

УДК 577.1

## ИОНЫ НАТРИЯ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

### Обзор

© 2022 О.Д. Лопина\*, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, О.В. Букач, Е.А. Климанова\*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119234 Москва, Россия; электронная почта: od\_lopina@mail.ru, klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2022

После доработки 13.06.2022

Принята к публикации 13.06.2022

Поддержание неравномерного распределения ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в цитоплазме и во внеклеточной среде является основой функционирования любой клетки животного. Изменение внутриклеточного соотношения этих катионов возникает в ответ на многочисленные стимулы и имеет важное регуляторное значение. К настоящему моменту в литературе представлено множество экспериментальных данных, свидетельствующих о наличии механизма регуляции транскрипции генов в клетках млекопитающих за счёт изменения внутриклеточного соотношения ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . В данном обзоре рассмотрены возможные способы реализации таких механизмов в различных типах клеток с особым вниманием к  $[\text{Ca}^{2+}]$ -независимым сигнальным путям, которые предполагают наличие внутриклеточного сенсора одновалентных катионов. В качестве такого сенсора мы предлагаем обратить внимание на вторичные структуры нуклеиновых кислот, называемые G-квадруплексами. Они широко представлены в геноме млекопитающих и часто встречаются в промоторах генов, кодирующих транскрипционные факторы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** натрий, калий, регуляция транскрипции, G-квадруплексы, эндотелий, провоспалительный ответ.

DOI: 10.31857/S0320972522080115, EDN: AYZLMK

### ВВЕДЕНИЕ. РОЛЬ $\text{Na}$ , $\text{K}$ -АТРАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СООТНОШЕНИЯ $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$

Характерной особенностью клеток животных является неравномерное распределение ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в цитоплазме и во внеклеточной среде. Хотя суммарная концентрация двух этих одновалентных катионов вне и внутри клеток животных колеблется в пределах 130–160 мМ, их соотношение во внешней среде и в цитоплазме различно. Внутри клетки концентрация  $[\text{Na}^+]_i$  составляет примерно 8–10 мМ для большинства нейронов [1], 4–8 мМ – в сердце млекопитающих [2, 3], в клетках астроглии она достигает 15–20 мМ [1]. В то же время внутри-

клеточная концентрация  $[\text{K}^+]_i$  находится в пределах 120–140 мМ [1]. Для внеклеточной среды характерно обратное соотношение этих катионов: 3–4 мМ  $\text{K}^+$  и 145–155 мМ  $\text{Na}^+$  [1, 4, 5]. Не взирая на наличие каналов и переносчиков, осуществляющих транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  по градиенту концентраций, клетки способны поддерживать градиент концентраций этих катионов на плазматической мембране в основном за счёт работы ионного насоса –  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТРАЗЫ. Этот фермент представляет собой молекулярную машину, которая осуществляет транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через плазматическую мембрану против электрохимического градиента ( $\text{Na}^+$  транспортируется из клетки в окружающую среду, а ионы  $\text{K}^+$  – в обратном направлении)

Принятые сокращения: СаМКI, II, III, IV –  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин-зависимые протеинкиназы I, II, III, IV; сАМР – циклический аденозин-3',5'-монофосфат; Сd68 – антиген макрофагов CD68; CRE – элемент ответа на сАМР; Fos – ген субъединицы Fos транскрипционного активаторного фактора 1 (AP-1); HeLa – клетки карциномы шейки матки человека; Ier2, Ier3, Ier5 – гены немедленного раннего ответа 2, 3, 5; Iл6 – ген интерлейкина 6; Jun – ген субъединицы Jun транскрипционного активаторного фактора 1 (AP-1); NFAT1–5 – ядерные факторы 1–5 активированных Т-клеток; Pigs2 – ген простагландин-эндопероксид синтазы 2 (циклооксигеназы 2).

\* Адресат для корреспонденции.

за счёт энергии, которая освобождается при гидролизе АТР [6].

Поскольку Na,K-АТРазы активируется ионами  $\text{Na}^+$  с внутренней стороны плазматической мембраны, а ионами  $\text{K}^+$  — с наружной [6], в норме суммарная активность Na,K-АТРазы в клетке ограничена в основном именно скоростью входа  $\text{Na}^+$  и в меньшей степени скоростью выхода  $\text{K}^+$ . Невзирая на то что потенциальная активность Na,K-АТРазы в норме избыточна по отношению к потоку входящего натрия (в покое 2–6% от максимально возможной активности Na,K-АТРазы достаточно для устранения последствий пассивного входа  $\text{Na}^+$  и утечки  $\text{K}^+$  через сарколемму скелетной мышцы [7, 8]), в некоторых случаях возникают ситуации, когда Na-насос не справляется с выбросом этих катионов, и их концентрация в клетках животных существенно изменяется. Например, повышение концентрации  $[\text{Na}^+]_i$  в кардиомиоцитах наблюдается при сердечной недостаточности как у пациентов [9], так и у животных [10, 11]. В сердечной мышце это может быть вызвано, с одной стороны, недостаточным для работы насоса количеством АТР (сердце потребляет около 2% всего запаса АТР при каждом его биении [9, 12, 13]), с другой стороны, это может быть следствием ингибирования Na,K-АТРазы, возникающего в результате взаимодействия окисленного глутатиона, накапливающегося при гипоксии, с важными для катализа остатками цистеина  $\alpha$ -субъединицы фермента [14]. Повышение внутриклеточной концентрации  $[\text{Na}^+]_i$  в 2–3 раза отмечается при гипоксии и в гладкомышечных клетках сосудов [15, 16]. Показано также, что даже кратковременная синаптическая активность в нейронах и астроцитах приводит к локальному повышению внутриклеточной концентрации  $[\text{Na}^+]_i$  до 50–100 мМ за счёт его входа через ионотропные глутаматные рецепторы и/или Na-зависимые транспортёры медиаторов [17, 18]. Интенсивные физические упражнения также увеличивают соотношение  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  в скелетной мышце в 5–10 раз за счёт интенсивного входа  $\text{Na}^+$  и выхода  $\text{K}^+$  через потенциал-зависимые Na- и K-каналы [19, 20]. Таким образом, значительные изменения внутриклеточных концентраций  $[\text{Na}^+]_i$  и  $[\text{K}^+]_i$  характерны в основном для возбудимых тканей, однако их изменение возможно также в клетках некоторых невозбудимых тканей, что часто наблюдается при различных онкотрансформациях [21], например, за счёт работы Na/H-обменника. Этот антипортер переносит внутриклеточный  $\text{H}^+$  из цитоплазмы наружу в обмен на внеклеточный  $\text{Na}^+$  в соотношении 1/1. Неза-

висимо от происхождения раковые клетки характеризуются защелачиванием цитоплазмы, что приводит к активации ростовых факторов и гликолиза. Показано, что по крайней мере одной из причин защелачивания цитоплазмы раковых клеток является активация изоформы 1 Na/H-обменника (NHE1). Параллельно с защелачиванием цитоплазмы этот антипортер обеспечивает повышение концентрации внутриклеточного  $[\text{Na}^+]_i$  [22, 23].

### ДИСБАЛАНС ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СООТНОШЕНИЯ $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Достаточно давно известно об изменении экспрессии генов при изменении внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ . Ещё в 1974 году было показано, что изменение этого соотношения в клетках карциномы шейки матки человека (клетки HeLa), вызванное подавлением активности Na,K-АТРазы (за счёт устранения внеклеточного  $\text{K}^+$ ) или Na,K,Cl-котранспортёра (добавлением его ингибитора, этакриновой кислоты), приводит к увеличению количества молекул Na,K-АТРазы. Этот эффект не наблюдался в присутствии циклогексимида или пурамицина, ингибиторов синтеза белка [24]. На основе этих результатов было сделано заключение, что именно повышение концентрации  $[\text{Na}^+]_i$  в клетках HeLa увеличивает синтез молекул Na,K-АТРазы.

