радиорезистентность трансфицированных клеток 3T3 на 30–40%. Рост внутриядерного Prdx6 приводит к уменьшению экспрессии генов репарации ДНК в ответ на действие радиации, что указывает на снижение повреждений геномной ДНК. В работе обсуждаются возможные молекулярные механизмы подавления p53 при гиперпродукции Prdx6, которые могут найти применение в разработке новых подходов терапии рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксиредоксин 6, p53, клеточная гибель, пролиферация клеток, окислительный стресс, ионизирующее излучение.

DOI: 10.31857/S0320972522070107, **EDN:** AWAZNN

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что в физиологических концентрациях активные формы кислорода (АФК) являются важнейшими внутриклеточными и межклеточными сигнальными молекулами [1]. Сигнально-регуляторная функция АФК реализуется через их влияние на «многоуровневую» редокс-чувствительную систему регуляторных белков клетки, которая представлена различными рецепторами, протеинкиназами, фосфатазами и транскрипционными факторами [2, 3].

Ключевую роль в процессах АФК-опосредованной сигнализации играют остатки цистеинов (Cys), доступные для окислительной модификации как в самих регуляторных белках, так и в белках-посредниках, известных как редокс-реле [4]. В свою очередь, уровень внутриклеточных и межклеточных АФК контролируется антиоксидантной системой. В регуляции концентрации АФК основную роль играют ферменты-антиоксиданты, среди которых особая роль принадлежит пероксиредоксинам (Prdx) — эволюционно-древнему семейству тиоредоксин-подобных перокси-

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; карбокси-H2DCFDA — 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат; AP-1 — транскрипционный фактор (Activating Protein-1); GFP — зелёный флуоресцентный белок; HIF-1 α — транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией (Hypoxia-inducible factor 1-alpha); NF- κ B — транскрипционный фактор (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); Nrf2 — транскрипционный фактор (nuclear factor erythroid 2-related factor 2); p53 — транскрипционный фактор; Prdx — пероксиредоксин.

* Адресат для корреспонденции.

даз. Среди известных пероксидаз именно Prdx способны восстанавливать наиболее широкий спектр органических и неорганических гидропероксидов, являющихся наиболее стабильными и долгоживущими формами АФК [5]. Кроме того, Prdx при окислении пероксидазного активного центра проявляют функцию шаперонов и фосфолипаз, что также оказывает влияние на внутриклеточную сигнализацию и физиологию клетки [6]. Следует также отметить, что Prdx, помимо непосредственного участия в регуляции концентрации гидропероксидов, выполняют функцию редокс-реле, взаимодействуя с белками-мишенями и образуя с ними межмолекулярные дисульфидные связи [7, 8]. Например, транскрипционный фактор FOXO3 (Forkhead box O3) через остатки Cys31 и Cys150 взаимодействует с Prdx1, что защищает FOXO3 от деградации, способствует его проникновению в ядро и активации транскрипции целевых генов [4]. Активность транскрипционного фактора STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) регулируется через окисление и восстановление остатков Cys (Cys328, Cys542, Cys259) с участием Prdx2 и тиоредоксина 1 (Trx1) [4]. По-видимому, подобная регуляторная функция может быть характерна для всех пероксиредоксинов [5, 6].

Среди пероксиредоксинов особый интерес вызывает Prdx6, который содержит один остаток цистеина в активном центре, а также обладает активностью фосфолипазы A2 (aiPLA2), что позволяет этому белку играть важнейшую роль в антиоксидантной защите и восстановлении клеточных мембран [9]. Животные, нокаутные по гену *PRDX6*, характеризуются ростом окислительных повреждений тканей и органов (в особенности почек, печени и лёгких), а также повышенной чувствительностью к окислительным повреждениям [10]. Напротив, трансгенные мыши с повышенной экспрессией *PRDX6* обладают более высокой резистентностью (по сравнению с нормальными животными) к окислительным повреждениям [11]. Однако гиперэкспрессия *PRDX6* способствует повышению уровня пролиферативной активности и онкотрансформации клеток. Кроме того, гиперпродукция Prdx6 коррелирует с ростом устойчивости раковых клеток к химиопрепаратам и ионизирующему излучению [6]. При этом пероксидазная активность Prdx6 стимулирует рост раковых клеток (обеспечивая устойчивость к окислительным факторам), а фосфолипазная активность aiPLA2 способствует их метастазированию. Нокдаун *PRDX6* в раковых клетках приводит к снижению скорости их роста и метастазирования [12].

В настоящее время молекулярные механизмы канцерогенного действия Prdx6 изучены недостаточно. Однако не вызывает сомнений, что онкогенный эффект Prdx6 не ограничен лишь его каталитическими свойствами, а также обусловлен его сигнально-регуляторной функцией [6]. Например, нокдаун *PRDX6* в клетках меланомы сопровождается снижением активности циклин-зависимой киназы CDK4/6, что приводит к подавлению роста и деления клеток [12]. Prdx6 связывается с DED (Death Effector Domain), доменом инициаторной каспазы-10, тем самым препятствуя формированию TRAIL-опосредованного сигнального комплекса DISC (Death-Inducing Signaling Complex) и последующей активации эффекторных каспаз (3 и 7). Нокдаун *PRDX6* в клетках HeLa приводит к активации TRAIL-опосредованного апоптоза [13]. Нокдаун *PRDX6* в клетках HEK293T и HeLa вызывает активацию PTEN-индуцированной киназы 1 (PINK1), накопление маркера аутофагии p62, проникновение паркина внутрь митохондрий и запуск митофагии [14]. Показано, что онкогенная функция Prdx6 также осуществляется через взаимодействие с белком JAK2 и стимуляцию сигнального пути JAK2/STAT3, в результате чего значительно увеличивается уровень хемокина CCL5, стимулирующего деление клеток [15]. Таким образом, Prdx6 играет важную роль в физиологии клетки благодаря взаимодействию с ключевыми регуляторами апоптоза.

Как отмечалось ранее, транскрипционные факторы являются важнейшими объектами редокс-регуляции, т.к. под действием АФК изменяется их активность и специфичность, что оказывает влияние на экспрессию соответствующих генов, позволяя клетке адаптироваться в ответ на изменения её редокс-статуса [2]. Транскрипционный фактор p53 вовлечён в регуляцию множества клеточных процессов, включая рост, старение и апоптоз. Известно, что p53 является важнейшим онкосупрессором. Более половины из всех известных форм рака ассоциированы с различными мутациями в гене *TP53* (кодирующем белок p53), которые приводят к нарушению функции p53 и онкотрансформации клеток [16]. Способность p53 связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов-мишеней регулируется посттрансляционными модификациями, среди которых важное значение имеет редокс-регуляция, опосредованная окислением остатков цистеина [17]. Белок p53 имеет 10 остатков цистеина, расположенных в ДНК-связывающем домене (100–300

