# ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

# ДЗРЕЯН ВАЛЕНТИНА АЛЕКСАНДРОВНА

# АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ р53 И E2F1 КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

1.5.4 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

# Научный руководитель:

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Демьяненко С.В.

Ростов-на-Дону – 2022

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Проблема терапии нейротравм	14
1.2 Экспериментальные модели нейротравмы	15
1.3 Ацетилирование/деацетилирование гистонов	19
1.3.1 Ферменты ацетилирования и деацетилирования белков	20
1.3.2 Ацетилирование/деацетилирование негистоновых белков	25
1.3.2.1 Белок р53	
1.3.2.2 Фактор транскрипции E2F1	
1.4 Молекулярные и эпигенетические механизмы аксотомии	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Эксперименты на животных	
2.1.1 Двусторонне аксотомированные ганглии брюшной нервной	і цепочки
речного рака	
2.1.2 Аксотомированные дорзальные ганглии крыс	
2.2 Методы исследования	
2.2.1 Протеомное исследование экспрессии сигнальных белков в	ганглиях
БНЦ рака	
2.2.2 Выделение суммарной мРНК и ПЦР в реальном времени	
2.2.3 Выделение ядерной и цитоплазматической фракций спинно	мозговых
ганглиев крыс и ганглиев брюшной нервной цепочки речного рака.	47
2.2.4 Иммуноблоттинг	49
2.2.5 Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание	
2.2.6 Коиммунопреципитация	
2.2.7 Анализ активности гистондеацетилаз	

2.2.8 Анализ близкого лигирования 55
2.2.9 Визуализация апоптотических клеток 56
2.2.10 Ингибиторный анализ 57
2.2.11 Статистический анализ 58
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ
3.1 Протеомное исследование изменений содержания сигнальных белков в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки (БНЦ) рака 60
3.2 Вестерн-блот анализ влияния аксотомии на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях БНЦ рака
3.3 Апоптоз нейронов и глиальных клеток в ганглиях дорсальных корешков крысы после перерезки седалищного нерва
3.4 Влияние перерезки седалищного нерва на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крыс
3.4.1 Уровень белка p53 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях
3.4.2 Уровень белка E2F1 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях
3.4.3 Уровень каспазы 3 и ее активной формы в аксотомированных DRG крыс
3.4.4 Уровень ацетилирования гистонов НЗ и Н4 в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крыс после аксотомии
3.4.5 Уровень HDAC1 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях
3.4.6 Уровень HDAC2 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях

3.4.7 Уровень HDAC3 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и
цитоплазматических фракциях
3.5 Уровень мРНК HDAC1, HDAC2, p53 и E2F1 в DRG крыс на разные
сроки после аксотомии
3.6 Локализация HDAC1 в нейронах DRG ганглия крысы через 1, 4 и 24 часа
после перерезки седалищного нерва
3.7 Локализация p53 в нейронах DRG ганглия крысы через 1 и 24 часа после
перерезки седалищного нерва
3.9 Эндогенное белок – белковое взаимодействие факторов транскрипции
р53 и E2F1 с HDAC192
3.10 Анализ активности HDAC1 по отношению к E2F1 и p53 через 24 часа
после аксотомии
3.11 Нейропротекторный эффект ингибирования HDAC вальпроатом натрия
3.12 Влияние фармакологического ингибирования E2F1 in vivo на уровень
апоптоза и содержание проапоптотических белков в аксотомированных
DRG крыс 107
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ110
4.1 Участие проапоптотических белков E2F1, p53 и каспазы 3 в гибели
клеток аксотомированных DRG крыс110
4.2 Участие HDAC1, HDAC2 HDAC3 в гибели клеток аксотомированных
DRG крыс 120
4.3 Ацетилирование/деацетилирование p53 и E2F1 при аксотомии 124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ВЫВОДЫ135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ137

#### **ВВЕДЕНИЕ**

проблемы. Актуальность Посттрансляционному ацетилированию/деацетилированию с помощью гистонацетилтрансфераз (HAT) и деацетилаз гистонов (HDAC) подвергаются не только гистоны, но и негистоновые белки, такие как шапероны, сигнальные белки, факторы ацетилирование/деацетилирование транскрипции. Через регулируется белков, белок-белковые взаимодействия активность негистоновых ИХ клеточная локализация, что определяет рост, дифференцировку, миграцию и выживание клеток как в норме, так и при патологии (Demyanenko et al., 2021; Chao et al., 2016).

Травмы периферических нервов (ТПН) – одна из распространенных причин инвалидизации и смертности населения и, как следствие, одна из актуальных проблем здравоохранения не только в России, но и во всем мире (Rishal, Fainzilber, 2014; Navarro et al., 2007). Ситуация ухудшается отсутствием эффективных нейропротекторов, способных защитить нервные клетки, особенно в первые часы после повреждения. Разработка новых подходов к поиску эффективных нейропротекторов требует более глубокого и всестороннего изучения внутриклеточных процессов регуляции выживания и смерти нервных клеток после повреждения.

В настоящей работе изучаются процессы ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков при аксональном повреждении, которое имеет место быть при бытовых и спортивных травмах, дорожно – транспортных происшествиях, ошибках медперсонала при проведении инъекций и т.д. (Abe, Cavalli, 2008; Casas et al., 2015), а также сопровождает ранние стадии нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и бокового амиотрофического склероза (Gandhi, Abramov, 2015; Batulan et al., 2006). Растущий объем знаний о биохимических процессах, череду которых вызывает аксотомия, указывают на

важную роль пострансляционных модификаций факторов транскрипции и сигнальных белков в реакциях посттравматических нейронов и глии. Однако, влияние ацетилирования/деацетилирования на функции белков при травматическом повреждении нервов практически не изучено.

ацетилирования/деацетилирования белков Изучение негистоновых началось в связи с успехами клинического использования ингибиторов HDACs в терапии различных форм рака и было обусловлено поиском причин цитотоксичности неселективных ингибиторов HDAC (HDACi) (Chao et al., 2016; Lakshmaiah et al., 2014). Были идентифицированы негистоновые субстраты HDACs и HATs, которые являются супрессорами опухолей, медиаторами передачи сигналов, стероидными рецепторами, факторами транскрипции И ко-регуляторами, а также структурными белками, шаперонами и белками ядерного импорта (Spange et al., 2009; Mrakovcic et al., 2019). Количество идентифицированных белков, активность которых регулируется ацетилированием/деацетилированием на сегодняшний день наверняка ниже фактического количества, представляющего ацетилом in vivo. Исследований, направленных на изучение ацетилирования/деацетилирования нейродегенерации негистоновых белков В условиях крайне мало, а исследования этих процессов при травмах периферических нервов практически отсутствуют.

HDACs и HATs широко представлены в нервной системе, однако роль разных изоформ HDACs в выживании и смерти нейронов и глии неоднозначна. Некоторые HDAC опосредуют процессы выживания, в то время как другие участвуют в нейротоксических реакциях клеток, а третьи могут проявлять как нейропротекторные, так и патологические свойства в зависимости от типа клеток, их внутриклеточной локализации и характера посттрансляционных модификаций ферментов (Demyanenko et al., 2020a; 2020b). Показано. ингибиторы HDACs (HDACi) что оказывают нейропротекторный эффект в опытах с моделированием повреждения спинного мозга (Kameda et al., 2018; Wong, Zou, 2014), а также при аксотомии

зрительного нерва (Schmitt et al., 2016; Weng et al., 2016). Исследование изоформ HDAC и HAT, которые способны взаимодействовать с факторами транскрипции и сигнальными белками в посттравматических нервных клетках способствовать будет разработке субстрат тканеспецифичных И нейропротекторов на основе ингибиторов HDAC. Выполненные на двух экспериментальных моделях аксотомии беспозвоночных и млекопитающих исследования позволили не только установить сам факт взаимодействия HDAC и НАТ с негистоновыми белками, но и оценить в каких клетках – нейронах или глии, в каких компартментах клеток и в какой период после травмы происходит ацетилирование/деацетилирование регуляторных белков, как это влияет на апоптоз и регенерацию, а также насколько эволюционно древним является данный механизм регуляции активности белков.

**Цель работы.** Исследование процессов ацетилирования и деацетилирования факторов транскрипции E2F1 и p53 в нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в различные периоды после аксотомии периферических нервов.

#### Задачи:

1. Провести протеомное исследование изменения уровня сигнальных и нейрональных белков в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки речного рака на ранних сроках после аксотомии. Установить потенциальные терапевтические мишени – белки, уровень которых повышался в ответ на аксотомию в первые часы.

2. Исследовать уровень И внутриклеточную локализацию эпигенетических сигнальных белков, И содержание которых повышалось в аксотомированных ганглиях речного рака в первые часы после повреждения: гистондеацетилаз I класса HDAC1, HDAC2 и HDAC3, факторов транскрипции E2F1 и p53 и их ацетилированных форм, а также каспазы 3 и ее активной формы в нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в разные сроки после аксотомии.

3. Изучить белок-белковые взаимодействия ацетилированных форм факторов транскрипции E2F1 и p53 с различными изоформами HDAC I класса после перерезки седалищного нерва крыс.

4. Оценить деацетилазную активность HDAC I класса в аксотомированных спинномозговых ганглиях крысы.

5. Оценить влияние ингибирования гистондеацетилаз HDAC I класса вальпроатом натрия на содержание и внутриклеточную локализацию факторов транскрипции p53 и E2F1 и их ацетилированных форм

6. Изучить влиние ингибирования фактора транскрипции E2F1 и гистондеацетилаз HDAC I класса на уровень апоптоза в аксотомированных ганглиях крыс.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведено исследование экспрессии и внутриклеточной локализации гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, а также факторов транскрипции E2F1 и p53 в нейронах и глиальных клетках аксотомированных ганглиев речного рака и крысы в острейший и ранний восстановительный периоды после перерезки седалищного нерва. Изучены белок-белковые взаимодействия факторов транскрипции E2F1 и p53 с различными изоформами HDAC I класса. Полученные данные позволили определить, какая изоформа HDAC I класса способна деацетилировать белки-регуляторы апоптоза E2F1 и p53 в клетках ганглиев в разные периоды времени после аксотомии.

После выявления пар белков «субстрат-фермент» определена деацетилазная активность изоформ HDAC I класса в отношении конкретного белка. Это позволило при помощи доступных ингибиторов HDAC I класса перейти к установлению зависимости между ацетилированием регуляторного белка и его активностью в отношении нижестоящих мишеней, а также апоптозом клеток ганглиев после аксонального повреждения.

Научно-практическая значимость. Проведенные исследования позволили выявить два основных фактора транскрипции p53 и E2F1, которые подвергаются посттрансляционному ацетилированию В клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в ранний период после аксотомии, что в значительной степени определяет судьбу клетки. В работе показаны сайты ацетилирования, клеточная и внутриклеточная локализация ацетилированных белков И определены изоформы ферментов деацетилирующих p53 и E2F1. Удалось оценить влияние ацетилирования на внутриклеточную локализацию p53 и E2F1 и апоптоз клеток аксотомированных ганглиев беспозвоночных и млекопитающих. Эти знания лягут в основу теоретической базы, которая может быть далее использована для разработки новых селективных ингибиторов HDAC в потенциальных нейропротекторов, качестве защищающих нейроны И глиальные клетки на ранних сроках после аксонального стресса.

Сфокусированность проекта на механизмах ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков, позволит по-новому взглянуть на функции гистонацетилтрансфераз и деацетилаз гистонов, которые могут быть более обширными, чем регуляция транскрипции. Результаты работы оригинальны и научно значимы, поскольку процессы ацетилирования/деацетилирования регуляторных белков находятся в начале пути изучения.

## Положения, выносимые на защиту:

1. Выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдаются уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков повышается, а 31 белка - снижается. Через 3 часа наблюдается повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков

снижаются. При этом, в аксотомированных ганглиях одновременно экспрессируются белки, участвующие как в нейродегенерации, среди которых узучаемые нами белки HDAC1, HDAC2, p53, E2F1, каспаза 3, а также ряд других белков (Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF и другие), так и в нейропротекции (Bcl-х, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов).

2. B аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наиболее ранние и специфичные изменения наблюдаются со стороны гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, экспрессия которых увеличивается уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 аксотомированных нейронах В ганглиев повышается через 4 часа, а проапоптотических белков р53, активированной 3 через 24 часа. каспазы Уровень ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) снижаются в цитоплазме нейронов ганглиев через 24 часа после аксотомии.

3. Нейротравма вызывает транслокацию HDAC1, факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после аксотомии и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после повреждения.

4. Аксотомия седалищного нерва ассоциирована с повышением экспрессии и активности HDAC1 в аксотомированных ганглиях крыс, что приводит к снижению ацетилированного p53 (K373) и ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазме нейронов.

5. Введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и увеличивает уровень ацетилирования p53 и E2F1 по K373 и K120, соответственно в нейронах ганглиев, защищая их клетки от апоптоза.

 6. Ингибирование активности E2F1 оказывает выраженное нейропротекторное действие: полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию белков p53 и активной каспазы
3, защищая аксотомированные ганглии от апоптоза.

Личный вклад автора. Личное участие автора заключалось в постановке и проведении экспериментальных исследований, в получении всех видов изображений, систематизации, обработке и интерпретации всех полученных данных. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с д.б.н., ведущим научным сотрудником лаборатории «Молекулярная нейробиология» С.В. Демьяненко. Проведение операционных процедур по аксотомии и выделению ганглиев осуществлялось совместно с младшим научным сотрудником

Степень достоверности. Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Статистический анализ проводили в SigmaPlot 12.5. Все эксперименты были выполнены минимум в 3х независимых биологических повторах. Статистическую оценку различий между экспериментальными группами проводили с помощью t-теста, а также 1-Way ANOVA и 2- Way ANOVA. Высокая степень достоверности результатов достигалась благодаря достаточному количеству животных в верификацией экспериментальных группах, полученных данных альтернативными методами, использованию сертифицированного научного оборудования И реагентов, позволило сопоставлять полученные ЧТО результаты с результатами других авторов.

Апробация, публикации. внедрение, Материалы диссертации представлены всероссийских конференциях: на И международных Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, Россия, 2019, 2021), Научно-практической конференции С международным участием «Генетика — фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов на Дону, Россия, 2019), Международном симпозиуме «Оптика и биофотоника» «Saratov Fall Meeting» (Саратов, Россия, 2016, 2017, 2021), XIV интернациональной конференции «International Conference on Neuroptrotective agents» (Колорадо, США, 2018), XVIII международной конференции «Биомембраны-2018» (Долгопрудный, Россия, 2018), XXVI Европейской конференции по апоптозу «Cell death in disease: from small molecules to translational medicine» (Санкт-Петербург, Россия, 2018), VI Съезде биохимиков России (Сочи, Дагомыс, Россия, 2019), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов» (Москва, Россия, 2021, 2022), IX Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике на тему: «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям» (виртуальная конференция, 2021), Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов – на – Дону, Россия, 2019, 2020, 2021), VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, Россия, 2021), Международном Конгрессе: VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПБГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, Россия. 2019), XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Россия, Гатчина, 2019, 2020), на заседании лаборатории «Молекулярная нейробиология» (Ростов-на-Дону, Россия, 2022).

Результаты научных исследований вошли в отчеты по грантам Минобрнауки России № 6.6324.2017/8.9 и №6.4851.2017/6,7.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 40 работ, из них: 27 публикаций в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень

ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 13 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

Конкурсная поддержка работы. Проведенные исследования поддержаны стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики, на 2022-2024 годы (СП-5690.2021.4), а также проектами Минобрнауки России (№ 6.6324.2017/8.9 и №6.4851.2017/6,7).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 157 страницах, включает 3 таблицы и 37 рисунков. Список литературы содержит 189 источников, из них 188 зарубежных.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1 Проблема терапии нейротравм

Травмы периферических нервов (ТПН) на сегодняшний день являются одной из распространенных причин инвалидизации и смертности населения во всем мире (Berezhnaya et al., 2017; Rishal, Fainzilber, 2014; Navarro et al., 2007). Любая нейротравма представляет собой каскад молекулярно – клеточных событий и любое обсуждение основополагающих механизмов нейротравмы требует хорошей основы. Кроме того, существующая гетерогенность внутри нейротравм создает дополнительные трудности их исследования, а также сложности в диагностике и подборе правильного лечения (Richardson et al., 2009; Abe, Cavalli, 2008). Поэтому будущие исследования необходимы для понимания более конкретных нейрональных и молекулярных механизмов травматического повреждения нервной ткани. Новые исследования в данной теме, с одной стороны, будут способствовать укреплению и дополнению современного понимания структурных и функциональных изменений, вызванных травмой, с другой стороны, помогут обеспечить инновационные подходы к восстановлению и терапевтическому вмешательству.

Ситуация ухудшается в связи с отсутствием эффективного нейропротектора для защиты ткани в первые часы после повреждения (Li et al., 2014). Поэтому актуальными остаются исследования клеточномолекулярных механизмов повреждения периферической нервной системы на модельных объектах.

На сегодняшний день для идентификации аксонального повреждения используютсятакие подходы как: нейровизуализация, анализ сыворотки и спиномозговой жидкости на наличие биохимических маркеров (S100, NSE, cleaved Tau protein, и др.), иммуногистохимия с антителами против  $\beta$ -APP и NF-68/NF-200 для выявления нарушений аксонального транспорта И нейрофиламентов, структурных повреждений а электронная также микроскопия (Wang, Ma, 2010). Однако, имеющиеся на сегодняшний день биомаркеры аксонального повреждения, полученные на основе доклинических моделей, отличаются низкой специфичностью, что требует усовершенствования доклинических моделей и дополнительных исследований (Manivannan et al., 2018).

#### 1.2 Экспериментальные модели нейротравмы

Аксональное повреждение, на котором мы остановили свое внимание, имеет место быть при спортивных и бытовых травмах, ошибках медперсонала при проведении инъекций, а также дорожно – транспортных происшествиях, и т.д. (Casas et al., 2015; Abe, Cavalli, 2008). В дополнение к этому, повреждение аксона сопровождает ранние стадии нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, а кроме того, развитие бокового амиотрофического склероза (Gandhi, Abramov, 2012; Batulan et al., 2006).

Аксотомия относится к механическим повреждениям нервов И представляет собой полную перерезку нерва, инициирующую сложный каскад сигнальных и метаболических процессов, направленных на гибель или выживание нейрона. Даже несмотря на значительные микрохирургические инновации в восстановлении периферических нервов, результаты лечения с 1940-х годов мало улучшились, что отражает не достаточное понимание нейрональных и молекулярных механизмов повреждения и регенерации нервов. Индуцированная аксотомией гибель нейронов является наиболее фундаментальной проблемой, опубликованные И, учитывая недавно результаты, данная работа несет в себе научный потенциал и является своевременной (Attwell et al., 2018).

С конца 1980-х годов многие исследователи пытались разработать модели, которые могут точно воспроизводить различные аспекты нейротравмы (Wang, Ma, 2010): к примеру, модели растяжения, механического или гидростатического сдавливания, гидродинамического удара, удара

падающего груза, рассечения нерва (Wang, Ma, 2010; Challa, 2014; Hill et al., 2016).

Экспериментальные модели травматического аксонального повреждения обычно включают модели in vivo, модели in vitro, физические модели и математические модели (Challa, 2014).

Данные исследований с использованием моделей *in vivo*, дополненных *in vitro*, физическими и математическими моделями, способствовали растущему пониманию механизмов повреждения. Модели *in vivo* проливают свет на условия травматической нагрузки и позволяют исследовать патологические, физиологические И поведенческие изменения, происходящие при травматическом повреждении. Они также позволяют оценивать новые терапевтические и профилактические стратегии. Модели In vitro позволяют точно и воспроизводимо контролировать внеклеточную среду и являются лополнением к моделям in vivo. Они особенно полезным хорошо приспособлены для изучения биохимических изменений В ответ на повреждение и для быстрой оценки потенциальных терапевтических стратегий. Поскольку каждая экспериментальная модель предлагает определенные преимущества, но также имеет определенные недостатки, выбор экспериментальной модели зависит как от целей исследования, так и от Хотя обсуждаемые здесь экспериментальные модели основных задач. расширили наше понимание молекулярных основ травмы, все модели являются упрощенными формами повреждений, с которым сталкиваются пациенты, и неотражают достоверно сложность клинически значимых событий. Это может объяснить расхождения, обычно встречающиеся между доклиническими клиническими испытаниями нейропротекторных И препаратов. Потребуются дальнейшие усовершенствования существующих экспериментальных моделей, чтобы более полно воспроизвести разнообразные сложности нейротравмы человека и облегчить переход новых терапевтических стратегий из лаборатории в клинику (Abe, Cavalli, 2008; Challa, 2014).

Для максимальной надежности И достоверности данных экспериментальные модели должны соответствовать следующим критериям: травматическое аксональное повреждение является преобладающим патологическим изменением, происходящим после травмы; Механизм повреждения напоминает, насколько это возможно, механизмы, которые, как известно, лежат в основе аксонального повреждения у пациентов; Модель может воспроизводить различные степени повреждения; В идеале, тяжесть травмы должна зависеть от степени приложенной механической силы; Механическое воздействие можно точно контролировать; ответ на травму также должен быть поддающимся количественной оценке, клинически значимым и воспроизводимым для разных исследователей и лабораторий; Другие критерии включают низкую стоимость, простоту и удобство использования, широкое применение (Wang, Ma, 2010).

Различные моделели аксотомии на объектах с разным уровнем организации (Danio rerio, zebra fish, цыплята, хомяки, крысы, мыши и т.д.) хорошо приспособлены для изучения биохимических изменений в ответ на травму и для быстрой оценки возможных терапевтических стратегий (Hill et al., 2016). Перечислим популярные модели аксотомии и нейродегенерации периферических нервов: аксотомия зрительного нерва (Magharious et al., 2011), модель повреждения аксона у *Drosophila* (Purice et al., 2017), модель *zebrafish* с аксотомией зрительного нерва (Nagashima et al., 2011), повреждение спинного мозга (Gower et al., 1989), модель бокового амиотрофического склероза на клеточной культуре (Batulan et al., 2006), модель аксотомии на культуре клеток спинного мозга (Batulan et al., 2005), аксотомия лицевого нерва хомяка (Newfry, Jones, 1998) и другие.

В нашей лаборатории исследование молекулярно – биохимических изменений при травматическом повреждении периферической нервной системы проводилось на следующих модельных объектах с разным уровнем организации: в аксотомированных ганглиях корешков спинного мозга (DRG, dorsal root ganglia) крысы (Dzreyan et al., a2021; Dzreyan et al., 62021; Dzreyan et al., b2021; Dzre

al., 2022), ганглиях брюшной нервной цепочки (БНЦ) (Demyanenko et al., 2021; Demyanenko et al., 2019) и абдоминальном рецепторе растяжения (PPP) речного рака *Astacus leptodactylus* (Fedorenko, Uzdensky, 2008; Khaitin et al., 2015; Rudkovskii et al., 2020; Rodkin et al., 2020). Используемые нами модели аксотомии представлены на рисунке 1.

Проводимые нашим коллективом протяжении на многих лет исследования направлены на поиск веществ, ингибиторов или активаторов, направленно воздействующих на разные сигнальные пути, участвующие в выживании и гибели нервных клеток с перспективой их использования в терапии нейротравмы. За время проведенной работы нам удалось выявить ряд белков, вовлеченных в механизмы повреждения и защиты нервной ткани, среди которых эпигегетические регуляторы гистондеацетилазы, а также проапоптотические белки и факторы транскрипции (Dzreyan et al., 2021а; Dzreyan et al., 20216; Dzreyan et al., 2022; Demyanenko et al., 2021; Demyanenko et al., 2019; Fedorenko, Uzdensky, 2008; Khaitin et al., 2015; Rudkovskii et al., 2020; Rodkin et al., 2020).

Проведение экспериментов сразу на нескольких экспериментальных моделях, как на позвоночных, так и на беспозвоночных животных с разным позволяет получить уровнем организации сравнительные данные, а полученные знания смогут послужить теоретической базы, что поможет лучше понять фундаментальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов. Полученные знания могут лечь в основу теоретической базы, которая поможет лучше понять фундаментальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток после повреждения нервов. Кроме того, открытие механизмов повреждения нейронов и глии аксотомированных ганглиев может выявить новые мишени для лечения нейротравмы и ее последствий.

Последние обзоры повествуют о новой роли эпигенетики в травматическом повреждении нервов (Saha et al., 2018; Schmitt et al., 2016; Wong, Zou, 2014) и их регенерации (Shin, Cho, 2017; Wahane, 2019; Kameda et

al., 2018; Berry, Lu, 2016; Zhong, Zou, 2014). Также объясняется значение эпигенетических механизмов в нейропластичности, обучении и памяти (Phan et al., 2017). Данные последних исследований подтверждают участие таких эпигенетических механизмов, как метилирование ДНК, посттрансляционная миРНК модификация хроматина И регуляция экспрессии генов В посттравматических нервных клетках, в основном центральной нервной системы. Однако роль эпигенетической регуляции при травматическом повреждении периферических нервов остается малоизученной, что делает данную область исследований еще более перспективной.

#### 1.3 Ацетилирование/деацетилирование гистонов

Считается, что первичные эпигенетические механизмы включают метилирование ДНК, модификации гистонов, включая метилирование и ацетилирование, и посттранскрипционные механизмы регуляции через малые некодирующие РНК (Bertogliat, 2019). Хотя область эпигенетики в настоящее время хорошо известна, интерес К эпигенетическим механизмам, участвующим в патофизиологии нейротравм, только недавно получил свое развитие. Действительно, последние обзоры по травмам ЦНС подтверждают актуальность эпигенетики в этой области, но они в значительной степени сосредоточены на патофизиологии инсульта (Bertogliat, 2019; Elder et al., 2013) и травмах спинного мозга (York et al., 2013). Это новая область исследований, которая потенциально может предложить важное и новое понимание биологии регенерации и восстановления посттравматических нервных клеток.

Посттрансляционные модификации субъединиц гистонов, с которыми ДНК ассоциируется в виде нуклеосом – один из хорошо изученных эпигенетических механизмов (Nagalakshmi et al., 2018; Harrison, 2013). Существует множество типов обратимых модификаций ковалентных гистонов, таких как ацетилирование лизина, метилирование лизина и аргинина, фосфорилирование серина и треонина, убиквитинирование лизина, рибозилирование Поли-АД $\Phi$  и сумоилирование (Nagalakshmi et al., 2018; Ruijter et al., 2003; Bannister, Kouzarides, 2011).

В соответствие с темой настоящей работы рассмотрим более подробно процессы ацетилирования и деацетилирование гистонов и негистоновых белков с участием гистонацетилтранфераз и гистондеацетилаз, соответственно.

#### 1.3.1 Ферменты ацетилирования и деацетилирования белков

Ацетилирование и деацетилирование гистонов и негистоновых белков осуществляется гистондеацетилазой (HDAC) и гистонацетилтрансферазой (HAT). Гистоновые ацетилтрансферазы (HATs) переносят ацетильные группы с ацетилкоэнзима А на є-аминогруппу остатков лизина, в то время как гистондеацетилазы (HDACs), напротив, катализируют удаление ацетильных групп. Поскольку гистоны были первыми идентифицированными мишенями деацетилаз ацетилтрансфераз, ферменты были И ЭТИ названы гистондеацетилазами и гистоновыми ацетилтрансферазы. Однако, помимо регуляции транскрипции, HAT/HDAC регулируют наиболее важные функции клеток путем ацетилирования/деацетилирования огромного количества негистоновых белков, которые всегда были их эволюционно первичными мишенями (Spange et al., 2009). Эти белки регулируют выживание и гибель клеток, репликацию, репарацию ДНК, клеточный цикл и реакцию клеток на стресс и старение.

#### Общая характеристика гистоновых ацетилтрансфераз

B зависимости внутриклеточной ОТ локализации гистоновые ацетилтрансферазы (HATs) классифицируются на типы А или Б, которые либо содержат, либо не содержат бромодомен (Marmorstein, Roth, 2001). НАТѕ типа А в основном ответственны за ацетилирование, связанное с транскрипцией. Цитоплазматические HATs типа Б ацетилируют de novo синтезированные гистоны негистоновые белки. Основываясь И на гомологии последовательностей, а также общих структурных особенностях и функциях,

НАТѕ были сгруппированы в три основные категории: GNAT (связаные с GCN5 N-ацетилтрансферазы), EP300/CREBBP (E1A связывающий белок p300/CREB-связывающий белок) и семейство MYST. PCAF (P300/CBPассоциированный фактор), относящийся к семейству GNAT, является наиболее важным ферментом, который ацетилирует негистоновые белки (Kimura et al., 2005).



Рисунок 1. Ферменты, осуществляющие ацетилирование и деацетилирование гистонов и негистоновых белков. Адаптированно из (Demyanenko, Sharifulina, 2021)

Кроме того, PCAF – единственная гистоновая ацетилтрансфераза, в которой даже при полном нокауте не наблюдается фенотипических изменений (Yamauchi et al., 2000). Внутриклеточная локализация и активность PCAF регулируются его ацетилированием. Аутоацетилирование PCAF или его ацетилирование p300 усиливает ацетилтрансферазную активность фермента и

приводит к его транслокации в ядро. Деацетилирование PCAF HDAC3 снижает активность фермента и способствует его цитоплазматической локализации (Santos-Rosa et al., 2003).

НАТ1 рассматривается как цитоплазматический белок. Фермент ацетилирует вновь синтезированные гистоны в цитоплазме перед их импортом в ядро (Yang et al., 2015).