Похожие результаты были получены позднее различными авторами при подавлении Na,K-АТРазы убаином, её специфическим ингибитором из класса сердечных гликозидов, или устранением ионов  $\text{K}^+$  из внешней среды. Анализ этих данных позволил заключить, что длительное подавление активности Na-насоса (Na,K-АТРазы) приводит к увеличению количества активных молекул Na,K-АТРазы в плазматической мембране, и это (по крайней мере частично) обусловлено увеличением синтеза  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц фермента, индуцированным, скорее всего, изменением концентрации  $[\text{Na}^+]_i$  в клетке [25]. Было установлено, что частичное ингибирование Na,K-АТРазы в кардиомиоцитах с использованием убаина регулирует также экспрессию нескольких генов раннего и позднего ответа, включая ген  $\beta 1$ -субъединицы, причём этот эффект устраняется в присутствии актиномина D [26]. Изменение экспрессии генов в этом случае сопровождается развитием гипертрофии. В концентрациях 5–100 мкМ убаин увеличивал также синтез мРНК скелет-

ного  $\alpha$ -актина, натрийуретического фактора предсердия, лёгких цепей миозина 2 и трансформирующего фактора роста  $\beta$  в культивируемых кардиомиоцитах, причём действие убаина на регуляцию этих генов было похоже на те гипертрофические эффекты, которые вызывает хроническое повышение системного артериального давления [27]. Однако экспрессия скелетного  $\alpha$ -актина была более чувствительна к действию убаина по сравнению с эффектом, который он оказывал на экспрессию натрийуретического фактора предсердия, что позволяет предполагать различные механизмы активации двух этих генов. Установлено также, что не только убаин, но и дигоксин способен регулировать экспрессию изоформ  $\alpha$ -субъединиц Na,K-АТФазы [28].

Возрастающие концентрации убаина (вплоть до 10 мкМ) ингибируют рост клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVES) и изменяют экспрессию белка-6 программированной смерти клеток, цитохрома  $c_1$ , эндотелин-превращающего фермента, клаудина-1, ретикулона-4, галектина-1, белка Rab-11B (белок, родственник Ras), калнексина, профилина 1 и белка теплового шока 60 [29]. Метод проточной цитометрии и определение активности каспазы-3 показал, что смерть клеток HUVES, индуцированная убаином, является апоптозом. Длительная обработка моноцитов человека убаином в концентрации 0,1 мкМ также приводила к увеличению экспрессии маркеров их активации, таких как CD69 (ранний антиген активации Т-лимфоцитов CD69), HLA-DR (антиген лейкоцитов человека, изотип DR), CD86 (ранний антиген активации Т-лимфоцитов CD86) и CD80 (ранний антиген активации Т-лимфоцитов CD80), а также стимулировала эндоцитоз [30]. Кроме того, было показано, что выдерживание нескольких разных типов клеток с убаином активирует экспрессию некоторых генов раннего ответа, таких как *Fos*, *Jun*, *Egr-1* [31–35].

Было высказано предположение, что убаин обеспечивает регуляцию экспрессии генов опосредованно, влияя на уровень внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$  и действуя далее через классические  $Ca^{2+}$ -зависимые сигнальные пути. Повышение внутриклеточной концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  в диапазоне 0,1–1 мкМ приводит к связыванию его с кальмодулином и другими  $Ca^{2+}$ -связывающими белками, что, в свою очередь, способно повлиять на экспрессию генов несколькими способами: за счёт фосфорилирования под действием  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназы (СаМКI, II или III) лёгкой цепи ядерного фактора кВ и его

транслокации из цитозоля в ядро; либо за счёт транслокации в ядро другого фактора регуляции транскрипции – ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) после его дефосфорилирования  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой фосфатазой (кальцинеирином); либо же путём фосфорилирования транскрипционного фактора CREB (белок, связывающийся с элементом ответа на сАМР) протеинкиназами СаМКII и СаМКIV, приводящее к связыванию этого фактора с  $(Ca^{2+} + сАМР)$ -регуляторным элементом (CRE) в последовательности ДНК [36]. Поскольку промотор *Fos* содержит CRE, усиление экспрессии этого гена в клетках после их обработки убаином также может быть вызвано повышением концентрации внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$ . Действительно, в некоторых работах, процитированных выше, отмечалось, что при действии убаина концентрация  $[Ca^{2+}]_i$  возрастает внутри таких клеток, как неонатальные кардиомиоциты крысы и моноциты человека [26, 30, 32].

Кроме того, было установлено, что при частичном ингибировании Na,K-АТФазы, вызванном добавлением низких концентраций убаина (50–250 мкМ) к клеткам эпителия проксимальных канальцев почек крысы, наблюдаются осцилляции внутриклеточной концентрации  $[Ca^{2+}]_i$ , которые устраняются добавлением блокатора Са-каналов нифедипина или удалением  $Ca^{2+}$  из внеклеточной среды [37]. Похожие осцилляции внутриклеточной концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  были обнаружены также в клетках эндотелия аорты человека [38].

Достаточно давно известно, что подавление активности Na-насоса сопровождается повышением внутриклеточной концентрации  $[Na^+]_i$ , что, в свою очередь, может вызвать повышение концентрации внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$ . В клетках возбудимых (различные типы мышц, нейроны), а также некоторых невозбудимых тканей (в частности, в эндотелии) присутствует Na/Ca-обменник, обеспечивающий в норме обмен трёх внеклеточных ионов  $Na^+$  на один ион внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Функционирование Na/Ca-обменника зависит от соотношения этих катионов внутри и снаружи клетки и электрического потенциала на мембране: в нормальном режиме обменник обеспечивает выход  $Ca^{2+}$  из кардиомиоцитов и вход в них  $Na^+$  при изменении соотношения  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  внутри и снаружи, а также при изменении мембранного потенциала обменник начинает транспортировать из клетки  $Na^+$  и обеспечивать вход  $Ca^{2+}$  [39]. Именно повышением внутриклеточной концентрации  $[Na^+]_i$  за счёт ингибирования Na-насоса и последующими

изменениями в работе Na/Ca-обменника многие исследователи объясняют положительный инотропный эффект кардиостероидов на сердечную мышцу, хотя в настоящий момент этот вопрос все ещё вызывает дискуссии [40].

### **Ca<sup>2+</sup>-НЕЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ**

Для выяснения роли Ca<sup>2+</sup> в индукции экспрессии генов, вызванной ингибированием Na,K-АТФазы в различных типах клеток, в лаборатории проф. С.Н. Орлова была проведена серия исследований [41–43]. Результаты этих экспериментов демонстрируют следующее. Установлено, что инкубация гладкомышечных клеток сосудов крысы с убаином предотвращает развитие апоптоза, вызванного удалением сыворотки. Антиапоптотический эффект убаина коррелирует с увеличением внутриклеточного соотношения [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> [44] и устраняется ингибиторами синтеза белка и РНК [45], что свидетельствует о синтезе в клетках гладких мышц сосудов новых белков, блокирующих апоптоз. В дальнейшем было показано, что одним из белков, экспрессируемых под действием убаина, является морталин, который в значительной степени ответственен за устранение апоптоза, вызванного отсутствием сыворотки [46]. Антиапоптотический эффект убаина был обнаружен также на культивируемых клетках проксимальных канальцев почки [47], гранулярных клетках мозжечка крысы [48], эндотелиальных клетках пупочной вены человека [49]. В клетках гладкой мускулатуры сосудов развитие апоптоза сопровождалось значительной активацией экспрессии *Fos* (6-кратное увеличение синтеза белка после 2 ч инкубации) и *Jun* (4-кратное увеличение через 12 ч инкубации). В то же время убаин не влиял на внутриклеточную концентрацию [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; кроме того, экспрессия *Fos* была нечувствительна к добавлению никардипина и хелаторов внутри- и внеклеточного Ca<sup>2+</sup> [41]. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что экспрессия генов, индуцированная увеличением внутриклеточного соотношения [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, осуществляется не через Ca<sup>2+</sup>-зависимые механизмы.