аминокислотные остатки), чувствительных к действию АФК. Три из них (Cys176, Cys238 и Cys242) связываются с атомом цинка (вместе с His179) и имеют решающее значение для правильного сворачивания и функционирования р53 [18]. Окисление вышеуказанных остатков цистеина подавляет способность р53 связываться с ДНК [19]. При этом окислительная модификация других цистеинов в ДНК-связывающем домене влияет на специфичность р53 и активацию соответствующих генов-мишеней [17]. Например, обратимое окисление Cys277 р53 способствует активации другого набора генов [17]. В современных представлениях о процессах редокс-регуляции р53 ещё много пробелов, это требует дальнейших исследований. Однако не вызывает сомнений, что регуляция этих процессов идёт с участием антиоксидантной системы клетки. Мы предположили, что Prdx6, будучи важнейшим ферментом-антиоксидантом, может играть важную роль в регуляции р53. В данной работе впервые показано, что при суперэкспрессии *PRDX6* наблюдается существенное подавление онкосупрессора р53, что может являться новым важным молекулярным механизмом канцерогенного действия пероксиредоксинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генно-инженерной конструкции. Ген пероксиредоксина 6 (*PRDX6*) мыши был получен с помощью ПЦР, в которой использовали высокоточную ДНК-полимеразу Tetsus («Евроген», Россия), ген-специфические олигонуклеотиды: прямой 5'-TGCCCTCGAGCCCGGAGGGTTGCTTCTCG-3' (XhoI), обратный 5'-CAAAGGTACCAGGCTGGGGTGTATAACGGAG-3' (KpnI) («Евроген») и кДНК мыши, полученную с помощью набора MMLV RT kit («Евроген») из тотальной РНК, выделенной с помощью реагента ExtractRNA («Евроген») из клеток эмбриональных фибробластов мыши 3Т3. Условия ПЦР и процедура клонирования была подробно описана нами ранее для изоформы *PRDX6* человека [20]. Полученный ген *PRDX6* мыши был клонирован по точкам XhoI и KpnI в эукариотический экспрессирующий вектор рTagGFP2-N («Евроген»), который кодирует химерный белок с зелёным флуоресцентным белком (GFP) на N-конце Prdx6. Точность генно-инженерной конструкции (рTagGFP2-N-PRDX6) подтверждали секвенированием.

Клеточная культура. Клетки эмбриональных фибробластов мыши Balb/c — 3Т3 (пре-

доставлены Лабораторией культур клеток и клеточной инженерии, ИБК РАН) высевали в культуральные флаконы (25 см²) с плотностью 1×10^6 клеток на флакон в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific», Великобритания) и смеси антибиотиков/антимикотиков («Sigma-Aldrich», США). Культивацию клеток проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для получения клеточной культуры с суперэкспрессией гена *PRDX6* проводили трансфекцию клеток 3Т3 (~10⁷ клеток) плазмидой рTagGFP2-N-PRDX6 с помощью реагента Lipofectamin 3000 («Thermo Fisher Scientific», США), следуя инструкции производителя. Трансфицированные клетки 3Т3 культивировали в присутствии генетицина (G-418, «Gibco», США), устойчивость к которому несёт плазида рTagGFP2-N-PRDX6. В дальнейших экспериментах использовали клетки 3–5 пассажа.

Облучение клеток. Клеточные культуры (нормальные и трансфицированные) подвергались воздействию рентгеновского излучения при комнатной температуре на терапевтическом рентгеновском аппарате РУТ-15 («Мосрентген», Россия) при мощности дозы 4 Гр/мин (фокусное расстояние 8,5 см, ток 20 мА, напряжение 200 кВ), полунлетальной дозой 16 Гр, которая была определена нами ранее для этой клеточной культуры [21].

Оценка жизнеспособности клеток. Клетки 3Т3 (нормальные и трансфицированные) в 96-луночных планшетах (из расчёта 1×10^4 клеток на лунку) подвергали облучению 16 Гр и затем культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. Монослой клеток трижды отмывали $1 \times$ PBS (1,7 мМ KH₂PO₄, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl, pH 7,4) и затем окрашивали в течение 10 мин 0,05%-ным кристаллическим фиолетовым («Sigma-Aldrich», США), лунки тщательно промывали проточной дистиллированной водой, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл 1%-ного додецилсульфата натрия (Ds-Na). Поглощение измеряли через 10 мин при 546 нм на планшетном спектрофотометре Titertek Multiscan MCC/340 («Flow Laboratories», Финляндия) [22].

Экспрессия генов. Уровень экспрессии генов в клетках 3Т3 определяли с помощью ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Общую РНК из клеточных культур выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген») и обрабатывали термоинактивируемой ДНКазой I (RQ1, «Promega», США). Для обратной транскрипции использовали набор MMLV RT («Евроген»). Полученную кДНК

использовали в ПЦР с ген-специфическими олигонуклеотидами (таблица в Приложении). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе DTrprime 4 («ДНК-Технология», Россия) с использованием HS-Таг ДНК-полимеразы («Евроген»). Условия ПЦР были подробно описаны нами ранее [21]. Оценку изменения экспрессии генов проводили по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [23].

Определение пероксидазной активности клеточных лизатов. Нормальные и трансфецированные клетки 3Т3 ($\sim 10^8$) собирали с культуральных флаконов. Осадок клеток ресуспендировали в $1 \times$ PBS и подвергали разрушению с помощью ультразвука на установке УЗДН-2Т («У-РосПрибор», Россия) на льду. Образцы клеточных лизатов нормировали по концентрации белка (~ 2 мг/мл). Пероксидазную активность клеточных лизатов определяли по описанной ранее методике [24].

Определение редокс-статуса клеток. Уровень внутриклеточных АФК в клетках оценивали с помощью 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (карбокси-H2DCFDA, «Invitrogen», США). Карбокси-H2DCFDA является нефлуоресцирующей молекулой, которая эффективно проникает в живые клетки. После отщепления от карбокси-H2DCFDA ацетатных и эфирных групп внутриклеточными эстеразами и последующего окисления внутриклеточными АФК образуется флуоресцирующий зелёным цветом 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF). Интенсивность флуоресценции DCF пропорциональна уровню АФК в клетке [25]. Стококовый раствор 2,5 мМ карбокси-H2DCFDA готовили перед экспериментом в диметилсульфоксиде («Applichem», Германия). Клетки 3Т3 (нормальные и трансфецированные) предварительно культивировали в течение 24 ч в 96-луночной планшете ($2,5 \times 10^4$ клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM), промывали $1 \times$ PBS и обрабатывали свежеприготовленным раствором DMEM с обеднённой фетальной сывороткой (2%) и 2,5 мкМ карбокси-H2DCFDA. Клетки инкубировали с карбокси-H2DCFDA в темноте в течение 1 ч, затем клетки облучали полудетальной дозой рентгеновского излучения (16 Гр). После облучения клеток измеряли флуоресценцию (λ возбуждения – 480 нм, λ эмиссии – 530 нм) в культуре клеток с использованием планшетного ридера Infinite 200 («Tecan», Австрия) по описанной ранее методике [26]. Сигнал флуоресценции до облучения клеток 3Т3 использовали в качестве контроля. Фоновый сигнал культуральной среды DMEM до и после облучения клеток вычитали из со-

ответствующих сигналов образцов клеточных культур.

Электрофорез белков и иммуноблоттинг. Получение белковых образцов, электрофорез в 10%-ном Ds-Na-ПААГ, перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», США) и иммуноблот проводили по протоколам, описанным ранее [27]. В работе в качестве первичных были использованы кроличьи поликлональные антитела (титр 1 : 10 000) против Prdx6 (ИБК РАН), поликлональные антитела (титр 1 : 5000) кролика против белка GFP («Евроген»), моноклональные антитела (титр 1 : 3000) против общего p53 и каспазы-3 («Cell Signaling Technology», США). Нормирование данных проводили по уровню цитоскелетного β -актина с помощью соответствующих антител (титр 1 : 3000) к β -Act («Agrisera», Швеция). В качестве вторичных использовали антитела (титр 1 : 5000) к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена («ИМТЭК», Россия). Детекцию проводили с помощью набора для хемилюминисцентной детекции Novex ECL («Invitrogen») на установке iBright Imaging Systems («Thermo Fisher Scientific», США).