## Общая характеристика гистондеацетилаз

Гистондеацетилазы (HDACs) - ферменты, которые регулируют экспрессию генов и механизмы в клетках путем удаления ацетильной группы с гистона и могут действовать как по пути, который зависит от метилирования ДНК, так и по пути, который не зависит от метилирования ДНК (Harrison, 2013).

Деацетилирование гистонов усиливает связывание гистонов и уплотняет хроматин, тем самым ограничивая факторам транскрипции доступ к регуляторным областям (Oger et al., 2008; Harrison, 2013).

У млекопитающих белки семейства HDAC в соответствии с функциями, клеточной локализацией, паттернов экспрессии можно разделить на четыре класса HDACs. Классы I (HDACs -1, -2, -3 и -8), II (HDACs -4, -5, -6, -7, -9 и - 10) и IV (HDAC) -11 представляют собой цинк-зависимые ферменты, в то время как ферменты класса III (Сиртуины) являются цинк-независимыми, но никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD) –зависимые (Oger et al., 2008).

Класс I HDACs локализуются в ядре, повсеместно экспрессируются в тканях млекопитающих (за исключением HDAC8, который специфичен для мышц). Эти ферменты участвуют в регуляции генов транскрипции через формирование стабильных транскрипционных комплексов. HDAC2 и HDAC3 играют важную роль в физиологии центральной нервной системы (Ruijter et al., 2003; Nagalakshmi et al., 2017). HDACs класса II подразделяются на класс IIa (HDAC-4, -5, -7, -9) и класса IIб (HDAC-6 и -10). Эти подклассы могут курсировать между цитозолем и ядром нервных клеток. HDAC4 локализуются

в дендритах. Класс III HDACs (SIRT 1-7) представляет собой класс NAD + зависимых ферментов, которые локализуются как в ядре, так и в цитоплазме: SIRT 1, SIRT 6 и SIRT 7 локализованы в ядре, в то время как SIRT 2 преимущественно в цитозоле и SIRT 3, SIRT 4 и SIRT 5 находятся исключительно в митохондриях. Класс IV HDAC (HDAC-11) конструктивно отличается от других групп, а также локализован в цитоплазме и ядре. HDAC11 является членом белкового комплекса «выживания моторного нейрона», играя функциональную роль в сплайсинге мPHK. HDACs также могут деацетилировать не гистоновые белки (супрессор p53 является одним из негистоновых целей ацетилирования / деацетилирования) (Oger et al., 2008; Harrison, 2013).

В соответствие с полученными данными, более подробно остановимся на HDACs I класса.

## Класс I (HDACs -1, -2, -3 и -8)

HDACs первого класса локализованы В основном В ядре, экспрессируются во всех тканях, имея самый высокий уровень экспрессии в мозге. HDACs катализируют удаление ацетильной группы N-ацетил-лизина гистонов, внесенные ферментами HATs в остатки лизина 9 (К9) и лизина14 (К14) гистона Н3 и лизинов 5 (К5), 8 (К8), 12 (К12) и лизина16 (К16) гистона H4, а также остатки некоторых лизинов гистонов H2A и H2B (de Ruijter et al., 2003). При ишемическом повреждении клеток мозга наблюдается изменение экспрессии ряда HDACs (Baltan et al., 2011, Demyanenko et al., 2021). Множество работ посвящены изучению роли HDACs в выживаемости и гибели клеток мозга после разного рода повреждений, синаптической пластичности и нейродегенерации. В многочисленных работах показано защитное действие неселективных ингибиторов HDAC на моделях инсульта и нейродегенерации у животных (Gibson, Murphy, 2010). Однако, недавние исследования свидетельствуют о TOM, ЧТО одни изоформы HDAC

способствуют гибели клеток, тогда как другие обладают защитным эффектом (Ruijter et al., 2003).

HDAC1 является молекулярным переключателем между выживаемостью нейронов и их гибелью в моделях нейродегенерации на мышах, взаимодействие HDAC1 с укороченной формой HDAC9 (histone deacetylase-related protein (HDRP)), экспрессия которого снижается во время гибели нейронов, приводит к выживаемости нейронов, в то время как взаимодействие HDAC1 с HDAC3 – к их гибели (Bardai et al., 2012). Взаимодействие HDAC1 с PHK/ДНК-связывающим белком FUS имеет важное значение для репарации двухцепочечных разрывов ДНК в нейронах при боковом амиотрофическом склерозе (Wang et al., 2009). HDAC1 является положительным регулятором транскрипции генов во время развития ЦНС позвоночных (Harrison et al., 2011), высказывается предположение о потенциально важной роли HDAC1 в пролиферации клеток мозга. Кроме того, показано, что HDAC1 контролирует выживаемость шванновских клеток, регулируя уровень активного бета-катенина, HDAC2 а активирует транскрипционную программу миелинизации.

В отличие от HDAC1 увеличение экспрессии HDAC2 приводит к снижению количества синапсов и синаптической пластичности, отрицательно влияет на формирование памяти (Guan et al., 2009; Morris et al., 2013). Наблюдается увеличение экспрессия HDAC2 в мозге у больных Альцгеймером, связанное со снижением синаптической пластичности и нарушением когнитивных функций (Graff et al., 2012). HDAC2 снижает синаптическую передачу возбуждения и повышает синаптическое торможение нейронов гиппокампа, участвующих в регуляции пластичности мозга.

Было показано, что уровень экспрессии HDAC3 значительно увеличивается в первые часы после экспериментального инсульта, при этом нокдаун HDAC3 способствует выживанию нейронов (Chen et al., 2012). Нейротоксическая активность HDAC3 была показана в ряде моделей ишемии и нейродегенерации (Bardai et al., 2012). Кроме того, рост экспрессии HDAC3

затрудняет формирование долговременной памяти. С другой стороны, HDAC3 участвует в репрессии транскрипции апоптоз-индуцирующего фактора E2F1 в нейронах, способствуя их выживаемости. HDAC 1, 2 и 3, которые ранее характеризовались ядерной локализацией, также были обнаружены и в цитоплазме клеток мозга через 24 часа после инсульта, что свидетельствует о более сложной роли HDAC в регуляции ответа клеток мозга на повреждение (Baltan et al., 2011).

Наименее изученным представителем гистондеацетилаз I класса является HDAC8. Селективный ингибитор HDAC8 – PCI-34051 обладает мощными нейропротекторными свойствами. При этом, его защитный эффект был обусловлен его способностью связывать металлы, а не ингибировать HDAC8 (Sleiman et al., 2014). Высокое содержание HDAC8 в цитоплазме и дендритах моноаминергических нейронов предполагает участие фермента не только в транскрипции генов, но и во внутриклеточном сигналинге (Takase et al., 2013).

# 1.3.2 Ацетилирование/деацетилирование негистоновых белков

Гистоновые деацетилазы помимо их функции в качестве эпигенетических регуляторов способны деацетилировать и централизованно регулировать активность некоторых факторов транскрипции, а также других белков в цитоплазме клеток (Sikder et al., 2020). Однако роль эпигенетических процессов, включая процессы деацетилирования негистоновых белков в регуляции гибели и выживаемости клеток после повреждения нервов, пока не изучена (Rosato et al., 2003; Yoon et al., 2019; Glozak et al., 2005; Downey et al., 2021; Sikder et al., 2020).

Негистоновые субстраты НАТ/НDAC включают белки-супрессоры опухолей (например, p53, RUNX3), медиаторы передачи сигналов (например, STAT3, β-катенин, SMAD7), стероидные рецепторы (например, андрогены, эстрогены, SHP), факторы транскрипции и корегуляторы (например, с-Мус,

HMG, YY1, EKLF, E2F1, факторы GATA, HIF-1, MyoD, NF- кВ, FoxB3), а также структурные (например, белки подвижности клеток), шаперонные и ядерные импортные белки (например, альфа-тубулин, импортин-α, Ки70, HSP90) (Spange et al., 2009; Mrakovcic et al., 2019; Glozak et al., 2005). Ацетилирование негистоновых белков может влиять на многие молекулярные функции этих белков, такие как сплайсинг мРНК, транспорт и целостность мРНК, трансляция белка, активность белка, локализация, стабильность и взаимодействия (Spange et al., 2009; Downey et al., 2021; Sikder et al., 2020), и этот список обновляется каждый год. Эти белки определяют рост, дифференцировку, миграцию и выживание клеток, как в нормальных условиях, так И при повреждении. Следовательно, зависимые OT ацетилирования сигнальные пути являются ключевыми детерминантами Протеомные исследования гомеостаза. экспрессии сотен белков В аксотомирванных ганглиях БНЦ речного рака указывают на последовательное повышение уровня многих сигнальных белков, которые могут инициировать, опосредовать регулировать апоптоз, белков или а также ряда С антиапоптотическим эффектом (Demyanenko, Uzdensky, 2017; Uzdensky, 2019). На развитие апоптоза указывала повышенная экспрессия проапоптотических белков, таких как p53, p38, p75, c-Myc, E2F1, JNK, AIF, Par4, DYRK1A, NMDAR2a, GADD153, GAD65/67, Smac/DIABLO, каспаз и PSR. Однако в то же время повышался уровень антиапоптотических белков, в том числе рецепторы факторов роста EGFR и эстрогенов, протеинкиназ ERK 1 и 5, Akt, фосфатазы МКР-1, белков p63, p21Waf-1 и MDM2. Многие из этих белков являются ацетилированными и деацетилированными. Основные белки, которые играют центральную роль в координации решений о судьбе клетки, рассматриваются в данной работе более подробно.

## 1.3.2.1 Белок р53

Белок р53 исключительно важен и интересен. Он экспрессируется во всех клетках организма и регулирует основные клеточные функции, включая

метаболизм, клеточный цикл, репарацию ДНК, выживаемость и апоптоз (Napoli, Flores, 2017; Marcel et al., 2018; Simabuco et al., 2018). В качестве фактора транскрипции он регулирует экспрессию сотен генов (Fischer, 2017; Sullivan et al., 2018). В клетках с нерепарируемыми повреждениями ДНК р53 стимулирует апоптоз (Aubrey et al., 2018; Nicolai et al., 2015; Hofseth et al., 2004; Culmsee et al., 2005). Это позволяет устранять злокачественные клетки и защищать организм от раковых опухолей. Поэтому его называют супрессором опухолей и стражем генома. Мутации гена ТР53, инактивирующие р53, найдены в половине случаев рака человека. Однако р53 не только регулирует экспрессию генов, но также, независимо от транскрипции, регулирует митохондриальные функции И индуцирует апоптоз В клетках С митохондриальной недостаточностью (Wan et al., 2014; Wang et al., 2014; Dai et al., 2016). Этот древний консервативный белок найден у организмов на ранних эволюционных стадиях у простейших и губок, намного раньше, чем возникли раковые опухоли. Поэтому предполагается, что истинная роль белков семейства р53 заключается в поддержании целостности генома при неблагоприятных воздействиях на организм (Åberg et al., 2017; Joerger et al., 2016).

Обычно уровень белка p53 в цитоплазме поддерживается на низком уровне. После синтеза в цитоплазме он транспортируется в ядро, где связывается с ДНК. Несвязанный p53 образует комплекс с MDM2, который моноубиквитинирует его и транспортирует обратно в цитоплазму, где он дополнительно убиквитинируется и быстро деградирует в протеасомах (Gottifredi et al., 2016).

При сильных, нерепарируемых повреждениях ДНК, вызванных такими вредными факторами, как гипоксия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, ионизирующее излучение или нарушение функции ядрышка, увеличивается экспрессия p53. При этом ацетилируются почти все лизиновые остатки, и p53 начинает стимулировать экспрессию генов, кодирующих апоптотические белки: каспазы 6, Apaf-1, HtrA2, Bax, Bid, NOXA, PUMA, Fas, DR4, DR5 и т.п. Это приводит к апоптотической смерти клеток (Bonini et al., 2004; Rashi-Elkeles et al., 2011; Parlato, Kreiner, 2013; Woods et al., 2015). Но p53 может индуцировать апоптоз не только транскрипционным путем, но и независимо от транскрипции. Цитоплазматический p53 непосредственно связывается с наружной митохондриальной мембраной, ингибирует антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-XL, активирует проапоптотические белки Bax и Bid и стимулирует Bax/Bak-опосредованное формирование мегапор в наружной митохондриальной мембране, через которые цитохром с, SMAC/Diablo, AIF и другие проапоптотические белки выходят в цитозоль и вызывают апоптоз (Aubrey et al., 2018; Dai et al., 2016).

Разные посттрансляционные модификации регулируют активность p53, у которого 36 аминокислот могут подвергаться фосфорилированию, метилированию, ацетилированию, гликозилированию и т.д. (Kruse, Gu,2009).

Белок р53 является наиболее изученным негистоновым субстратом НАТ и HDAC. Роль ацетилирования/деацетилирования р53 в регуляции экспрессии генов и внутриклеточных сигнальных путей чрезвычайно важна. р53 был первым негистоновым белком, который был обнаружен с активностью, ацетилирования. Ацетилирование которая зависела ОТ p53 вызывает активацию многих генов, контролирующих остановку клеточного цикла и апоптоз (Bonini et al., 2004; Rashi-Elkeles et al., 2011; Parlato, Kreiner, 2013). p53 может быть ацетилирован с помощью гистонацетилтрансферазы р300/СВР по множественным остаткам лизина в пределах С-концевого регуляторного домена, что сильно коррелирует со стабилизацией и активацией белков (Kruse, Gu, 2009). Находящийся в комплексе с p300/CBP белок F также ацетилирует р53 в области сигнала ядерной локализации по лизину К320. Позже было показано, что p53 может in vivo ацетилироваться в ответ на множество разнообразных клеточных сигналов стресса. Белки p300/CBP и PCAF ацетилируют р53 по различным сайтам: р300/СВР – по К372, К373, К381 и K382 по C-концам, а PCAF – по K320 в линкерной области, соединяющей ДНК-связывающий и тетрамеризующий домены. Ацетилирование р53 по

каждому из этих двух участков приводит к значительному повышению трансактивационной функции p53 (Gu et al., 2004). В результате указанных процессов происходит стимуляция инициации транскрипции с p53-Гиперэкспрессия PCAF респонсивного промотора. способствовала регенерации сенсорных аксонов на расстоянии до 1 мм от места поражения в моделях повреждения спинного мозга. Две другие ацетилтрансферазы hMOF и TIP60 участвуют в ацетилирование p53 по K120 в ДНК-связывающем домене. Интересно, что данная модификация не влияет на стабильность р53 и его способность связывать ДНК, однако ацетилирование р53 вне С-концевого домена имеет решающее значение для активации таких проапоптотических генов как PUMA и BAX (Bonini et al., 2004; Rashi-Elkeles et al., 2011; Parlato, Kreiner, 2013; Woods et al., 2015). Фосфорилирование p53, активирующее, как функции, может облегчать ацетилирование известно, его белка. Фосфорилированный р53 более эффективно взаимодействует с НАТ (histone acetyltransferase), чем нефосфорилированный. Фосфорилирование p53 по Nконцевым остаткам усиливает взаимодействие р53 с р300.

В различных типах онкотрансформированных клеток было показано, что HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8 и SIRT1 могут деацетилировать р53, что приводит к снижению активности белка и подавлению транскрипции (Juan et al., 2000; Brooks et al., 2011; Ryu et al., 2017). В клетках колоректального рака HDAC6 деацетилирует p53 в лизинах 381/382. Сконцевые остатки лизина в p53 также деацетилируют HDAC1, HDAC2 и SIRT1. Ромидепсин, специфический ингибитор HDAC1/2, усиливает ацетилирование p53 в лизинах 320/372, но не в лизинах 381/382. SIRT1 преимущественно деацетилирует p53 в лизине 382 (Luo et al., 2001). Снижение уровня ацетилированного р53 у пациентов с колоректальным раком связано с увеличением экспрессии HDAC6. HDAC6 ингибитор A452 уменьшает количество ядерного HDAC6 и, следовательно, взаимодействие между HDAC6 и р53, что приводит к увеличению ацетилирования р53 в лизинах 381/382. Сумоилирование HDAC2 по лизину 462 в клетках колоректальной карциномы

позволяет HDAC2 для связывания с p53. Деацетилирование p53 в лизине 320 сумоилированным HDAC2 блокирует p53-зависимую экспрессию генов контроля клеточного цикла и апоптоза, уменьшая апоптоз, вызванный повреждением ДНК (Brandl et al., 2012). Генотоксический стресс индуцирует десумоилирование HDAC2, которое активирует p53 и стимулирует апоптоз. В клетках лимфомы p53 взаимодействует с HDAC1, HDAC3 и HDAC8 и становится деацетилированным, что уменьшает их апоптоз (Juan et al., 2000; Yu et al., 2002).

Таким образом, ацетилирование/деацетилирование регулирует активность p53 путем изменения экспрессии генов-мишеней. Более того, в разных типов клеток различные изоформы НАТ и HDAC участвуют в ацетилировании/ деацетилировании белка. р53 – многофункциональный moonlighting-белок, который действует как фактор транскрипции, функции которого опосредованы экспрессией множества белков. И как проапоптотический агент, непосредственно влияющий на митохондрии. Открытым остается вопрос об эпигенетической регуляции р53 в нервных клетках при аксотомии. Не изучено влияние аксотомии на субклеточную локализацию р53. Это имеет важное значение, поскольку при действии патологических факторах HDACs I класса могут перемещаться из ядра в цитоплазму и ацетилировать там различные цитоплазматические белки, включая транскрипционный фактор р53. Деацетилирование р53 способствует изменению его субклеточной локализации, как следствие этого, его активности. Это и предстоит изучить в настоящей работе.

## 1.3.2.2 Фактор транскрипции E2F1

Фактор транскрипции E2F1 играет важную роль в регуляции критических клеточных процессов, включая остановку клеточного цикла и апоптоз (Denechaud et al., 2017; Polager, Ginsberg, 2009; Stanelle, Pützer 2006; Dzreyan et al., 2021). Это делает его объектом интенсивных исследований в контексте профилактики и лечения рака (Liu, Hu, 2020; Stanelle, Pützer, 2006).

Однако, в дополнение к роли E2F1 в механизмах защиты от опухолей, на сегодняшний день имеются доказательства того, что E2F1 опосредует патологическую гибель клеток, вызывающую разрушение тканей (например, дегенерацию нейронов и ишемическое повреждение клеток) (Demyanenko et al., 2019; Dzreyan et al., 2020; Demyanenko, Uzdensky, 2016; MacManus et al., 2003). Недавние исследования различных моделей повреждения ЦНС, включая травму позвоночника (Ma et al., 2017; Liu et al., 2016; Wu et al., 2015), нейродегенеративные патологии (Ranganathan, Bowser, 2010; Giovanni et al., 2000) и церебральную ишемию (Zhao et al., 2019), выявили повышенную экспрессию этого белка. Эти результаты еще раз доказывают, что E2F1 может играть ключевую роль в заболеваниях, поражающих нервную систему. Белки семейства E2F содержат несколько эволюционно консервативных доменов, обнаруженных у большинства представителей этого семейства. Эти домены включают ДНК-связывающий домен, ломен димеризации, который определяет взаимодействие с другими факторами транскрипции, домен трансактивации, обогащенный кислыми аминокислотами, и домен ассоциации с белком-супрессором опухоли, который встроен в домен трансактивации. Этот белок и еще 2 члена семейства, E2F2 и E2F3, имеют дополнительный циклинсвязывающий домен. Этот белок связывается преимущественно с белком pRB ретинобластомы зависимым от клеточного цикла образом. Появляется все больше свидетельств того, что факторы транскрипции р53 и E2F1 посредством взаимодействия, могут регулировать друг друга координируя как пролиферацию, так и гибель клеток и, в конечном итоге, поддерживая гемостаз в живых организмах. При этом ингибирование пути p53/E2F1 предотвращает апоптоз нейронов (Camins et al., 2007).

Было показано, что ингибиторы гистоновых деацетилаз влияют на активность E2F1 (Abramova et al., 2006). В раковых клетках в ответ на генотоксический стресс, вызванный доксорубицином, E2F1 ацетилируется PCAF по трем лизинам (K117, 120 и 125). Это стабилизирует белок и увеличивает его специфическое связывание с ДНК (Martínez-Balbás et al., 2000; Ianari et al., 2004). Ацетилирование этих лизинов индуцирует накопление E2F1 убиквитинированного, НО стабильного (Galbiati et al., 2005). Ацетилирование E2F1 способствует рекрутированию модифицирующих хроматин ферментов и факторов репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Xia et al., 2020). HDAC1 действует как деацетилаза в различных типах раковых клеток (Martínez-Balbás et al., 2000; Zhang et al., 2014; Wu et al., 2015). В эпителиальных клетках сетчатки E2F1 деацетилируется Sirt1, ЧТО способствует устойчивости клеток к окислительному стрессу, вызванному H2O2 (Gong et al., 2020). Таким образом, ацетилирование/деацетилирование E2F1 может способствовать устойчивости различных типов клеток к повреждению. Однако в доступной нам литературе нам не удалось найти информацию об ацетилировании/деацетилировании E2F1 в клетках ПНС, как в нормальных условиях, так и при патологии.

#### 1.4 Молекулярные и эпигенетические механизмы аксотомии

Аксотомия представляет собой полный физический разрыв в аксоне, вызванный растяжением или перерезкой (Richardson et al., 2009). Перерезка нерва (аксотомия) характеризуется тремя основными молекулярноклеточными событиями: валлерова деградация отрезанного аксона, гибель поврежденного нейрона или его регенерация с отрастанием аксона и восстановлением нервных связей. Аксотомия (механическое повреждение аксонов) предоставляет полезные парадигмы для изучения клеточных ответов на повреждение, механизмов регенерации и пластичности, а также процессов, ведущих к дегенерации нервных клеток (Li et al., 2014; Challa, 2015).

Уязвимость нейронов к аксотомии зависит от ряда факторов, таких как локализация, возраст и расстояние. Внутренний ответ нейронов на повреждение аксонов заметно различается между нейронами периферической и центральной нервных систем. Нейроны периферической нервной системы (ПНС) обычно регенерируют и выживают, в то время как многие нейроны в центральной нервной системе (ЦНС) подвергаются дегенерации и гибели после аксотомии. Это связано с нейрональными факторами, такими как различия в экспрессии генов в ответ на аксотомию и ненейрональными факторами, такие как иммунные белки, тормозящие регенерацию, так и взаимодействие обоих типов факторы (Abe, Cavalli, 2008; Casas et al., 2015). Поэтому, усиление внутреннего регенеративного ответа нейронов будет быть одним из способов стимулировать регенерацию аксонов в поврежденной центральной нервной системе.

У очень молодых животных повреждение аксонов приводит К ретроградной дегенерации и гибели как в ПНС, так и в ЦНС (Casas et al., 2015). Как правило, чем более удалено поражение от сомы, тем более устойчивым к аксотомии является нейрон (Casas et al., 2015). Есть два основных предложения возможных механизмов передачи информации о травме к соме: а) механизм двойных сигналов, при котором оценивается расстояние до очага поражения на основе временной задержки между ранними и быстрыми потоками ионов, вызванными поражением, и более поздним приходом моторно-зависимых сигнальных комплексов; и (б) механизм, включающий непрерывное сканирование И регуляцию аксонального транспорта в двух направлениях (Gandhi, Abramov, 2012; Wang, Ma, 2010).

B настоящее рассматриваются время две формы аксотомии. «Первичная» аксотомия происходит, когда аксоны разрываются или перерезаются непосредственно при механическом воздействии на нервную ткань. Физическая перерезка аксона массово затрагивает его микроокружение и создает немедленное нарушение ионной регуляции. «Вторичная» аксотомия возникает после относительно незначительных повреждениях аксонов, такие как растяжение или диффузное повреждение аксонов при травме головного мозга (Wang, Ma, 2010).

При повреждении аксона происходит передача сигналов повреждения к соме, что вызывает дифференциальную экспрессию генов. На сегодняшний день обнаружено несколько механизмов, регулирующих ретроградную передачу сигналов о повреждении. К ним относятся приток

Са<sup>2+</sup>, локальный и ретроградный синтез аксоплазматических белков, прекращение притока питательных веществ с периферии (Weng et al., 2016; Shin, Cho, 2017). Повышенный уровень Ca<sup>2+</sup> активирует несколько сигнальных каскадов, чтобы инициировать регенерацию. Например, известно, что Ca<sup>2+</sup> активирует аденилатциклазу для повышения уровня внутриклеточного цАМФ, что впоследствии приводит к CREB-зависимой экспрессии генов (Rishal, Fainzilber, 2014). Кроме того, Ca<sup>2+</sup> влияет на эпигенетическую регуляцию, что изменяет форму транскриптома (Wahane et al., 2017; Weng et al., 2016). Исследования на ненейрональных типах клеток показали, что повышенный уровень Ca<sup>2+</sup> может способствовать ядерному экспорту HDAC4/5/7/9 за счет активации CaMK. Действительно, кальций-зависимый ядерный экспорт HDAC5 показан после аксотомии периферических нейронов, что в свою очередь увеличивает ацетилирование гистонов в нейронах DRG и инициирует регенеративную экспрессию генов in vitro (Weng et al., 2016).

Выявлено несколько белков, синтезируемых или активируемых при повреждении аксонов, которые могут участвовать в передаче сигнала повреждения. К ним относятся STAT3, JNK, MAPK и другие киназы (Berry, Lu, 2020). Они в свою очередь могут активировать нижестоящие факторы транскрипции через сложные пути, что вызывает измения паттернов экспрессии генов в поврежденных нейронах (Rishal, Fainzilber, 2014; Weng et al., 2016). Например, ретроградный транспорт фосфорилированного ERK1/2 активирует ELK1, тогда как JNK приводит к фосфорилированию с-JUN и активирует ATF3 (Mar et al., 2014). Недавние данные показали, что ERK-опосредованная ретроградная передача сигналов необходима для PCAF-опосредованного ацетилирования гистонов на промоторах нескольких RAG (Weng et al., 2016; Shin, Cho, 2017).

Хотя экспрессия генов, способствующих росту в зрелых нейронах, со временем снижается как в ПНС, так и в ЦНС, после аксонального повреждения нейроны ЦНС проявляют плохую регенеративную способность, тогда как нейроны ПНС способны к восстановлению утраченных связей, посредством активации транскрипции большого репертуара генов, связанных с регенерацией (RAG) (Weng et al., 2016; Shin, Cho, 2017). RAG – это гены, на экспрессию которых влияет передача сигналов повреждения (Weng et al., 2016). Кроме того, полногеномное исследование аксотомированных нейронов ПНС привело к гипотезе о том, что активация специфических факторов транскрипции (TF) может служить ключевым узлом в регуляторных сетях, переключающих нейроны ПНС В регенеративное состояние. К таким факторам транскрипции относят: CREB, c-Jun, Smad1, STAT3 и ATF3 (Storer et al., 2003; Bomze et al., 2001).

Нейроны ганглия задних корешков спинного мозга (DRG) уникальны тем, что они имеют как центральные, так и периферические аксоны (Martin et al., 2019; Esposito et al., 2019). Интересно, что поражения ветвей периферических аксонов, но не центральных ветвей аксонов, увеличивают глобальное ацетилирование гистонов H3 и H4 в нейронах DRG (Weng et al., 2016; Shin, Cho, 2017). In vitro показано, что аксональное повреждение нейронов DRG индуцирует обратное распространение кальциевой волны к соме, что, в свою очередь, вызывает ядерный экспорт HDAC5 и приводит к увеличению ацетилированного НЗ и стимулирует экспрессию генов. Среди этих HDAC5-зависимых генов несколько известных TF-RAG, такие как Jun, Fos и Klf. Согласно этим данным транслокация HDAC5 может играть важную роль в формировании эпигенетического состояния для инициации регенеративной программы. Аксотомированные нейроны ЦНС, напротив, по-видимому, не способны к такому механизму, ЧТО свидетельствует о возможных различиях в изменении эпигенетических состояний ЦНС и ПНС в ответ на повреждение (Weng et al., 2016).

В дополнение к ремоделированию хроматина и регуляции активности генов в ядре было идентифицировано несколько членов HDAC, таких как HDAC5, HDAC6 и SIRT2, которые выполняют цитоплазматическую функцию деацетилирования тубулина И микротрубочек и тем самым регулируют рост аксонов (Thomas, D'Mello, 2018). Например, повышенный уровень HDAC5 после периферического повреждения приводит к деацетилированию тубулина проксимальнее места повреждения, тем самым дестабилизируя микротрубочки, что способствует динамике конусов роста и регенерации аксонов. Чтобы выяснить, как HDAC5 транспортируется к кончикам поврежденных аксонов, в недавнем исследовании было установлено, что Filamin A, актинсвязывающий белок, организующий актиновые филаменты, способен связывать HDAC5 in vitro. Напротив, HDAC6 не играет роли в деацетилировании тубулина и в регуляции внутренней способности к росту нейронов DRG (Weng et al., 2016).

Применение MS-275, HDAC1-специфического ингибитора, значительно увеличивает уровни ацетилированного H4, одновременно с активацией нескольких генов, связанных с регенерацией (RAG). Стоит отметить, что MS-275 также увеличивает ацетилирование гистона H3 (Shin, Cho, 2017).
#### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Эксперименты на животных

Модели нейротравмы, используемые в настоящей работе – аксотомированные ганглии брюшной нервной цепочки (БНЦ) самцов речного рака *Astacus leptodactylus* и ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglion), полученные путем перерезки седалищного нерва. Используемые нами модели аксотомии представлены на рисунке 2.