Ещё одно возможное объяснение эффекта убаина на экспрессию генов заключается в том, что сам убаин, использованный в большей части экспериментов по увеличению внутриклеточной концентрации [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, способен регулировать экспрессию генов не за счёт изменения концентрации этого иона вну-

три клетки. Оказалось, что при связывании с Na,K-АТФазой этот кардиостероид может активировать сигнальные каскады, влияющие на экспрессию генов, за счёт взаимодействия этого фермента с белками-партнёрами или путём дестабилизации липидных рафтов (по крайней мере, в плазмалемме скелетных мышц) [50, 51]. Устранить эти эффекты убаина можно, обеспечив подавление активности Na,K-АТФазы другим способом, например, путём удаления внеклеточного K<sup>+</sup>, поскольку Na,K-АТФаза функционирует только при совместном присутствии Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>. Однако удаление K<sup>+</sup> из внеклеточной среды может сопровождаться гиперполяризацией плазматической мембраны, что, в свою очередь, может изменить активность различных потенциал-зависимых каналов [52].

Для доказательства прямого эффекта увеличения внутриклеточного соотношения [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> на экспрессию генов в лаборатории проф. С.Н. Орлова было проведено сравнение транскриптома трёх типов клеток (клетки гладкой мускулатуры сосудов крысы (RVSMC), HeLa, и HUVEC), в которых соотношение [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> увеличивали двумя независимыми способами: инкубацией клеток в течение 3 ч с полностью ингибирующими Na,K-АТФазу концентрациями убаина и в бескальциевой среде [43]. С использованием технологии Affymetrix были идентифицированы общие и тканеспецифичные гены, активируемые в результате двух независимых воздействий, приводящих к изменению внутриклеточного соотношения [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. В обоих вариантах ингибирования Na,K-АТФазы количество изменяющихся уровней экспрессии генов составило 684, 737 и 1839 для HeLa, HUVEC и RVSMC соответственно. При этом была выявлена высокая степень положительной корреляции между двумя типами стимулов. Среди генов, чувствительных к изменению внутриклеточного соотношения [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, создаваемого убаином и бескальциевой средой, обнаружено 80 генов, общих для всех трёх типов клеток, экспрессия которых увеличивалась или снижалась по меньшей мере на 20% [43]. Чтобы исключить влияние Ca<sup>2+</sup> на регуляцию транскрипции этих генов, аналогичные эксперименты были проведены в присутствии хелаторов вне- и внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. В этом случае удалось идентифицировать 135 общих генов, чувствительных к изменению внутриклеточной концентрации одновалентных катионов. Среди этих генов обнаружены те, продукты которых регулируют транскрипцию и трансляцию, клеточный цикл, адгезию и миграцию клеток, а также воспалительный и иммунный ответ (*Fos*,

*Zfp36* (ген белка 36 с цинковым пальцем), *Jun*, *Hoxb5* (ген гомеобоксного белка B5), *Ptgs2*, *Il6*, *Cd68* и др.) [43]. В другом исследовании мы изучали изменение транскриптома клеток скелетной мускулатуры мыши C2C12 в ответ на увеличение внутриклеточного соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ , которое индуцировали с помощью электрической пульсовой стимуляции, имитирующей мышечное сокращение, а также посредством инкубации клеток в присутствии 30 мкМ убаина. С целью идентификации  $Ca^{2+}$ -независимых  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительных генов аналогичные эксперименты проводили в присутствии 10 мкМ никардипина, устраняющего внутриклеточные  $Ca^{2+}$ -осцилляции и не влияющего на соотношение  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ . Среди таких 113 генов были также обнаружены

гены, кодирующие регуляторы транскрипции и воспалительного ответа (*Fos11* (ген белка 1, подобного Fos), *Ier3*, *Ier5*, *Fil1* (ген лёгкой цепи ферритина 1), *Nfkb1a* (ген ингибитора ядерного фактора κВ альфа), *Ptgs2* и др.) [53].

Таким образом, анализируя транскриптомы различных типов клеток, подверженных стимулам, приводящим к диссипации градиента одновалентных катионов, мы идентифицировали несколько групп генов:  $Ca^{2+}$ -активируемые,  $Ca^{2+}$ -ингибируемые и  $Ca^{2+}$ -независимые. Последняя группа представляет особый интерес, так как её существование позволяет нам заключить, что изменение внутриклеточного соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  можно рассматривать в качестве независимого фактора регуляции транскрипции (таблица).

Универсальные  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -чувствительные  $[Ca^{2+}]_i$ -независимые гены, общие для клеток HeLa, HUVEC, RVSMC и C2C12

Ген	Изменение экспрессии	Основные функции
<i>Fos</i>	≥ 3,14	регуляция транскрипции
<i>Fosb</i>	≥ 2,05	регуляция транскрипции
<i>Adm</i>	≥ 2,01	вазодилатация, регуляция ангиогенеза
<i>Zfp36</i>	≥ 1,88	регуляция транскрипции
<i>Ptgs2</i>	≥ 1,78	биосинтез простагландинов
<i>Nfkb1a</i>	≥ 1,58	регуляция транскрипции
<i>Plk3</i>	≥ 1,48	регуляция клеточного цикла
<i>Btg2</i>	≥ 1,42	регуляция клеточного цикла
<i>Cyr61</i>	≥ 1,34	регуляция пролиферации, адгезии, ангиогенеза
<i>Tiparp</i>	≥ 1,33	ADP-рибозилирование белков
<i>Rgs2</i>	≥ 1,33	регуляция сигнальных каскадов с участием рецепторов, сопряжённых с G-белками
<i>Nr4a1</i>	≥ 1,31	регуляция транскрипции
<i>Insig1</i>	≥ 1,31	регуляция биосинтеза холестерина
<i>Ier2</i>	≥ 1,30	регуляция транскрипции
<i>Nfkbiz</i>	≥ 1,29	регуляция транскрипции
<i>Slc19a2</i>	≥ 1,29	транспорт тиамин
<i>Ppp1r15a</i>	≥ 1,23	регуляция трансляции
<i>Gadd45b</i>	≥ 1,23	регуляция пролиферации
<i>Cd68</i>	≥ 1,22	член семейства скванджер-рецепторов
<i>Ttc14</i>	≤ -1,23	РНК- и ДНК-связывающая активность
<i>Snarp3</i>	≤ -1,24	регуляция транскрипции

Примечание. Таблица составлена по данным исследований Koltsova et al. [43] и Sidorenko et al. [53]. Сокращения: *Adm* – ген адреномедуллина; *Btg2* – ген 2 транслокации В-клеток; *Fosb* – ген субъединицы транскрипционного активаторного фактора 1 (AP-1); *Gadd45b* – ген бета, индуцируемый остановкой роста и повреждением ДНК; *Ier2* – ген немедленного раннего ответа 2; *Insig1* – ген 1, индуцируемый инсулином; *Nfkbiz* – ингибитор ядерного фактора κВ зета; *Nr4a1* – ген белка 1 группы А подсемейства ядерных рецепторов; *Plk3* – ген поло-подобной киназы 3; *Ppp1r15a* – ген регуляторной субъединицы 15А протеинфосфатазы 1; *Rgs2* – ген регулятора сигнальных каскадов G-белков 2; *Slc19a2* – ген тиаминного транспортера; *Snarp3* – ген полипептида 3-комплекса, активирующего малые ядерные РНК; *Tiparp* – ген, кодирующий TCDD-индуцибельную поли-(ADP-рибоза)-полимеразу; *Ttc14* – ген, кодирующий белок 14 с тетрапептидными повторами.