Микроскопия клеток. Клетки 3Т3 культивировали в 8-луночных ячеек ($\sim 10^4$ клеток на лунку) для конфокальной микроскопии Nunc Lab-Tek («Thermo Fisher Scientific», США). После культивации клетки 3Т3 трижды промывали $1 \times$ PBS, фиксировали с помощью 4%-ного раствора формальдегида (30 мин), проводили пермеабиллизацию 0,2% (w/v) Triton X-100 (10 мин). Затем добавляли раствор бромистого этидия (1 мг/мл), инкубировали с ним в течение 5 мин и промывали 3 раза $1 \times$ PBS. Микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа Leica TCS SP-5 и программного обеспечения Leica Application Suite X CMS GmbH («Leica», Германия). Анализировали не менее 5 оптических полей в каждой ячейке.

Статистический анализ выполняли с использованием программы Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft», США) и SigmaPlot11 («Systat Software Inc.», США). Результаты выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Для оценки нормальности распределений использовали критерий χ^2 Пирсона. Внутригрупповые статистические различия определялись с помощью одностороннего анализа ANOVA, а статистическая значимость между отдельными экспериментальными группами определялась с помощью непарного t -критерия Стьюдента. Значение $p < 0,05$ принимали статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансфекция эмбриональных фибробластов мыши 3Т3 плазмидой рTag-GFPN2-PRDX6 приводила к росту уровня мРНК гена *PRDX6* в 4–6 раз, а уровень белка Prdx6, в том числе в составе гибридной молекулы GFP-Prdx6, увеличивался в 3–4 раза (рис 1, *a* и *b*), т.е. наблюдался синтез как собственного Prdx6 клетки, так и в составе химерной молекулы. Химерный белок Prdx6-GFP был обнаружен во всех компартментах клетки, в том числе в ядре клетки (рис 1, *b–e*), что коррелирует с известными данными для нормального Prdx6 [5, 6].

Пероксиредоксины являются важным элементом регуляции редокс-гомеостаза клетки [5], а изменения уровня этих ферментов (как снижение, так и повышение) оказывает значительное влияние на многие физиологические процессы клетки [28, 29]. Показано, что гиперпродукция Prdx1–6 приводит к повышению устойчивости клеток к окислительным факто-

рам, росту их пролиферативной активности и подавлению апоптоза [6, 30]. Наши исследования также показали, что гиперпродукция Prdx6 приводит к росту радиорезистентности трансфицированных клеток 3Т3 (рис. 2, *a*).

В нормальных условиях трансфицированные клетки 3Т3 (с суперэкспрессией *PRDX6*) по сравнению с обычными делились на ~25% чаще (рис. 2, *a*), что коррелировало с ростом уровня маркера пролиферации – *MKI67* в 2–3 раза (таблица). При действии рентгеновского излучения в дозе 16 Гр выживаемость трансфицированных клеток возрастала на 15–20% по сравнению с контрольными (рис. 2, *a*). Повышенная радиорезистентность клеток с суперэкспрессией *PRDX6*, по-видимому, связана с ростом их антиоксидантного статуса. Оценка пероксидазной активности клеточных лизатов клеток 3Т3 (нормальных и трансфицированных рTagGFP2-N-PRDX6) показала, что рост уровня эндогенного Prdx6 в 3–4 раза приводил к увеличению пероксидазной активности клеточного лизата на 20–50% (рис. 2, *b*).

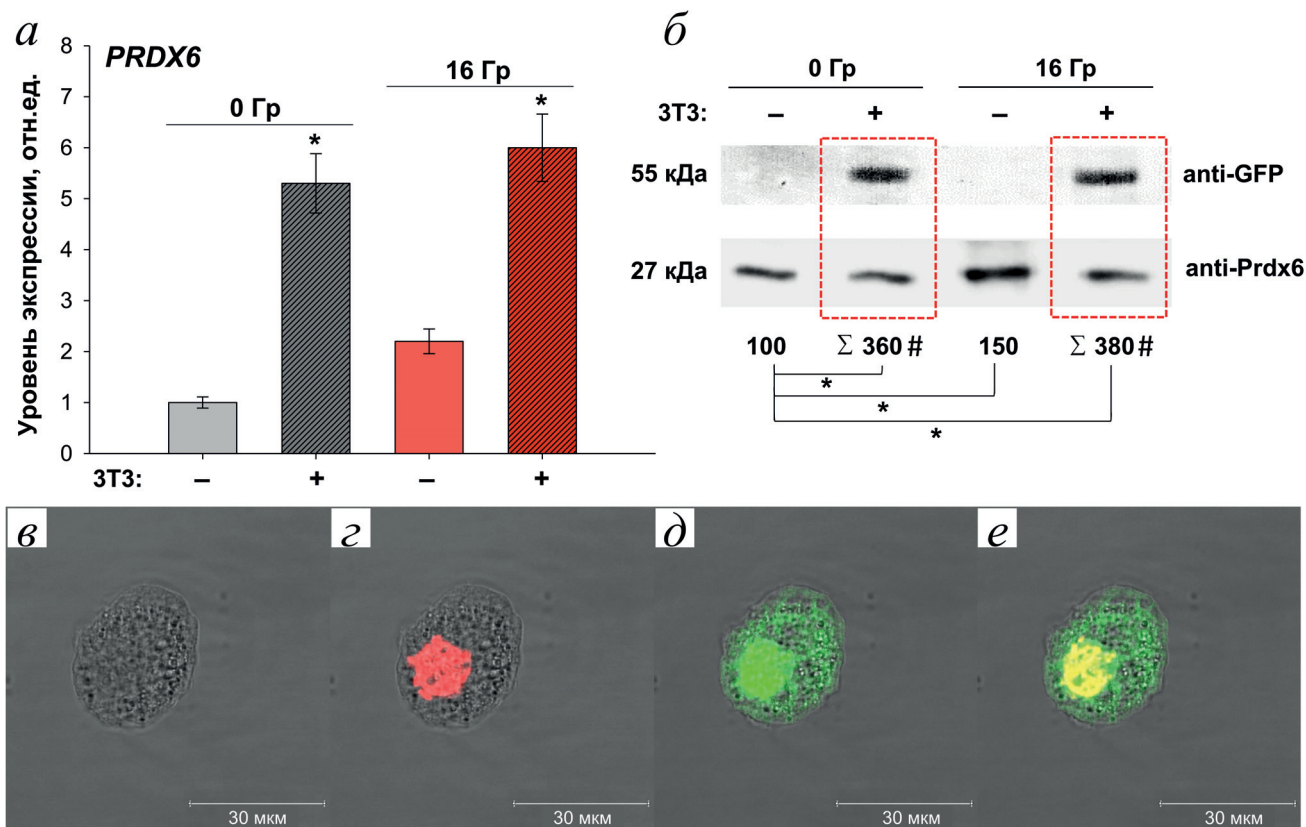


Рис. 1. Экспрессия *PRDX6* в обычных (–) и трансфицированных (+) клетках 3Т3. *a* – Уровень мРНК гена *PRDX6*. *б* – Уровень белка Prdx6. Химерный белок Prdx6-GFP молекулярной массой ~55 кДа идентифицируется антителами против GFP и поликлональными антителами к Prdx6. # Представлено суммарное значение уровня Prdx6 (эндогенного ~27 кДа, IgG anti-Prdx6) и в составе химерного белка Prdx6-GFP (~55 кДа, IgG anti-GFP). Изменения статистически значимы, * $p < 0,05$. Конфокальная микроскопия клеток 3Т3, трансфицированных плазмидой рTag-GFPN2-PRDX6: *в* – фазовый контраст; *г* – окраска этидиум бромидом (канал TexasRed); *д* – флуоресценция химерного белка Prdx6-GFP (канал FAM); *е* – наложение каналов TexasRed и FAM