Рисунок 2. Экспериментальные модели аксотомии. а – ганглии брюшной нервной цепочки; б – дорзальные ганглии крысы; в – строение дорзальных ганглиев (Rodkin et al., 2021).

Ганглии брюшной нервной цепочки (БНЦ) получали из самцов речного рака из притоков Дона *Astacus leptodactylus* (размер≥4-6 см.), купленного на местном рынке у коммерческих поставщиков.

Опыты с перерезкой седалищного нерва проводились на взрослых крысах-самцах (Wistar, беспородные), весом 200–250 г. Лабораторные крысы были приобретены в следующих специализированных питомниках: аутбрендные крысы линии Wistar в питомнике в г. Пущино Московской области (http://www.spf-animals.ru/animals/rats/). Беспородные крысы – виварии ФБУН Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии).

Исследования на беспозвоночных включало от 3 до 7 независимых экспериментов в трех экспериментальных группах (контроль, 1, 4 часа после аксотомии). Исследования на крысах включало также от 3 до 7 независимых экспериментов в пяти экспериментальных группах (1, 4, 24 часа или 7 суток после односторонней перерезки правого седалищного нерва + 2 группы с модуляторами белков).

Были соблюдены международные, национальные и /или институтские инструкции по уходу и использованию животных. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с директивами Европейского Союза 86/609 / ЕЕС по использованию экспериментальных животных и местным законодательством по этике экспериментов на животных. Протоколы для животных были оценены и одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Южного федерального университета (протокол № 2 от 18.04.2022 и протокол № 3 от 27.04.2022). Специальной рандомизации для распределения субъектов исследования не проводилось.

## 2.1.1 Двусторонне аксотомированные ганглии брюшной нервной цепочки речного рака

Одна из моделей нейротравмы, используемая в настоящей работе аксотомированные ганглии брюшной нервной цепочки речного рака. Аксотомированные ганглии брюшной нервной цепочки речного рака состоят из 6 ганглиев, каждый ганглий содержит 500-1000 нейронов. Ганглии соеденены между собой коннективами, состоящими из нескольких сот аксонов (Seichter et al., 2014; Skinner, 1985; Mulloney et al., 2003). Соответственно, после перерезки образуется 6 двусторонне аксотомированных ганглиев брюшной нервной цепочки речного рака (Рис. 3).

Обезболивание и эвтаназия производились по описанному ранее протоколу (Khaitin et al., 2015). Кратко: обезболивание животного проводили на льду в течение 15-20 мин, рака убивали путем рассечения передней части грудной клетки за глазами на уровне подпищеводного ганглия.

38



Рисунок 3. Нервная система рака и аксотомия брюшной нервной цепочки (БНЦ). а) Схема строения нервной системы речного рака; б) Ганглий брюшной нервной цепочки с парой коннектив; в) Брюшная нервная цепочка из 6 ганглиев, соединенных коннективами; г) 6 двусторонне аксотомированных ганглиев, полученных в результате перерезки БНЦ (Demyanenko et al., 2019).

Процедуры аксотомии выделение ганглиев проводили пол И стереомикроскопическим контролем (увеличение 16–20x). После удаления хитина с вентральной стороны хвоста рака с помощью щипцов быстро извлекали БНЦ и переносили в ванночку с раствором ван Харревельда. Контрольные БНЦ остроконечными офтальмологическими перерезали ножницами на переднем и заднем концах, а в опытных коннективы разрезали между ганглиями, так получалось 6 двусторонне ПО краям и ЧТО аксотомированных ганглиев (Rodkin et al., 2020; Demyanenko et al., 2019). Образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для дальнейшего анализа в соответствии с задачами исследования.

#### 2.1.2 Аксотомированные дорзальные ганглии крыс

Одно из преимуществ наших исследований – использование экспериментальных моделей аксотомии как на беспозвоночных животных, так и млекопитающих. Поэтому следующая модель нейротравмы, используемая в настоящей работе - аксотомированные ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglion) (Рис. 4), полученные путем перерезки седалищного нерва.

Перерезка седалищного нерва (sciatic nerve transection, SNT) на бедре у грызунов представляет собой одну из важных экспериментальных моделей нейротравмы (Savastano et al., 2014; Esposito et al., 2019; Dubový et al., 2018). Данная модель имитирует состояние, которое возникает у людей после ампутации или при повреждении позвоночника (Challa, 2015), предполагая такую степень рассечения нерва, при которой возможно повторное соединение нервов, так как периферические аксоны спосбны к регенерации И восстановлению утраченных связей. Данное явление продемонстрировано как в литературе (Dubový et al., 2018), так и в наших прошлых работах (Dzreyan et al., 2021a; Dzreyan et al., 2021б). Поэтому данную даную модель можно использовать как в изучении механизмов раннего ответа на нейротравму (1, 4 или 24 часа после перерезки) так и для исследования особенностей регенеративного периода, развивающегося к 7 суткам после аксонального повреждения.

Кроме того, популярность этой модели связана, во – первых, с доступностью седалищного нерва в средней части бедра животного для хирургического рассечения, во – вторых, с меньшим неудобством, и стрессом животного в сравнении с аксотомией нервов верхних конечностей (Savastano et al., 2014). Нейроны DRG уникальны тем, что являются псевдобиполярными нейронами и имеют две аксональные ветви (Abe, Cavalli, 2008; Dubový et al., 2018; Esposito et al., 2019; Martin et al., 2019). Длинная сенсорная ветвь ЦНС поднимается по спинному столбу спинного мозга, а вторая ветвь проходит через периферический нерв. Сенсорные аксоны в спинном мозге взрослого

человека не регенерируют после травмы, в то время как периферическое повреждение приводит к устойчивой регенеративной реакции. (Weng et al., 2016).



Рисунок 4. Объект исследования – ганглии дорсальных корешков спинного мозга крыс (DRG, dorsal root ganglia). Адаптированно из (Martin et al., 2019)

Седалищный нерв содержит аксоны сенсорных, соматических и автономных мото- нейронов, расположенных, в основном, в дорсальных ганглиях 4-го и 5-го корешков спинного мозга (Рис. 4, 5). Сенсорные нейроны, получают информацию от седалищного нерва, иннервирующего задние конечности. Тела мотонейронов находятся в спинном мозге внутри позвонков, а тела сенсорных нейронов образуют ганглии дорзальных корешков спинного мозга вне позвоночника (Рис. 5).

Нейроны DRG не имеют дендритов и синапсов, но содержат рецепторы различных нейромедиаторов.



Рисунок 5. Псевдобиполярные нейроны дорзальных ганглиев и их аксоны. Адаптированно из (Martin et al., 2019).

Нейроны составляют около 15% всех клеток DRG (Рис. 2) (Esposito et al., 2019; Dubový et al., 2018). Вокруг нейронов находятся сателлитные глиальные клетки (СГК), которые обеспечивают трофическую поддержку нейронов и были широко изучены, а также меньшее количество Шванновских клеток и иммунных клеток, таких как макрофаги (Рис. 4).

### Процедура аксотомии

Крыс анестезировали путем внутримышечного введения смеси 2% раствора ксилазина гидрохлорид (препарат Ксила, Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды) в дозе 5 мг/кг и тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (комбинированный препарат Телазол, Zoetis, США) в дозе 15 мг/кг, соответственно. Адекватная глубина анестезии достигалась примерно за 30 мин. Оценка глубины анестезии проводилась путем проверки рефлексов. А именно, отсутствием подошвенного рефлекса и реакции на защипывание перепонки между пальцами, а кроме того, снижением/отсутствием тонуса мышц конечностей, замедленным ровным ритмом сердечных сокращений и дыхания.

Операционные процедуры, направленные на перерезку седалищного нерва крысы осуществляли согласно стандартному протоколу, описанному Савастано и соавторами (Savastano et al., 2014). Перед выполнением операции необходимо побрить боковую поверхность крестца и бедра правой задней ноги крысы. Далее животное помещается вентральной стороной вниз на рабочую поверхность, оснащенную креплениями для фиксации задних ног. Необходимо зафиксировать задние ноги крысы в достаточно растянутом положении, но без излишнего усердия и причинения вреда животному. Это положение уменьшает толщину мышцы, лежащей над нервом, и расправляет сам нерв, что облегчает его нахождение. Далее производится местная дезинфекция побритого участка кожи. Затем следует нащупать бедренную кость и сместиться по ее направлению латерально на 1 см. При помощи пинцета и ножниц выполняется надрез кожи длиной 1,5 см. Далее ножницами следует вертикально надавить на обнажившуюся мышцу, что бы они прошли в полость, где проходит нерв. При этом следует избегать режущих движений и сделать отверстие в мышце за счет давления на ножницы. После проваливания ножниц в полость необходимо аккуратно их раскрыть, увеличивая таким образом зону видимости. Необходимо при помощи изогнутых пинцетов найти седалищный нерв. После нахождения нерва необходимо аккуратно его разрезать ножницами не допуская смещения. После перерезки нерва, нейроны 5 - ого и 4 – ого спинномозговых ганглиев оказываются аксотомированными (Рис. 6). Далее необходимо зашить кожу, используя простой узловой шов, накладываемый через каждые 4-5 мм.



Рисунок 6. Модель аксотомии седалищного нерва: после перерезки седалищного нерва нейроны DRG оказываются аксотомированными. Адаптированно из (Martin et al., 2019)

Умерщвление животных путем декапитации гильотиной проводили через 1, 4, 24 часа или 7 суток после односторонней перерезки правого седалищного нерва после наркотизирования (Dzreyan et al., 2021а; Dzreyan et al., 2021б). Данные сроки выбраны не случайно: изменения экспрессии белков раннего ответа наблюдаются в первые 24 часа после аксонального повреждения, тогда как к 7 суткам запускается устойчивая регенеративная реакция, которая имеет свои особенности белкового набора клетки. Таким образом, выбранная модель и сроки исследования позволяют наблюдать биохимические изменения, вызванные апоптозом клеток и аксотомией, а также их особенности в ранний и восстановительный период после травмы.

В экспериментальной группе с модуляторами белков проводили введение ингибиторов HDAC1 или E2F1 внутрибрюшинно сразу после аксотомии и далее ежедневно в течение 7 суток после односторонней перерезки правого седалищного нерва (Dzreyan et al., 2021a; Dzreyan et al., 2022).

#### 2.2 Методы исследования

В соответствие с целями и задачами работы, первый этап работы включал протеомное исследование изменения уровня сигнальных и нейрональных белков в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки речного рака на ранних сроках после аксотомии, с целью выявить белки, уровень которых повышался в ответ на аксотомию в первые часы. Для дальнейшего исследования выбраны следующие белки, уровень которых после аксотомии заметно возрастал: p53, E2F1, каспаза 3, гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3.

Далее проведен анализ уровня экспрессии исследуемых белков с помощью ПЦР в реальном времени, а также содержания и внутриклеточной локализации выявленных белков и их ацетилированных форм в поврежденных ганглиях экспериментальных животных в разные сроки после аксотомии. Второй этап исследования включал анализ белок-белковых взаимодействий ацетилированных форм факторов транскрипции p53 и E2F1 с различными изоформами HDAC I класса после перерезки седалищного нерва крыс. Также была определена деацетилазная активность HDAC1 в отношении конкретного белка в иммунопрецепитате цитоплазматической фракции аксотомированных спинномозговых ганглиев крысы. Исследован нейропротекторный эффект ингибирования активности гистондеацетилаз HDAC I класса и фактора транскрипции E2F1.

### 2.2.1 Протеомное исследование экспрессии сигнальных белков в ганглиях БНЦ рака

В опытах использовали раков Astacus leptodactilus. После отсечения хвоста рака с вентральной стороны брюшка рака снимался хитиновой покров и в каждом ганглии перерезались боковые нервы. Нервные цепочки выделялись и быстро переносились в ванночки с раствором ван Харревельда, где они инкубировались в темноте при комнатной температуре (около 22 °C) 1 или 3 часа. И в контроле, и в опыте, где БНЦ разрезались между ганглиями, т.е. производилась двустороняя аксотомия ганглиев, для получения необходимой для анализа массы биоматериала объединялись ВНЦ из 10 животных.

Для протеомного исследования использовались наборы реактивов и протеомные микрочипы «The Panorama Antibody Microarray - Cell Signaling»

(CSAA1, SigmaAldrich). В них на предметных стеклах в виде микрокапель иммобилизованы в дубликате антитела к 224 важнейшим сигнальным белкам. полученные из 10 аксотомированных ВНЦ (опыт), или Ганглии, 10 изолированных ВНЦ (контроль) гомогенизировали на холоду с помощью ультразвукового гомогенизатора Vibra-Cell VCX 130 (Sonics, США) в лизирующем буфере «Extraction/Labeling Buffer» (E0655, SigmaAldrich), содержащем нуклеазу бензоназу и ингибиторы протеаз и фосфатаз. После центрифугирования В надосадочной жидкости, содержащей Bradford цитоплазматические фракции, с помощью реактива спектрофотометрически определялась концентрация белка. Концентрации белка в опытном и контрольном образцах доводились до 1 мг/мл. Затем подопытный и контрольный лизаты окрашивались в одном варианте с помощью флуорохромов Cy3 и Cy5, а в другом – наоборот, с помощью Cy5 и Су3. Это позволило проконтролировать специфичность окрашивания и самоконтроль эксперимента. Несвязавшиеся флуорохромы осуществить удаляли с помощью колонок SigmaSpin (SigmaAldrich). Затем в растворах меченых белков инкубировали протеомные микрочипы. После 40-минутной гибридизации, высушивания отмывки И микрочипы сканировали на флуоресцентном сканере GenePix 4100A (Molecular Devices, USA) на длинах волн, соответствующих максимумам флуоресценции Су3 и Су5: 532 и 635 нм. Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству связанного белка, поэтому отношение величины флуоресценции опытных и контрольных образцов говорит об изменении экспрессии изучаемых белков. При сканировании каждого пятна получали массив этих отношений (порядка 100-200 значений), из которых выбирали медианное значение. В каждом опыте получали по 4 медианных значения отношения опытных (аксотомированные ганглии) и контрольных величин (два микрочипа, содержащие по две микрокапли с иммобилизованными антителами). Опыты повторяли 2 раза и полученные данные усредняли. Использовали критерий Стьюдента и уровень

значимости 95%. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

#### 2.2.2 Выделение суммарной мРНК и ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК выделяли из DRG через 1, 4, 24 часа и 7 суток после перерезки седалищного нерва с использованием коммерческого набора Реагент ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия). кДНК получали путем обратной транскрипции с использованием набора реагентов MINT Reverse Transcriptase (Евроген, Москва, Россия), а количественную ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Москва, Россия). Уровень экспрессии каждой мРНК рассчитывали с использованием порогового цикла (CT), а количественное определение мРНК проводили сравнительным методом  $2-\Delta\Delta Ct$ использованием β-актина с В качестве эталонного гена. Последовательности праймеров следующие: HDAC1: прямая 5'-CAGAAGCCAAAGGGGTCAAAG-3', обратная 5'-AGGGACTTGGAGAGAAGATGGA-3'; 5'-CTGATTTGGCTCCTTTGGTGTC-3', 5'-HDAC2: обратная прямая ACGTCCAACATCGAGCAACA-3'; p53: прямая 5'-CCCCTGAAGACTGGATAACTGT-3', 5'-5'-TCTCCTGACTCAGAGGGAGC-3'; обратная E2F1: прямая CAGGAATGCTGACTCTGGCA-3', обратная 5'-TTTCACACCTTTCCCTGGGTG-3'; β-5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 5'обратная актин: прямая GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'.

Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия).

## 2.2.3 Выделение ядерной и цитоплазматической фракций спинномозговых ганглиев крыс и ганглиев брюшной нервной цепочки речного рака

Образцы БНЦ после двусторонней аксотомии инкубировали 1 или 4 часа в растворе ван Харревельда при комнатной температуре в темноте. Контрольные БНЦ пересекали только на переднем и заднем концах. Для получения достаточного количества материала для каждого временного интервала после аксотомии объединяли по пять опытных и контрольных БНЦ. В каждой исследуемой группе было не менее 35 животных (5 животных на опыт, всего 7 опытов).

Операцию по пересечению седалищного нерва и выделению DRG выполнялась в соответствии с протоколом, описанным Savastano et al. (Savastano et al., 2014). Неповрежденные контралатеральные DRG и участки нерва использовались в качестве контроля. Для получения образцов аксотомированных контрольных DRG крыс анестезировали ИЛИ И декапитировали через 1, 4, 24 часа или 7 дней после перерезки седалищного нерва, затем быстро вырезали 4-й и 5-й люмбарные DRG. Для получения достаточного количества материала для каждого временного интервала после аксотомии объединяли четвертые и пятые люмбарные DRG, взятые от трех крыс. Таким образом, в каждой исследуемой группе было не менее 21 животных (всего 7 опытов).

Полученные образцы ткани были использованы в дальнейшем для проведения вестерн-блот анализа и иммуннофлуоресцентного агализа.

Далее протокол выделения цитоплазматической и ядерной фракций был общий, независимо от типа образца.

Цитоплазматическая и ядерная фракции были получены с помощью набора реактивов для экстракции CelLytic<sup>TM</sup> NuCLEAR<sup>TM</sup> Extraction Kit (NXTRACT, Sigma). Для этого образцы гомогенизировали на льду в течение 3 минут с помощью ультразвукового гомогенизатора Vibra-Cell VCX 130 (Sonics, США) в Lysis Buffer, который входит в набор реактивов для экстракции CelLytic<sup>TM</sup> NuCLEAR<sup>TM</sup> Extraction Kit (NXTRACT, Sigma), дополненный смесью ингибиторов протеаз и фосфатаз (PPC1010, Sigma-Aldrich), необходимых для сохранения белков и их фосфорилированных форм, а также нуклеазой бензоназой (E1014, Sigma-Aldrich), которая разрушает нуклеиновые кислоты. После гомогенизации образцы центрифугировали в течение 20 минут при 10,000-11,000 х g при 4 0С на центрифуге Mikro 220R (Hettich, Германия). Затем отбирали супернатант, содержащий цитоплазматические белки, а из осадка, содержащего обломки клеток и

48

клеточные ядра, экстрагировали ядерные белки с помощью буфера Nuclear Extraction Buffer, входящего в состав набора реактивов NXTRACT. Для этого осадок ресуспендировали и инкубировали 40 мин с данным буфером. После чего лизат центрифугировали 5 мин при 20,000-21,000 х g при 40С. В белковых экстрактах с помощью реагента Bradford (B6916, SigmaAldrich) определяли содержание белка. Далее лизаты аликвотили, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 С для дальнейшего вестерн блот анализа и иммуннопреципитации.

Проверку чистоты фракций проводили следующим образом: использовали отрицательный контроль цитоплазматического маркера в ядерной фракции, и наоборот, отрицательный контроль ядерного маркера в маркера цитоплазматической фракции. В качестве ядерной фракции использовали ацетилированный белок гистона H4 (ас-H4). Мы использовали антиацетил-гистон H4, полученный у кроликов (№ 06-866, Merck) в В 1:500. качестве маркера цитоплазматической разведении фракции использовали протеинглицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Мы использовали антитело против GAPDH, полученное у кроликов (G9545, Sigma-Aldrich) в разведении 1:1000. Соответственно, после одновременной инкубации мембраны с ядерным И цитоплазматическим маркерами, цитоплазматическую фракцию подтверждали отсутствием ас-Н4, ядерную – отсутствием маркера цитоплазматической фракции GAPDH.

#### 2.2.4 Иммуноблоттинг

После определение содержания общего белка в образце, 10-15 мкг белка разделяли с помощью 8% SDS-полиакриламидного геля в ячейке mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, CША). В качестве стандартных белковых маркеров использовали ColorBurst Electrophoresis Marker (C1992, Sigma-Aldrich). После разделения белки подвергли электропереносу на PVDF-мембрану (polyvinyl difluoride membrane 162-0177, Bio-Rad) с использованием системы Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad, CША). После промывки в PBS (0.24 g/L КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 г, NaCl 8.0 г и КCl 0,2 г, pH 7.4) мембрану последовательно инкубировали 1 час в блокирующем буфере (PBS 1% Casein Blocker, Bio-Rad) и в течение ночи при 4 °C с первичными антителами против исследуемых белков: гистондеацетилазы HDAC1 (SigmaAldrich SAB1400121, 1:500), или гистондеацетилазы HDAC2 (SigmaAldrich H2663, 1:500), или гистондеацетилазы HDAC3 (SigmaAldrich H6537, 1:500), или p53 (Sigma Aldrich SAB4503000, 1:500), или E2F1 (Sigma Aldrich SAB4500682, 1:500), или ацетилированного E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd, 1:500), или ацетилированного p53 (K373) (SigmaAldrich 06-916, 1:500) или каспазы 3 (SigmaAldrich C9598, 1:500) или активной каспазы 3 (SigmaAldrich AB3623, 1:500) или GAP-43 (SAB4300525, 1:500) или ацетилированному гистону H3 (K9) (SAB4500347; 1:500), или ацетилированному гистону H4 (06-598, Millipore; 1:500) и β-актину (А5441, 1:5000). После инкубации мембраны промывали в Трис-буфере с добавлением 0,1% Твин-20 (TTBS, 10 мМ; рН 8) и инкубировали 1 час при комнатной температуре с вторичными антителами против IgG-пероксидазы кролика (A6154, SigmaAldrich, 1:1000) и Peroxidase labelled anti-mouse antibody (NIF825, Amersham; 1:5000). Детекцию белков проводили с использованием Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). β-актин составляет 10-20% от общего клеточного белка и считается эволюционно консервативным белком. Таким образом, полученные данные нормировали по β-актину и анализировали хемилюминесценцию с помощью системы гельдокументации Fusion SL (Vilber Lourmat, Франция). Значения плотности исследуемых полос анализировали с помощью программного пакета Vision Capt (Vilber Lourmat, Франция, https://visioncapt.software.informer.com/, по состоянию на 4 октября 2021г.). Полученные результаты выражали в относительных единицах (отн. ед.): отношение оптической плотности полоски исследуемого белка к оптической плотности полоски маркера белковой нагрузки (β-актина). Отрицательный контроль: без первичных антител.

#### 2.2.5 Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание

Метод двойной иммунофлуоресцентной микроскопии был использован для оценки экспрессии и распределения HDAC1 и факторов транскрипции p53 и E2F1 и их ацетилированных форм в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крыс на разные сроки после односторонней перерезки правого седалищного нерва.

Для этого после фиксации 4% PFA и промывки образцы крысиных DRG помещали в 20% раствор сахарозы и заливали в 4% агарозный гель (Agarose LM, Dia-m, 1925, 0025). Срезы толщиной 20 мкм получали на вибратоме, промывали PBS и инкубировали с 5% BSA и 0,3% Triton X-100 для сайтов неспецифического блокирования связывания. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 4°С в том же растворе с первичными кроличьими антителами против гистондеацетилазы HDAC1 (SigmaAldrich SAB1400121, 1:500) или против p53 (Sigma Aldrich SAB4503000), или против E2F1 (Sigma Aldrich SAB4500682), или против ацетилированного E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd), или против ацетилированного p53 (K373) (SigmaAldrich 06-916), а также против NeuN (маркер нейронов) (SigmaAldrich MAB377, 1:1000). После промывки в PBS срезы инкубировали 1 час с флуоресцентно-мечеными вторичными анти-кроличьими CF488A (SAB4600045, 1:1000) или анти-мышиными антителами CF555 (SAB4600302, 1:1000). Негативный контроль: без первичных антител. Затем срезы монтировались на предметных стеклах в 60% глицерин/PBS. Ядра всех нейронов и глиальных клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (кат. № 14533), окрашивающего хроматин. Отрицательный контроль не содержал первичных антител. Анализ проводился на 10 изображениях для каждого из 21 животного в каждой группе. В расчетах использовалось не менее 100 клеток. Для количественной оценки среднего уровня флуоресценции в опытных и контрольных препаратах DRG использовали по 10 контрольных и 10 экспериментальных изображений для каждой из 7 крыс. Оценивали среднюю (по площади) флуоресценцию цитоплазмы и ядра для каждой клетки и

51

полученные значения усредняли. Полученные данные выражали в относительных единицах (отн. ед.).

Колокализацию E2F1 с маркером нейронов NeuN оценивали с помощью программы Image J с плагином JACoP (Bolte, Cordelières, 2006). Коэффициент колокализации M1 отражает долю пикселей в зеленых каналах (исследуемый болок), относительно общего сигнала, зарегистрированного в красном канале (маркер нейронов NeuN) (Fletcher et al., 2010).

Срезы DRG фотографировали с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX-51, оснащенного цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония), при длине волны возбуждения приблизительно 535 нм для анти-мышиного IgG1 ( $\gamma$ 1), меченного CF555, 488 нм для анти-кроличьего IgG (H + L), меченного CF488A, и 365 нм для Hoechst-33342. Флуоресценцию регистрировали при длинах волн >580 нм и >460 нм соответственно.

#### 2.2.6 Коиммунопреципитация

Для подтверждения факта межбелкового взаимодействия между HDAC1/ ацетилированный p53 (K373) и HDAC1/ацетилированный E2F1(K120) была проведена коиммунопреципитация (Ко-ИП). Коиммунопреципитацию проводили с использованием коммерческого набора компании Sileks и помощью магнитных частиц с белком G (SileksMag-Protein G, кат. номер K0182) в соответствие с рекомендациями производителя (https://sileks.com/assets/files/protocol-for-kits/sileksmag-protein-g-200228rus.pdf).

Для этой цели, в цитоплазматическом белковом экстракте аксотомированных ганглиев крыс, полученных через 24 часа после перерезки седалищного нерва, эндогенные белки ацетилированного p53 (K373) или ацетилированного E2F1(K120) были иммунопреципитированы антителом против ацетилированного p53 (K373) или ацетилированного E2F1(K120), а совместно осажденные белки HDAC1 впоследствии были обнаружены антителами против HDAC1, соответственно. Для визуализации белокбелкового взаимодействия, полученный иммунопреципитат подвергали иммуноблоттингу.

Более подробно. В пробирку с 50 мкл магнитных частиц с белком G 20 крольичего вносили мкл поликлонального антитела к белку ацетилированного p53 (K373) (06-916 SigmaAldrich) или ацетилированного E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd) с концентрацией 1мг/мл и инкубировали 1 при комнатной температуре. После час трех последовательных этапов промывки фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7.4) намагничиванием частиц, с удаляли супернатант с несвязавшимися антителами. К осадку добавляли 100 мкл цитоплазматической фракции аксотомированных ганглиев крыс, полученных через 24 часа после аксотомии или контралатеральных неповрежденных ганглиев, каждая из которых содержит 200 мкг белка. Цитоплазматическая фракция была получены ранее с помощью набора реактивов для экстракции CelLytic<sup>TM</sup> NuCLEAR<sup>TM</sup> Extraction Kit (NXTRACT, Merk), как описано выше и в наших публикациях. Далее образцы инкубировали 1 час при комнатной температуре. После трех последовательных этапов промывки фосфатно-солевым буфером PBS с 0.02% Tween-20 с намагничиванием частиц, удаляли супернатант, а осадок представлял собой смесь лизат-антитело. На этапе элюции в денатурирующих условиях осадок смешивали с 100 мкл буфера для элюции (буфер Laemmli, pH 6,8) и подвергали кипячению 10 минут при температуре 70-100°С, перемешивая содержимое пипетированием. В периодически качестве отрицательного контроля то же количество лизата (100 мкл) смешивали либо с 3 мкг нормального мышиного IgG (AntibodySystem FMB96410) вместо антител к иммунопрецепитированному белку для исключения неспецифического либо без связывания, лизат использовали антител, соответственно. Положительный контроль \_ исходный лизат, не подвергшийся иммунопреципитации. Для вестерн-блоттинга 20 мкг исходного белка, 3 мкг нормального мышиного IgG и 40 мкл элюата разделяли с помощью 8-12% Трис-глицин SDS-PAGE. Использовали следующие первичные антитела:

моноклональные мышиные антитела к белку HDAC1 (Merk SAB1400121, 1:500), поликлональные кроличьи антитела к ацетилированному р53 (К373) (06-916 SigmaAldrich) или кроличьи антитела к ацетилированному E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd). HRP-конъюгированные антитела (козий анти-кроличий IgG-HRP, Merk A6154, 1:1000; козий анти-мышиный IgG-HRP, Amersham NIF825, 1:1000) использовали в качестве вторичных антител. Для идентификации белков на блоте использовали белковый стандарт Color Burst Electrophoresis Marker (С1992, Merk). Детекцию белков проводили с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Иммуноблоты визуализировали с помощью системы гель-документирования Fusion SL (Vilber Франция) Vision Lourmat, И программы Capt (https://visioncapt.software.informer.com/). Изучали 3 крыс на каждую группу.

В полученном иммунопреципитате определяли гистондеацетилазную активность.

#### 2.2.7 Анализ активности гистондеацетилаз

Для измерения активности HDAC1 использовали коммерческий набор твердофазного иммуноферментного анализа для HDAC1 (USCN Life Science, Ухань, Китай). В каждую лунку добавляли по 100 мкл иммунопреципитата или стандарта и инкубировали 2 часа при 37°С, затем из каждой лунки удаляли жидкость и добавляли по 100 мкл реагента А для детекции и инкубировали 1 час при 37°С. Далее, удаляли жидкость, и лунки трижды промывали промывным раствором. Реагент обнаружения Б (100 мкл) добавляли в лунки и инкубировали в течение 30 минут при 37°С. Жидкость удаляли из каждой лунки и промывали промывочным раствором пять раз. Добавляли раствор субстрата (90 мкл) с последующей инкубацией в течение 20 минут при 37°С. После добавляли стоп-раствор (50 мкл) и планшеты считывали на многолуночном планшет-ридере при 450 нм. Активность HDAC1 выражали как значения относительной оптической плотности (ОП) на нанограмм белка в образце.