**ЭНДОТЕЛИЙ КАК СЕНСОР ИОНОВ  $\text{Na}^+$** 

Диссипация градиента  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  лежит в основе функционирования возбудимых тканей, таких как мышечная и нервная, в то же время физиологическое значение изменения внутриклеточного соотношения этих одновалентных катионов в невозбудимых тканях не столь очевидно. Наше внимание в этом аспекте сфокусировано на клетках эндотелия по нескольким причинам. Во-первых, эндотелий, представленный одним слоем клеток мезенхимального происхождения, выстилает внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов и имеет непосредственный контакт с плазмой крови и лимфой, состав которых оказывает прямое влияние на метаболизм этих клеток. Во-вторых, эндотелий можно рассматривать как эндокринный орган, который регулирует работу многих систем органов и вносит значительный вклад в патогенез ряда заболеваний, включая сердечно-сосудистые, метаболические и нейрональные [54].

В нормально функционирующем эндотелии его клетки находятся в покое, а любой эндотелиальной дисфункции предшествуют события, которые суммарно именуется активацией эндотелия. Стоит отметить, что в большинстве случаев этот процесс обратимый и является реакцией клеток на изменение окружающей среды, а от степени эндотелиальной активации зависит тяжесть протекания заболевания.

За последние 50 лет получены многочисленные свидетельства того, что повышенное потребление поваренной соли ( $\text{NaCl}$ ) вовлечено в развитие различных заболеваний, включая дисфункцию эндотелия, гипертоническую болезнь и другие поражения сердечно-сосудистой системы. Помимо этого установлено, что в развитии гипертонической болезни значительную роль играет воспаление: в сосудах и почках пациентов с гипертонической болезнью было обнаружено значительное количество иммунных клеток, повышенный уровень биомаркеров воспаления и провоспалительных изменений в иммунных клетках, циркулирующих в крови, в частности в миелоидных клетках [55].

Поскольку клетки эндотелия непосредственно соприкасаются с плазмой крови и лимфой, можно ожидать, что изменение концентрации  $[\text{Na}^+]_o$  в этих жидкостях способно изменить экспрессию генов и метаболизм в этих клетках. Известно также, что клетки эндотелия характеризуются наличием хорошо развитого гликокаликса — сети гликозаминогликанов, являющихся углеводной частью

встроенных в люминальную плазматическую мембрану гликопротеидов. Ранее было установлено, что избыток потребленного натрия связывается с отрицательно заряженными гликозаминогликанами [56]. Это значительно влияет на жёсткость клеток эндотелия, зависящую от состояния примембранного цитоскелета и гликокаликса. Избыток натрия может разрушать гликокаликс и влиять на жёсткость клеток [57], что способно привести к изменению транскрипции генов через механо-сенсорное сопряжение [58]. В целом, увеличение  $[\text{Na}^+]_o$  в плазме крови можно рассматривать как фактор риска сердечно-сосудистой дисфункции [59]. Так, в недавнем исследовании было показано, что у крыс, содержащихся на высокосолевого диете в течение двух недель, концентрация натрия в плазме была повышена по сравнению с контрольной группой животных (147 мМ и 137 мМ соответственно). Кроме того, у этих животных было также отмечено увеличение внутриклеточного содержания натрия в коже, сердечной и скелетной мускулатуре [60]. В связи с этим мы сравнили, как повышенный в пределах физиологических значений (до 145 мМ) уровень внеклеточного натрия влияет на накопление клетками эндотелия этого иона, экспрессию некоторых  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов (среди которых гены раннего ответа, провоспалительные гены и важные для функционирования эндотелия гены), а также на жёсткость клеток HUVEC [61].

Мы установили, что инкубация HUVEC в среде с увеличенным уровнем  $\text{NaCl}$  приводит к активации  $\text{Na,K-ATPase}$  за счёт транспорта  $\text{Na}^+$  внутрь клетки через амилорид-чувствительные  $\text{Na}$ -каналы. Эти данные показывают, что даже небольшое изменение внеклеточной концентрации  $[\text{Na}^+]_o$  приводит к некоторому уменьшению его содержания в клетках HUVEC и установлению нового равновесного состояния, определяемого соотношением  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  внутри и снаружи клеток и константами связывания двух этих катионов с переносчиками, участвующими в поддержании гомеостаза одновалентных катионов [61, 62].

Однако даже кратковременного изменения внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  в ответ на повышение наружной концентрации  $[\text{Na}^+]_o$  в физиологическом ряду концентраций оказалось достаточным для изменения количества мРНК некоторых генов: мы обнаружили уменьшение уровня мРНК *Ptgs2*, *Il1r1* (ген рецептора 1, подобного рецептору интерлейкина 1) и *Il6*. Однако количество мРНК генов *Fos* и *Nos3* (ген, кодирующий NO-синтазу 3) после инкубации клеток

с повышенным уровнем внеклеточного NaCl оставалось неизменным. Важно отметить, что жёсткость клеток, определённая с использованием двух различных физических методов (определение значения модуля Юнга и эквивалентной константы упругости) в пределах 48 ч инкубации клеток в среде с повышенной концентрацией  $\text{Na}^+$ , не изменялась. Эти результаты показывают, что изменение уровня мРНК некоторых генов клеток HUVEC, в частности провоспалительных генов, вызывается даже незначительными изменениями внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  [61].

Повышение внеклеточной концентрации NaCl приводит к изменению осмолярности окружающей среды, а клетки животных крайне чувствительны к изменению этого параметра, поскольку они не имеют прочной клеточной стенки. Объём таких клеток изменяется в ответ на изменение осмолярности: уменьшается в ответ на гиперосмотическую стимуляцию и снижается в ответ на перемещение в гипосмотические условия. Однако уже через несколько минут после такого воздействия клетки начинают возвращаться к прежнему объёму за счёт активации каналов и переносчиков, уменьшающих или увеличивающих концентрации определённых осмолитов в клетке, обеспечивая сопряжённый с этим выход или вход воды [63–65]. Это позволяет клеткам животных избежать смерти путём некроза или апоптоза. В регуляцию экспрессии соответствующих переносчиков в клетках, подвергнутых гипо- или гиперосмотическому воздействию, вовлечён транскрипционный фактор NFAT5, фактор регуляции транскрипции, являющийся членом семейства ядерных факторов активированных Т-клеток. Он играет важную роль в экспрессии генов белков, вовлечённых в развитие осмотического стресса и ликвидацию его последствий [66]. Стоит, однако, отметить, что его регуляция зависит, скорее всего, от тоничности среды, а не от внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  [61, 62].

Ранее в лаборатории проф. С.Н. Орлова было показано, что подавление активности Na,K-АТФазы убаином или помещением клеток в среду без  $\text{K}^+$  в трёх различных типах клеток, включая HUVEC, сопровождается увеличением количества мРНК генов, экспрессия которых изменяется также и в других типах клеток (почечного эпителия, макрофагов, гепатоцитов и эндотелия), подвергнутых гиперосмотическому стрессу [15, 43, 67]. Подробное сравнение профиля изменения количества мРНК генов в клетках HUVEC, выдержанных в среде с 0,1 мкМ убаина и гиперосмотиче-

ской среде с NaCl, продемонстрировало, что в обоих случаях увеличение количества мРНК для нескольких генов раннего ответа (*Egr1* (ген фактора транскрипции *Egr1*), *Fos*, *Atf3*, *Zfp36* и *Jun*) одинаково, если оба воздействия равным образом меняют внутриклеточное соотношение  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ . При замене ионов натрия во внеклеточной среде на N-метил-D-глюкамин (NMDG) прирост мРНК соответствующих генов не наблюдался [68]. Из этого был сделан вывод, что увеличение экспрессии этих генов было вызвано именно изменением внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ , а не собственно гиперосмотическим стимулом.