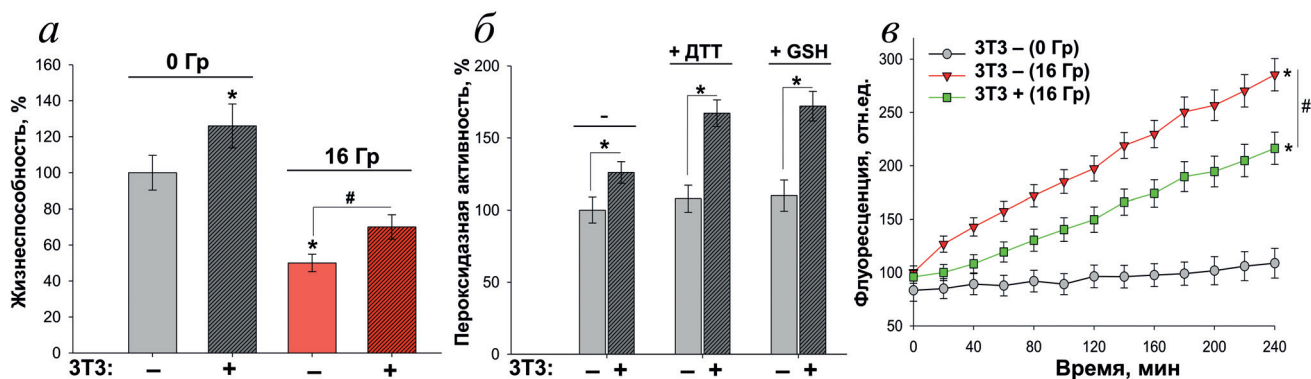


Рис. 2. Влияние суперэкспрессии *PRDX6* на физиологию клеток ЗТ3. *а* – Жизнеспособность обычных (–) и трансфицированных (+) клеток ЗТ3 в нормальных условиях (0 Гр) и при действии рентгеновского излучения (16 Гр). Значения статистически значимы ($p < 0,05$) относительно контроля 0 Гр (*) и клеток после облучения 16 Гр (#). *б* – Оценка пероксидазной активности лизатов исходных клеток ЗТ3 и трансфицированных плазмидой рTag-GFPN2-*PRDX6* при отсутствии и в присутствии восстановителей (ДТТ – дитиотреитол, GSH – глутатион); $n = 5$; * $p < 0,05$, # $p < 0,05$. *в* – Уровень внутриклеточных АФК в обычных и трансфицированных клетках ЗТ3, с повышенным уровнем Prdx6; $n = 3$; * $p < 0,01$, # $p < 0,05$

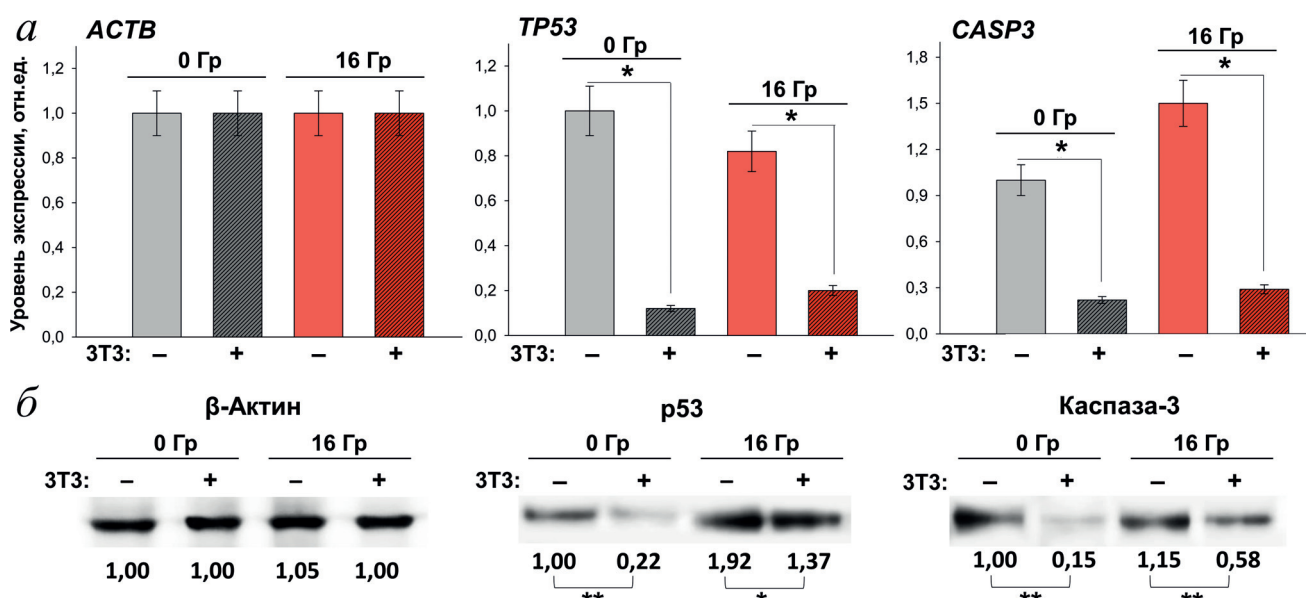


Рис. 3. Изменение уровня мРНК *TP53* и *CASP3* (*а*), белков p53 и каспазы-3 (*б*) в нормальных условиях (0 Гр) и спустя 3 ч после облучения (16 Гр) в обычных (–) и трансфицированных (+) клетках ЗТ3. Данные нормированы относительно мРНК (*ACTB*) и белка цитоскелетного β-актина; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Кроме того, трансфицированные клетки спустя 4 ч после облучения дозой 16 Гр имели на 20–30% меньший уровень внутриклеточных АФК (рис. 2, *в*), а также сниженную индукцию некоторых генов (*NFE2L2*, *SOD1*, *PRDX1*) антиоксидантного ответа (таблица) по сравнению с обычными клетками ЗТ3.

Важно отметить, что суперэкспрессия *PRDX6* влияла не только на антиоксидантный статус клеток, но также и на сигнально-регуляторные процессы клетки. По-видимому, внутриядерная локализация Prdx6–GFP (рис. 1, *е*) позволяла ему не только участвовать в защите геномной ДНК (наряду с другими ферментами-антиоксидантами) от повреждающего

действия АФК, но и оказывать влияние на активность важнейших редокс-чувствительных транскрипционных факторов. Исследования показали, что рост уровня эндогенного Prdx6 приводил к существенному снижению уровня маркеров апоптоза: каспазы-3 (в 4–5 раз) и p53 (в 6–8 раз) (рис. 3). Известно, что снижение уровня p53 или его активности (вследствие мутаций) приводят к подавлению апоптоза и онкотрансформации клеток [31].