#### 2.2.8 Анализ близкого лигирования

ко-иммунопрецепитации В ходе была обнаружено эндогенное взаимодейсвие p53(K373)/HDAC1 между ацетилированным И ацетилированным E2F1(K120)/HDAC1. В обнаруженных парах «субстратфермент» была проведена визуализация белок-белковых взаимодействий с помощью системы Duolink<sup>тм</sup> In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma-Aldrich). Технология Duolink® PLA (Proximity Ligation Assay) позволяет эндогенные белок-белковые взаимодействия с высокой обнаруживать чувствительностью и специфичностью (Alam, 2022; Bagchi et al., 2015; Tang et al., 2017). Белок-белковые взаимодействия визуализируются в виде точек, а количество, локализацию и интенсивность точек можно количественно определить с помощью флуоресцентной микроскопии (Alam, 2022; Young, 2019). Анализ проводили в соответствии с протоколом производителя (Sigma Aldrich) (https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/technical-

documents/protocol/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/duolinkfluorescence-user-manual). Покровные стекла с помещенными на них срезами, фиксировали, пермеабилизировали и блокировали согласно инструкции. Далее образцы инкубировали с первичными антителами в течение ночи. Антитела были подобраны в соответствии с требованиями методики. В качестве первичных антител выступали моноклональные мышиные антитела к белку HDAC1 (Merk SAB1400121, 1:500), поликлональные кроличьи антитела к ацетилированному p53 (K373) (06-916 SigmaAldrich, 1:500) или кроличьи антитела к ацетилированному E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd, 1:500). Далее проводили инкубацию с зондами. Зонд PLA MINUS (Sigma-Aldrich, anti-mouse MINUS: Cat. No. DUO92004) связывался с мышиными моноклональными антителами к HDAC1, а зонд PLA PLUS (Sigma-Aldrich, anti-rabbit PLUS: DUO92002) Cat. No. связывался с кроличьими поликлональными антителами, направленными против ацетилированного р53 (К373) р53 или против ацетилированного E2F1 (К120). Когда оба белка находились ближе, чем 40 нм, зонды PLA генерировали сигнал, указывающий

55

на взаимодействие (Alam, 2022). После этапов лигирования и амплификации срезы монтировались на предметных стеклах с использованием специальной среды Duolink® in situ mounting medium с DAPI (для окрашивания ядер) (SigmaAldrich, Cat. No. DUO82040). Сигналы PLA распознавались как дискретные флуоресцентные пятна в различных местах исследуемых клеток и показаны красным цветом, представляя интересующий белок-мишень. Ядра, окрашенные DAPI – синим цветом. Сигналы PLA регистрировались с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse FN1 (Япония) и анализировались с помощью программного обеспечения Image J.

#### 2.2.9 Визуализация апоптотических клеток

Визуализацию апоптотических клеток проводили с помощью метода TUNEL (метка концов dUTP, опосредованная терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой (TdT), который маркирует разрывы цепей ДНК с использованием набора для обнаружения гибели клеток in situ, TMR red (#12156792910, Roche). Для этого выделенные ганглии через 7 суток после аксотомии фиксировали в течение 6 ч в 4% параформальдегиде и инкубировали в течение 48 ч в 20% сахарозе при 4 °C. Затем их помещали в 4% агарозный гель (Agarose LM, Dia-m, 1925, 0025). Гелевые блоки вырезали на вибратоме Leica VT 1000 S (Nussloch, Германия). Срезы сначала инкубировали при 37°C с первичным антителом против исследуемого белка (зеленая флуоресценция), затем промывали, обрабатывали реагентами из этого набора. Индекс апоптоза (AI) рассчитывали для TUNEL-положительных клеток при 20-кратном увеличении по формуле: AI = количество TUNELположительных клеток/общее количество клеток (окрашенных Hoechst 33342) × 100.

Совместную локализацию E2F1 (зеленый сигнал) с маркером апоптоза (красный сигнал) оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/) с подключаемым плагином JACoP. На изображении вычислялся коэффициент Мандерса М1, отражающий долю

56

пикселей с красным сигналом, содержащих зеленый сигнал, к общему сигналу красного канала. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX51WI, оснащенного цифровой камерой ORCA-Flash4.0 V3 (Hamamatsu, Iwata, Japan). Диапазон возбуждения флуоресценции составлял 570–620 нм. TUNEL-позитивные клетки подсчитывали в 3-х срезах 5-ого правого аксотомирванного ганглия и неповрежденного левого ганглия, полученных от 7 животных через 7 суток после перерезки седалищного нерва. Полученные значения выражали как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего, n = 7.

#### 2.2.10 Ингибиторный анализ

#### Введение вальпроата натрия

Опыты проводили на взрослых самцах крыс Вистар (2-2,5 мес; 200-250 г). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Перерезку седалищного нерва и изоляцию DRG осуществляли по методу Савастано и al., 2014) соавторов (Savastano et после наркоза, с помощью внутримышечного введения 0,75 мл смеси ксилазина и телазола (2:1). После операции рану зашивали. Вальпроат натрия (Sigma-Aldrich) (300 мг/кг в 1,5 мл физиологического раствора) вводили внутрибрюшинно сразу после аксотомии и далее в течение 7 дней (AT+VPA). Животным группы сравнения вводили физиологический раствор по той же схеме (АТ). Животных декапитировали через 7 дней после односторонней перерезки правого седалищного нерва. Ганглии дорсальных корешков 4-ого и 5-ого поясничных нервов извлекали сразу после декапитации, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C. Для получения достаточного количества материала для вестерн-блот анализа объединяли ганглии дорсальных корешков 4-го и 5-го поясничных нервов от 3 крыс опытных (AT+VPA) или от 3 контрольных крыс (AT).

#### Фармакологическое ингибирование E2F1 in vivo

Мы исследовали эффект фармакологического ингибирования активности E2F1 на модели перерезки седалищного нерва крысы (SNT),

чтобы оценить, способствует ли этот фактор транскрипции апоптозу клеток DRG, индуцированному аксотомией. Для этого использовали пан-ингибитор E2F1, HLM006474, также называемый CAS 353519-63-8 (324461, Sigma-Aldrich). Это низкомолекулярный ингибитор E2F, который блокирует транскрипционную активность E2F, нарушая связывание E2F-ДНК (Giralt et al., 2018; Liu et al., 2020; Sangwan et al., 2012).

После анестезии внутримышечным введением по 0,75 мл ксилазина и телазола (2:1) и пересечения седалищного нерва рану ушивали. Химический ингибитор E2F HLM006474, сокращенно 6474 (Sigma-Aldrich), вводили внутрибрюшинно (100 мг/кг) сразу после аксотомии и ежедневно в течение следующих 7 дней (группа аксотомии + 6474). Доза 6474 была выбрана на основании предыдущих исследований наших коллег in vivo (Downey, 2021; Dubový et al., 2018) и экспериментов в нашей лаборатории (Dzreyan et al., 2021а). Животным контрольной группы вводили ДМСО по той же схеме. Через 7 сут после перерезки седалищного нерва животных декапитировали. После декапитации 4-ый и 5-ый ганглий удаляли с двух сторон, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C. Кроме того, в полученных образцах определяли уровень апоптоза методом TUNEL, описанным выше, а также уровни проапоптотических белков, активной каспазы 3 и p53, определяли методом иммуноблоттинга.

#### 2.2.11 Статистический анализ

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM) из семи или более независимых экспериментов (n). Статистический анализ включал среднее значение, стандартную ошибку, доверительный интервал, пределы, линейную регрессию, однофакторный дисперсионный анализ для сравнения нескольких групп, двухфакторный дисперсионный анализ для нескольких групп с двумя независимыми переменными и t – критерий для сгруппированного или парного анализа данных дисперсии. Данные иммуноблотинга и иммунофлуоресцентной микроскопии образцов

крыс были проанализированны с помощью 2-Way ANOVA и теста Даннетта (Dunnett's a posteriori test), поскольку имеют две независимые переменные (мы сравнивали три временные точки и проводили сравнение контралатерального против ипсилатерального ганглия). One-Way ANOVA с тестом Даннетта использовали для статистической обработки данных, полученные в ходе экспериментов на раках (данные иммуноблоттинга), где мы сравнивали значения трех экспериметальных групп (время после аксотомии). Влияние ингибирования HDAC и E2F1 на крысиной модели аксотомии оценивали путем сравнение контралатерального против ипсилатерального ганглия, а также сравнивали группу животных, которым вводили физиологический раствор или DMSO и группу, которым вводили ингибитор. Для этого использовали 2-Way ANOVA с тестом Даннетта. Для оценки уровня апоптоза В аксотомированных ганглиях И нерве сравнению крыс по с неаксотомированными образцами, а также для оценки уровня апоптоза при E2F1 ингибитора с контрольной действии по сравнению группой использовали критерий Стьюдента. Оценку колокализации E2F1 с маркером апоптоза и маркером глиальных клеток также проводили сравнением средних выборках значений В ДBVX с использованием t-теста. Мы провели статистический анализ с использованием статистического программного обеспечения SigmaPlot 12.5. Значение  $P \le 0,05$  считалось значимым.

#### ГЛАВА З РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Протеомное исследование изменений содержания сигнальных белков в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки (БНЦ) рака

Отправной точкой для изучения биохимических изменений в нервной системе при аксотомии является протеомное исследование изменений экспрессии 224 сигнальных белков основных В двусторонне аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака. Брюшная нервная цепочка 6 ганглиев (по 500-1000 нейронов), рака состоит из соединенных коннективами. Ганглии находятся в глиальной и соединительно-тканной оболочке. Перерезка коннектив даст сразу 6 ганглиев, аксотомированных с двух сторон. Анализ изменений экспрессии 224 важнейших сигнальных белков в ганглиях по сравнению с неперерезанной БНЦ с помощью микрочипов Panorama Ab microarray – Cell Signaling (Sigma-Aldrich) позволяет выявить наиболее реактивные белки, являющиеся потенциальными мишенями для нейропротекторного воздействия.

Полученные данные об относительных изменениях экспрессии сигнальных белков в ганглиях вентральной нервной цепочки рака через 1 или 3 часа после перерезки коннектив между всеми 6 ганглиями по сравнению с контрольными нервными цепочками, у которых были перерезаны только начальные и конечные нервы, приведены в таблице 1. В каждой подопытной и контрольной группах объединялись ткани 10 животных. Эксперименты повторили дважды, в каждом из которых было получено по 4 значения отношения медианных значений флуоресценции белков, меченных либо Су3, либо Су5, в подопытной группе к таковым в контрольной группе (или наоборот, контрольных к подопытным в случае уменьшения). Эти 8 значений усреднялись. В таблице приведены средние значения, превышающие «уровень отсечения» 30%, и стандартные отклонения (SD). Результаы суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Относительные изменения содержания сигнальных белков в ганглиях БНЦ рака через 1 или 3 часа после перерезки коннектив между всеми 6 ганглиями по сравнению с контрольными нервными цепочками, у которых были перерезаны только начальные и конечные нервы.

Болки	1 час		3 часа		Функции				
Велки	Сред	SD	Сред	SD	Фупкции				
Exp/Ctr									
Инициация апоптоза									
с-тус	2,10	0,38	2,40	0,64	Фактор транскрипции, контролирует синтез белков (РНК полимеразы I, II и III), клеточный цикл, апоптоз				
PAR4	2,28	0,61	2,13	0,25	Prostate Apoptosis Response 4. Инициация p53- независимого апоптоза. Участвует в апоптозенейронов				
Bcl-10	2,01	0,22	2,10	0,27	Активирует JNK, p38 и NF-βB; рекрутирует TRADD и RIP, участвующие в апоптозе и некроптозе.				
GADD153/CHOP-10	1,90	0,33	1,94	0,16	Фактор транскрипции. Индуцируется при стрессе,включая повреждения ДНК, ишемию, и др. Ингибирует пролиферацию и активирует апоптоз.				
E2F1	1,78	0,28	1,82	0,21	Фактор транскрипции, регулирует синтез проапоптотических белков при нарушении деления клеток Стимулирует клеточное деление				
NGFR p75	1,70	0,21	1,64	0,14	Рецептор нейротрофинов. Регулирует апоптознейронов, рост и миграцию нейритов при нейрорегенерации.				
NMDAR 2a	1,61	0,19	1,57	0,06	Рецептор глутамата. Эксайтотоксичность, Ca <sup>2+</sup> ,апоптоз				
p38	1,50	0,14	1,47	0,06	Активируемая стрессом МАР киназа; стимулирует апоптоз при инсульте мозга				
JNK	1,36	0,09	1,43	0,06	Активируемая стрессом МАР киназа; стимулирует апоптоз при инсульте мозга				
p53	1,82	0,26	1,74	0,16	Стимуляция апоптоза, остановка клеточного цикла,фактор транскрипции сотен генов				
			Испол	нение а	поптоза				
AIF	1,42	0,10	1,66	0,11	Фактор, индуцирующий апоптоз. Запускает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК				
Каспаза 3	1,80	0,26	1,83	0,17	Исполнение апоптоза				
Каспаза 3 активная	1,48	0,21	1,48	0,05	Исполнение апоптоза				
Каспаза 6	1,74	0,23	1,76	0,11	Исполнение апоптоза				
Каспаза 7	1,61	0,19	1,67	0,12	Исполнение апоптоза				
Каспаза 11	1,66	0,40	1,86	0,06	Воспалительная каспаза; стимулирует апоптоз астроцитов и микроглии при воспалении				
SMAC/DIABLO	1,64	0,22	1,70	0,24	Апоптоз. Активирует каспазы 9, 3, 6 и 7				
PSR	1,66	0,17	1,63	0,06	Рецептор фосфатидилсерина. Распознавание иудаление апоптотических клеток				
		Про	тивоап	оптот	ические белки				
Bcl-x	1,86	0,16	1,85	0,47	Противоапоптозный белок семейства Bcl-2				
p21Waf-1	1,78	0,17	1,68	0,16	р53-зависимый ингибитор пролиферации,Ингибирует апоптоз				
MDM2	1,34	0,12	1,30	0,03	Антагонист p53. Активирует пролиферацию, стимулируя E2F1. Стимулирует деградацию p53				

McI-1	1,38	0,14	1,49	0,29	Противоапоптозный белок семейства Bcl-2			
Рецептор эстрогенов	1,73	0,32	1,59	0,12	Нейропротектор при ишемии мозга; ингибирует апоптоз. Антиоксидант; противовоспалительноедействие, модиляция синтеза белка			
ERK5 (Big MAPK- BMK1)	1,62	0,19	1,52	0,06	Антиапоптозный нейропротектор. Активируется приокислительном стрессе кальций-зависимым образом.			
Сигналинг								
Фосфотреонины	1,35	0,18	1,37	0,25	Редки в стационарном состоянии, но появляютсяпри активации клеток			
ERK1	1,72	0,20	1,70	0,18	МАР киназа			
ERK1+ERK2	1,60	0,29	1,77	0,23	МАР киназа			
RAF1	1,39	0,20	1,31	0,03	Серин/треонин киназа, регулирует МАР киназныйпуть, фосфорилируя нижележащие МАР киназы			
ΡΚCα	1,59	0,14	1,45	0,06	Регулирует рост, дифференцировку и делениеклеток, модулирует нейротрансмиссию.			
МАРКАРК2	1,67	0,23	1,61	0,11	Протеинкиназа 2, активируемая МАР киназой			
MKP-1	1,66	0,16	1,66	0,21	МАР киназа фосфатаза-1			
Кальмодулин	1,56	0,10	1,59	0,14	Кальций-связывающий сигнальный белок.Активирует множество клеточных белков.			
АРР	1,48	0,11	1,51	0,12	Белок-предшественник β-амилоида, который индуцирует окислительный стресс и астроцитоз			
Эпигенетические процессы и клеточный цикл								
HDAC 1	1,75	0,14	1,84	0,31	Гистондеацетилаза 1			
HDAC 2	1,59	0,16	1,53	0,10	Гистондеацетилаза 2			
HDAC 4	1,50	0,09	1,53	0,22	Гистондеацетилаза 4			
HAT1	1,51	0,32	1,48	0,11	Гистонацетилтрансфераза			
PCAF	1,50	0,17	1,44	0,12	Гистонацетилтрансфераза			
Фосфогистон H3 (pS28)	1,35	0,05	1,36	0,07	Фосфорилированный гистон НЗ			
			Ц	итоске	пет			
Кофилин	1,80	0,27	1,73	0,18	Деполимеризация актина. Перестройки цитоскелета(подвижность, формирование лидирующего края, эндоцитоз			
а-катенин	1,75	0,26	1,59	0,13	Связывает кадгерины с актиновыми цитоскелетом.Участвует в нейропротекции при ишемии мозга			
Миозин IIA	1,38	0,26	1,38	0,26	Цитоплазматический миозин. Подвижность клеток,адгезия, везикулярный транспорт			
Миозин Va (LE-16)	1,61	0,26	1,55	0,06	Участвует в транспорте везикул, органелл и мРНК вдоль актиновых волокон в нейронах и глиальных клетках. Связан с белками синаптических везикул			
p35	1,79	0,37	1,63	0,14	Связан с адгезионным комплексом β- катенин/N- кадгерин. Участвует в росте и навигации аксонов имиграции нейронов при нейрогенезе коры. Регулирует экзоцитоз нейромедиатора			
p120CTN	1,84	0,20	1,79	0,19	Катенин-120. Связывает Е-и N-кадгерины с актиновым цитоскелетом и сигнальными белками.Участвует в нейропротекции при ишемии мозга			
		L	Зезикуля	ярный п	пранспорт			
SNAP-25	1,46	0,19	1,42	0,08	Пресинаптический белок, участвует в слиянии синаптических везикул с мембраной и экзоцитоземедиатора			
	÷	•	•	•	· · · · · ·			

bCOP	1,35	0,11	1,40	0,09	Везикулярный транспорт между ЭР и комплексомГольджи				
Сигналинг									
NAK	1,40	0,13	1,68	0,64	NF-кВ активирующая киназа. Активируетсяфакторами роста и протеинкиназой Сɛ.				
S-100	2,60	0,59	2,16	0,25	Регулирует Ca2+ гомеостаз, разные ферменты ифакторы транскрипции				
GAPDH	1,58	0,19	1,78	0,18	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа Участвует в инициации апоптоза и транскрипцииантиапоптотических генов				
Рецептор EGF	1,55	0,38	1,61	0,21	При связывании EGF стимулирует пролиферацию,дифференцировку и репарацию повреждений ДНК				
				Апопто	03				
Каспаза 4	2,35	0,58	3,14	1,24	Провоспалительная каспаза. Активируется при ERстрессе и опосредует апоптоз				
FADD	1,58	0,13	1,64	0,41	Fas-associated protein with death domain. Участвует винициации апоптоза				
p14 arf	1,52	0,28	1,38	0,25	Инициирует p53-зависимый арест клеточного циклаи апоптоз				
Метаболизм и зашита клеток									
Цистатин А	1,35	0,15	1,36	0,15	Ингибитор лизосомных цистеиновых протеаз.				
AOP-1	1,53	0,26	1,51	0,17	Митохондриальный антиоксидантный белок 1; он жепероксиредоксин-3 (Prdx3)				
	Клеі	точное	деление	е, эпиген	етические процессы				
Сdc7 киназа 1,59 0,43 1,59 0,13 Инициирует и регулирует пролиферацию									
Топоизомераза -1	1,48	0,10	1,64	0,17	Участвует в делении клеток и транскрипции.				
Trf-1	1,66	0,44	1,55	0,21	Влияет на теломеразный белок, негативно влияетна длину теломеров				
Гистон Н3 (Ac-Lys9)	4,13	1,01	14,4	13,54	Ацетилированный гистон НЗ				
Гистон H3(Ac-Lys9, pS10)	3,85	0,78	4,62	0,73	Ацетилированный и фосфорилированный гистон Н3				
NTF2	1,66	0,46	1,69	0,41	Участвует в импорте белков из цитоплазмы в ядро				
			Ц	итоскел	nem				
Эзрин	1,72	0,45	1,75	0,47	Связывает плазматическую мембрану с актиновыми филаментами. Регулирует адгезию, перестройкицитоскелета, форму и миграции клеток, апоптоз.				
Спектрин (α+β)	1,75	0,31	3,10	0,38	Поддерживает целостность плазматической мембраны и цитоскелета. Его расщепление ведет кпузырению мембран и апоптозу				
Дистрофин	< 1.30	-	3,63	1,78	Компонент платформы, связывающей актиновые филаменты с клеточной мембраной				
Тропомиозин	2,44	0,82	3,34	2,06	Связывается с актиновым цитоскелетом				
Фосфо-Рук2 (рҮ579/580)	< 1.30	-	2,35	0,72	Фокальная адгезионная киназа, специфичная для ЦНС. Фосфорилированная Рук2 влияет на ERK, JNKи p38 и модулирует цитоскелет, форму, ионные каналы, деление и смерть клеток				
Plakoglobin	1.52	0.41	1.51	0.10	Гомолог β-катенина. Компонент				
β <sub>IV</sub> -т∨б∨лин	6.19	2,70	6.00	2.04	десмосом иадгезивных соединений Компонент микротрубочек, регулирует их сборку и				
В-тубулин попи-		_,. 0		_,	взаимодействие с тау и другими белками				
глутамированный	3,82	1,34	3,56	0,63	тауи построение микротрубочек.				

Фосфо-тау (pS199/202)	< 1.30	-	2,00	1,25	Фосфорилированный тау-белок, регулирует сборкуи стабилизацию микротрубочек	
MAP1	1,50	0,34	1,42	0,20	Связывается с микротрубочками и участвует в ихсборке	
Цитокератин 7	3,30	2,06	5,45	3,50	Цитоскелет, промежуточные филаменты	
Цитокератин 8,60	1,47	0,24	1,45	0,19	Цитоскелет, промежуточные филаменты	
Цитокератин 19	4,21	2,44	2,70	0,89	Цитоскелет, промежуточные филаменты	
Везикулярный транспорт, синаптические						
процессы						
Адаптин (β1+β2)	1,63	0,16	2,03	0,40	Везикулярный транспорт (клатриновые пузырьки)	
ΑΡ2α	2,97	1,26	2,43	0,22	Везикулярный транспорт (клатриновые пузырьки)	
ΑΡ2γ	2,63	0,69	3,68	2,24	Везикулярный транспорт (клатриновые пузырьки)	
Синтаксин	6,88	5,51	6,21	3,63	Докинг синаптических пузырьков и секреция нейромедиаторов	
ARNO (Cytohesin 2)	< 1.30	-	1,69	0,57	Контролирует структуру и функции комплекса Гольджи: сортировку белков и трафик мембран	
GRP1(ARNO3 Cytohesin-3)	1,70	0,28	1,86	0,60	Контролирует структуру и функции комплекса Гольджи: сортировку белков и трафик мембран	
DOPA декарбоксилаза	< 1.30	-	6,51	4,08	Синтез дофамина	
Триптофан- гидроксилаза	< 1.30	-	1,72	0,51	Синтез серотонина	
Тирозингидроксилаза	1,60	0,19	1,72	0,45	Синтез катехоламинов (дофамина, норэпинефринаи эпинефрина)	

Выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдались уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков повышалась, а 31 белка - снижалась. Через 3 часа наблюдалось повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков снижались. Эти белки выполняют разные функции, а изменения их уровней представляют собой интегральную биохимическую характеристику наиболее процесса аксотомии. Одним ИЗ важных эффектов В аксотомированных ганглиях БНЦ рака было одновременное повышение уровня разных проапоптотических белков. К их числу относятся белки, выполняющие программу апоптоза, такие как Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF, исполнительные каспазы 3, 6 и 7; проапоптотические сигнальные белки р75, МАР киназы p38 и JNK; факторы транскрипции, регулирующие экспрессию белков апоптоза: E2F1, p53, с-Мус и GADD153/CHOP-10, а также многофункциональные белки, такие как Par4, глутаматный рецептор NMDAR2a и провоспалительная каспаза 11, которые кроме других функций в определенных ситуациях могут запускать апоптоз.

Одновременно повышалась экспрессия противоапоптотических белков, таких как Bcl-x, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов, а также эпигенетических регуляторов гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и гистоацетилтрасфераз HAT1 и PCAF (Demyanenko et al., 2019).

## 3.2 Вестерн-блот анализ влияния аксотомии на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях БНЦ рака

Содержание белков в цитоплазматической и ядерной фракциях ганглий БНЦ рака оценивали с помощью вестерн-блот анализа. Результаты представлены в таблице 2. В целом, данные вестерн-блот анализа соответствовуют данным протеомных исследований.

Увеличение уровня исследуемых белков, таких как p53, E2F1, HDAC1 и HDAC2 наблюдалось уже в первые 4 часа после аксотомии. Сверхэкспрессия E2F1 была ранним результатом нейротравмы. По данным иммуноблоттинга, исходный уровень E2F1 в контрольных ганглиях брюшной нервной цепочки рака был низок. Через 1 час после двусторонней аксотомии ганглиев БНЦ достоверное повышение экспрессии наблюдалось белка на 40% В цитоплазматической фракции ганглиев БНЦ речного рака (p<0,01), хотя его уровень в ядерной фракции при этом не изменялся. Через 4 часа повышение E2F1 в цитоплазматической фракции становилось более значительным: в 2 раза по сравнению с контрольным значением (p<0,01) и в полтора раза относительно уровня белка через 1 час (p<0,05). Уровень E2F1 в ядерной фракции через 4 часа после аксотомии повышался почти в два с половиной раза относительно контрольных значений (p<0,01) и относительно уровня белка через 1 час (p <0,01). Таким образом, двусторонняя аксотомия вызывала повышение уровня белка E2F1 в цитоплазматической и ядерной фракциях через 4 часа после перерезки коннектив, соединяющих ганглии. При этом в цитоплазматической, но не ядерной фракции уровень E2F1 достоверно повышался уже через 1 час после аксотомии.

Проведенные исследования выявили 1.5-кратное повышение уровня проапоптотического белка p53 в ганглиях БНЦ через 4 часа после аксотомии. Это подтверждает результаты протеомных экспериментов и свидетельствует об инициации апоптоза в аксотомированных ганглиях.

Уровень каспазы 3, ключевого белка апоптотических каскадов, демонстрировал такую же тенденцию через 4 часа после аксотомии ганглиев БНЦ (увеличение в 1.86 раз), но эти изменения не были достоверными. Тем не менее, нужно учитывать данные о 80-83% увеличении уровня каспазы 3 через 1-3 часа после аксотомии в протеомном эксперименте.

Уровень HDAC1 в суммарной фракции аксотомированных ганглиев повышался относительно контроля через 4 часа после перерезки коннектив, соединяющих ганглии. Через 1 час мы не наблюдали значительной сверхэкспрессии HDAC1. Через 4 часа повышался уровень HDAC2 в ядерной фракции поврежденных ганглиев.

Таблица 2. Суммарные данные анализа изменений содержания ряда сигнальных и эпигенетических белков в БНЦ речного рака на разные сроки после аксотомии. Показаны только значимые изменения (p<0,05): ↑ увеличение; ↓ уменьшение; = отсутствие изменений; - отсутствие данных.

Белок	Роль в клетке	Фракция DRG	1ч	4ч
HDAC1	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	суммарная	=	1
HDAC2	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	ядерная	Ш	1
F7F1	фактор транскрипции,	ядерная	=	↑
E2F1	проапоптотический белок	цитоплазматическая	↑	↑
p53	фактор транскрипции, проапоптотический белок	суммарная	=	1
Каспаза 3	продукт частичного протеолиза каспазы 3, апоптоз	суммарная	=	1

Полученные данные вестерн-блот анализа согласуется с протеомными данными и свидетельствует об участии данных гистондеацетилаз в эпигенетической регуляции смерти клеток ганглиев после аксотомии. Результаты вестерн-блот анализа сведены в таблице 2. Данные, полученные на нервной системе беспозвоночных животных необходимо верифицировать в опытах на нервной системе млекопитающих для последующей трансляции на человека.

## 3.3 Апоптоз нейронов и глиальных клеток в ганглиях дорсальных корешков крысы после перерезки седалищного нерва

(левых) B контрольных контралатеральных ганглиях DRG, не подвергавшихся аксотомии, метод TUNEL не выявлял апоптотических нейронов через 1 или 7 суток после перерезки седалищного нерва. При этом также не наблюдался апоптоз нейронов ипсилатерального (правого) ганглия, у которого были перерезаны нервные волокна. Однако через 7 суток в этом ганглии появлялись единичные апоптотические нейроны (Рис. 7). Это согласуется с литературными данными о позднем, через недели, развитии апоптоза нейронов в ганглиях DRG после перерезки седалищного нерва (McKay Hart et al., 2002). Глиальные клетки больше, чем нейроны, подвержены апоптозу. TUNEL-позитивные апоптотические глиальные клетки наблюдались как в контрольном контралатеральном (левом), так и в подопытном (правом) аксотомированном ганглии. Количество апоптотических глиальных клеток увеличилось через 24 часа после аксотомии по сравнению с контрольным ганглием с 6±1 отн. ед. до 18±2 отн. ед. (n=9, p<0.001). На 7-е сутки после перерезки седалищного нерва количество апоптотических глиальных клеток в ипсилатеральном правом ганглии возрастало до 37±6 отн. ед.