Для устранения возможности уменьшения уровня мРНК *Ptgs2*, *Il1r1*, *Il6* в клетках HUVEC в результате гиперосмотической стимуляции мы вместо дополнительного NaCl вносили во внеклеточную среду маннитол так, чтобы осмолярность двух гиперосмотических сред была одинаковой. Гиперосмотическая стимуляция маннитолом не приводила к изменению внутриклеточного содержания одновалентных катионов, а также не влияла на количество мРНК тестируемых генов. Кроме того, в этих условиях мы не выявили изменения экспрессии NFAT5 [61]. Это даёт нам основания утверждать, что изменение количества транскриптов генов, обнаруженное нами в клетках HUVEC при непродолжительной их инкубации с повышенной (в физиологических пределах) концентрацией натрия во внеклеточной среде, вызвано именно изменением внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ , а не осмолярности окружающей среды.

### Г-КВАДРУПЛЕКСЫ ДНК – СЕНСОРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ?

Приведённые выше данные о не зависимом от  $\text{Ca}^{2+}$  и осмолярности среды,  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительном механизме экспрессии генов ставит вопрос о сенсоре внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ . Поиски белков, способных производить сигнал при связывании этих одновалентных катионов в различных соотношениях, привели нас к заключению, что существует единственный белок клеток животных, способный реагировать на изменение этого соотношения – Na,K-АТФаза [69]. Однако функция этого белка иная: он поддерживает нужное для нормального функционирования клетки соотношение этих одновалентных катионов в цитоплазме. Сенсор же необходим в ситуации, когда Na,K-АТФаза не справляется

с поддержанием соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  в определённых пределах, вследствие чего необходимо включение других механизмов, позволяющих избежать смерти клеток – это изменение экспрессии генов и появление белков, позволяющих устранить возникающую для клетки угрозу.

Поскольку мы не обнаружили сенсора внутриклеточного соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  в белках, наше внимание привлекли другие макромолекулы, в которых есть неканонические структуры, по-разному связывающие ионы  $Na^+$  и  $K^+$  и способные к изменению конформации. Это так называемые G-квадруплексы, неканонические вторичные структуры, состоящие из четырёх соединённых в спираль нитей нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), которые образуются при наличии в их последовательностях областей, обогащённых гуанином. Секвенирование многих геномов показало, что в них присутствует множество последовательностей, которые потенциально могут сформировать такие квадруплексные спиральные структуры [70].

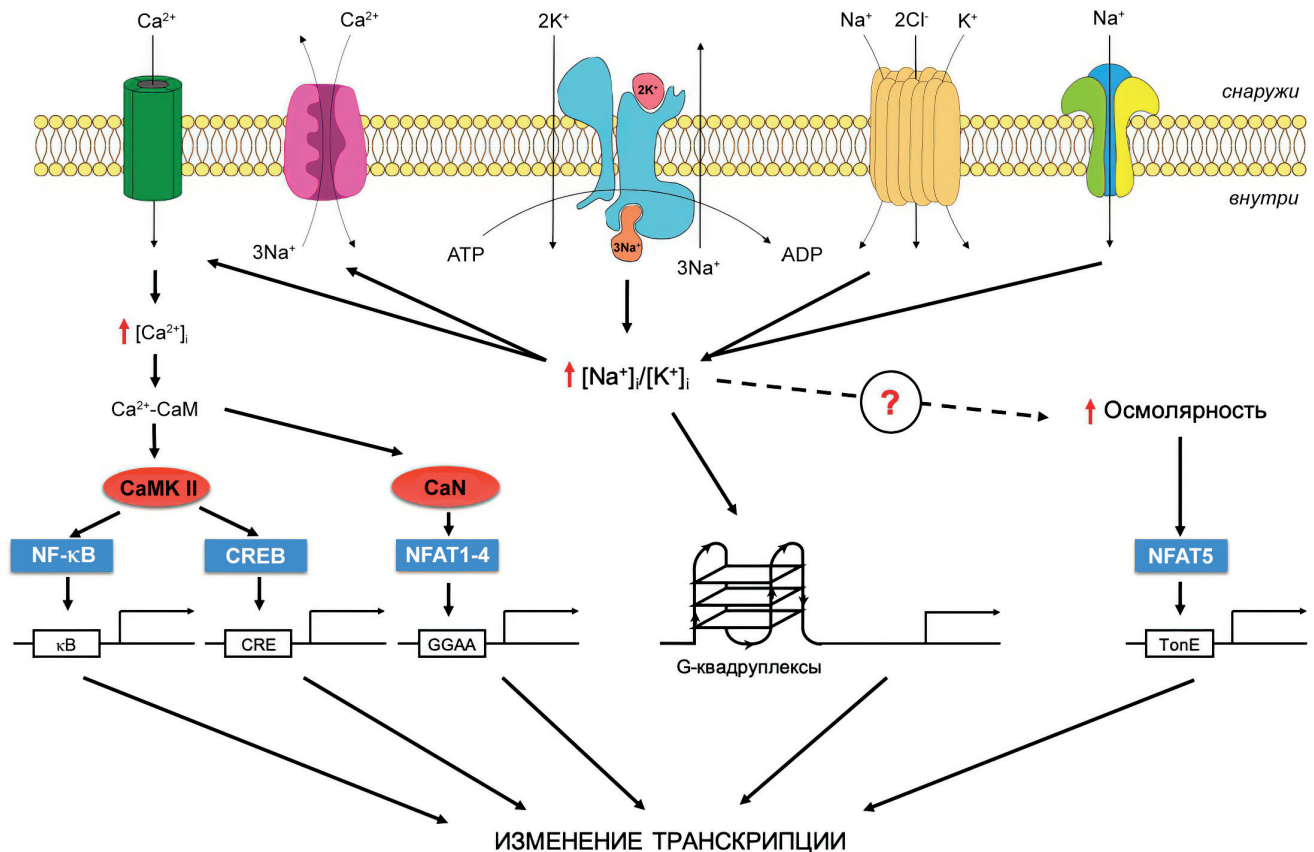
G-квадруплексы образуются из блоков, содержащих по 4 гуаниновых основания, располагающихся в виде плоского квадрата, которые объединяются стэкинг-взаимодействиями. Последовательности ДНК и РНК, содержащие ряд гуаниновых оснований, разделённых другими азотистыми основаниями, спонтанно формируют G-квадруплексы *in vitro*. Расположение в геноме таких обогащённых гуаниновыми основаниями последовательностей (G-тракты) не является случайным, они находятся в функционально важных областях [71], например, часто обнаруживаются в промоторах генов [72]. Интересно, что G-квадруплексы чаще встречаются в онкогенах или в регуляторных генах, нежели в генах, кодирующих белки домашнего хозяйства [73, 74].

Установлено, что G-квадруплексы в физиологических условиях стабилизируются одновалентными катионами. Катионы связываются в центре плоскости, образуемой кватертом гуанинов, располагаясь на или между этими плоскостями [75]. Анализируя влияние одновалентных катионов на формирование G-квадруплексов методом нативного электрофореза, Sen и Gilbert [76] показали, что  $K^+$  значительно более эффективен, чем  $Na^+$  или  $Rb^+$ , а  $Li^+$  и  $Cs^+$  крайне неэффективны в этом отношении. Позднее Włodarczyk et al. [77] подтвердили, что катионы стабилизируют G-квадруплексы в различной степени в зависимости от радиуса иона, их стабилизирующая способность снижается в ряду  $K^+ > Na^+$  и  $NH_4^+ \gg \gg Li^+$ .

Но наиболее интересные результаты были получены в экспериментах с изменением соотношения  $Na^+/K^+$ : при низкой молярной доле  $K^+$  скорость формирования G-квадруплексов ДНК была на порядок ниже, чем в присутствии только ионов  $Na^+$ , в то время как при очень высокой концентрации  $K^+$  скорость их формирования снижалась [76]. Основным выводом, сделанным исследователями, сводится к тому, что способность последовательностей, обогащённых гуаниновыми основаниями, к формированию квадруплексов зависит от баланса  $Na^+$  и  $K^+$ , при различных соотношениях этих одновалентных катионов могут проявляться как синергичные, так и антогонистичные эффекты.