Известно, что основным механизмом активации p53 является повреждение геномной ДНК с последующей активацией комплекса MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) и ключевой редокс-чувствительной киназы АТМ (Ataxia

Изменение экспрессии некоторых маркерных генов в обычных и трансфецированных клетках 3Т3, спустя 3 и 6 ч после облучения

Функция	Гены	3Т3			3Т3 (pTagGFP-PRDX6)		
		0 Гр	16 Гр	16 Гр	0 Гр	16 Гр	16 Гр
	Доза/ Время	— 3 ч	3 ч 6 ч	6 ч	— 3 ч	3 ч 6 ч	6 ч
Воспаление, пролиферация, апоптоз	<i>HIF1A</i>	1	1,5	1,7	2,8*	2,0	3,5*
	<i>RELA</i>	1	0,8	12*	3,2*	2,4	15*
	<i>IL6</i>	1	0,9	5,4*	2,1	3,3	7,5*
	<i>MKI67</i>	1	0,3	0,6	2,5*	2,6*	3,2*
	<i>cJUN</i>	1	1,2	1,8	0,5*	0,9	1,5
	<i>TP53</i>	1	0,8	6,2*	0,1*#	0,2#	0,6#
	<i>CASP3</i>	1	1,5	10,7*	0,2*#	0,6#	3,5#
Антиоксидантный ответ	<i>NFE2L2</i>	1	0,7	6,5*	0,5	0,8	1,5#
	<i>SOD1</i>	1	4,9*	10,3*	1	2,4	4,5
	<i>SOD3</i>	1	5,5*	3,2	1	3,6	15,5*#
	<i>CAT</i>	1	2,5	2,2	0,8	2,7	2,5
	<i>PRDX1</i>	1	2,9*	10,9*	1,6	1,7	4,3*#
	<i>PRDX6</i>	1	4,6*	7,4*	5,3*	5,7*	6,5*
Репарация ДНК	<i>OGG1</i>	1	3,1*	30*	0,6	1,5	5,5*#
	<i>LIG4</i>	1	3,5*	18*	1	2	5,1*#
	<i>APEX1</i>	1	4,5*	8,7*	1	2,1	2,5#
	<i>XRCC4</i>	1	2,2	3,5*	1,3	1,7	2,6
	<i>XRCC5</i>	1	3,7*	7,8*	1,1	2,2	4,3#

Примечание. *HIF1A* – ген HIF-1 α ; *RELA* – ген, кодирующий р65-субъединицу NF- κ B; *IL6* – ген интерлейкина 6; *MKI67* – ген маркера пролиферации Ki-67; *cJUN* – ген, кодирующий Jun-субъединицу AP-1; *TP53* – ген, кодирующий белок р53; *CASP3* – ген эффекторной каспазы-3; *NFE2L2* – ген Nrf2; *SOD1* и *SOD3* – гены, кодирующие супероксид-дисмутазы 1 и 3 соответственно; *CAT* – ген каталазы; *PRDX1* и *PRDX6* – гены пероксиредоксина 1 и 6 соответственно; *OGG1* – ген, кодирующий 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазу; *LIG4* – ген ДНК-лигазы 4; *APEX1* – ген апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1; *XRCC4* и *XRCC5* – гены, кодирующие белки Ku70 и Ku80, участвующие в репарации двуцепочечных разрывов ДНК (X-ray repair cross complementing). Представлены средние значения (SD \pm 10%) изменений экспрессии генов относительно уровня в обычных клетках 3Т3 при нормальных условиях; * $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно контроля 0 Гр; # $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно нормальных клеток 3Т3 после облучения (16 Гр).

Telangiectasia Mutated) [32]. По всей видимости, избыток эндогенного Prdx6 в 3–4 раза способен понижать уровень АФК-опосредованных повреждений геномной ДНК. В частности, это проявлялось в снижении индукции генов репарации ДНК после облучения клеток, особенно это заметно спустя 6 ч после облучения (например, для гена *OGG1* показано уменьшение индукции почти в 6 раз), что сви-

детельствует о снижении уровня повреждения геномной ДНК в трансфецированных клетках (таблица). Обнаруженный ранее факт, что экспрессия гена *TP53* активируется с ростом АФК [18], также подтверждается полученными нами результатами. Обнаружено, что гиперпродукция Prdx6 снижала уровень внутриклеточных АФК на 30–40% (рис. 2, в), что коррелирует со снижением индукции р53 после

облучения (рис. 3, б) примерно на те же 30%. Следовательно, активная элиминация внутриклеточных пероксидов химерным белком Prdx6–GFP также может снижать индукцию экспрессии *TP53*.

Как упоминалось ранее, p53 подвержен посттрансляционной редокс-регуляции, в которой ферменты-антиоксиданты могут участвовать в качестве редокс-реле [4, 9, 19]. Ранее было показано, что транскрипционная активность p53 зависит от системы тиоредоксинов (TrxR1/Trx) – важнейших регуляторов редокс-гомеостаза [33], которые препятствуют окислению и S-глутатионилированию p53 (Cys124, Cys141 и Cys182), тем самым сохра-

няя его ДНК-связывающую способность [34]. По-видимому, пероксиредоксины аналогичным образом могут оказывать влияние на редокс-статус p53, непосредственно взаимодействуя с окисленной формой p53 по принципу редокс-реле (рис. 4, б). Ранее для олигомерной формы Prdx1 было показано прямое воздействие (по-видимому, в качестве шаперона) с p53 [35], а также киназами MST-1 и c-Abl, участвующих в регуляции активности p53. Учитывая консервативную трёхмерную структуру пероксиредоксинов [36], нельзя исключать подобного взаимодействия Prdx6 и p53, что может стать предметом дальнейших исследований. Кроме того, активация p53 может