Рисунок 7. Результаты TUNEL анализа, визуализирующего ядра апоптотических клеток с ДНК разрывами В спинномозговом ганглии крыс через 1 и 7 суток после аксотомии. а) контрольный неповрежденный ганглий. Наблюдаются лишь редкие ядра апоптотических клеток. b) положительный контроль: инкубация ганглиев с нуклеазой бензоназой, инициирующей разрывы ДНК. с) Через 24 ч после перерезки седалищного нерва В поврежденом наблюдается ганглии множество ядер апоптотических глиальных клеток. d) Многочисленные ядра апоптотических глиальных клеток наблюдаются в поврежденном DRG через 7 сут после перерезки седалищного нерва. e)

Одиночный апоптотический нейрон (стрелка) в поврежденном DRG через 7 дней после перерезки седалищного нерва. Заштрихованные стрелки: ядра нейронов DRG. Пустые стрелки: ядра апоптотических нейронов. 1-Way ANOVA. М  $\pm$  SEM; ;\*- p<0,05; \*\*P < 0,01,\*\*\*P < 0,001; n=6. Масштабный отрезок 100 мкм

Таким образом, перерезка седалищного нерва вызывала апоптоз незначительного числа нейронов в DRG ганглиях через 1 и 7 суток, но втрое повышала уровень апоптоза глиальных клеток уже через 24 часа, и еще больше, в 6 раз, через 7 суток после нейротравмы.

3.4 Влияние перерезки седалищного нерва на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крыс

Из пяти десятков белков. которые, как показали протеомные эксперименты, сверхэкспрессировались после двусторонней аксотомии в ганглиях БНЦ рака, мы выбрали ряд сигнальных и эпигенетических белков, регулирующих выживаемость и смерть клеток: каспаза 3, p53, E2F1, гистон НЗ, ацетилированный по лизину 9 (АсНЗК9), ацетилированый гистон Н4 (AcH4) и гистондеацетилазы HDAC1 HDAC2 и HDAC3 для проверки их экспрессии в аксотомированных ганглиях корешков спинного мозга крыс. Результаты вестерн-блот анализа сведены в таблице 3. Эти белки принадлежат различным клеточным подсистемам и выполняют разные, хотя и зачастую связанные функции в клетках. Общее, что их объединяет, – повышенная экспрессия в нервной ткани раков в первые часы после аксотомии.

Таблица 3. Суммарные данные анализа изменений содержания ряда сигнальных и эпигенетических белков в DRG крысы на разные сроки после перерезки седалищного нерва. Показаны только значимые изменения (р <0,05): ↑ увеличение; ↓ уменьшение; = отсутствие изменений; - отсутствие данных.

Белок	Роль в клетке	Фракция DRG	1ч	4ч	24ч	7д
HDAC1		суммарная	←	↑	II	=
	эпигенетическая регуляция, репрессор	ядерная	=	↓	=	=
	транскрипции	цитоплазматическая	=	1	=	=
HDAC2	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	ядерная	II	1	1	-
	эпигенетическая регуляция, репрессор	ядерная	=	1	=	-
прасэ	транскрипции	цитоплазматическая	1	→		
AcH4	ацетилированный гистон Н4, ядерный	ядерная	Ш	=	=	↓

	субстрат гистондеацетилаз					
AcH3K9	ацетилированный гистон H3 по лизину 9, ядерный субстрат гистондеацетилаз	ядерная	=	=	↓	↓
AcE2F1K120	ацетилированный E2F1 по лизину 120, фактор ранскрипции	цитоплазматическая	=	=	$\rightarrow$	-
F9F1	фактор транскрипции,	ядерная	=	1	=	-
E2F1	проапоптотический белок	цитоплазматическая	=	1	=	-
	фактор транскрипции.	ядерная	=	=	↓	-
р53	проапоптотический белок	цитоплазматическая	=	=	↑	-
Аср53К373	ацетилированный p53 по лизину 173, фактор транскрипции	цитоплазматическая	=	=	$\rightarrow$	-
Каспаза 3	исполнительная каспаза, апоптоз	суммарная	=	=	=	=
Активная	продукт частичного протеолиза каспазы	суммарная	=		↑	↑
каспаза З	3, апоптоз	Суммарная				

# 3.4.1 Уровень белка p53 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях

Белок p53 многофункциональный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию сотен клеточных белков В клетке И регулируюший при этом различные метаболические и функциональные процессы. Он также инициирует апоптотическую смерть клетки. Через 24 часа после перерезки правого седалищного нерва крысы в ядерной фракции аксотомированных (правых) DRG ганглиях (брали суммарно 4-й и 5-й ганглии) уровень р53 достоверно снижался в 1.8 раза относительно контрольного контралатерального ганглия (p<0.05; рисунок 8a). Но в цитоплазматической фракции он существенно повышался (p<0.05; Рис. 8б). Через 1-4 часа после аксотомии существенных различий не наблюдалось. Полученные данные указывает на перераспределение р53 между клеточными ядрами и цитоплазмой.



Рисунок 8. Иммуноблоттинг: (а) изменение уровня р53 в ядерной фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG (ipsi) через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению С контралатеральными ганглиями (contra) тех же животных. (б) изменение p53 цитоплазматической фракции аксотомированных уровня B ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. M±SEM. n=6. \* p <0,05; \*\* p <0,01; # p < 0,05 относительно значения через 4 часа в ипсилатеральном ганглии

## 3.4.2 Уровень белка E2F1 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях

Фактор транскрипции E2F1 – ключевой белок, определяющий судьбу клеток. Он контролирует клеточное деление, но при нарушениях клеточного цикла может запускать апоптоз (Biswas, Johnson, 2011). E2F1 регулирует экспрессию ряда генов, регулирующих синтез и репарацию ДНК, клеточный цикл и апоптоз. Он может регулировать апоптоз либо p53-зависимым, либо p53-независимым способом. В частности, он запускает экспрессию проапоптотических белков семейства Bcl-2, белков SMAC/DIABLO, Apaf-1,

каспаз 3, 7, 8 и 9, белков р53 и р73. Экспрессия E2F, в свою очередь, контролируется МАР-киназой р38 и фактором транскрипции с-Мус (Engelmann, Pützer, 2012).



Рисунок 9. Иммуноблоттинг: (a) изменение уровня E2F1 в ядерной фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG (ipsi) через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями (contra) тех же животных. (б) изменение уровня E2F1 в цитоплазматической фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. М±SEM. n=6. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01

Односторонняя перерезка правого седалищного нерва крысы вызывала повышение уровня белка E2F1 относительно неповрежденных ганглиев как в цитоплазматической, так и ядерной фракциях DRG крыс через 4 часа после перерезки: на 43% (p<0,05) и 40% (p<0,05), соответственно (Рис. 9). Иммуноблоттинг показал, что как в аксотомированных, так и в контрольных
неповрежденных ганглиях DRG экспрессия белка значительно увеличивалась через 4 и 24 часа по сравнению с уровнем, определяемым через 1 час после перерезки седалищного нерва (р<0,01), что отражает неспецифическую реакцию нервной системы крысы на повреждение. При этом в ядерной фракции повышение белка в течение первых 24 часов после травмы было выражено сильнее. Таким образом, общее повышение уровня E2F1 в DRG сверхэкспрессии белка В ядерной, складывалось ИЗ как так И В цитоплазматической фракциях аксотомированных DRG крыс.

Как видно из рисунка 10, повышенная экспрессия E2F1 в аксотомированных ганглиях через 4 часа после пересечения седалищного нерва связана с повышенной экспрессией белка в нейронах, но не в глиальных клетках DRG: коэффициент колокализации Мандерса M1 E2F1 с GFAP (маркер астроцитов) не изменялся по сравнению с интактными ганглиями.



Рисунок 10. Колокализация E2F1 с глиальным маркером GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) и маркером ядерного хроматина Hoechst 33342

в DRG через 4 часа после односторонней перерезки правого седалищного нерва по сравнению с контрольными ганглиями контралатеральной интактной стороны того же животного. (а) Иммунофлуоресценция E2F1 (зеленый), GFAP (красный) или Hoechst 33342 (синий) и объединенные изображения. Масштабный отрезок 100 мкм. (б) Коэффициент колокализации M1 E2F1 и GFAP в аксотомированном ипсилатеральном и контрольном контралатеральном DRG через 4 часа после перерезки седалищного нерва. t-тест. M±SEM. n=7.

Для исследования участия E2F1 в развитии апоптоза после аксотоми мы определяли колокализацию белка с маркером апоптоза TUNEL по сравнению с контрольным контралатеральным DRG.

Было показано, что перерезка седалищного нерва крысы вызывала апоптоз глиальных клеток DRG, удаленных от места перерезки, через 24 ч после аксотомии, а апоптоз нейронов начинался только через 7 суток (Dzreyan et al, 2021). Поэтому результаты колокализации E2F1 с апоптотическими клетками представлены только через 7 дней после перерезки седалищного нерва, так как к этому времени мы можем наблюдать апоптоз как глии, так и нейронов.

Как видно из рисунка 11, через 7 суток после перерезки седалищного нерва наблюдается повышенная колокализация E2F1-положительных клеток с маркером апоптоза TUNEL по сравнению с контрольной контралатеральной DRG. Эти результаты позволяют предположить, что апоптоз в аксотомированных ганглиях был связан со сверхэкспрессией E2F1.

75



Рисунок 11. Вызванный аксотомией апоптоз в DRG и участке нерва крысы. (а) Визуализация ганглиев DRG и участка нерва крыс, окрашенных антителами 76

против E2F1 (зеленый цвет), и визуализация апоптоза с помощью анализа TUNEL (красный цвет) в контрольной и аксотомированной группах через 7 дней после аксотомии. Масштабный отрезок 100 мкм и 50 мкм. (б) Изменение индекса апоптоза (AI, %) в контрольной и аксотомизированной группах. (в) Коэффициент Мандерса М1 отображающий совместную локализацию E2F1, вызванную аксотомией, с TUNEL-положительными ядрами клеток. t-тест. M±SEM. n=7. \*p<0,05 относительно контрольной группы, \*\*p<0,01 относительно контрольной группы.

Здесь важно отметить тот факт, что через 7 дней после перерезки седалищного нерва, экспрессия E2F1 низкая (Рис. 11). При том, такая картина наблюдается как в поврежденных гангиях, так и в контроле. Такие результаты также говорят в пользу того, что E2F1 учувствует непосредственно только в запуске апоптоза, после чего его содержание в клетке стремится к минимуму.

### 3.4.3 Уровень каспазы 3 и ее активной формы в аксотомированных DRG крыс

Вестерн-блот в наших экспериментах не выявил достоверных изменений уровня каспазы 3 через 1, 4 или 24 часа в аксотомированных правых DRG ганглиях по сравнению с контралатеральными (левыми) ганглиями (Рис. 12а). Вероятно, в первые 24 часа после перерезки седалищного нерва в DRG ганглиях только начал развиваться апоптоз глиальных клеток, как показали данные TUNEL анализа, и имеющейся в клетках каспазы 3 было достаточно для его реализации.

Тем не менее, через 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы активированной (cleaved) каспазы 3 уровень В поврежденном ипсилатеральном ганглии достоверно повышался в 1.5 раза относительно контрольного контралатерального ганглия (p<0.05; Рис. 126). Это свидетельствует о развитии апоптотических процессов в глиальных клетках, т.к. по данным TUNEL анализа в это время апоптоз заметно увеличивался в

глие, но не в нейронах. Таким образом, данные вестерн блот анализа соответствуют усилению апоптоза к этому времени.



Рисунок 12. Иммуноблоттинг: (a) изменение уровня каспазы 3 В аксотомированных ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных; (б) изменение уровня активной каспазы 3 в аксотомированных ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. М±SEM. n=6. \* p <0,05; \*\* p <0,01; # p < 0,05 относительно значения через 1 и 4 часа в ипсилатеральном ганглии

#### 3.4.4 Уровень ацетилирования гистонов НЗ и Н4 в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крыс после аксотомии

Деацетилирование гистонов H3 и H4 способствует нарушению транскрипции и синтезу белка в клетке. Иммуноблоттинг DRG крыс показал значительное снижение уровня ацетилирования лизина 9 в гистоне H3 (AcH3K9) по сравнению с контралатеральными ганглиями через 24 (p < 0,01) часа и 7 дней (p < 0,05) после перерезки седалищного нерва. Уровень ацетилирования гистона H4 (AcH4) снижался позже, через 7 дней (p < 0,05), но не через 1 день после аксотомии (Рис. 13).



Рисунок 13. Влияние перерезки правого седалищного нерва на уровень ацетилирования гистонов H3 (а) и H4 (б) в правом аксотомированном DRG (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левым) ганглием (contra) через 24 ч и 7 дней после аксотомии. t-тест. M  $\pm$  SEM; n = 6. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 по сравнению с контролем (contra).

# 3.4.5 Уровень HDAC1 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях

Уровень HDAC1 в суммарной фракции аксотомированных DRG повышался относительно контроля уже через 1 (р < 0,01) и 4 часа (р < 0,05) после перерезки седалищного нерва. Через 24 часа разницы не наблюдалось. Через 7 дней после аксотомии мы также не наблюдали значительной сверхэкспрессии HDAC1 (Рис. 14).



Рисунок 14. Иммуноблоттинг: изменение уровня HDAC1 в суммарной фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. М±SEM. n=6. \* p <0,05; \*\* p < 0,01

Поскольку HDAC1 может локализоваться как в ядре, так и в цитоплазме и деацетилировать не только гистоны, но и некоторые цитоплазматические белки, экспрессию HDAC1 МЫ исследовали отдельно В ядерной и фракции цитоплазматической фракциях DRG. При этом, в ядерной поврежденных ипсилатеральных ганглиях DRG уровень HDAC1 значительно повышался через 1 час после аксотомии (р < 0,05), но снижался через 4 часа (p < 0.01) по сравнению с контролем (Рис. 15а).



Рисунок 15. Иммуноблоттинг: (а) изменение уровня HDAC1 в ядерной фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG (ipsi) через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы сравнению ПО С контралатеральными (contra) ганглиями тех же животных; (б) изменение HDAC1 цитоплазматической фракции аксотомированных уровня В ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. М±SEM. n=6. \* p <0,05; \*\* p <0,01

В цитоплазматической фракции аксотомизированных DRG уровень HDAC1 увеличивался через 4 часа по сравнению с неповрежденными ганглиями (p<0,01), но не через 1 час или 24 часа (Рис. 15б). Это свидетельствует о перераспределении HDAC1 из ядра в цитоплазму через 4 часа после перерезки седалищного нерва.

## 3.4.6 Уровень HDAC2 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях

HDAC2 относится к первому классу гистондеацетилаз, локализуется исключительно в ядрах клеток, где деацетилирует гистоновые белки (Anderton

еt al., 2013; Вагтоп, 2004). В наших опытах на 4 и 5 DRG ганглиях крысы уровень HDAC2 в ядерной фракции аксотомированных ипсилатеральных ганглиях был достоверно выше, чем в интактных контралатеральных ганглиях (контроль) уже через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва (173%, p<0,01) (Рис. 16). При этом уровень этого белка через 4 и 24 часа в аксотомированных DRG крысы был существенно выше, чем через 1 час после перерезки седалищного нерва, хоть и снижался со временем: на 157% и 76%, соответственно (p<0,01).



Рисунок 16. Иммуноблоттинг: изменение уровня HDAC2 в ядерной фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG (ipsi) через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными (contra) ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. М±SEM. n=6. \* p <0,05; \*\* p < 0,01

Следовательно, гиперэкспрессия HDAC2, инициируемая через 4 часа после аксотомии и поддерживающаяся в течение 24 часов, вероятно, являлась необходимым звеном регуляции выживаемости и смерти клеток DRG ганглиев. Она была, по-видимому, связана как с общим неспецифическим ухудшением состояния животного, так и с регуляцией апоптоза в аксотомированных нейронах.

### 3.4.7 Уровень HDAC3 в аксотомированных DRG крыс и их ядерных и цитоплазматических фракциях

По данным вестерн блот анализа уровень HDAC3 в цитоплазматической фракции поврежденных DRG HDAC3 значительно сверхэкспрессируется уже через 1 час после аксотомии (p<0,01), но снижается через 4 часа по сравнению с контрольными ганглиями (p<0,05) и уровнем, определяемым через 1 час (p<0,01). Через 24 часа после повреждения разницы не наблюдалось (Рис. 176).



Рисунок 17. Иммуноблоттинг: (а) изменение уровня HDAC3 в ядерной фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными животных; ганглиями тех же (б) изменение уровня HDAC3 В цитоплазматической фракции аксотомированных ипсилатеральных DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы по сравнению с контралатеральными ганглиями тех же животных. 2-Way ANOVA. М±SEM. n=6. \* p <0,05; \*\* p <0,01

В ядерной фракции аксотомированных DRG уровень HDAC3 увеличивался через 4 часа после перерезки седалищного нерва по сравнению с неповрежденными ганглиями крыс (p<0,01), но не через 1 или 24 часа (Рис. 17а). Это свидетельствует о перераспределении HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после аксотомии седалищного нерва крысы.

#### 3.5 Уровень мРНК HDAC1, HDAC2, p53 и E2F1 в DRG крыс на разные сроки после аксотомии

Увеличение уровня мРНК HDAC1 было ранним результатом нейротравмы. Достоверное повышение уровня мРНК белка в 7 раз (p<0,01) по сравнению с неповрежденными ганглиями наблюдадлось уже через 1 час после односторонней аксотомии ганглиев DRG. Через 4 часа отмечена схожая динамика (p<0,01), тогда как через 24 часа после травмы уровень мРНК значительно снижался в поврежденных ганглиях относительно показателей через 1 и 4 часа (p<0,01). Таким образом, максимальное увеличение мРНК HDAC1 отмечено в первые 4 часа после перерезки седалищного нерва. При этом к 24 часам показатели возвращались к контрольным значениям (Рис. 18a).

Увеличение мРНК HDAC2 отмечено через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва (p<0,01). Через 1 час после аксотомии достоверных отличий не наблюдалось (Рис. 18б).

Уровень мРНК p53 (Рис. 18в) и E2F1(Рис. 18г), демонстрировали такую же тенденцию через 4 и 24 часа после аксотомии спинномозговых ганглиев крыс (p<0,01). Через 1 час мы не наблюдали сверхэкспрессии мРНК этих белков.



Рисунок 18. Результаты ПЦР в реальном времени: уровень мРНК HDAC1 (a), HDAC2 (б), p53 (в) и E2F1 (г) в DRG крыс на разные сроки после аксотомии. Уровень экспрессии каждой мРНК рассчитывали с использованием порогового цикла (СТ). 2-Way ANOVA. n=3 \*\*p <0.01

#### 3.6 Локализация HDAC1 в нейронах DRG ганглия крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что HDAC1 локализован в основном в нейронах DRG, а не в глиальных клетках, многочисленные ядра которых были визуализированы Hoechst 33342 (Рис. 19а). Экспрессия HDAC1 в ядрах аксотомированных нейронов DRG увеличивалась через 1 час после аксотомии (p<0.01), но снижалась через 4 часа как относительно неповрежденного ганглия (p<0.01), так и в сравнении с одночасовыми ганглиями (p<0.01). Коэффициент совместной локализации HDAC1 с нейрональным маркером NeuN, который окрашивает в основном ядра нейронов, также увеличивался через 1 час (p<0.01), но снижался через 4

часа после перерезки седалищного нерва (p<0.001) (Рис. 196). Более слабая иммунофлуоресценция HDAC1 наблюдалась в цитоплазме нейронов ипсилатеральных ганглиев DRG через 1 час после аксотомии по сравнению с ядерной флуоресценцией. Однако одновременно со снижением HDAC1 в ядрах ипсилатеральных ганглиев DRG уровень HDAC1 в цитоплазме нейронов увеличивался через 4 ч после аксотомии (Рис. 19в).

Это подтверждает факт перераспределения HDAC1 из ядра в цитоплазму. Возможно, активация HDAC1 в цитоплазме в основном способствовала общему увеличению уровня HDAC1 в поврежденных ганглиях DRG.



Рисунок 19. Флуоресцентная микроскопия: (а) экспрессия HDAC1 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции HDAC1 в ядрах и цитоплазме

нейронов ипсилатерального и контрольного контралатерального DRG через 1,4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации HDAC1 и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном контралатеральном и аксотомированном ипсилатеральном ганглиях DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Обозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; HDAC1+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. 2-Way ANOVA. M±SEM. n=6. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.01

#### 3.7 Локализация p53 в нейронах DRG ганглия крысы через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что p53 локализован в основном в нейронах DRG, а не в глиальных клетках, многочисленные ядра которых были визуализированы Hoechst 33342 (Рис. 20а). Уровень белка не изменялся в ядерной фракции DRG в течение первых 4 ч после перерезки седалищного нерва, но уменьшался вдвое через 24 ч как относительно неповрежденных ганглиев (p<0.01), так и в сравнении с одночасовыми ганглиями (p<0.01, Рис. 20б). При этом, уровень p53 в цитоплазматической фракции значительно увеличивался через 24 ч после перерезки седалищного нерва как относительно неповрежденных ганглиев (p<0.01), так и в сравнении с одночасовыми с одночасовыми ганглиями (p<0.01, Рис. 20б). При этом, уровень p53 в цитоплазматической фракции значительно неповрежденных ганглиев (p<0.01), так и в сравнении с одночасовыми с одночасовыми ганглиями (p<0.01), но не через 1 или 4 часа (Рис. 20б).

Коэффициент М1 колокализации p53 и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном контралатеральном и аксотомированном ипсилатеральном ганглиях DRG крысы подтверждает факт перераспределения p53 из ядра в цитоплазму через 24 часа после односторонней аксотомии (p<0.05, Puc. 20в).



Рисунок 20. Флуоресцентная микроскопия: (а) экспрессия p53 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции p53 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного контралатерального DRG через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (в) Коэффициент M1 колокализации p53 и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном контралатеральном и аксотомированном ипсилатеральном ганглиях DRG крысы через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Обозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; p53+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. 2-Way ANOVA. M±SEM. n=6. \*p < 0.05; \*\*p < 0.0

#### 3.8 Локализация E2F1 в нейронах DRG ганглия крысы через 1,4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва

Иммунофлуоресцентная микроскопия подтвердила результаты иммуноблоттинга (Рис. 9). Крупные нейроны DRG, экспрессирующие E2F1,

ядра окружены множеством глиальных клеток, чьи выявляются флуорохромом Hoechst 33342 (Рис. 21а). E2F1 локализовался исключительно в нейронах DRG, но не в глиальных клетках (Рис. 24а). Через 1 час после перерезки седалищного нерва E2F1 практически отсутствовал как в контралатеральном, так и ипсилатеральном ганглиях DRG (Рис. 21б). Через 4 часа после аксотомии средний уровень E2F1 аксотомированных ганглиев значительно повышался относительно одночасовой группы как в цитоплазме нейронов (в 2 раза, p<0,01), так и в особенности в их ядрах (в 2 раза, p<0,01), где флуоресценция E2F1 была максимальной (Рис. 21б). О повышенной локализации E2F1 в ядрах нейронов DRG свидетельствует увеличение коэффициента Мандерса (p<0,05, Рис. 21в). Уровень E2F1 четырехчасовых аксотомированных DRG относительно контралатеральных не подвергшихся аксотомии ганглиев, увеличивался в цитоплазме нейронов на 40% (p<0,05) и в ядрах на 20% (p<0,05), соответственно. Через 24 часа после перерезки седалищного нерва уровень иммунофлуоресценции E2F1 относительно контралатеральных ганглиев не изменялся как в ядре, так и цитоплазме нейронов, но наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции E2F1 в ядрах (p<0,05) и цитоплазме (p<0,05) нейронов аксотомированных ганглиев относительно четырехчасовой группы (Рис. 21б), и повышение интенсивности флуоресценции через 24 часа после перерезки седалищного нерва в аксотомированных ганглиях как в ядре (p < 0.01), так и цитоплазме (p < 0.05), по сравнению с одночасовыми ганглиями.



Рисунок 21. Флуоресцентная микроскопия: (а) экспрессия E2F1 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции E2F1 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного контралатерального DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации E2F1 и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном контралатеральном и аксотомированном ипсилатерального нерва. Обозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный седалищного нерва. Обозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный седалищного нерва. Контрольный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; E2F1+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. OneWay ANOVA. M±SEM. n=6. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01

## 3.9 Эндогенное белок – белковое взаимодействие факторов транскрипции p53 и E2F1 с HDAC1

Иммунофлуоресцентная микроскопия и вестерн-блот анализ показали, что клеточная и внутриклеточная локализация p53 и E2F1 совпадает с HDAC1. Для подтверждения факта межбелкового взаимодействия между HDAC1/ ацетилированный p53 (K373) и HDAC1/ацетилированный E2F1(K120) была проведена коиммунопреципитация (Ко-ИП). Полученный иммунопреципитат подвергали иммуноблоттингу. Иммуноблот показал повышение уровня связывания AcE2F1 (K120)/HDAC1 (Рис. 22а) и Acp53 (K373)/HDAC1 (Рис. 22б) после аксотомии по сравнению с неповрежденными контралатеральными ганглиями (контроль).

а	ИП: AcE2F1	аксотомия 24 ч контроль					24 4		
	иь: нраст	ип	IgG	образец	ип	IgG	образец		кДа
	HDAC1	-			_		-		100
							-		60
A	cE2F1 (Lys120)	-		-	-		-		
									45
6	ИП: Аср53 ИБ: HDAC1	акс	отомі	ня 24 ч	K	онтро.	ль 24 ч		
		ип	IgG	образец	ип	IgG	образец		кДа
	HDAC1	-		-	-		-	1	100
	50 (1 . 070)	_							60
Ac	(lys3/3)	-		-	-		-		
								-	45

Рисунок 22. Результат вестерн-блот анализа ко-иммунопреципитации белка HDAC1 и AcE2F1 (K120) (а), либо HDAC1 и Acp53 (K373) (б) в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG крысы через 24 часа после повреждения. Контрольная группа: симметричные неповрежденные контралатеральные ганглии того же животного. Эндогенные белки HDAC1 были иммунопреципитированы (ИП) антителом против HDAC1, а совместно

осажденные белки AcE2F1 (К120) либо Acp53 (К373) впоследствии были обнаружены антителами против AcE2F1 (K120) либо Acp53 (K373), соответственно (иммуноблоттинг, ИБ). Уровень экспрессии HDAC1 служил контролем коиммунопреципитации. Отрицательный контроль: нормальные IgG: вместо антител против прецепитируемого белка вносили 3 мкг нормального мышиного IgG для исключения неспецифического связывания. Положительный контроль исходный образец, подвергшийся не иммунопреципитации. Для идентификации белков на блоте использовали маркер молекулярных весов.

обнаруженных В «субстрат-фермент» была парах проведена визуализация белок-белковых взаимодействий с помощью системы Duolink<sup>тм</sup> In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma-Aldrich). Белок-белковые взаимодействия визуализируются в виде точек, а количество, локализацию и интенсивность точек определяли с помощью флуоресцентной микроскопии (Alam, 2022; Young, 2019). Как показано на рисунке 23, в аксотомированных ганглиях значительно увеличивается количество сигналов (красные точки) в опытных ганглиях по сравнению с неповрежденными ганглиями. На графике показана средняя интенсивность флуоресценции PLA, указывающая на повышенное взаимодействие Acp53 (K373)/HDAC1 (a) и между AcE2F1 (K120)/HDAC1 (б) в аксотомированных спиномозговых ганглиях крыс. Таким образом, полученные результаты подтвердили наличие прямого физического взаимодействия в исследуемых парах белков (p < 0.01).



Рисунок 23. Результаты Duolink in situ PLA: (a) Репрезентативные изображения Duolink in situ PLA, показывающие, что существует прямое физическое взаимодействие между Acp53 (K373) /HDAC1 и AcE2F (K120)/ HDAC1. В качестве отрицательного контроля одно из первичных антител было исключено. (б) Интенсивность флуоресценции сигналов PLA (красные представляющие взаимодействие Аср53 (K373) точки), И HDAC1 В аксотомированных ганглиях по сравнению с контралатеральными ганглиями. PLA **(B)** Интенсивность флуоресценции сигналов (красные точки). (K373) HDAC1 представляющие взаимодействие AcE2F И В аксотомированных ганглиях по сравнению с контралатеральными ганглиями. Сигналы PLA - дискретные флуоресцентные пятна в различных местах исследуемых клеток, показаны красным цветом, представляя интересующий

белок-мишень. Ядра, окрашенные DAPI - синий цвет. t-тест.  $M \pm SEM$ ; \*\*P < 0,01; n=3. Масштабный отрезок: 10 мкм.

#### 3.10 Анализ активности HDAC1 по отношению к E2F1 и p53 через 24 часа после аксотомии

После выявления пар белков «субстрат-фермент» нами была определена деацетилазная активность HDAC1 в отношении конкретного белка, а именно: ацетилированного E2F1 (Рис. 24а) и ацетилированного p53 (Рис. 24б) в полученном ранее иммунопреципитате этих белков. Исследования на модели перерезки седалищного нерва крысы показали, что аксотомия вызывает значительное увеличение активности HDAC1 по отношению к E2F1 ( $1.06 \pm 0.1$ нг/мл) p53  $(0.9\pm0.1)$ нг/мл) цитоплазматической фракции И В аксотомированных ганглиев через 24 часа после аксотомии (р<0.01). Как графика в аксотомированных ганглиях активность HDAC1 видно ИЗ повышается приблизительно в 5 раз по сравнению с неаксотомированными ганглиями.