Исследования, проведённые на клетках HeLa, показали, что лиганды, связывающиеся с G-квадруплексами могут изменять экспрессию генов [78]. Кроме того, было обнаружено, что промоторы многих генов, кодирующих факторы регуляции транскрипции, в частности, *Myc* (ген протоонкогена c-Myc), *Mycb* (ген протоонкогена c-Mycb) и *Fos* содержат области, способные формировать G4-квадруплексы [70]. Nakagawa et al. [31], используя различные типы клеток мыши и человека, показали, что убаин в концентрации, ингибирующей Na,K-АТФазу, индуцирует транскрипцию *Fos*. Этот эффект сохранялся и в присутствии хелаторов вне- и внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , верапамила (блокатора Ca-каналов), а также в бессывороточной и безнатриевой средах, что указывает на  $Ca^{2+}$ -независимый механизм транскрипции. С целью идентификации участка промотора, чувствительного к убаину, авторы трансфицировали фибробласты, изолированные из мышинных эмбрионов NIH/Swiss (NIH3T3), последовательностью гена *Fos* человека с делециями различных частей его промотора, содержащего различные регуляторные элементы, включая SRE (элемент ответа на сыворотку) и CRE (элемент ответа на cAMP). В результате этих экспериментов было установлено, что для убаин-индуцированной транскрипции *Fos* необходимо наличие в промоторе последовательности SRE и последовательности между 123 и 222 парами нуклеотидов от начала старта транскрипции. Мы проанализировали этот «убаин-чувствительный» участок промотора *Fos* и обнаружили, что внутри него располагается последовательность нуклеотидов, способная формировать G-квадруплекс. Это поддерживает предположение авторов о том, что именно изменение внутриклеточного ионного баланса, контролируемого Na,K-АТФазой, само по себе может являться механизмом, регулирующим транскрипцию *Fos*.





Возможные механизмы регуляции транскрипции в клетках млекопитающих, опосредованные изменением внутриклеточного соотношения ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . CaM – кальмодулин; CaMKII – кальмодулин-зависимая киназа II; CaN – кальцинейрин; CRE – элемент ответа на cAMP; CREB – белок, связывающийся с CRE; NF-κB – ядерный фактор κB; NFAT1–5 – ядерные факторы активированных T-клеток 1–5; TonE – элемент ответа на осмолярность

Рассмотренные выше предполагаемые механизмы регуляции транскрипции в клетках млекопитающих, опосредованные изменением соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  представлены на рисунке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существуют достаточно веские экспериментальные доказательства того, что во многих типах клеток млекопитающих существуют гены, транскрипция которых регулируется непосредственно за счёт изменения внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ , причём это механизм, в реализацию которого не вовлечены такие стимулы, как изменение внутриклеточной концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  или изменение осмотической активности раствора.

Среди генов, количество мРНК которых увеличивается под действием этого стимула, есть гены, кодирующие белки, являющиеся факторами регуляции транскрипции, в частности, *Fos*. К клеткам, для которых характерно значительное изменение внутриклеточного

соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ , относятся в первую очередь клетки возбудимых тканей (нейроны, различные типы мускулатуры), а также клетки, соприкасающиеся с внеклеточными жидкостями, например, с кровью (эндотелий). Экспериментально показано, что повышение концентрации  $[\text{Na}^+]_o$  во внеклеточной среде даже в физиологическом диапазоне концентраций способно изменить внутриклеточное соотношение  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  и повлиять на транскрипцию  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов, среди которых есть и гены провоспалительного ответа. Одним из основных нерешённых вопросов в проблеме механизма регуляции таких генов является вопрос о внутриклеточном сенсоре одновалентных катионов. Мы предполагаем, что роль такого сенсора могут выполнять неканонические структуры ДНК, так называемые G-квадруплексы, стабильность которых различается в зависимости от того, связывается с ними  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ . Доказательства того, что именно через эти сенсоры регулируется транскрипция  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -чувствительных генов, нуждаются в дальнейших экспериментальных исследованиях.

**Вклад авторов.** О.Д. Лопина, О.В. Букач, Е.А. Климанова – написание оригинального текста рукописи и рецензирование; Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко – подготовка иллюстраций, таблиц и рецензирование.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного

фонда (грант № 19-75-10009).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Verkhatsky, A., Parpura, V., Vardjan, N., and Zorec, R. (2019) In *Neuroglia in Neurodegenerative Diseases* (Verkhatsky, A., Ho, M. S., Zorec, R., Parpura, V., eds) Springer, Singapore, pp. 45-91, doi: 10.1007/978-981-13-9913-8\_3.
- Harrison, S. M., McCall, E., and Boyett, M. R. (1992) The relationship between contraction and intracellular sodium in rat and guinea-pig ventricular myocytes, *J. Physiology*, **449**, 517-550, doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019100.
- Despa, S., Islam, M. A., Pogwizd, S. M., and Bers, D. M. (2002) Intracellular  $[Na^+]_i$  and  $Na^+$  pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes, *J. Physiology*, **539**, 133-143, doi: 10.1113/jphysiol.2001.012940.
- Reynolds, R. M., Padfield, P. L., and Seckl, J. R. (2006) Disorders of sodium balance, *BMJ*, **332**, 702-705, doi: 10.1136/bmj.332.7543.702.
- Pirkmajer, S., and Chibalin, A. V. (2016)  $Na, K$ -ATPase regulation in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **311**, E1-E31, doi: 10.1152/ajpendo.00539.2015.
- Skou, J. C. (1965) Enzymatic basis for active transport of  $Na^+$  and  $K^+$  across cell membrane, *Physiol. Rev.*, **45**, 596-618, doi: 10.1152/physrev.1965.45.3.596.
- Clausen, T. (2003)  $Na^+$ - $K^+$  pump regulation and skeletal muscle contractility, *Physiol. Rev.*, **83**, 1269-1324, doi: 10.1152/physrev.00011.2003.
- Clausen, T. (2013) Quantification of  $Na^+$ ,  $K^+$  pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance, *J. Gen. Physiol.*, **142**, 327-345, doi: 10.1085/jgp.201310980.
- Pieske, B., Maier, L. S., Piacentino, V., Weisser, J., Hasenfuss, G., et al. (2002) Rate dependence of  $[Na^+]_i$  and contractility in nonfailing and failing human myocardium, *Circulation*, **106**, 447-453, doi: 10.1161/01.CIR.0000023042.50192.F4.
- Despa, S., Islam, M. A., Weber, C. R., Pogwizd, S. M., and Bers, D. M. (2002) Intracellular  $Na^+$  concentration is elevated in heart failure but  $Na/K$  pump function is unchanged, *Circulation*, **105**, 2543-2548, doi: 10.1161/01.CIR.0000016701.85760.97.
- Pogwizd, S. M., Sipido, K. R., Verdonck, F., and Bers, D. M. (2003) Intracellular  $Na$  in animal models of hypertrophy and heart failure: contractile function and arrhythmogenesis, *Cardiovasc. Res.*, **57**, 887-896, doi: 10.1016/S0008-6363(02)00735-6.
- Harris, D. A., and Das, A. M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart, *Biochem. J.*, **280**, 561-573, doi: 10.1042/bj2800561.
- Balaban, R. S. (2002) Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **34**, 1259-1271, doi: 10.1006/jmcc.2002.2082.
- Petrushanko, I. Y., Yakushev, S., Mitkevich, V. A., Kamanina, Y. V., Ziganshin, R. H., et al. (2012) S-glutathionylation of the  $Na, K$ -ATPase catalytic  $\alpha$  subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32195-32205, doi: 10.1074/jbc.M112.391094.
- Koltsova, S. V., Shilov, B., Birulina, J. G., Akimova, O. A., Haloui, M., et al. (2014) Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1 $\alpha$ -independent,  $[Na^+]_i$ / $[K^+]_i$ -mediated, excitation-transcription coupling, *PLoS ONE*, **9**, e110597-e110597, doi: 10.1371/journal.pone.0110597.
- Orlov, S. N., Birulina, Y. G., Smaglii, L. V., and Gusakova, S. V. (2017) In *Hypoxia and Human Diseases* (Zheng, J., and Zhou, C., eds.) IntechOpen, London, doi: 10.5772/65384
- Rose, C. R., and Konnerth, A. (2001) NMDA receptor-mediated  $Na^+$  signals in spines and dendrites, *J. Neurosci.*, **21**, 4207-4214, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-12-04207.2001.
- Verkhatsky, A., Noda, M., Parpura, V., and Kirischuk, S. (2013) In *Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications: Proceedings of the 6th International Conference on Sodium Calcium Exchange* (Annunziato, L., ed.) Springer US, Boston, pp. 295-305, doi: 10.1007/978-1-4614-4756-6\_25.
- Kapilevich, L. V., Kironenko, T. A., Zaharova, A. N., Kotelevtsev, Y. V., Dulin, N. O., et al. (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of  $[Na^+]_i$ / $[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling, *Genes Diseases*, **2**, 328-336, doi: 10.1016/j.gendis.2015.10.001.
- Kironenko, T. A., Milovanova, K. G., Zakharova, A. N., Sidorenko, S. V., Klimanova, E. A., et al. (2021) Effect of dynamic and static load on the concentration of myokines in the blood plasma and content of sodium and potassium in mouse skeletal muscles, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 370-381, doi: 10.1134/S0006297921030123.
- Jacobs, M. M., and Pienta, R. J. (1991) In *Vitamins and Minerals in the Prevention and Treatment of Cancer* (Jacobs, M. M., ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 228-245, doi: 10.1080/07315724.1994.10738223.
- Reshkin, S. J., A. Cardone, R., and Harguindey, S. (2013)  $Na^+$ - $H^+$  exchanger, pH regulation and cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **8**, 85-99, doi: 10.2174/157489213803902116.