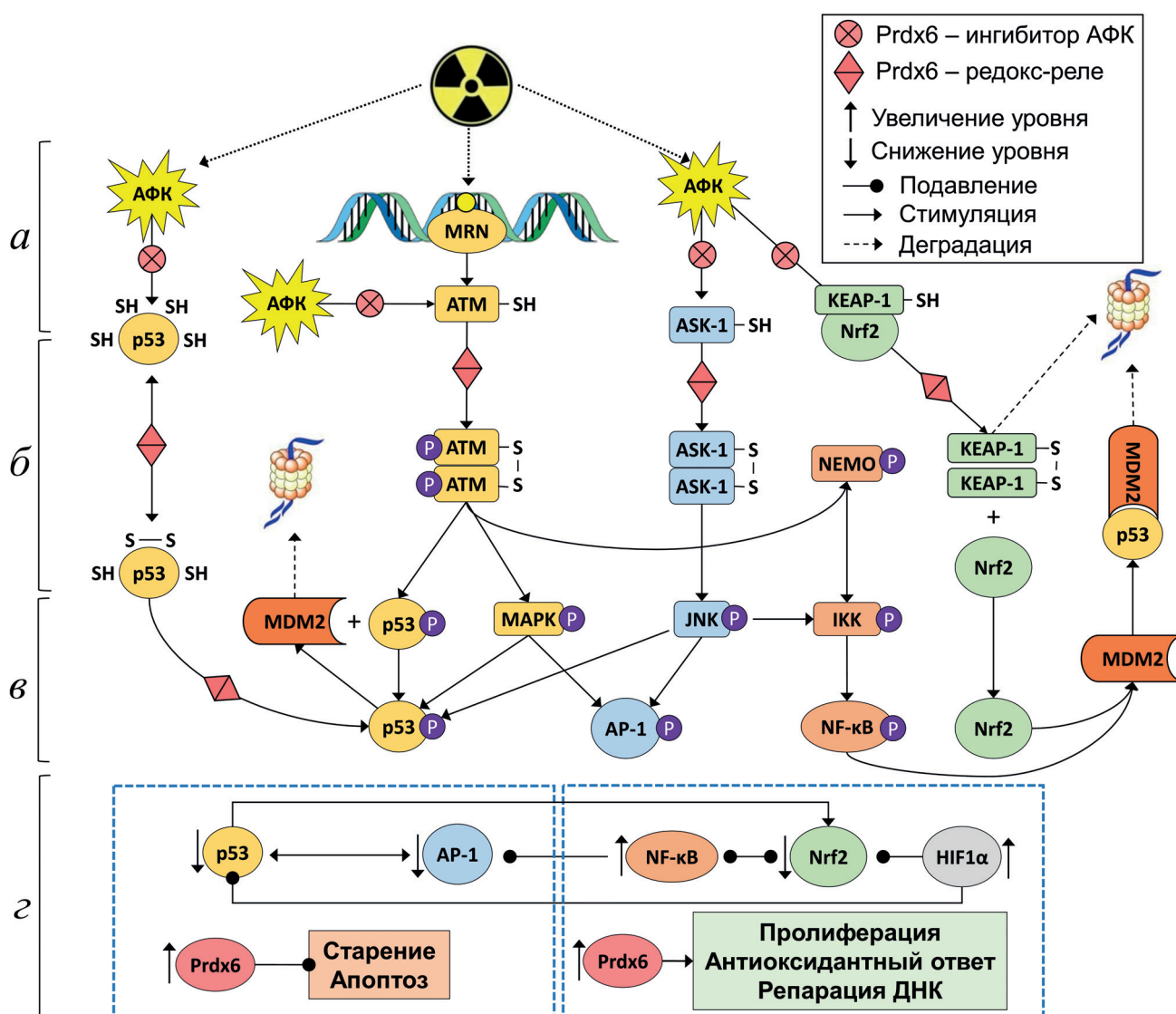


Рис. 4. Гипотетическая схема регуляции уровня p53 с участием эндогенного Prdx6 в условиях окислительного стресса, вызванного ионизирующим излучением. *a* – Влияние Prdx6 на уровень эндогенных АФК; *б* – регуляция редокс-статуса сигнально-регуляторных белков с участием Prdx6 (редокс-реле); *в* – многие киназы оказывают перекрёстное влияние на различные транскрипционные факторы; *г* – Prdx6 подавляет АФК-опосредованную активацию p53, AP-1 и Nrf2 и в то же время вызывает активацию NF-κB и HIF-1α, что в конечном счёте приводит к снижению уровня апоптоза и стимуляции клеточной пролиферации

происходить благодаря киназе JNK [37], функционирование которой, в свою очередь, могут контролировать пероксиредоксины через взаимодействие с вышележащей редокс-чувствительной киназой ASK-1 [38, 39] (рис. 4, б). Интересно, что в некоторых случаях рост уровня p53 приводит к усилению окислительного стресса из-за подавления экспрессии некоторых генов антиоксидантного ответа. Например, было показано, что p53 подавляет экспрессию MnSOD [40]. Таким образом, подавление p53 может вносить положительный вклад в антиоксидантную защиту клетки. При этом функционирование Prdx как редокс-реле может быть решающей в регуляции уровня p53 и его активности (рис. 4). По-видимому, рост пролиферативной активности и радиорезистентности клеток ЗТЗ с гиперпродукцией Prdx6 может быть обусловлен снижением уровня транскрипционного фактора p53 и подавлением апоптоза у трансфицированных клеток ЗТЗ после облучения (рис. 4).

Следует отметить, что уровень p53 регулируется не только АФК и различными киназами, но также и другими транскрипционными факторами.

Nrf2. Известно, что гиперпродукция Prdx6 способна подавлять в 2–4 раза экспрессию главного регулятора антиоксидантного ответа – транскрипционного фактора Nrf2 (*NFE2L2*) [41]. Этот факт подтвержден и в наших экспериментах как в нормальных условиях (0 Гр), так и после облучения (16 Гр), особенно заметно – спустя 6 ч после облучения (таблица). Известно, что транскрипционная активность Nrf2 в клетке контролируется с помощью АФК. В нормальных условиях одна молекула Nrf2 находится в комплексе с двумя молекулами ингибитора Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), который подвергается убиквитинированию и быстрой деградации в протеасомах. С ростом уровня АФК остатки цистеинов молекул Keap1 окисляются, что приводит к диссоциации комплекса Keap1–Nrf2, транслокации Nrf2 в ядро клетки и последующей активацией целевых генов [42]. По-видимому, с ростом уровня Prdx6 падает концентрация внутриклеточных АФК, и активация Nrf2 существенно снижается (таблица). Кроме того, подавляющее действие на уровень Nrf2 оказывает рост NF-κB [43] и снижение уровня p53 [44].

NF-κB. С ростом количества Prdx6 в клетке наблюдается рост экспрессии NF-κB (*RELA*) в 2–3 раза (таблица). Увеличение уровня NF-κB под действием экзогенного Prdx6, которое обусловлено стимуляцией TLR4, было пока-

зано нами ранее [21]. Механизмы индукции NF-κB при увеличении эндогенного Prdx6 на сегодняшний день не ясны. Возможно, Prdx6 участвует в АФК-опосредованной стимуляции редокс-чувствительных киназ ATM и NEMO (NF-κB Essential Modulator) [45], которые активируют IκB-киназы (IKK). В свою очередь, IKK фосфорилируют ингибитор IκB [46], способствуя высвобождению NF-κB из комплекса с IκB и запуску транскрипции целевых генов (рис. 4, б). Рост уровня NF-κB оказывает подавляющее действие на p53 [47]. Негативный регулятор p53 – E3-убиквитинлигаза MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) является геном-мишенью как самого p53 (обеспечивая регуляцию по принципу отрицательной обратной связи), так и NF-κB. С ростом уровня NF-κB возрастает продукция MDM2, что способствует снижению p53 [48].

HIF-1. Гиперпродукция Prdx6 также приводит к росту (в 2–3 раза) экспрессии *HIF1A*. Транскрипционный фактор HIF-1, имеющий более 800 генов-мишеней, является важнейшим регулятором клеточных процессов в условиях гипоксии, окислительного стресса, а также он играет важную роль в канцерогенезе [49]. Недавно был показан АФК-опосредованный механизм регуляции транскрипционной активности HIF-1 через редокс-чувствительный белок Ref-1 (redox effector factor-1) [50]. По-видимому, аналогичным образом может действовать Prdx6. Интересно отметить, что HIF-1, наряду с Nrf2, NF-κB и C/EBPβ, участвует, в свою очередь, в регуляции экспрессии *PRDX6* [51]. При этом для некоторых изоформ пероксиредоксинов (*PRDX2*, *PRDX4*) показано влияние на транскрипционную активность HIF-1α по принципу отрицательной обратной связи [52]. Важно отметить, что HIF-1 подавляет p53 (через тираминазу TYR-2), тем самым предотвращая апоптоз, вызванный ионизирующим излучением [53].

AP-1 участвует в регулировании процессов клеточного роста, дифференцировки и апоптоза. AP-1 представляет из себя гомо- и гетеродимеры двух семейств белков: Jun (c-Jun, JunB, JunD) и Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB). Экспрессия Jun и Fos может индуцироваться различными факторами, в том числе АФК. Кроме того, АФК оказывают влияние на активность AP-1 через окисление остатков цистеина как в самих субъединицах Jun и Fos, так и в протеинкиназах (PTK, PKC, MAPK), которые активируются при окислении и модулируют функционирование AP-1 [54]. По-видимому, гиперпродукция Prdx6 снижает уровень внутриклеточных АФК, тем самым предотвра-

щает индукцию AP-1 (*cJUN*) (таблица) и его активацию вышестоящими киназами ASK-1 и JNK (рис. 4). Показано, что активность AP-1 регулируется белками редокс-реле: тиоредоксином 1 (Tx1) и редокс-эффекторным фактором (Ref-1) через реакции тиол-дисульфидного обмена [55]. По-видимому, аналогичным образом может действовать Prdx6. Интересно также отметить, что AP-1 в комплексе с NF-κB и Мус/Мах участвует в активации экспрессии *TP53* [56].