Рисунок 24. Активность HDAC1 в иммунопреципитате белка ацетилированного E2F1 (K120) (а) и ацетилированного p53 (K373) (б) в цитоплазматической фракции аксотомированного правого дорзального ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левым) ганглием (contra) через 24 часа после аксотомии. t-тест. M ± SEM; \* p < 0,01; n=4.

Эти результаты подтверждаются вестерн-блот-анализом (Рис. 25), показывающим значительное снижение уровня ацетилированных форм белков p53 (p <0.01) и E2F1 (p <0.01) в этот же момент времени, что по видимому связано с увеличения деацетилазной активности HDAC1.



Рисунок 25. Иммуноблотинг: уровень ацетилированных форм E2F1 (K120) (a) и p53 (K373) (б) в аксотомированном правом дорзальном ганглии (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левым) ганглием (contra) на разные сроки после аксотомии. 2-Way ANOVA.  $M \pm SEM$ ; \* p < 0,05; n=7.

## 3.11 Нейропротекторный эффект ингибирования HDAC вальпроатом натрия

Для изучения механизмов участия исследуемых белков, а также процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы (перерезки седалищного нерва) мы выбрали два коммерчески доступных препарата: вальпроат натрия, ингибитор гистондеацетилаз, и ингибитор фактора траскрипции E2F1 HLM006474.

Вальпроевая кислота (VPA) и ее натриевая соль, использовавшиеся ранее как стабилизаторы настроения, в сравнительно больших дозах ингибируют гистондеацетилазы и оказывают нейропротекторное действие. Она стимулирует протеасомную деградацию HDAC2 (Chuang et al, 2009), ингибирует ее активность, восстанавливает ацетилирование белков, метаболизм и нормальные клеточные функции, повышает выживаемость клеток, снижает некроз и апоптоз при нейротравмах (Kramer, 2003).

В настоящей работе мы использовали вальпроат натрия (Sigma-Aldrich) в дозе 300 мг/кг веса в день, который вводили подопытным крысам внутрибрюшинно в 1.5 мл физиологического раствора сразу после перерезки седалищного нерва и далее в течение 7 дней. Животным контрольной группы вводили 1,5 мл физиологического раствора по той же схеме. Оценивали влияние ингибирования гистондеацетилаз на уровень апоптоза и прооапоптотических белков.

Определение апоптоза в 4-м и 5-м DRG ганглиях крысы проводили через 7 суток после перерезки седалищного нерва по методу TUNEL в двух вариантах:

1) аксотомия (АТ) без вальпроата натрия (VPA) в поврежденных ипсилатеральных (правых) ганглиях, у которых был перерезан правый седалищный нерв (АТ ipsi), и в неповрежденных контралатеральных (левых) ганглиях (АT contra);

2) аксотомия с последующими инъекциями вальпроата (AT+VPA) в поврежденных ипсилатеральных (правых) ганглиях, у которых был перерезан правый седалищный нерв (AT ipsi), и в неповрежденных контралатеральных (левых) ганглиях (AT contra).

Через 7 суток после перерезки седалищного нерва и в ипсилатеральных, и в контралатеральных ганглиях апоптоз наблюдался только у единичных

97

нейронов, но в присутствии VPA апоптоз нейронов не наблюдался. Апоптоз глиальных клеток, как и в других сериях опытов без модуляторов наблюдался намного чаще.



Рисунок 26. Результаты TUNEL анализа, визуализирующего ядра апоптотических клеток с разрывами ДНК в спинномозговом ганглии крыс

через 7 суток после аксотомии. (а) положительный контроль: инкубация ганглиев с нуклеазой бензоназой, инициирующей разрывы ДНК. (b) апоптоз клеток в неповрежденном контралатеральном ганглии в отсутствие вальпроата натрия. (c) апоптоз клеток в поврежденном ипсилатеральном ганглии в отсутствие вальпроата натрия. (d) апоптоз клеток в неповрежденном контралатеральном ганглии в присутствии вальпроата натрия. (e) апоптоз клеток в поврежденном ганглии в альпроата натрия. (c) апоптоз клеток в присутствии вальпроата натрия. (d) апоптоз клеток в неповрежденном контралатеральном ганглии в присутствии вальпроата натрия. (e) апоптоз клеток в поврежденном ганглии в присутствии вальпроата натрия. Белые закрашенные стрелки указывают на ядра апоптотических нейронов; пустые стрелки показывают нейроны с крупными слабо флуоресцирующими ядрами. 2-Way ANOVA. М  $\pm$  SEM; \*\* p < 0,01,\*\*\* p < 0,001; n=6. Масштабный отрезок 100 мкм.

Как видно из рисунка 26, повреждение правого седалищного нерва вызывало 2,7-кратное увеличение уровня апоптоза глиальных клеток в ипсилатеральном правом ганглии по сравнению с контралатеральным левым ганглием (p<0.001). Вальпроат натрия оказывал значительное проапоптотическое действие. Он в 6,6 раз снижал уровень апоптоза в ипсилатеральных (правых) аксотомированных DRG ганглиях и в 4,4 раза в неповрежденных контралатеральных (левых) ганглиях (p<0.001).

Для подтверждения ингибирующего действия вальпроата натрия измеряли активность HDAC1 через 7 суток после перерезки седалищного нерва также в двух вариантах: аксотомия (AT) без вальпроата натрия (VPA) и аксотомия с последующими инъекциями ингибитора (AT+VPA) в поврежденных ипсилатеральных (правых) ганглиях, у которых был перерезан правый седалищный нерв (ipsi), и в неповрежденных контралатеральных (левых) ганглиях (contra).

99



Рисунок 27. Влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень активности HDAC1 в ипсилатеральном (правом) ганглии (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левый) ганглием (contra) в суммарной фракции через 7 дней после аксотомии (AT). 2-Way ANOVA. М  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n=6; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

Через 7 дней после перерезки седалищного нерва вальпроат натрия значительно снижал активность HDAC1 суммарной фракции DRG крысы, почти в 10 раз (р <0,001), что свидетельствует об ингибирующем эффекте препарата (Рис. 27).

Кроме того, косвенно об ингибирующем эффекте вальпроата натрия на деацетилазную активность HDAC1 судили по увеличению уровня ацетилирования гистонов H3 и H4: введение препарата предотвращало вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования гистонов H3 (р < 0,05) и H4 (р < 0,05), которое могло приводить к снижению белкового синтеза в клетке (Рис. 28).



Рисунок 28. Влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень ацетилирования гистов H3 (a) and H4 (б) в ипсилатеральном (правом) ганглии (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левый) ганглием (contra) через 7 дней после аксотомии (AT). 2-Way ANOVA. М  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n=6; \* p < 0,05

Вальпроат натрия отменял, вызванное аксотомией снижение уровня ацетилированного E2F1 (K120) (р <0,05) и ацетилированного p53 (K373) (р <0,05) (Рис. 29).



Рисунок 29. Влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень ацетилированных форм E2F1 (K120) (а) и p53 (K373) (б) в цитоплазматической фракции ипсилатерального (правоого) ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левый) ганглием (contra) через 7 дней после аксотомии (AT). 2-Way ANOVA. М  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n=6; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01

Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 (р <0,01) и р53 (р <0,05) в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белков между ядром и цитоплазмой, на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером.



### Аксотомия+VPA. 7 суток



Рисунок 30. Иммунофлуоресцентная микроскопия (а) влияние вальпроата натрия (VPA) на экспрессию p53 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через 7 суток после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции p53 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального DRG при введении VPA через 7 суток после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации p53 и маркера ядер нейронов NeuN в аксотомированном

ипсилатеральном ганглиях DRG крысы при введении VPA через 7 суток после перерезки седалищного нерва. Обозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; p53+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. OneWay ANOVA. M±SEM. n=6. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*p < 0.001

При этом ацетилированные формы E2F1 и p53 увеличиваются в цитоплазматической фракции под действием ингибитора.



Рисунок 31. Иммунофлуоресцентная микроскопия (а) влияние вальпроата натрия (VPA) на экспрессию E2F1 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG 104

крысы через 7 суток после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции E2F1 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального DRG при введении VPA через 7 суток после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации E2F1 и маркера ядер нейронов NeuN в аксотомированном ипсилатеральном ганглиях DRG крысы при введении VPA через 7 суток после перерезки седалищного нерва. Сбозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; E2F1+NeuN – наложение. Ноеchst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. OneWay ANOVA. M±SEM. n=6. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*p < 0.001

О нейропротекторном свойстве препарата также говорило то, что через 7 дней после перерезки седалищного нерва вальпроат натрия повышал уровень маркера регенерации нервов GAP-43 как в поврежденном ипсилатеральном, так и в неповрежденном контралатеральном ганглии (p<0.05).



Рисунок 32. Влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень GAP-43 (маркер регенерации нервов) в ипсилатеральном (правом) ганглии (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левый) ганглием (contra) через 7 дней после аксотомии. 2-Way ANOVA. М  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n=6; \* p<0,05; \*\* p<0,01

Таким образом, ингибирование гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 вальпроатом натрия защищало глиальные клетки DRG ганглиев крыс от апоптоза, вызванного перерезкой седалищного нерва, практически полностью отменяло, вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования гистонов и транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму нейронов DRG. 3.12 Влияние фармакологического ингибирования E2F1 in vivo на уровень апоптоза и содержание проапоптотических белков в аксотомированных DRG крыс

Для оценки влияния фармакологического ингибирования E2F1 in vivo на уровень апоптоза и содержание проапоптотических белков в аксотомированных DRG крыс мы выбрали химический ингибитор E2F1 HLM006474, сокращенно обозначенный здесь как 6474 (Sigma-Aldrich). Внутрибрюшинное введение этого ингибитора крысам проводили в течение 7 дней.

Введение 6474 значительно снижало апоптоз (индекс апоптоза, %) как в поврежденном ипсилатеральном DRG, так и в поврежденном ипсилатеральном нерве по сравнению с контрольной группой (которым вводили ДМСО) на 1,6 (р <0,01) и 1,7 (р <0,01) раз, соответственно.



E2F ингибитора HLM006474 на апоптоза как В поврежденном ипсилатеральном так И В поврежденном ипсилатеральном (HLM006474+аксот омия) по сравнению контрольной группой (ДМСО+аксотомия) . Крысам ежедневно вводили ДМСО или HLM006474 В течение 7 дней. аксотомии. Масштабный отрезок: 100 мкм. t-Μ  $\pm$ стандартная ошибка

33.

среднего; **\*\***Р <0,01
Повышение уровня активной каспазы 3 и транскрипционного фактора p53 в DRG крыс после нейротравмы было показано выше. Самым ранним проапоптотическим событием в поврежденном DRG было увеличение уровня фактора транскрипции E2F1 через 4 часа после перерезки седалищного нерва. Это предшествовало индукции p53 и активации каспазы 3 через 24 часа после аксотомии. Введение 6474 значительно снижало экспрессию активной каспазы 3 (р <0,05) и фактор транскрипции p53 (р < 0,01), вызванную перерезкой седалищного нерва в общей фракции DRG.



Рисунок 34. Влияние ингибитора E2F1 HLM006474 на уровень активной каспазы 3 (а) и p53 (б) в общей фракции аксотомированного правого дорзального ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левым) ганглием (contra) через 7 дней после аксотомии . 2-Way ANOVA. M  $\pm$  SEM; \* p <0,05; n=7.

#### ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1 Участие проапоптотических белков E2F1, p53 и каспазы 3 в гибели клеток аксотомированных DRG крыс

По результатам протеомного исследования для дальнейшего изучения на млекопитающих были выбраны белки, уровень которых после аксотомии заметно возрастал: p53, E2F1, каспаза 3, гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3.

Белок p53 является многофункциональным белком, участвующим во множестве клеточных процессов. Как фактор транскрипции, он контролирует экспрессию сотен и, возможно, тысячи генов, участвующих в регуляции метаболизма, стрессовых реакций, пролиферации, апоптоза и др. (Chumakov, 2007; Brooks, Gu, 2010). Его проапоптотическая активность связана со стимуляцией биосинтеза каспазы 6, Puma, Noxa, Apaf-1 и других белков, участвующих в различных стадиях апоптоза (Joerger, Fersht, 2016). Однако, он также может функционировать и независимо от транскрипции: механизм, связан с перемещением p53 в митохондрии, что в свою чередь нарушает биоэнергетические процессы и стимулирует высвобождение цитохрома с и AIF, что приводит к развитию апоптоза (Brooks, Gu, 2010).

Стоит отметить, что в нормальных физиологических условиях уровень p53 в клетках не высок. Это связано с быстрым MDM2-зависим убиквитинированием белка и его протеасомной деградацией. Однако, повреждающие воздействия, такие как гипоксия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, ионизирующее излучение, способствуют гиперэкспрессии p53 (Brooks, Gu, 2010).

Проведенные исследования выявили 1.5-кратное повышение уровня проапоптотического белка p53 в ганглиях БНЦ речного рака через 4 часа после аксотомии (Табл. 2). Это подтверждает результаты протеомных экспериментов (Табл. 1) и свидетельствует об инициации апоптоза в аксотомированных ганглиях. Уровень проапоптотического белка p53 в ядерной и цитоплазматической фракциях поврежденных DRG крыс изменялся по-разному по сравнению с неповрежденными контралатеральными DRG (Табл. 3, Рис. 8). Он не изменялся в ядерной фракции DRG в течение первых 4 ч после перерезки седалищного нерва, но уменьшался вдвое через 24 ч. При этом, уровень p53 в цитоплазматической фракции значительно увеличивался через 24 ч после перерезки седалищного нерва, но не через 1 или 4 часа. Хотя увеличение уровня мРНК белка наблюдается уже через 4 часа (Рис. 18в). Результаты иммунофлуоресцентного анализа также свидетельствуют о транслокации p53 из ядра в цитоплазму через 24 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 20). В этот же период времени происходило усиление апоптоза клеток DRG (Рис. 7).

После синтеза в цитоплазме p53 транспортируется в ядро, где связывается с ДНК. Несвязанный p53 образует комплекс с MDM2, который моноубиквитинирует его и транспортирует обратно в цитоплазму, где он дополнительно убиквитинируется и быстро деградирует в протеасомах (Chumakov, 2007; Brooks, Gu, 2010). Накопление p53 в цитоплазме может быть связано с высокой скоростью синтеза в цитоплазме, нрушениями деградации, а также с ядерным экспортом белка (Ma et al., 2017).

Обсуждая возможные механизмы накопления белка в цитоплазме аксотомированных нейронов спинномозговых ганглиев крыс, вспомним доменную организацию p53 (Рис. 35).



Рисунок 35. Схема строения p53. Структура p53 включает в себя трансактивационный домен, состоящий из двух субдоменов TAD1 и TAD2, за которыми располагается область, насыщенная пролином (PRR), ДНКсвязывающего центрального домена, образованного иммуноглобулинподобным β-сэндвич-каркасом и расположенной на его конце ДНКсвязывающей поверхностью, а также домена тетрамеризации и С-концевого домена СTD, регулирующим активность p53 (Родькин и др., 2021).

Белок p53 состоит из одной полипептидной цепи из 393 аминокислот. В клетках он образует тетрамер из двух одинаковых димеров. Как у многих факторов транскрипции, в первичной структуре p53 можно выделить ряд функциональных модулей. На N-конце располагается трансактивационный домен TAD (transactivation domain), подразделяющийся на два субдомена TAD1 и TAD2 (аминокислоты 1–43 и 44–63). За ними следует богатый пролином участок PRR (proline-rich region, аминокислоты 64–92), ДНК-связывающий домен DBD (аминокислоты 102–292), который распознает p53RE и связывается с ним, сигнал ядерной локализации NLS (nuclear localization sequence); домен TET (tetramerization domain, аминокислоты 320–

355), ответственный за тетрамеризацию p53, и С-концевой домен (аминокислоты 356–393). Домены DBD и TET высококонсервативны, тогда как внутренне неупорядоченные домены TAD и С-концевой домен более изменчивы, что позволяет белку p53 гибко взаимодействовать со многими партнерами. Именно С-концевой домен играет важную роль в активации, клеточной локализации и деградации p53 (Uzdensky, 2020; Joerger, Fersht, 2016).

Разнообразные модификации В С-концевых участках p53 (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, пришивание убиквитинподобных белков SUMO NEDD-8) И приводят к нейтрализации ингибирующего действия С-концевого сегмента, к дальнейшей стабилизации р53, как позитивной, так и негативной модуляции его активности и к изменениям его внутриклеточной локализации (Joerger, Fersht, 2016).

Р53 может ацетилироваться р300-гистонацетилтрансферазой (ГАТ) по С-концам нескольких остатков лизина. Находящийся в комплексе с р300/СВР транскрипционный коактиватор-PCAF также ацетилирует р53 в области сигнала ядерной локализации по Lys-320, Позже было показано, что p53 может in vivo ацетилироваться в ответ на множество разнообразных клеточных сигналов стресса. Р300/СВР и РСАF ацетилируют p53 по различным сайтам; p300/CBP - по К372, К373, К381 и К382 по С-концам, а РСАF - по K320 в линкерной области, соединяющей ДНК-связывающий и тетрамеризующий домены (Brooks, Gu, 2011). Ацетилирование p53 по каждому из этих двух участков приводит к значительному повышению трансактивационной активности р53. В результате указанных процессов происходит стимуляция инициации транскрипции с р53-респонсивного промотора. Показано, что сверхэкспрессия РСАГ способствовала регенерации сенсорных аксонов на расстоянии до 1 мм от места поражения в моделях (Anderton el повреждения спинного al. 2013). Лве мозга другие ацетилтранферазы, hMOF и TIP60, учувствуют в ацетилирование p53 по K120 в ДНК - связывающем домене. Интересно, что данная модификация не

влияние на стабильность p53 и его способность связывать ДНК, однако ацетилирование p53 вне С-терминального домена имеет решающее значение для активации таких проапоптотических генов, как PUMA и BAX.

Ацетилирование p53 стимулируется позитивным регулятором (фосфорилирование) и отменяется негативным регулятором (Mdm2) (Brooks, Gu, 2010). Это подтверждает мысль о том, что, вне зависимости от механизма действия, ацетилирование p53 является, вероятно, решающим для его функционирования в качестве супрессора опухолей.

Учитывая тот факт, что ацетилирование белка p53 необходимо для стабилизации, ядерной локализации, и активация транскрипции, активность p53 может быть специфически изменена путем регулирования активности HDACs.

Накопление белка в цитоплазме поврежденных ганглиев могло быть также связанно с усилением синтеза белка. Потенциальными сигналами для синтеза p53 при аксотомии являются такие факторы транскрипции, как E2F1, с-Мус, p38, гиперэкспрессия которых была продемонстрирована в аксотомизированных ганглиях БНЦ раков в протеомном исследовании (Demyanenko et al., 2019).

Наши исследования, показали, что аксотомия вызывает значительное увеличение уровня p53 в цитоплазме нейронов, что указывает на дополнительную нетранскрипционную активность p53, индуцированную аксотомией, вызывающей ядерно-цитоплазматическую транслокацию p53.

Независимая от транскрипции проапоптотическая активность p53 связана с его транслокацией в митохондрии с нарушением биоэнергетических процессов, высвобождением цитохрома с и AIF, которые вызывают активацию ключевой проапоптотической протеазы – каспазы 3, что в конечном итоге приводит к апоптозу.

Исполнительным звеном, реализующим программу апоптоза, является каскад каспаз – протеолитических ферментов, последовательно активирующих друг друга и нижележащие протеазы. Из них центральную

роль играет каспаза 3, которая активируется каспазой 8 после связывания внеклеточных проапоптотических лигандов (Fas, TNF и др.) с рецепторами на клеточной мембране (внешний путь) или каспазой 9 после высвобождения цитохрома с и других проапоптотических белков из межмембранного пространства митохондрий (внутренний путь). Каспаза 9 стимулирует нижележащие каспазы 6 и 7 и другие гидролитические белки, разрушающие ДНК и клеточное ядро (Dzreyan et al., 2021).

Проведенный иммуноблотинг не выявил достоверных изменений уровня каспазы 3 через 1–24 часа после перерезки седалищного нерва в ипсилатеральных (правых) DRG ганглиях, по сравнению с контрольными контралатеральными (левыми) ганглиями (Рис. 12а). Эти данные говорят о том, что в первые 24 часа после перерезки седалищного нерва в 4 и 5-м DRG ганглиях апоптоз еще не развивался, что согласуется с результатами TUNEL-опосредованной флуоресцентной микроскопии (Рис. 7). Тем не менее, через 24 часа после перерезки седалищного нерва в 4 и 5-м DRG ганглиях апоптоз еще не развивался, что согласуется с результатами TUNEL-опосредованной флуоресцентной микроскопии (Рис. 7). Тем не менее, через 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы уровень активированной (cleaved) каспазы 3 в поврежденном ипсилатеральном ганглии достоверно повышался в 1.5 раза относительно контрольного контралатерального ганглия (Рис. 126). Это свидетельствует о развитии апоптотических процессов в глиальных клетках, т.к. по данным TUNEL анализа в это время апоптоз заметно увеличивался в глие, но не в нейронах (Рис. 7).

Экспрессия p53, каспазы 3 и других проапоптотических белков (каспаз 7, 8, 9, SMAC/DIABLO, Apaf-1 и др.) контролируется транскрипционным фактором E2F1 (Polager, Ginsberg, 2009). Вестерн блот анализ показал, что сверхэкспрессия E2F1 наблюдалась уже через 4 часа после перерезки седалищного нерва, как в ядерной, так и в цитоплазматической фракциях аксотомированных DRG крысы (Рис. 9). Это предшествовало активации каспазы 3 (Рис. 12) и изменениям уровня p53 (Рис. 8) в аксотомированных ганглиях крысы. Максимальный уровень мРНК белка наблюдается через 4 часа после перерезки седалищного нерва и остается повышенным в течение первых 24 часов после травмы (Рис. 18г). Вероятно, повышенное содержание белка в цитоплазме складывается как за счет экспорта белка из ядра, так и за счет увеличения экспрессии самого гена.

Иммуноблоттинг выявил сверхэкспрессию E2F1 уже через 4 часа после перерезки седалищного нерва как в цитоплазматической, так и ядерной фракциях ганглиев (Рис. 9), а также уже через 1 час в аксотомированных ганглиях речного рака (Табл. 2). Эти результаты согласуются с данными опытов с протеомными микрочипами, в которых 1.8-кратное повышение экспрессии E2F1 В аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака наблюдалось уже через 1 и 3 часа после аксотомии (Табл. 1). Важное наблюдение состоит в том, что уровень экспрессии E2F1 в наших экспериментах повышался как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов. В ядре E2F1, очевидно, действует как фактор транскрипции. Известно, что он регулирует экспрессию проапоптотических белков, таких как каспазы 3, 7, 8 и 9, SMAC/DIABLO, Apaf-1, p53, p73, белки семейства Bcl-2 и тем самым стимулирует апоптоз. Как показано в протеомном исследовании, В аксотомированных ганглиях БНЦ рака одновременно с E2F1 повышались уровни этих проапоптотических белков (Табл. 1). Это свидетельствует об участии E2F1 в апоптозе нейронов. В случае цитоплазматической локализации одна из возможных функций E2F1 – его взаимодействие с митохондриями и регуляция их функций, например, путем непосредственного взаимодействия с белком Bcl-xL на наружной митохондриальной мембране и регулирования ее пермеабилизации.

Видно, что динамика экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях, достигая своего максимума к 4 часам после аксотомии, постепенно уменьшается. Это говорит, во-первых, о скором E2F1-зависимом ответе в нейронах, развивающемся при аксональном стрессе, во-вторых, указывает на роль E2F1 в запуске апоптоза, после чего его содержание в клетке стремится к минимуму.

Полученные результаты обусловили использование нами ингибиторного анализа. Описаны четыре ингибитора E2F1, три из которых представляют

собой пептиды (Montigiani et al., 2003) и один - это низкомолекулярный ингибитор (HLM006474, сокращенно здесь 6474) (Rosales-Hurtado, et al., 2018; Giralt et al., 2018; Liu et al., 2020). Насколько нам известно, ни один из них не тестировался in vivo и не применялся в случаях повреждения периферических нервов. Внутрибрюшинное введение этого ингибитора крысам в течение 7 суток полностью устраняло индуцированную аксотомией повышенную экспрессию проапоптотически активных белков каспазы 3 и p53 (Рис. 34), а также защищало аксотомированные клетки DRG от апоптоза (Рис. 33). Следовательно, фактор транскрипции E2F1 может быть вовлечен в индуцированное аксотомией повреждение нейронов DRG и глиальных клеток.

Ингибитор E2F1 6474 блокирует транскрипционную активность E2F1, нарушая связывание E2F1-ДНК (Rosales-Hurtado et al., 2018). Ихонг Ма и др. показали на нескольких клеточных линиях, что воздействие HLM006474 к подавлению известных мишеней E2F1. приводит включая транскрипционный фактор p53 (Ma et al., 2008). Таким образом, снижение уровня фактора транскрипции p53 в аксотомированных DRG через 7 дней введения 6474 животным напоминает эффект снижения активности E2F1 и является прямым свидетельством эффективности ингибитора. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что ингибитор 6474 действует in vivo, и использование этого соединения может иметь клиническое применение при лечении нейротравмы и ее последствий.

Известно, что нарушение регуляции экспрессии E2F1 вызывает апоптоз через p53-зависимый и p53-независимый пути (Stanelle, Pützer, 2006). Литературные данные о взаимодействии p53 и E2F1 остаются весьма противоречивыми (Stanelle, Pützer, 2006). E2F1 напрямую связывается как с MDM2, так и с p53, увеличивая экспрессию последнего (Inoue et al., 2015; Wichmann et al., 2010). Было показано, что в раковых клетках активация p53 ингибирует активность E2F1, вызывая остановку клеточного цикла, или p53 напрямую взаимодействует с E2F1 и запускает апоптоз. Наоборот, при повреждении нерва повышается экспрессия E2F1, что стимулирует

117

высвобождение цитохрома с из митохондрий и в конечном итоге приводит к апоптозу. Несколько исследований показали, что E2F1 взаимодействует с p53, активируя экспрессию проапоптотических кофакторов p53, таких как JMY и TP53INP1, а также белков, стимулирующих апоптоз (ASPP) ASPP-1 и ASPP-2, посредством прямого механизма транскрипции. Из другого исследования (Sangwan et al., 2012), известно, что запуск апоптоза с помощью E2F1 опосредован, по крайней мере частично, активацией транскрипции p19ARF, которая инактивирует MDM2, тем самым стабилизируя p53. Ма и др. наблюдали обратное течение проапоптотических явлений: повышенная экспрессия p53 через 1 ч после повреждения спинного мозга сопровождалась повышенной экспрессией E2F1 через 3 часа (Ma et al., 2008). Столь противоречивые данные свидетельствуют о том, что механизмы развития апоптоза, сопровождающегося активацией этих двух белков, остаются не до конца изученными.

Данных о взаимосвязи p53 и E2F1 при поражении периферических нервов нет. Это позволило сделать нам второй важный вывод, основанный на результатах исследования: повышение экспрессии E2F1 через 4 часа после повышением повреждения сопровождается экспрессии р53, а также активацией каспазы 3 с последующим развитием глиального апоптоза через 24 часа и развитие апоптоза нейронов через 7 дней после аксотомии седалищного нерва крысы. Однако в то время как каспаза-3 способствует клеточной деградации на последних стадиях пути апоптоза, ингибиторы каспазы не всегда обеспечивают нейропротекцию. Это связано с существованием независимых от каспаз путей апоптоза или других цистеиновых протеаз, таких как кальпаины или катепсины, которые также участвуют в апоптотической гибели нейронов.

Последовательное увеличение экспрессии E2F1 и p53 также показано с помощью протеомного анализа аксотомированных ганглиев раков (Табл. 1). Мы предполагаем, что в условиях аксотомии фактор транскрипции E2F1 может участвовать в активации p53 в качестве нижестоящего факторамишени, который, в свою очередь, вызывает вторичные изменения экспрессии генов и белков, запускающих апоптоз. Таким образом, повышение экспрессии E2F1 может быть ключевым событием в инициации апоптоза нейронов и отдаленных глиальных клеток в аксотомированных DRG и подготавливает последующие изменения других белков, в частности p53, и общий ответ клеток ганглий в ответ на повреждение. Например, Каминс и др. показали, что ингибирование пути E2F1/p53 предотвращает апоптоз нейронов (Camins et al., 2007).

Ранее проведенный нами ингибиторный анализ in vivo на нейронах рецептора растяжения речного рака (PPP) с использованием активаторов и ингибиторов р53 показал, что индуцированная аксотомией гибель нейронов и глиальных клеток связана как с влиянием р53 на процессы транскрипции, так и с независимым от транскрипции влиянием р53 на митохондрии в клетке. Эти результаты в сочетании с данными иммуноблотинга относительно ядерной и цитоплазматической локализации E2F1 позволяют предположить, что роль этого белка в гибели нервных клеток не ограничивается его действием в качестве фактора транскрипции, но также связана с его прямым взаимодействием с митохондриями и белком р53 в цитоплазме клеток. Важно отметить, что глиальные клетки, расположенные на большом расстоянии в несколько сантиметров от места рассечения, были более уязвимы для аксотомии, чем нейроны DRG. Действительно, глиальный апоптоз наблюдался через 24 ч после аксотомии и усиливался на 7-й день, в то время как апоптоз некоторых нейронов DRG не начинался до 7-го дня (Рис. 7).