23. Li, T., and Tuo, B. (2020) Pathophysiology of hepatic  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange (review), *Exp. Ther. Med.*, **20**, 1220-1229, doi: 10.3892/etm.2020.8888.
24. Boardman, L., Huett, M., Lamb, J. F., Newton, J. P., and Polson, J. M. (1974) Evidence for the genetic control of the sodium pump density in HeLa cells, *J. Physiol.*, **241**, 771-794, doi: 10.1113/jphysiol.1974.sp010684.
25. Pressley, T. A. (1988) Ion concentration-dependent regulation of Na, K-pump abundance, *J. Membr. Biol.*, **105**, 187-195, doi: 10.1007/BF01870996.
26. Kometiani, P., Tian, J., Nabih, Z., Gick, G., and Xie, Z. (2000) Regulation of Na/K-ATPase  $\beta$ 1-subunit gene expression by ouabain and other hypertrophic stimuli in neonatal rat cardiac myocytes, *Mol. Cell. Biochem.*, **215**, 65-72, doi: 10.1023/A:1026503319387.
27. Huang, L., Li, H., and Xie, Z. (1997) Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 429-437, doi: 10.1006/jmcc.1996.0320.
28. Wang, H., Yuan, W., and Lu, Z. (2001) Effects of ouabain and digoxin on gene expression of sodium pump  $\alpha$ -subunit isoforms in rat myocardium, *Chinese Med. J.*, **114**, 1055-1059, doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2001.10.111.
29. Qiu, J., Gao, H.-Q., Li, B.-Y., and Shen, L. (2008) Proteomics investigation of protein expression changes in ouabain induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells, *J. Cell. Biochem.*, **104**, 1054-1064, doi: 10.1002/jcb.21691.
30. Teixeira, M. P., and Rumjanek, V. M. (2014) Ouabain affects the expression of activation markers, cytokine production, and endocytosis of human monocytes, *Mediat. Inflamm.*, **2014**, e760368, doi: 10.1155/2014/760368.
31. Nakagawa, Y., Rivera, V., and Larner, A. C. (1992) A role for the Na/K-ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription, *J. Biol. Chem.*, **267**, 8785-8788, doi: 10.1016/s0021-9258(19)50347-7.
32. Peng, M., Huang, L., Xie, Z., Huang, W.-H., and Askari, A. (1996) Partial inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by ouabain induces the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.*, **271**, 10372-10378, doi: 10.1074/jbc.271.17.10372.
33. Ando, K., Omi, N., Shimosawa, T., Takahashi, K., and Fujita, T. (2001) Effects of ouabain on the growth and DNA synthesis of PC12 cells, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **37**, 233-238, doi: 10.1097/00005344-200103000-00001.
34. Numazawa, S., Inoue, N., Nakura, H., Sugiyama, T., Fujino, E., et al. (1996) A cardiotonic steroid bufalin-induced differentiation of THP-1 cells: involvement of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase inhibition in the early changes in proto-oncogene expression, *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 321-329, doi: 10.1016/0006-2952(96)00210-9.
35. Golomb, E., Hill, M. R., Brown, R. G., and Keiser, H. R. (1994) Ouabain enhances the mitogenic effect of serum in vascular smooth muscle cells: role of progesterone and digoxin-like substances, *Am. J. Hypertens.*, **7**, 69-74, doi: 10.1093/ajh/7.1.69.
36. Pinto, M. C. X., Kihara, A. H., Goulart, V. A. M., Tonelli, F. M. P., Gomes, K. N., et al. (2015) Calcium signaling and cell proliferation, *Cell Signal.*, **27**, 2139-2149, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.08.006.
37. Aizman, O., Uhlén, P., Lal, M., Brismar, H., and Aperia, A. (2001) Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13420-13424, doi: 10.1073/pnas.221315298.
38. Saunders, R., and Scheiner-Bobis, G. (2004) Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1054-1062, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04012.x.
39. Ottolia, M., Torres, N., Bridge, J. H. B., Philipson, K. D., and Goldhaber, J. I. (2013) Na/Ca exchange and contraction of the heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **61**, 28-33, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.06.001.
40. Askari, A. (2019) The sodium pump and digitalis drugs: dogmas and fallacies, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **7**, e00505, doi: 10.1002/prp2.505.
41. Taurin, S., Dulin, N. O., Pchejetski, D., Grygorczyk, R., Tremblay, J., et al. (2002) c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism, *J. Physiol.*, **543**, 835-847, doi: 10.1113/jphysiol.2002.023259.
42. Haloui, M., Taurin, S., Akimova, O. A., Guo, D.-F., Tremblay, J., et al. (2007)  $[\text{Na}^+]_i$ -induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements, *FEBS J.*, **274**, 3557-3567, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05885.x.
43. Koltsova, S. V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O. A., Tremblay, J., et al. (2012) Ubiquitous  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for  $\text{Ca}^{2+}_i$ -independent excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **7**, e38032-e38032, doi: 10.1371/journal.pone.0038032.
44. Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S. V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) Inversion of the intracellular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16545-16552, doi: 10.1074/jbc.274.23.16545.
45. Orlov, S. N., Taurin, S., Thorin-Trescases, N., Dulin, N. O., Tremblay, J., et al. (2000) Inversion of the intracellular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle cells by induction of RNA synthesis, *Hypertension*, **35**, 1062-1068, doi: 10.1161/01.HYP.35.5.1062.
46. Taurin, S., Seyrantepe, V., Orlov, S. N., Tremblay, T.-L., Thibault, P., et al. (2002) Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  ratio in cultured vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.*, **91**, 915-922, doi: 10.1161/01.RES.0000043020.45534.3E.
47. Zhou, X., Jiang, G., Zhao, A., Bondeva, T., Hirszel, P., et al. (2001) Inhibition of Na,K-ATPase activates PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-