Таким образом, регуляция уровня p53 при суперэкспрессии *PRDX6* может происходить с участием различных сигнальных каскадов клетки. Несмотря на то что транскрипционные факторы p53, NF-κB, Nrf2, HIF-1 и AP-1 влияют на различные процессы клетки, они зачастую активируются одними и теми же стимулами. Во многих исследованиях было показано, что эти транскрипционные факторы могут как взаимно подавлять [2], так и активировать друг друга [57]. По-видимому, в зависимости от физиологического состояния клетки и уровня внутриклеточных АФК осуществляется регуляция внутриклеточной сигнализации, а определяющим фактором могут служить именно пероксиредоксины, функционирующие в сигнальных каскадах в качестве редокс-реле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что антиапоптотическое действие гиперпродукции Prdx6 может быть обусловлено подавлением онкосупрессора p53. Предложены молекулярные механизмы угнетения p53 при повышенном уровне Prdx6, которые требуют дальнейших детальных экспериментальных исследований. Влияние Prdx6 на уровень p53 может осуществляться на нескольких уровнях редокс-сигнализации, включая контроль концентрации гидропероксидов,

а также регуляцию окисления сигнальных киназ/фосфатаз и транскрипционных факторов по принципу редокс-реле. Несомненно, для сохранения нормальной физиологии клетки уровень эндогенных пероксиредоксинов должен находиться на оптимальном уровне, а экспрессия генов *PRDX1–6* строго контролироваться, обеспечивая соразмерный ответ на изменение концентрации АФК в клетке и внеклеточном пространстве [5]. Есть веские основания полагать, что дальнейшие исследования роли пероксиредоксинов в регуляции активности p53 смогут помочь в разработке новых эффективных методов терапии рака [6].

Вклад авторов. М.Г. Шарапов, О.В. Глушкова — концепция и руководство работой; М.Г. Шарапов, Р.Г. Гончаров, С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова — проведение экспериментов и обсуждение результатов; М.Г. Шарапов — написание текста статьи; О.В. Глушкова — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00216А).

Благодарности. В работе использовали оборудование ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН: сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии (Leica TCS SP-5, «Leica», Германия), сектора источников ионизирующих излучений (РУТ-15, «Мосрентген», Россия). Часть работы выполнена с использованием планшетного ридера (Infinite 200, «Tecan», Австрия) ЦКП ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
2. Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dybala-Rukes, N., McNamara, C. A., and Altschmied, J. (2017) Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 679-699, doi: 10.1089/ars.2016.6946.
3. Dustin, C. M., Heppner, D. E., Lin, M. C. J., and Van Der Vliet, A. (2021) Redox regulation of tyrosine kinase signalling: more than meets the eye, *J. Biochem.*, **167**, 151-163, doi: 10.1093/JB/MVZ085.
4. Hopkins, B. L., and Neumann, C. A. (2019) Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response, *Redox Biol.*, **21**, 101104, doi: 10.1016/j.redox.2019.101104.
5. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide-reducing enzymes in the regulation of free-radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, doi: 10.1134/s0006297921100084.
6. Sharapov, M. G., and Novoselov, V. I. (2019) Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogen-

- esis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 79-100, doi: 10.1134/s0006297921100084.
7. Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A., and Dick, T. P. (2018) The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs, *Antioxid. Redox Signal.*, **28**, 558-573, doi: 10.1089/ars.2017.7162.
 8. Wadley, A. J., Aldred, S., and Coles, S. J. (2016) An unexplored role for peroxiredoxin in exercise-induced redox signalling? *Redox Biol.*, **8**, 51-58, doi: 10.1016/j.redox.2015.10.003.
 9. Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling, *Arch. Biochem. Biophys.*, **617**, 68-83, doi: 10.1016/j.abb.2016.12.003.
 10. Wang, X., Phelan, S. A., Forsman-Semb, K., Taylor, E. F., Petros, C., et al. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179-25190, doi: 10.1074/jbc.M302706200.
 11. Phelan, S. A., Wang, X., Wallbrandt, P., Forsman-Semb, K., and Paigen, B. (2003) Overexpression of Prdx6 reduces H₂O₂ but does not prevent diet-induced atherosclerosis in the aortic root, *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 1110-1120, doi: 10.1016/S0891-5849(03)00462-3.
 12. Yun, H.-M., Park, K.-R., Lee, H. P., Lee, D. H., Jo, M., et al. (2014) PRDX6 promotes lung tumor progression via its GPx and iPLA2 activities, *Free Radic. Biol. Med.*, **69**, 367-376, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.001.
 13. Choi, H., Chang, J. W., and Jung, Y. K. (2011) Peroxiredoxin 6 interferes with TRAIL-induced death-inducing signaling complex formation by binding to death effector domain caspase, *Cell Death Differ.*, **18**, 405-414, doi: 10.1038/cdd.2010.113.
 14. Ma, S., Zhang, X., Zheng, L., Li, Z., Zhao, X., et al. (2016) Peroxiredoxin 6 is a crucial factor in the initial step of mitochondrial clearance and is upstream of the PINK1-Parkin pathway, *Antioxid. Redox Signal.*, **24**, 486-501, doi: 10.1089/ars.2015.6336.
 15. Yun, H.-M., Park, K.-R., Park, M. H., Kim, D. H., Jo, M. R., et al. (2015) PRDX6 promotes tumor development via the JAK2/STAT3 pathway in a urethane-induced lung tumor model, *Free Radic. Biol. Med.*, **80**, 136-144, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.022.
 16. Zhu, G., Pan, C., Bei, J. X., Li, B., Liang, C., et al. (2020) Mutant p53 in cancer progression and targeted therapies, *Front. Oncol.*, **10**, 1-9, doi: 10.3389/fonc.2020.595187.
 17. Shi, T., and Dansen, T. B. (2020) Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxidants Redox Signal.*, **33**, 839-859, doi: 10.1089/ars.2020.8074.
 18. Eriksson, S. E., Ceder, S., Bykov, V. J. N., and Wiman, K. G. (2019) P53 as a hub in cellular redox regulation and therapeutic target in cancer, *J. Mol. Cell Biol.*, **11**, 330-341, doi: 10.1093/jmcb/mjz005.
 19. Butturini, E., Butera, G., Pacchiana, R., de Prati, A. C., Mariotto, S., et al. (2021) Redox sensitive cysteine residues as crucial regulators of wild-type and mutant p53 isoforms, *Cells*, **10**, 3149, doi: 10.3390/cells10113149.
 20. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., Fesenko, E. E., Bruskov, V. I., and Gudkov, S. V. (2017) The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals, *Free Radic. Res.*, **51**, 148-166, doi: 10.1080/10715762.2017.1289377.
 21. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., et al. (2021) The role of TLR4/NF-κB signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 22. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., et al. (2019) Protective effect of peroxiredoxin 6 against toxic effects of glucose and cytokines in pancreatic RIN-m5F β-cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 637-643, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 23. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 24. Sharapov, M. G., and Ravin, V. K. (2009) Peroxiredoxin 6 from the clawed frog *Xenopus laevis*: CDNA cloning, enzyme characterization, and gene expression during development, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 898-902, doi: 10.1134/S0006297909080112.
 25. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K., Dennery, P., Forman, H., et al. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 1-6, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.
 26. Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, *J. Vis. Exp.*, **57**, e3357, doi: 10.3791/3357.
 27. Novoselova, E. G., Sharapov, M. G., Lunin, S. M., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., et al. (2021) Peroxiredoxin 6 applied after exposure attenuates damaging effects of X-ray radiation in 3T3 mouse fibroblasts, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1951, doi: 10.3390/antiox10121951.
 28. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., Lankin, V. Z., and Novoselov, V. I. (2021) Role of glutathione peroxidases and peroxiredoxins in free radical-induced pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1418-1433, doi: 10.1134/s0006297921110067.
 29. Lee, Y. J. (2020) Knockout mouse models for peroxiredoxins, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 182, doi: 10.3390/antiox9020182.
 30. Gao, L., Meng, J., Yue, C., Wu, X., Su, Q., et al. (2021) Integrative analysis the characterization of peroxiredoxins in pan-cancer, *Cancer Cell Int.*, **21**, 1-18, doi: 10.1186/s12935-021-02064-x.
 31. Hernández Borrero, L. J., and El-Deiry, W. S. (2021) Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1876**, 188556, doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188556.