В связи с этим для нас также было важно определить, в каких клетках, нейронах или глии экспрессируется этот белок. Интересно отметить, что E2F1 был локализован как в нейронах DRG, так и в глиальных клетках. Однако коэффициент колокализации E2F1 с GFAP, который окрашивает в основном глиальные клетки, существенно не изменился по сравнению с интактными ганглиями, а увеличение экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях было связано с ростом белка в нейронах DRG. Наши данные представляют собой первое успешное применение ингибитора E2F HLM006474 in vivo, а его нейропротекторная эффективность свидетельствует о том, что E2F1 является важной терапевтической мишенью, поскольку проведенный ингибиторный анализ продемонстрировал участие фактора транскрипции E2F1 в запуске повреждения нейронов DRG и глиальных клеток при аксотомии.

E2F1 и p53 можно рассматривать как потенциальные мишени для терапии повреждений нервов, а их ингибиторы следует изучать как перспективные нейропротекторные препараты.

Учитывая многообразие функций E2F1 и p53 в клетках, актуальным остается исследование механизмов регуляции этих белков в процессах нейродегенерации и нейропротекции, к тому же стоит обратить внимание и на дополнительные пути регуляции с участием гистондеацетилаз.

# 4.2 Участие HDAC1, HDAC2 HDAC3 в гибели клеток аксотомированных DRG крыс

Патологические воздействия, такие как ишемия или нейротравмы, снижают ацетилирование гистонов и негистоновых белков (Thomas, D'Mello, 2018; Lebrun-Julien, Suter, 2015; Baltan et al, 2011; Broughton, 2009; Kouzarides et al, 2006). Деацетилирование гистонов H3 и H4 способствует нарушению транскрипции и синтезу белка в клетке.

Иммуноблоттинг DRG крыс показал значительное снижение уровня ацетилирования лизина 9 в гистоне H3 (AcH3K9) по сравнению с контралатеральными ганглиями через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва (Рис. 13а). Уровень ацетилирования гистона H4 (AcH4) снижался позже, через 7, но не через 1 день после аксотомии (Рис. 13б). Такое деацетилирование гистонов может быть результатом активности гистондеацетилаз (HDACs). Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать изменения экспрессии данных белков как начальные этапы патологического процесса.

Эпигенетическая регуляция повреждений периферических нервов в последние годы привлекает пристальное внимание исследователей. Но роль эпигенетических процессов в регуляции гибели и выживаемости клеток в первые часы после повреждения нервов пока не изучена (Lebrun-Julien, Suter, 2015; Zhang et al., 2012; Biermann et al., 2010). Исследования последних лет показали, что некоторые изоформы HDACs обладают защитными эффектами, а другие наоборот могут способствовать гибели клеток (Palmisano, Di Giovanni, 2018; Thomas, D'Mello, 2018; Schmitt, 2014; Bardai et al., 2012; Krämer, 2009).

нейронах HDAC1 HDAC2 В нормальных И локализуются преимущественно в ядрах (Bardai et al., 2012; Krämer, 2009). Однако, при действии неблагоприятных факторов HDACs Ι класса способны перемещаться из ядра в цитоплазму клеток, где они влияют на функцию разнообразных негистоновых белков (Thomas, D'Mello, 2018; Schmitt, 2015; Chen et al., 2012). Гистондеацетилаза HDAC3 в нейронах локализована главным образом в цитоплазме и активируется путем фосфорилирования серин/треонин киназы GSK3<sub>β</sub>: механизм, который обычно ингибируется стимуляцией факторами роста сигнального пути PI3K / Akt (Demyanenko et al, 2020).

Сверхэкспрессия HDAC1 была ранним результатом нейротравмы. Действительно, уровень HDAC1 в суммарной фракции аксотомированных DRG повышался относительно контроля уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 14). Через 24 часа разницы не наблюдалось. Через 7 дней после аксотомии мы также не наблюдали значительной сверхэкспрессии HDAC1. При этом повышенный уровень HDAC1 был отмечен как в нейронах позвоночных животных, на примере крысы, так и в нервных клетках безпозвоночных (речной рак Astacus leptodactylus). Это свидетельствует о том, активности белков что, вероятно, механизм регуляции путем ИХ

121

ацетелирования и деацетилирования является эволюционно древним и высококонсервативным.

Поскольку HDAC1 может локализоваться как в ядре, так и в цитоплазме и деацетилировать не только гистоны, но и некоторые цитоплазматические белки, мы исследовали отдельно экспрессию HDAC1 в ядерной и цитоплазматической фракциях DRG. При этом, в ядерной фракции поврежденных ипсилатеральных ганглиях DRG уровень HDAC1 значительно повышался через 1 час после аксотомии, но снижался через 4 часа по сравнению с контролем (Рис. 15а). В цитоплазматической фракции аксотомизированных DRG уровень HDAC1 увеличивался через 4 часа по сравнению с неповрежденными ганглиями, но не через 1 час или 24 часа (Рис. 15б). Это свидетельствует о перераспределении HDAC1 из ядра в цитоплазму через 4 часа после перерезки седалищного нерва (Abramova et al., 2006).

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что HDAC1 локализован в основном в нейронах DRG, а не в глиальных клетках, многочисленные ядра которых были визуализированы Hoechst33342 (Рис. 19). Экспрессия HDAC1 в ядрах аксотомированных нейронов DRG увеличивалась через 1 час после аксотомии, но снижалась через 4 часа (Рис. 19б). Коэффициент совместной локализации HDAC1 с нейрональным маркером NeuN, который окрашивает в основном ядра нейронов, также увеличивался через 1 час, но снижался через 4 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 19в). Более слабая иммунофлуоресценция HDAC1 наблюдалась в цитоплазме нейронов ипсилатеральных ганглиев DRG через 1 час после аксотомии по сравнению с ядерной флуоресценцией.

Однако одновременно со снижением HDAC1 в ядрах ипсилатеральных ганглиев DRG уровень HDAC1 в цитоплазме нейронов увеличивался через 4 ч после аксотомии. Это подтверждает факт перераспределения HDAC1 из ядра в цитоплазму. Возможно, активация HDAC1 в цитоплазме в основном способствовала общему увеличению уровня HDAC1 в поврежденных ганглиях DRG.

Уровень HDAC2 в ядерной фракции аксотомированных DRG повышался относительно контроля уже через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 16). Содержание HDAC3 в цитоплазматической фракции поврежденных DRG значительно сверхэкспрессируется уже через 1 час после аксотомии (Рис. 176). В ядерной фракции аксотомированных DRG уровень HDAC3 увеличивался через 4 часа после перерезки седалищного нерва по сравнению с неповрежденными ганглиями крыс (Рис. 17а), что свидетельствует о перераспределении HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после аксотомии седалищного нерва крысы.

Эти изменения происходят задолго до развития апоптоза. Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать повышение уровня гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3 как начальные этапы патологического процесса. Вероятно, эти белки готовят последующие изменения других белков и общую реакцию клеток DRG ганглиев на перерезку седалищного нерва.

Для изучения механизмов участия исследуемых белков, а также процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы (перерезки седалищного нерва) был использован неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия (300 мг/кг).

Эффект вальпроата натрия выражался в следующем:

1. Вальпроат натрия оказывал значительное проапоптотическое действие. Он в 6.6 раз снижал уровень апоптоза в ипсилатеральных (правых) аксотомированных DRG ганглиях и в 4. 4 раза в неповрежденных контралатеральных (левых) ганглиях (Рис. 26)

2. Введение препарата предотвращало вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования гистонов НЗ и Н4, которое могло приводить к снижению белкового синтеза в клетке (Рис. 28). 3. Вальпроат натрия отменял, вызванное аксотомией снижение уровня ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) после аксотомии (Puc. 29).

4. Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 (Рис. 31) и p53 (Рис. 30) в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белков между ядром и цитоплазмой, на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером. Таким образом, ингибирование вальпроатом натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму нейронов DRG. Это говорит о том, что во-первых уровень ацетилирования белка зависит от деацетилазной активности HDAC1, во-вторых, влияет на внутриклеточную локализацию белка.

5. О нейропротекторном свойстве препарата также говорило то, что через 7 дней после перерезки седалищного нерва вальпроат натрия повышал уровень маркера регенерации нервов GAP-43 как в поврежденном ипсилатеральном, так и в неповрежденном контралатеральном ганглии (Рис. 32).

# 4.3 Ацетилирование/деацетилирование p53 и E2F1 при аксотомии

Гистоновые деацетилазы способны деацетилировать и централизованно регулировать активность некоторых факторов транскрипции, а также других белков в цитоплазме клеток (Thomas, D'Mello, 2018). Однако роль эпигенетических процессов, включая процессы деацетилирования негистоновых белков в регуляции гибели и выживаемости клеток после повреждения нервов, пока не изучена. Наши исследования показывают, что являются важнейшими белками, которые E2F1 и p53 координируют выживаемость и апоптотическую гибель нервных клеток после нейротравмы. Из чего возникает вопрос об эпигенетической регуляции этих белков под действием HDAC1, HDAC2 и HDAC3, уровень которых повышался как в

ядерной, так и цитоплазматической фракциях аксотомированных ганглиях DRG крысы.

Поэтому актуальным остается исследование механизмов регуляции белков p53, E2F1 деацетилированием с участием гистондеацетилаз класса I HDAC 1, 2 и 3 и их ингибиторов в первые часы после повреждения нервов.

#### Белок E2F1

Согласно E2F1 последним исследованиям является одним ИЗ субстратов негистоновых некоторых гистондеацетилаз (HDACs). Иммуноблоттинг показал, что уровень ацетилированного E2F1 (K120) снижается через 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы (Рис. 25а), что говорит в пользу деацетилирования белка под действием HDAC1, которая также обнаружена в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG (Рис. 19). Наши эксперименты показали повышенную регуляцию E2F1 в модельных объектах аксотомии как беспозвоночных, так и позвоночных животных: в билатерально аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака, а также в аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс на ранних сроках после аксотомии. Важно отметить, что цитоплазматическая локализация E2F1 наблюдалась в обоих случаях: в нейронах позвоночных животных, на примере крысы, так и в нервных клетках безпозвоночных, таких как речной рак Astacus *leptodactylus*. Это свидетельствует о том, что, вероятно, механизм регуляции активности белков путем их ацетелирования и деацетилирования является эволюционно древним и высококонсервативным.

Было показано, что iHDAC влияют на активность E2F1 (Abramova et al., 2006). В раковых клетках в ответ на генотоксический стресс, вызванный доксорубицином, E2F1 ацетилируется PCAF по трем лизинам (K117, 120 и 125). Это стабилизирует белок и увеличивает его специфическое связывание с ДНК (Martínez-Balbás et al., 2000; Ianari et al., 2004). Ацетилирование этих лизинов вызывает накопление убиквитинированного, но стабильного E2F1 (Galbiati et al. др., 2005). Ацетилирование E2F1 способствует привлечению

модифицирующих хроматин ферментов и факторов репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Xia et al., 2020).

В качестве деацетилазы в разных типах раковых клеток, как правило, выступает HDAC1 (Martínez-Balbás et al., 2000; Zhang et al., 2014; Wu et al., 2015). В клетках сетчатки деацетилирование E2F1 эпителиальных осуществляет Sirt1, что способствует устойчивости клеток к окислительному стрессу. вызываемому H2O2 (Gong et al., 2020). Таким образом, ацетилирование/деацетилирование E2F1 может способствовать устойчивости разных типов клеток к повреждению. Однако, информации об ацетилировании/деацетилировании E2F1 в клетках периферической нервной системы как норме, так и при патологии в доступной нам литературе обнаружить не удалось.

В нашей работе показано, повышение уровня ацетилированного E2F1 (K120) под действием неселективного ингибитора гистондеацетилаз, вальпроата натрия (Рис. 29). Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белка (Рис. 316), на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером (Рис. 31в). При этом ацетилированная форма E2F1 по лизину K120 увеличивается в цитоплазме под действием ингибитора.

Важно отметить, что цитоплазматическая локализация E2F1 наблюдалась как: в нейронах позвоночных животных, на примере крысы, так и в нервных клетках безпозвоночных, таких как речной рак *Astacus leptodactylus*. Этоговорит в пользу того, что, вероятно, механизм регуляции активности белков путем их ацетелирования и деацетилирования является эволюционно древним и высококонсервативным.

### Белок р53

Белок p53 относят к числу негистовых субстратов гистондеацетилаз I класса (Thomas; 2018; Schmitt, 2015; Anderton et al., 2013; Brochier et al., 2013;

Вгоокѕ, Gu, 2011). Гибель нейронов, вызванная p53, была продемонстрирована при различных нейродегенеративных заболеваниях и в экспериментальных моделях повреждения нервов (Rodkin et al., 2020; Schmitt, 2015; Schmitt, 2014; Checkler and Alves da Costa, 2014; Richardson et al., 2009; Yu and Zhang, 2005). Учитывая тот факт, что ацетилирование белка p53 необходимо для стабилизации, ядерной локализации и активации транскрипции (Schmitt, 2015; Schmitt, 2014; Brooks, Gu, 2011), активность p53 может быть специфически изменена путем регулирования активности HDACs (Thomas; 2018; Brooks, Gu, 2011; Kruse, Wei, 2008).

НDAC1 и HDAC2 активируют p53 путем деацетилирования его остатков K381 и K382, что приводит к увеличению экспрессии генов, участвующих в апоптозе, включая Bbc3 (PUMA) и Bim. HDAC2 может выполнять дополнительную функцию по подавлению других генов-мишеней p53, таких как p21. В этом механизме HDAC2 действует с FOXO3a, который рекрутирует HDAC2 на сайт промотора p21 (Puc. 36) (Lebrun-Julien, Suter, 2015; Schmitt, 2015).



Рисунок 36. Эффекты деацетилирование p53 с участием HDAC1, HDAC2, SIRT1. HDAC3 HDAC1 HDAC2 активируют p53 И И путем его деацетилирования по остаткам К381 и К382, что приводит к увеличению экспрессии генов, участвующих в апоптозе, включая Bbc3 (PUMA) и Bim, что в свою очередь способствуют активации ВАХ и каспазного каскада и приводит к активации эндонуклеазы, которая расщепляет ДНК. HDAC2 может дополнительно подавлять другие гены-мишени p53, включая p21. HDAC3 играет основную роль В деацетилировании гистонов И образовании гетерохроматина. В нейронах HDAC3 активируется фосфорилированием с участием GSK3β серин/треонинкиназы. Ас – ацильная группа; Р – остаток фосфорной кислоты (Родькин и др., 2021).

Нами было показано, что перерезка седалищного нерва в первые 24 ч после аксотомии вызывает транслокацию HDAC1 из ядра в цитоплазму, где она может, по всей видимости, деацетилировать различные негистоновые белки, в том числе белок p53, гиперэкспрессия которого также наблюдалась в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG крысы (Рис. 20). Деацетилирование p53 может привести к изменению его субклеточной локализации и, как следствие, его активности. Именно поэтому HDAC стали многообещающими мишенями для терапевтических вмешательств при патологических состояниях, включая нейродегенеративные патологии.

HDAC3, наряду с HDAC1 и HDAC2, играет первостепенную роль в деацетилировании гистонов и образовании гетерохроматина (Thomas, D'Mello, 2018). Гистондеацетилаза HDAC3 в нейронах локализована главным образом в цитоплазме и активируется путем фосфорилирования серин/треонин киназы GSK-3β: механизм, который обычно ингибируется стимуляцией факторами роста сигнального пути PI3K/Akt. Ряд исследований показывают ключевую нейротоксическую роль HDAC3, однако специфичность активации HDAC3 при индукции гибели нейронов и влияние HDAC3 на уровень апоптоза и экспрессию p53 после аксотомии до конца не изучены (Thomas, D'Mello, 2018; Schmitt, 2015).

Ряд работ демонстрирует защитный эффект ингибиторов HDAC на различных экспериментальных моделях повреждения нервов (Thomas, D'Mello, 2018).

Наши результаты показали, что уровень ацетилированной формы белка p53 (К373) снижался в цитоплазматической фракции ганглиев через 24 часа после аксотомии (Рис. 25б). Однако, ацетилирование p53 по лизину К373 увеличивается в цитоплазме под действием ингибитора гистондеацетилаз (Рис. 29). Кроме того, введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень p53 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белка (Рис. 30), на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером.

Вероятно, защитный эффект вальпроата натрия связан с регуляцией экспрессии И внутриклеточной локализации p53 путем подавления деацетилирования p53 с помощью HDAC1 (Engelmann, Pützer, 2012). Такие результаты наталкивают на мысль 0 деацетилазной активности гистондеацетилаз I класса в отношении E2F1 и p53 в цитоплазме клеток DRG.

Чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу и изучить возможное взаимодействие между HDAC1, HDAC2 или HDAC3 и E2F1 или p53, мы провели ко-иммунопреципитацию, данные которой показали, что HDAC1, но не HDAC2 и HDAC3, действительно взаимодействует с ацетилированными формами E2F1 и p53 в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев (Рис. 22)

Для подтверждения белок-белковых взаимодействий между p53 или E2F1 с HDAC1, мы использовали технологию Duolink PLA (метод близкого лигирования) с последующим считыванием результатов с помощью флуоресцентной микроскопии (Рис. 23), результаты которой подтвердили нашу теорию. Исследования на модели перерезки седалищного нерва крысы показали, что аксотомия вызывает значительное увеличение активности HDAC1 по отношению к E2F1 и p53 через 24 часа после аксотомии (Рис. 24).

Повышение активности HDAC1, по-видимому, связано с последующим снижением ацетилирования факторов транскрипции E2F1 и p53. Подобное увеличение активности HDAC1 и возникающее в результате этого гипоацетилирование белка p53 также наблюдалось на нескольких моделях повреждения зрительного нерва. Такие повторяющиеся результаты на различных моделях повреждения периферических нервов убедительно свидетельствуют в пользу того, что HDAC-зависимый механизм вовлечен в начальные события, которые приводят к гибели нервных клеток.

Ранее сообщалось о возможности деацетилирования p53 гистондеацетилазами HDAC1 и HDAC2 в онкотрансформированных клетках (Ryu et al., 2017). Однако, о способности HDAC1 и HDAC2 деацетилировать p53 после аксотомии периферических нервов не упоминалось и показано нами

впервые. HDAC1 опосредует деацетилирование E2F1 и p53 в DRG после аксотомии, что может приводить к снижению транскрипционной активности p53, усилению его взаимодействия с митохондриями и апоптозу клеток.

Таким образом, стратегии, направленные на усиление ацетилирования p53 по лизину К373 могут способствовать разработке соединений, которые будут проявлять нейропротекторные эффекты в периферической нервной системе при нейротравмах.



Рисунок 37. Эпигенетические процессы, приводящие к гибели сенсорных нейронов DRG крысы после аксотомии. Красные – эпигенетические белки, синие – сигнальные белки. Стрелками ↓↑ обозначено снижение или повышение уровня белка. Влияния вальпроата натрия обозначено синим крестиком, ингибитора E2F1 – красным.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из вышесказанного следует, что в аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наблюдается повышение уровня гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3. Аксотомия приводит к снижению уровня ацетилирования гистонов H3 и H4, а также накоплению проапоптотических белков: E2F1, p53 и активной каспазы 3. Перерезка седалищного нерва вызывает транслокацию HDAC1 и факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро.

В результате аксотомии HDAC1 перемещается в цитоплазму нейронов DRG, где опосредует деацетилирование факторов транскрипции E2F1 и p53, что может приводить к нарушению их транскрипционной активности и взаимодействия усилению проапоптотического с митохондриями. Нейропротекторный эффект ингибитора HDACs вальпроата натрия связан с восстановлением уровня ацетилирования гистонов Н3 и Н4. Вальпроат натрия также отменял, вызванное аксотомией снижение уровня ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373). Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 и p53 в цитоплазме, но увеличивает В ядре, что свидетельствует о перераспределении белков между ядром и цитоплазмой. При ЭТОМ ацетилированные формы E2F1 и p53 увеличиваются в цитоплазматической фракции под действием ингибитора. О нейропротекторном свойстве препарата также говорит то, что через 7 дней после перерезки седалищного нерва вальпроат натрия повышает уровень маркера регенерации нервов GAP-43 как неповрежденном В поврежденном ипсилатеральном, так И В контралатеральном ганглии. Ингибирование гистондеацетилаз защищает глиальные клетки DRG ганглиев крыс от апоптоза, вызванного аксотомией.

Ингибирование E2F1 полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию проапоптотических белков каспазы 3 и p53,

защищая тем самым клетки аксотомированных DRG от апоптоза. Описанные результаты проиллюстрированы на рисунке 37.

Таким образом, селективное ингибирование HDAC1 и нижележащих сигнальных путей является основой для разработки новых терапевтических стратегий нейропротекции при повреждении нервов периферической нервной системы.

#### выводы

1. Выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдаются уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков повышается, а 31 белка - снижается. Через 3 часа наблюдается повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков ганглиях При аксотомированных снижаются. этом, В одновременно экспрессируются белки, участвующие как в нейродегенерации (Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF, исполнительные каспазы 3, 6 и 7, р75, МАР киназы р38 и JNK, E2F1, p53, c-Myc и GADD153/CHOP-10, провоспалительная каспаза 11) так и в нейропротекции (Bcl-x, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов).

2. В аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наиболее ранние и специфичные изменения наблюдаются со стороны гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, экспрессия которых увеличивается уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах ганглиев повышается через 4 часа, а проапоптотических белков p53, активированной каспазы 3 – через 24 часа. Уровень ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) снижаются в цитоплазме нейронов ганглиев через 24 часа после аксотомии.

**3.** Нейротравма вызывает транслокацию HDAC1, факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после аксотомии и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после повреждения.

**4.** Аксотомия седалищного нерва ассоциирована с повышением экспрессии и активности HDAC1 в аксотомированных ганглиях крыс, что приводит к снижению ацетилированного p53 (K373) и ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазме нейронов.

5. Введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и

увеличивает уровень ацетилирования p53 и E2F1 по K373 и K120, соответственно в нейронах ганглиев, защищая их клетки от апоптоза.

**6.** Ингибирование активности E2F1 оказывает выраженное нейропротекторное действие: полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию белков p53 и активной каспазы 3, защищая аксотомированные ганглии от апоптоза.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abe N. Nerve injury signaling / N. Abe, V. Cavalli // Curr Opin Neurobiol. 2008. – Vol. 18, № 3. – P. 276-283.
- Åberg E. Evolution of the p53-MDM2 pathway / E. Åberg, F. Saccoccia, M. Grabherr, W. Ore, P. Jemth, G. Hultqvist // BMC Evol Biol. 2017. Vol. 17, № 1. P. 177.
- Abramova M. V. G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin / M. V. Abramova, T. V. Pospelova, F. P. Nikulenkov, C. M. Hollander, A. J. Fornace, V. A. Pospelov // J Biol Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 21040-21051.
- Anderton R. S. Spinal muscular atrophy and the antiapoptotic role of survival of motor neuron (SMN) protein / R. S. Anderton, B. P. Meloni, F. L. Mastaglia, S. Boulos // Mol Neurobiol. – 2013. – Vol. 47. – P. 821.
- Aubrey B. J. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53mediated tumour suppression? / B. J. Aubrey, G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold, A. Strasser // Cell death and differentiation. – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 104-113.
- Baltan S. Expression of histone deacetylases in cellular compartments of the mouse brain and the effects of ischemia / S. Baltan, A. Bachleda, R. S. Morrilon, S. P. Murphy // Transl Stroke Res. – 2011. – Vol. 2.–P. 411-423.
- Bannister A. J. Regulation of chromatin by histone modifications / A. J. Bannister, T. Kouzarides // Cell Res. – 2011. – Vol. 21. – P. 381-395.
- Bardai F. H. Histone deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death / F. H. Bardai, V. Price, M. Zaayman, L. Wang, S. R. D'Mello // J Biol Chem. – 2012. – Vol. 287. – P. 35444-35453.
- Barron K. D. The axotomy response / K. D. Barron // J Neurol Sci. 2004. Vol. 220, № 1–2. – P. 119-121.
- 10. Batulan Z. Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis / Z. Batulan,

D. M. Taylor, R. J. Aarons, S. Minotti, M. M. Doroudchi, J. Nalbantoglu, H.
D. Durham // Neurobiol Dis. – 2006. – Vol. 24, № 2. – P. 213-225.

- Batulan Z. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially affect the heat shock response in cultured spinal cord cells / Z. Batulan, J. Nalbantoglu, H. D. Durham // Cell Stress Chaperones. 2005. Vol. 10, № 3. P. 185-196.
- Ben-Yaakov K. Retrograde injury signaling in lesioned axons / K. Ben-Yaakov, M. Fainzilber // Results Probl Cell Differ. – 2009. – Vol. 48. – P. 327-338.
- Berezhnaya E. Involvement of MAPK, Akt/GSK-3β and AMPK/mTOR signaling pathways in protection of remote glial cells from axotomy-induced necrosis and apoptosis in the isolated crayfish stretch receptor / E. Berezhnaya, M. Bibov, M. Komandirov, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, A. Uzdensky // Mol Cell Neurosci. 2017. Vol. 83. P. 1-5.
- Berry K. P. Chromatin modification and epigenetic control in functional nerve regeneration / K. P. Berry, Q. R. Lu // Semin Cell Dev Biol. – 2020. – Vol. 97. – P. 74-83.
- Bertogliat M. J. Epigenetic mechanisms of neurodegenerative diseases and acute brain injury / M. J. Bertogliat, K. C. Morris-Blanco, R. Vemuganti // Neurochem Int. – 2020. – Vol. 133. – P. 104642.
- Biermann J. Valproic acid-mediated neuroprotection and regeneration in injured retinal ganglion cells / J. Biermann, P. Grieshaber, U. Goebel, G. Martin, S. Thanos, S. Di Giovanni, W. A. Lagrèze // Invest Ophthalmol Vis Sci. - 2010. - Vol. 51. - P. 526-534.
- Biswas A. K. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage / A. K. Biswas, D. G. Johnson // Cancer Res. – 2011. – Vol. 72. – P. 13-17.
- Bolte S. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy / S. Bolte, F. P. Cordelières // J Microsc. – 2006. – Vol. 224, № 3. – P. 213-32.

- Bomze H. M. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons / H. M. Bomze, K. R. Bulsara, B. J. Iskandar, P. Caroni, J. H. Skene // Nat Neurosci. – 2001. – Vol. 4, № 1. – P. 38-43.
- 20. Bonini P. Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die / P. Bonini, S. Cicconi, A. Cardinale, C. Vitale, A. L. Serafino, M. T. Ciotti, L. N. Marlier // J Neurosci Res. 2004. Vol. 75, № 1. P. 83-95.
- Brandl A. Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress / A. Brandl, T. Wagner, K. M. Uhlig, S. K. Knauer, R. H. Stauber, F. Melchior [et al.] // J Mol Cell Biol. 2012. Vol. 4. P. 284-293.
- Bridge P. M. Nerve crush injuries a model for axonotmesis / P. M. Bridge,
  D. J. Ball, S. E. Mackinnon, Y. Nakao, K. Brandt, D. A. Hunter, C. Hertl //
  Exp Neurol. 1994. Vol. 127, № 2. P. 284-290.
- 23. Brochier C. Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons / C. Brochier, G. Dennis, M. A. Rivieccio, K. McLaughlin, G. Coppola, R. R. Ratan, B. Langley // J Neurosci. 2013. Vol. 33, № 20. P. 8621-32.
- Brooks C. L. New insights into p53 activation / C. L. Brooks, W. Gu // Cell Res. - 2010. - Vol. 20. - P. 614-621.
- 25. Brooks C. L. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway
  / C. L. Brooks, W. Gu // Protein Cell. 2011. Vol. 2. P. 456-462.
- Broughton B. R. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia / B. R. Broughton, D. C. Reutens, C. G. Sobey // Stroke. 2009. Vol. 40. P. 331-9.
- 27. Camins A. Inhibition of ataxia telangiectasia-p53-E2F-1 pathway in neurons as a target for the prevention of neuronal apoptosis / A. Camins, E. Verdaguer, J. Folch, C. Beas-Zarate, A. M. Canudas, M. Pallàs // Curr Drug Metab. 2007. Vol. 8, № 7. P. 709-715.

- Casas C. Network-based proteomic approaches reveal the neurodegenerative, neuroprotective and pain-related mechanisms involved after retrograde axonal damage / C. Casas, L. Isus, M. Herrando-Grabulosa, F. M. Mancuso, E. Borrás, E. Sabidó [et al.] // Sci Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 9185.
- 29. Challa S. R. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons / S.
  R. Challa // Int J Neurosci. 2015. Vol. 125, № 3. P. 170-174.
- Checkler F. p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers / F. Checkler, C. Alves da Costa // Pharmacol Ther. 2014. Vol. 142. P. 99-113.
- Chen Y. T. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection / Y. T. Chen, X. F. Zang, J. Pan, X. L. Zhu, F. Chen, Z. B. Chen, Y. Xu // Clin Exp Pharmacol Physiol. – 2012. – Vol. 39. – P. 751-758.
- 32. Chuang D.-M. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions / D.-M. Chuang, Y. Leng, Z. Marinova, H-J. Kim, C.-T. Chiu // Trends in Neurosci. 2009. Vol. 32. P. 591-601.
- 33. Chumakov P. M. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms
  / P. M. Chumakov // Biochemistry (Mosc.). 2007. Vol. 72. P. 1399-1421.
- 34. Culmsee C. p53 in neuronal apoptosis / C. Culmsee, M. P. Mattson // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – Vol. 331, № 3. – P. 761-777.
- 35. Dai C. Q. p53 and mitochondrial dysfunction: novel insight of neurodegenerative diseases / C. Q. Dai, T. T. Luo, S. C. Luo, J. Q. Wang, S. M. Wang, Y. H. Bai [et al.] // J Bioenerg Biomembr. 2016. Vol. 48, № 4. P. 337-347.
- Demyanenko S. Axotomy-induced changes of the protein profile in the crayfish ventral cord ganglia / S. Demyanenko, V. Dzreyan, A. Uzdensky // J Mol Neurosci. – 2019. – Vol. 68. – P. 667-678.