- PK1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 46-51, doi: 10.1006/bbrc.2001.5126.
48. Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., Halle, A., Harms, C., Lautenschlager, M., et al. (2000) Inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium, *Neurosci. Lett.*, **283**, 41-44, doi: 10.1016/S0304-3940(00)00903-4.
  49. Trevisi, L., Visentin, B., Cusinato, F., Pighin, I., and Luciani, S. (2004) Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 716-721, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.027.
  50. Orlov, S. N., Klimanova, E. A., Tverskoi, A. M., Vladychenskaya, E. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2017)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -dependent and -independent signaling triggered by cardiotoxic steroids: facts and artifacts, *Molecules*, **22**, doi: 10.3390/molecules22040635.
  51. Petrov, A. M., Kravtsova, V. V., Matchkov, V. V., Vasiliev, A. N., Zefirov, A. L., et al. (2017) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **312**, C627-C637, doi: 10.1152/ajpcell.00365.2016.
  52. Bezanilla, F. (2008) How membrane proteins sense voltage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 323-332, doi: 10.1038/nrm2376.
  53. Sidorenko, S., Klimanova, E., Milovanova, K., Lopina, O. D., Kapilevich, L. V., et al. (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent signaling and elevated  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72-86, doi: 10.1016/j.ceca.2018.09.007.
  54. Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., et al. (2013) The vascular endothelium and human diseases, *Int. J. Biol. Sci.*, **9**, 1057-1069, doi: 10.7150/ijbs.7502.
  55. Xiao, L., and Harrison, D. G. (2020) Inflammation in hypertension, *Can. J. Cardiol.*, **36**, 635-647, doi: 10.1016/j.cjca.2020.01.013.
  56. Minegishi, S., Luft, F. C., Titze, J., and Kitada, K. (2020) Sodium handling and interaction in numerous organs, *Am. J. Hypertension*, **33**, 687-694, doi: 10.1093/ajh/hpaa049.
  57. Oberleithner, H., and Welhemi, M. (2015) Vascular glycocalyx sodium store – determinant of salt sensitivity? *Blood Purif.*, **39**, 7-10, doi: 10.1159/000368922.
  58. Charbonier, F. W., Zamani, M., and Huang, N. F. (2019) Endothelial cell mechanotransduction in the dynamic vascular environment, *Adv. Biosystems*, **3**, 1800252, doi: 10.1002/adbi.201800252.
  59. Dmitrieva, N. I., and Burg, M. B. (2015) Elevated sodium and dehydration stimulate inflammatory signaling in endothelial cells and promote atherosclerosis, *PLoS One*, **10**, e0128870, doi: 10.1371/journal.pone.0128870.
  60. Thowsen, I. M., Karlsen, T. V., Nikpey, E., Haslene-Hox, H., Skogstrand, T., et al. (2022)  $\text{Na}^+$  is shifted from the extracellular to the intracellular compartment and is not inactivated by glycosaminoglycans during high salt conditions in rats, *J. Physiol.*, **600**, 2293-2309, doi: 10.1113/JP282715.
  61. Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Parshina, E. Y., Tverskoi, A. M., et al. (2021)  $\text{Na}^+_i/ \text{K}^+_i$  imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl, *Heliyon*, **7**, e08088, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08088.
  62. Fedorov, D., Sidorenko, S., Yusipovich, A., Bukach, O., Gorbunov, A., et al. (2022) Increased extracellular sodium concentration as a factor regulating gene expression in endothelium, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 488-498, doi: 10.1134/S0006297922060013.
  63. Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., et al. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms, *Physiol. Rev.*, **78**, 247-306, doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.247.
  64. Mongin, A. A., and Orlov, S. N. (2001) Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor, *Pathophysiology*, **8**, 77-88, doi: 10.1016/S0928-4680(01)00074-8.
  65. Hoffmann, E. K., and Pedersen, S. F. (2011) Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways, *Acta Physiol.*, **202**, 465-485, doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02190.x.
  66. Neuhofer, W. (2010) Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic stress, *Curr. Genomics*, **11**, 584-590, doi: 10.2174/138920210793360961.
  67. Koltsova, S. V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2015) Transcriptomic changes in  $\text{Ca}^{2+}$ -depleted cells: Role of elevated intracellular  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  ratio, *Cell Calcium*, **58**, 317-324, doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.009.
  68. Shiyan, A. A., Sidorenko, S. V., Fedorov, D., Klimanova, E. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2019) Elevation of intracellular  $\text{Na}^+$  contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage, *Cell. Physiol. Biochem.*, **53**, 638-647, doi: 10.33594/000000162.
  69. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Tverskoi, A. M., Shiyan, A. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2019) Search for Intracellular sensors involved in the functioning of monovalent cations as secondary messengers, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1280-1295, doi: 10.1134/S0006297919110063.
  70. Verma, A., Halder, K., Halder, R., Yadav, V. K., Rawal, P., et al. (2008) Genome-wide computational and expression analyses reveal G-quadruplex DNA motifs as conserved cis-regulatory elements in human and related species, *J. Med. Chem.*, **51**, 5641-5649, doi: 10.1021/jm800448a.
  71. Rhodes, D., and Lipps, H. J. (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8627-8637, doi: 10.1093/nar/gkv862.
  72. Lago, S., Nadai, M., Cernilogar, F. M., Kazerani, M., Domínguez Moreno, H., et al. (2021) Promoter G-quadruplexes and transcription factors cooperate to shape the cell type-specific transcriptome, *Nat. Commun.*, **12**, 3885, doi: 10.1038/s41467-021-24198-2.
  73. Huppert, J. L., and Balasubramanian, S. (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 406-413, doi: 10.1093/nar/gkl1057.

74. Eddy, J., and Maizels, N. (2006) Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 3887-3896, doi: 10.1093/nar/gkl529.
75. Balaratnam, S., and Basu, S. (2015) Divalent cation-aided identification of physico-chemical properties of metal ions that stabilize RNA G-quadruplexes, *Biopolymers*, **103**, 376-386, doi: 10.1002/bip.22628.
76. Sen, D., and Gilbert, W. (1990) A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA, *Nature*, **344**, 410-414, doi: 10.1038/344410a0.
77. Włodarczyk, A., Grzybowski, P., Patkowski, A., and Dobek, A. (2005) Effect of ions on the polymorphism, effective charge, and stability of human telomeric DNA. Photon correlation spectroscopy and circular dichroism studies, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 3594-3605, doi: 10.1021/jp045274d.
78. Grand, C. L., Han, H., Muñoz, R. M., Weitman, S., Von Hoff, D. D., et al. (2002) The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth *in vivo*, *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 565-573.

## SODIUM IONS AS REGULATORS OF TRANSCRIPTION IN MAMMALIAN CELLS

### Review

**O. D. Lopina\*, D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, O. V. Bukach, and E. A. Klimanova\***

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

The maintenance of an uneven distribution of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions in the cytoplasm and in the extracellular medium is the basis for the functioning of any animal cell. Changes in the intracellular ratio of these cations occur in response to numerous stimuli and are of important regulatory importance. A great number of experimental data have been presented in the literature to date showing that there is a mechanism of gene transcription regulation in mammalian cells by changing the intracellular [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ratio. In this review possible ways of realization of such mechanisms in various cell types are considered with special attention to [Ca<sup>2+</sup>]-independent signaling pathways, which suggest the presence of an intracellular sensor of monovalent cations. As such a sensor, we propose to pay attention to the secondary structures of nucleic acids called G-quadruplexes. They are widely represented in the mammalian genome and are often found in the promoters of genes encoding transcription factors.

*Keywords:* sodium, potassium, transcription regulation, G-quadruplexes, endothelium, proinflammatory response