32. Vaddavalli, P. L., and Schumacher, B. (2022) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging, *Trends Genet.*, **28**, 128-136, doi: 10.1016/j.tig.2011.12.002.
33. Pearson, G. D., and Merrill, G. F. (1998) Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression, *J. Biol. Chem.*, **273**, 5431-5434, doi: 10.1074/jbc.273.10.5431.
34. Velu, C. S., Niture, S. K., Doneanu, C. E., Pattabiraman, N., and Srivenugopal, K. S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-Binding domain during oxidative stress, *Biochemistry*, **46**, 7765-7780, doi: 10.1021/bi700425y.
35. Ding, C., Fan, X., and Wu, G. (2016) Peroxiredoxin 1 – an antioxidant enzyme in cancer, *J. Cell. Mol. Med.*, **21**, 193-202, doi: 10.1111/jcmm.12955.
36. Bolduc, J., Koruza, K., Luo, T., Malo Pueyo, J., Vo, T. N., et al. (2021) Peroxiredoxins wear many hats: Factors that fashion their peroxide sensing personalities, *Redox Biol.*, **42**, 101959, doi: 10.1016/j.redox.2021.101959.
37. Shi, Y., Nikulenkov, F., Zawacka-Pankau, J., Li, H., Gabdoulline, R., et al. (2014) ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis, *Cell Death Differ.*, **21**, 612-623, doi: 10.1038/cdd.2013.186.
38. Kim, S. Y., Kim, T. J., and Lee, K.-Y. Y. (2008) A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway, *FEBS Lett.*, **582**, 1913-1918, doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.015.
39. Jarvis, R. M., Hughes, S. M., and Ledgerwood, E. C. (2012) Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 1522-1530, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.001.
40. Dhar, S. K., Xu, Y., Chen, Y., and St. Clair, D. K. (2006) Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression, *J. Biol. Chem.*, **281**, 21698-21709, doi: 10.1074/jbc.M601083200.
41. Leonarduzzi, G., Sottero, B., and Poli, G. (2010) Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited, *Pharmacol. Ther.*, **128**, 336-374, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.003.
42. Wu, S., Lu, H., and Bai, Y. (2019) Nrf2 in cancers: a double-edged sword, *Cancer Med.*, **8**, 2252-2267, doi: 10.1002/cam4.2101.
43. Hellweg, C. E. (2015) The nuclear factor κ B pathway: A link to the immune system in the radiation response, *Cancer Lett.*, **368**, 275-289, doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.019.
44. Chen, W., Jiang, T., Wang, H., Tao, S., Lau, A., et al. (2012) Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death? *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1670-1675, doi: 10.1089/ars.2012.4674.
45. Miyamoto, S. (2011) Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage, *Cell Res.*, **21**, 116-130, doi: 10.1038/cr.2010.179.
46. Singh, V., Gupta, D., and Arora, R. (2015) NF- κ B as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures, *Discoveries*, **3**, e35, doi: 10.15190/d.2015.27.
47. Thomasova, D., Mulay, S. R., Bruns, H., and Anders, H. J. (2012) p53-independent roles of MDM2 in NF- κ B signaling: Implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases, *Neoplasia (United States)*, **14**, 1097-1101, doi: 10.1593/neo.121534.
48. Klein, A. M., De Queiroz, R. M., Venkatesh, D., and Prives, C. (2021) The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53, *Genes Dev.*, **35**, 575-601, doi: 10.1101/GAD.347872.120.
49. Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy, *Trends Pharmacol. Sci.*, **33**, 207-214, doi: 10.1016/j.tips.2012.01.005.
50. Li, H. S., Zhou, Y. N., Li, L., Li, S. F., Long, D., et al. (2019) HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria, *Redox Biol.*, **25**, 101109, doi: 10.1016/j.redox.2019.101109.
51. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Gudkov, S. V. (2019) Radioprotective role of peroxiredoxin 6, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 15, doi: 10.3390/antiox8010015.
52. Luo, W., Chen, I., Chen, Y., Alkam, D., Wang, Y., et al. (2016) PRDX2 and PRDX4 are negative regulators of hypoxia-inducible factors under conditions of prolonged hypoxia, *Oncotarget*, **7**, 6379-6397, doi: 10.18632/oncotarget.7142.
53. Sendoel, A., Kohler, I., Fellmann, C., Lowe, S. W., and Hengartner, M. O. (2010) HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase, *Nature*, **465**, 577-583, doi: 10.1038/nature09141.
54. Wu, S., Gao, J., Ohlemeyer, C., Roos, D., Niessen, H., et al. (2005) Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1601-1610, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.006.
55. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997) Ap-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3633-3638, doi: 10.1073/pnas.94.8.3633.
56. Kirch, H.C., Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D., and Esche, H. (1999) Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF- κ B and Myc/Max, *Oncogene*, **18**, 2728-2738, doi: 10.1038/sj.onc.1202626.
57. Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G. M., Peng, B., et al. (2004) NF- κ B and AP-1 connection: Mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 Activity, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 7806-7819, doi: 10.1128/mcb.24.17.7806-7819.2004.

EFFECT OF PEROXIREDOXIN 6 ON p53 TRANSCRIPTION FACTOR LEVEL

M. G. Sharapov*, R. G. Goncharov, S. B. Parfenyuk, and O. V. Glushkova

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: sharapov.mg@yandex.ru*

Peroxiredoxin 6 (Prdx6) is an important antioxidant enzyme with multiple functions in the cell. Prdx6 neutralizes a wide range of hydroperoxides, participates in phospholipid metabolism and cell membrane repair, and in the transmission of intracellular and intercellular signals. Disruption of normal Prdx6 expression in the cell leads to the development of pathological conditions. A decrease in Prdx6 concentration leads to an increase in oxidative damage to the cell. At the same time, hyperproduction of Prdx6 is associated with an increase in antioxidant status, suppression of apoptosis and carcinogenesis. Currently, the mechanisms of carcinogenic action of peroxiredoxins are not well understood. In this work we found that a 3-4-fold increase in Prdx6 production in mouse embryonic fibroblast 3T3 cells leads to a 4-5-fold decrease in the level of oncosuppressor p53. At the same time, hyperproduction of Prdx6 leads to increased expression of RELA and HIF1A, which have oncogenic effects. A 3-4-fold increase in intracellular Prdx6 increases the intensity of cell proliferation by 20-30%, promotes an increase in antioxidant activity by 30-50%, and increases the radioresistance of transfected 3T3 cells by 30-40%. The growth of intranuclear Prdx6 leads to a decrease in the expression of DNA repair genes in response to radiation, indicating a decrease in genomic DNA damage. This work discusses possible molecular mechanisms of p53 suppression during Prdx6 hyperproduction, which may find application in the development of new cancer therapy approaches.

Keywords: peroxiredoxin 6, p53, cell death, cell proliferation, oxidative stress, ionizing radiation