- Demyanenko S. Histone deacetylases and their isoform-specific inhibitors in ischemic stroke / S. Demyanenko, V. Dzreyan, S. Sharifulina // Biomedicines. - 2021. - Vol. 9. - P. 1445.
- 38. Demyanenko S. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex / S. Demyanenko, A. Uzdensky
  // Mol Neurobiol. 2017. Vol. 54, № 9. P. 6839-6856.
- 39. Demyanenko S. V. Expression of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 and their role in apoptosis in the penumbra induced by photothrombotic stroke / S. V. Demyanenko, V. A. Dzreyan, M. A. Neginskaya, A. B. Uzdensky // Mol Neurobiol. – 2020. – Vol. 57, № 1. – P. 226-238.
- 40. Demyanenko S. V. Overexpression of HDAC6, but not HDAC3 and HDAC4 in the penumbra after photothrombotic stroke in the rat cerebral cortex and the neuroprotective effects of α-phenyl tropolone, HPOB, and sodium valproate / S. V. Demyanenko, V. A. Dzreyan, A. B. Uzdensky // Brain Res Bull. 2020. Vol. 162. P. 151-165.
- 41. Demyanenko S. V. The focal-focal preconditioning effect of photothrombotic impact on the signaling protein profile in the penumbra surrounding the ischemic core induced by another photothrombotic impact / S. V. Demyanenko, A. B. Uzdensky // Mol Neurobiol. 2018. Vol. 55, № 1. P. 229-248.
- 42. Demyanenko S. V. The neuroprotective effect of the HDAC2/3 inhibitor MI192 on the penumbra after photothrombotic stroke in the mouse brain / S. V. Demyanenko, V. V. Nikul, A. B. Uzdensky // Mol Neurobiol. 2020. Vol. 57, № 1. P. 239-248.
- 43. Demyanenko S. V. The role of p53 protein in the realization of the exogenous heat shock protein 70 anti-apoptotic effect during axotomy / S. V. Demyanenko, M. A. Pitinova, V. A. Dzreyan, Y. N. Kalyuzhnaya, M. A. Eid, A. Y. Abramov [et al.] // Cells. 2021. Vol. 11, № 1. P. 93.
- 44. Denechaud P.-D. E2F1, a novel regulator of metabolism / P.-D. Denechaud,
  L. Fajas, A. Giralt // Front Endocrinol. 2017. Vol. 8. P. 311.

- 45. Downey M. Non-histone protein acetylation by the evolutionarily conserved GCN5 and PCAF acetyltransferases / M. Downey // Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. – 2021. – Vol. 1864. – P. 194608.
- 46. Dubový P. Expression of regeneration-associated proteins in primary sensory neurons and regenerating axons after nerve injury-an overview / P. Dubový, I. Klusáková, I. Hradilová-Svíženská, M. Joukal // Anat Rec (Hoboken). 2018. Vol. 301, № 10. P. 1618-1627.
- 47. Dzreyan V. A. HDAC1 expression, histone deacetylation, and protective role of sodium valproate in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection / V. A. Dzreyan, S. V. Rodkin, M. A. Pitinova, A. B. Uzdensky // Mol Neurobiol. – 2021a. – Vol. 58, № 1. – P. 217-228.
- Dzreyan V. E2F1 expression and apoptosis initiation in crayfish and rat peripheral neurons and glial cells after axonal injury / V. Dzreyan, M. Eid, S. Rodkin, M. Pitinova, S. Demyanenko // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – P. 4451.
- 49. Dzreyan V. The Expression of E2F1, p53, and caspase 3 in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection / V. Dzreyan, S. Rodkin, V. Nikul, M. Pitinova, A. Uzdensky // J Mol Neurosci. 2021b. Vol. 71, № 4. P. 826-835.
- 50. Elder J. The epigenetics of stroke recovery and rehabilitation: from polycomb to histone deacetylases / J. Elder, M. Cortes, A. Rykman, J. Hill, S. Karuppagounder, D. Edwards, R.R. Ratan // Neurotherapeutics. – 2013. – Vol. 10. – P. 808-816.
- Engelmann D. The dark side of E2F1: In transit beyond apoptosis / D. Engelmann, B.M. Pützer // Cancer Res. 2012. Vol. 72. P. 571-575.
- 52. Esposito M. F. Unique characteristics of the dorsal root ganglion as a target for neuromodulation / M. F. Esposito, R. Malayil, M. Hanes, T. Deer // Pain Med. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. S23-S30.
- Fawcett J. W. Intrinsic determinants of axon regeneration / J. W. Fawcett, J. Verhaagen // Dev Neurobiol. 2018. Vol. 78. P. 890-897.

- 54. Fedorenko G. M. Dynamics of ultrastructural changes in the isolated crayfish mechanoreceptor neuron under photodynamic impact / G. M. Fedorenko, A. B. Uzdensky // J Neurosci Res. 2008. Vol. 86, № 6. P. 1409-1416.
- Felling R. J. Epigenetic mechanisms of neuroplasticity and the implications for stroke recovery / R. J. Felling, H. Song // Exp Neurol. – 2015. – Vol. 268. – P. 37-45.
- 56. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes / M. Fischer // Oncogene. – 2017. – Vol. 36, № 28. – P. 3943-3956.
- 57. Fletcher P. A. Multi-image colocalization and its statistical significance / P.
  A. Fletcher, D. R. Scriven, M. N. Schulson, E. D. Moore // Biophys J. 2010.
   Vol. 99, № 6. P. 1996-2005.
- Galbiati L. Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination / L. Galbiati, R. Mendoza-Maldonado, M. I. Gutierrez, M. Giacca // Cell Cycle. – 2005. – Vol. 4. – P. 930-939.
- 59. Gandhi S. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration / S. Gandhi,
  A. Y. Abramov // Oxid Med Cell Longev. 2012. Vol. 2012. P. 428010.
- Gibson C. L. Benefits of histone deacetylase inhibitors for acute brain injury: a systematic review of animal studies / C. L. Gibson, S. P. Murphy // J Neurochem. – 2010. – Vol. 115. – P. 806-813.
- Giovanni A. E2F1 Mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on bax and caspase 3 / A. Giovanni, E. Keramaris, E. J. Morris, S. T. Hou, M. O'Hare, N. Dyson [et al.] // J Biol Chem. 2000. Vol. 275. P. 11553-11560.
- Giralt A. E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes / A. Giralt, P.-D. Denechaud, I. C.Lopez-Mejia, B. Delacuisine, E. Blanchet, C. Bonner [et al.] // Mol Metab. – 2018. – Vol. 11. – P. 104-112.
- Glozak M. A. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins / M. A. Glozak, N. Sengupta, X. Zhang, E. Seto // Gene. 2005. Vol. 363. P. 15-23.

- 64. Gong C. IL-6-induced acetylation of E2F1 aggravates oxidative damage of retinal pigment epithelial cell line / C. Gong, L. Qiao, R. Feng, Q. Xu, Y. Zhang, Z. Fang [et al.] // Exp Eye Res. – 2020. – Vol. 200. – P. 108219.
- Gottifredi V. Molecular biology. Getting p53 out of the nucleus / V.
   Gottifredi, C. Prives // Science. 2001. Vol. 292, № 5523. P. 1851-1852.
- 66. Gower D. J. Spinal cord injury and the stress protein response / D. J. Gower,
  C. Hollman, K. S. Lee, M. Tytell // J Neurosurg. 1989. Vol. 70, № 4. P.
  605-611.
- 67. Graff J. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain / J. Graff, D. Rei, J. S. Guan [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 483. – P.222-226.
- Gu W. Dynamics of the p53 acetylation pathway / W. Gu, J. Luo, C. L. Brooks, A. Nikolaev, M. Li // Novartis Found Symp. 2004. Vol. 259. P. 197-207.
- 69. Guan J. S. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity / J. S. Guan, S. J. Haggarty, E. Giacometti [et al.] // Nature. 2009. Vol. 459. P.55-60.
- 70. Harrison I. F. Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? / I. F. Harrison, D. T. Dexter // Pharmacol Ther. 2013. Vol. 140, № 1. P.34-52.
- 71. Hill C. S. Traumatic axonal injury: Mechanisms and translational opportunities / C. S. Hill, M. P. Coleman, D. K. Menon // Trends Neurosci. 2016. Vol. 39, № 5. P. 311-324.
- 72. Hofseth L. J. p53: 25 years after its discovery / L. J. Hofseth, S. P. Hussain,
  C. C. Harris // Trends in pharmacological sciences. 2004. Vol. 25, № 4. P. 177-181.
- 73. Ianari A. Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage / A. Ianari, R. Gallo, M. Palma, E. Alesse, A. Gulino // J Biol Chem. 2004. Vol. 279. P. 30830-30835.
- Joerger A. C. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches / A. C. Joerger, A. R. Fersht // Annu Rev Biochem. – 2016. – Vol. 85. – P. 375-404.
- Juan L.-J. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation / L.-J. Juan, W.-J. Shia, M.-H. Chen, W.-M. Yang, E. Seto, Y.-S. Lin, C.-W. Wu // J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 20436-20443.
- 76. Kameda T. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration / T. Kameda, T. Imamura, K. Nakashima // Cell Tissue Res. – 2018. – Vol. 371, № 1. – P. 189-199.
- 77. Karasawa M. Effects of various lengths of hypoglossal nerve resection on motoneuron survival / M. Karasawa, K. Yokouchi, K. Kawagishi, T. Moriizumi, N. Fukushima // J Clin Neurosci. – 2019. – Vol. 60. – P. 128-131.
- 78. Khaitin A. Ca2+ mediates axotomy-induced necrosis and apoptosis of satellite glial cells remote from the transection site in the isolated crayfish mechanoreceptor / A. Khaitin, M. Rudkovskii, A. Uzdensky // Mol Cell Neurosci. – 2018. – Vol. 88. – P. 7-15.
- 79. Khaitin A. M. The method of isolation of the crayfish abdominal stretch receptor maintaining a connection of the sensory neuron to the ventral nerve cord ganglion / A. M. Khaitin, M. V. Rudkovskii, A. B. Uzdensky // Invert Neurosci. 2015. Vol. 15, № 1. P. 176.
- Kimura A. A Decade of histone acetylation: Marking eukaryotic chromosomes with specific codes / A. Kimura, K. Matsubara, M. Horikoshi // J. Biochem. 2005. Vol. 138. P. 647-662.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and mechanisms / T. Kouzarides, S. L. Berger// Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2006. p. 191-209.
- Krämer O. H. HDAC2: a critical factor in health and disease / O. H. Krämer // Trends Pharmacol Sci. – 2009. – Vol. 30. – P. 647-655.
- 83. Krämer O. H. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2 / O. H. Krämer, P. Zhu, H. P.

Ostendorff, M. Golebiewski, J. Tiefenbach, M. A. Peters [et al.] // EMBO J. – 2003. – Vol. 22. – P. 3411–3420.

- 84. Kruse J. P. Modes of p53 regulation / J. P. Kruse, W. Gu // Cell. 2009. –
  Vol. 137, № 4. P. 609-622.
- Kruse J.-P. SnapShot: p53 posttranslational modifications / J.-P. Kruse, G. Wei // Cell. 2008. Vol. 133, № 5. P. 930-30.e1.
- Laskowitz D. Translational research in traumatic brain injury / D. Laskowitz,
   G. Grant (eds) // CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton (FL). –
   2016.
- 87. Lebrun-Julien F. Combined HDAC1 and HDAC2 depletion promotes retinal ganglion cell survival after injury through reduction of p53 target gene expression / F. Lebrun-Julien, U. Suter // ASN Neuro. 2015. Vol. 7, № 3. P. 1759091415593066.
- 88. Li R. Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review / R. Li, Z. Liu, Y. Pan, L. Chen, Z. Zhang, L. Lu // Cell Biochem Biophys. 2014. Vol. 68, № 3. P. 449-454.
- 89. Liu M. A hepatocyte differentiation model reveals two subtypes of liver cancer with different oncofetal properties and therapeutic targets / M. Liu, Q. Yan, Y. Sun, Y. Nam, L. Hu, J. H. Loong [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. 2020. Vol. 117. P. 6103-6113.
- 90. Liu X. Novel potential therapeutic target for E2F1 and prognostic factors of E2F1/2/3/5/7/8 in human gastric cancer / X. Liu, C. Hu // Mol Ther Methods Clin Dev. 2020. Vol. 18. P. 824-838.
- 91. Liu Y.-Y. E2F1-CDK1 pathway activation in kanamycin-induced spiral ganglion cell apoptosis and the protective effect of CR8 / Y.-Y. Liu, G.-P. Wang, Z. Peng, J.-Y. Guo, Q. Wu, J. Xie, S.-S. Gong // Neurosci Lett. 2016. Vol. 617. P. 247-253.
- 92. Luo J. Negative control of p53 by sir2alpha promotes cell survival under stress / J. Luo, A. Y. Nikolaev, S.-I. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh [et al.] // Cell. – 2001. – Vol. 107. – P. 137-148.

- 93. Ma L. P53-Mediated oligodendrocyte apoptosis initiates demyelination after compressed spinal cord injury by enhancing ER-mitochondria interaction and E2F1 expression / L. Ma, H.-J. Yu, S.-W. Gan, R. Gong, K.-J. Mou, J. Xue, S.-Q. Sun // Neurosci Lett. – 2017. – Vol. 644. – P. 55-61.
- 94. MacManus J. P. Absence of the transcription factor E2F1 attenuates brain injury and improves behavior after focal ischemia in mice / J. P. MacManus, M. Jian, E. Preston, I. Rasquinha, J. Webster, B. Zurakowski // J Cereb Blood Flow Metab. 2003. Vol. 23. P. 1020-1028.
- 95. Magharious M. M. Optic nerve transection: a model of adult neuron apoptosis in the central nervous system / M. M. Magharious, P. M. D'Onofrio, P. D. Koeberle // J Vis Exp. – 2011. – № 51. – P. 2241.
- 96. Manivannan S. Profiling biomarkers of traumatic axonal injury: From mouse to man / S. Manivannan, M. Makwana, A. I. Ahmed, M. Zaben // Clin Neurol Neurosurg. – 2018. – Vol. 171. – P. 6-20.
- 97. Mar F. M. Cell intrinsic control of axon regeneration / F. M. Mar, A. Bonni,
  M. M. Sousa // EMBO Rep. 2014. Vol. 15, № 3. P. 254-263.
- 98. Marmorstein R. Histone acetyltransferases: Function, structure, and catalysis / R. Marmorstein, S.Y. Roth // Curr Opin Genet Dev. 2001. Vol. 11. P. 155-161.
- 99. Martin S. L. Gene expression changes in dorsal root ganglia following peripheral nerve injury: roles in inflammation, cell death and nociception / S. L. Martin, A. J. Reid, A. Verkhratsky, V. Magnaghi, A. Faroni / Neural Regen Res. 2019. Vol. 14, № 6. P. 939-947.
- 100. Martínez-Balbás M. Regulation of E2F1 activity by acetylation / M. Martínez-Balbás, U.-M. Bauer, S. J. Nielsen, A. Brehm, T. Kouzarides // EMBO J. 2000. Vol. 19. P. 662-671.
- 101. McKay Hart A. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination / A. McKay Hart, T. Brannstrom, M. Wiberg, G. Terenghi // Exp brain res. – 2002. – Vol. 142, № 3. – P. 308-318.

- 102. Melle C. Proteomic analysis of microdissected facial nuclei of the rat following facial nerve injury / C. Melle, G. Ernst, M. Grosheva, D. N. Angelov, A. Irintchev, O. Guntinas-Lichius, F. von Eggeling // J Neurosci Methods. – 2009. – Vol. 185. – P. 23-28.
- 103. Meng P. Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? / P. Meng, R. Ghosh // Cell death dis. – 2014. – Vol. 5. – P. e1360.
- 104. Morris M. J. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning / M. J. Morris, M. Mahgoub, E. S. Na, H. Pranav, L. M. Monteggia // J Neurosci. – 2013. – Vol. 33. – P.6401-6411.
- 105. Mrakovcic M. p53 at the crossroads between different types of HDAC inhibitor-mediated cancer cell death / M. Mrakovcic, J. Kleinheinz, L.F. Fröhlich // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20. – P. 2415.
- 106. Mulder J. Systematically generated antibodies against human gene products: high throughput screening on sections from the rat nervous system / J. Mulder, H. Wernérus, T. J. Shi, F. Pontén, S. Hober, M. Uhlén, T. Hökfelt // Neuroscience. – 2007. – Vol. 146. – P. 1689-1703.
- 107. Mulloney B. Architectonics of crayfish ganglia / B. Mulloney, N. Tschuluun,
  W. M. Hall // Microsc Res Techniq. 2003. Vol. 60, № 3. P. 253-265.
- 108. Nagalakshmi B. Epigenetic mechanisms of traumatic brain injuries / B. Nagalakshmi, S. Sagarkar, A. J. Sakharkar // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2018. – Vol. 157. – P.263-298.
- 109. Nagashima M. HSP70, the earliest-induced gene in the zebrafish retina during optic nerve regeneration: its role in cell survival / M. Nagashima, C. Fujikawa, K. Mawatari, Y. Mori, S. Kato // Neurochem Int. 2011. Vol. 58, № 8. P. 888-895.
- 110. Napoli M. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy / M. Napoli, E. R. Flores // Br J Cancer. 2017. Vol. 116, № 2. P. 149-155.

- 111. Navarro X. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration / X. Navarro, M. Vivo, A. Valero-Cabre // Prog Neurobiol. 2007. Vol. 82. P. 163-201.
- 112. Newfry G. A. Differential effects of facial nerve transection on heat shock protein 70 expression in the developing and adult hamster facial nucleus / G. A. Newfry, K. J. Jones / Metab Brain Dis. 1998. Vol. 13, № 3. P. 253-257.
- 113. Nicolai S. DNA repair and aging: the impact of the p53 family / S. Nicolai, A. Rossi, N. Di Daniele, G. Melino, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Raschellà
  // Aging. 2015. Vol. 7, № 12. P. 1050-1065.
- 114. Oger F. The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite Schistosoma mansoni / F. Oger, F. Dubois, S. Caby, C. Noël, J. Cornette, B. Bertin [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. 2008. Vol. 377, № 4. P.1079-1084.
- 115. Palmisano I. Advances and limitations of current epigenetic studies investigating mammalian axonal regeneration / I. Palmisano, S. Di Giovanni // Neurotherapeutics. 2018. Vol. 15, № 3. P. 529-540.
- 116. Park M. J. The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, exhibits neuroprotective effects for ischemic stroke in middle-aged female rats / M. J. Park, F. Sohrabji // J Neuroinflammation. – 2016. – Vol. 13, – №. 1. – P. 300.
- 117. Parlato R. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? / R. Parlato, G. Kreiner // J Mol Med. 2013. Vol. 91, № 5. P. 541–547.
- 118. Patodia S. Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration / S. Patodia, G. Raivich // Front Mol Neurosci. 2012. Vol. 5. P. 8.
- Perlson E. From snails to sciatic nerve: retrograde injury signaling from axon to soma in lesioned neurons / E. Perlson, S. Hanz, K. F. Medzihradszky, A. L. Burlingame, M. J. Fainzilber // Neurobiol. – 2004. – Vol. 58. – P. 287-294.
- 120. Phan M. L. HDAC3 inhibitor RGFP966 modulates neuronal memory for vocal communication signals in a songbird model / M. L. Phan, M. M.

Gergues, S. Mahidadia, J. Jimenez-Castillo, D. S. Vicario, K. M. Bieszczad // Front Syst Neurosci. – 2017. – Vol. 11. – P. 65.

- 121. Polager S. P53 and E2f: Partners in life and death / S. Polager, D. Ginsberg// Nat Cancer. – 2009. – Vol. 9. – P. 738-748.
- 122. Purice M. D. A novel Drosophila injury model reveals severed axons are cleared through a Draper/MMP-1 signaling cascade / M. D. Purice, A. Ray, E. J. Münzel, B. J. Pope, D. J. Park, S. D. Speese, M. A. Logan // Elife. 2017. Vol. 6. P. e23611.
- 123. Qian C. SIRT1 activation by resveratrol reduces brain edema and neuronal apoptosis in an experimental rat subarachnoid hemorrhage model / C. Qian, J. Jin, J. Chen, J. Li, X. Yu, H. Mo, G. Chen // Mol Med Rep. – 2017. – Vol. 16. – P. 9627-9635.
- 124. Qureshi I. A. Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications / I. A. Qureshi, M. F. Mehler // Arch Neurol. – 2010. – Vol. 67. – P. 1316-1322.
- 125. Ranganathan S. P53 and cell cycle proteins participate in spinal motor neuron cell death in ALS / S. Ranganathan, R. Bowser // Open Pathol J. – 2010. – Vol. 4. – P. 11-22.
- 126. Rashi-Elkeles S. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player / S. Rashi-Elkeles, R. Elkon, S. Shavit, Y. Lerenthal, C. Linhart, A. Kupershtein [et al.] // Mol Oncol. 2011. Vol. 5, № 4. P. 336-348.
- 127. Redell J. B. Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes / J. B. Redell, Y. Liu, P.K. Dash // J Neurosci Res. 2009. Vol. 87. P. 1435-1448.
- 128. Richardson P. M. Responses of the nerve cell body to axotomy / P. M. Richardson, T. Miao, D. Wu, Y. Zhang, J. Yeh, X. Bo // Neurosurgery. 2009. Vol. 65, № 4. P. A74-A79.

- 129. Rishal I. Axon-soma communication in neuronal injury / I. Rishal, M. Fainzilber // Nat Rev Neurosci. 2014. Vol. 15, № 1. P. 32-42.
- 130. Rodemer W. Heterogeneity in the regenerative abilities of central nervous system axons within species: Why do some neurons regenerate better than others? / W. Rodemer, J. Hu, M. Selzer, M. Shifman // Neural Regen Res. – 2020. – Vol. 15. – P. 996.
- 131. Rodkin S. The localization of p53 in the crayfish mechanoreceptor neurons and its role in axotomy-induced death of satellite glial cells remote from the axon transection site / S. Rodkin, A. Khaitin, M. Pitinova, V. Dzreyan, V. Guzenko, M. Rudkovskii [et al.] // J Mol Neurosci. – 2020. – Vol. 70, № 4. – P. 532-541.
- 132. Rosato R. R. The Histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or Apoptosis in Human Leukemia Cells through a Process Regulated by Generation of reactive oxygen species and induction of p21 CIP1/WAF1 / R. R. Rosato, J. A. Almenara, S. Grant // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63. – P.3637-3645.
- Rowland B. D. Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs / B. D. Rowland,
  R. Bernards // Cell. 2006. Vol. 127, № 5. P. 871-874.
- 134. Rudkovskii M. V. The effect of axotomy on firing and ultrastructure of the crayfish mechanoreceptor neurons and satellite glial cells / M. V. Rudkovskii, A. G. Fedorenko, A. M. Khaitin, M. A. Pitinova, A. B. Uzdensky // Mol Cell Neurosci. 2020. Vol. 107. P. 103534.
- 135. Ruijter A. J. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family / A. J. Ruijter, A. H. Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, A. B. Kuilenburg // Biochem J. – 2003. – Vol. 370, № 3. – P. 737-749.
- 136. Ryu H.-W. HDAC6 deacetylates p53 at lysines 381/382 and differentially coordinates p53-induced apoptosis / H.-W. Ryu, D.-H. Shin, D. H. Lee, J. Choi, G. Han, K. Y. Lee, S. H. Kwon // Cancer Lett. – 2017. – Vol. 391. – P. 162-171.

- 137. Saha A. Class I histone deacetylases in retinal progenitors and differentiating ganglion cells / A. Saha, S. Tiwari, S. Dharmarajan, D. C. Otteson, T. L. Belecky-Adams // Gene Expr Patterns. – 2018. – Vol. 30. – P. 37-48.
- 138. Sangwan M. Established and new mouse models reveal E2f1 and Cdk2 dependency of retinoblastoma, and expose effective strategies to block tumor initiation / M. Sangwan, S. R. McCurdy, I. Livne-Bar, M. Ahmad, J. L. Wrana, D. Chen, R. Bremner // Oncogene. – 2012. – Vol. 31. – P. 5019-5028.
- 139. Santos-Rosa H. Mechanisms of P/CAF auto-acetylation / H. Santos-Rosa, E. Valls, T. Kouzarides, M. Martínez-Balbás // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. P. 4285-4292.
- 140. Savastano L. E. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery / L. E Savastano, S. R. Laurito, M. R. Fitt, J. A. Rasmussen, V. Gonzalez Polo, S. I. Patterson // J Neurosci Methods. – 2014. – Vol. 227. – P. 166-180.
- 141. Schmitt H. M. Histone deacetylase 3 (HDAC3) plays an important role in retinal ganglion cell death after acute optic nerve injury / H. M. Schmitt, H. R. Pelzel, C. L. Schlamp, R. W. Nickells // Mol Neurodegener. 2014. Vol. 9. P. 39.
- 142. Schmitt H. M. Role of HDACs in optic nerve damage-induced nuclear atrophy of retinal ganglion cells / H. M. Schmitt, C. L. Schlamp, R. W. Nickells // Neurosci Lett. – 2016. – Vol. 625. – P. 11-15.
- 143. Seichter H. A. The swimmeret system of crayfish: A practical guide for the dissection of the nerve cord and extracellular recordings of the motor pattern / H. A. Seichter, F. Blumenthal, C. R. Smarandache-Wellmann // J Vis Exp. 2014. № 93. P. e52109.
- 144. Sharifulina S. A. Epigenetic regulation of death of crayfish glial cells but not neurons induced by photodynamic impact / S. A. Sharifulina, M. A. Komandirov, A. B. Uzdensky // Brain Res Bull. 2014. Vol. 102. P. 15-21.

- 145. Shin J. E. Epigenetic regulation of axon regeneration after neural injury / J. E.
   Shin, Y Cho // Mol Cells. 2017. Vol. 40, № 1. P. 10-16.
- 146. Sikder S. Regulation of epigenetic state by non-histone chromatin proteins and transcription factors: Implications in disease / S. Sikder, S. Kaypee, T. K. Kundu // J Biosci. – 2020. – Vol. 45. – P. 1-16.
- 147. Simabuco F. M. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics / F. M. Simabuco, M. G. Morale, I. Pavan, A. P. Morelli, F. R. Silva, R. E. Tamura // Oncotarget. 2018. Vol. 9, № 34. P. 23780-23823.
- 148. Skinner K. The structure of the fourth abdominal ganglion of the crayfish, Procambarus clarki (Girard). II. Synaptic neuropils / K. Skinner // J Comp Neurol. – 1985. – Vol. 234, № 2. – P. 182-191.
- 149. Sleiman S. F. Hydroxamic acid-based histone deacetylase (HDAC) inhibitors can mediate neuroprotection independent of HDAC inhibition / S. F. Sleiman, D. E. Olson, M. W. Bourassa [et al.] // J Neurosci. –2014. Vol. 34, №. 40. P. 14328-14337.
- 150. Spange S. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels / S. Spange, T. Wagner, T. Heinzel, O.H. Krämer // Int J Biochem Cell Biol. – 2009. – Vol. 41. – P. 185-198.
- Stanelle J. E2F1-induced apoptosis: Turning killers into therapeutics / J.
   Stanelle, B. M. Pützer// Trends Mol Med. 2006. Vol. 12. P. 177-185.
- 152. Storer P. D. Treatment of chronically injured spinal cord with neurotrophic factors stimulates β-IItubulin and GAP-43 expression in rubrospinal tract neurons / P. D. Storer, D. Dolbeare, J. D. Houle // J Neurosci Res. – 2003. – Vol. 74, № 4. – P. 502-511.
- 153. Sullivan K. D. Mechanisms of transcriptional regulation by p53 / K. D. Sullivan, M. D. Galbraith, Z. Andrysik, J. M. Espinosa // Cell Death Differ. 2018. Vol. 25, № 1. P. 133-143.
- 154. Sun J. Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer / J.

Sun, J. Piao, N. Li, Y. Yang, K.-Y. Kim, Z. Lin // FEBS J. – 2019. – Vol. 287, № 10. – P. 2118-2133.

- Swieck K. Effect of lesion proximity on the regenerative response of long descending propriospinal neurons after spinal transection injury / K. Swieck, A. Conta-Steencken, F. A. Middleton, J. R. Siebert, D. J. Osterhout, D. J. Stelzner // BMC Neurosci. 2019. Vol. 20. P. 10.
- 156. Takase K. Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases / K. Takase, S. Oda, M. Kuroda, H. Funato // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 3. – P. 58437.
- 157. Thomas E. A. Complex neuroprotective and neurotoxic effects of histone deacetylases / E. A. Thomas, S. R. D'Mello // J neurochem. 2018. Vol. 145, № 2. P. 96-110.
- 158. Uzdensky A. B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: Expression of pro- and antiapoptotic proteins / A. B. Uzdensky // Apoptosis. – 2019. – Vol. 24. – P. 687-702.
- 159. Uzdensky A. B. Axotomy induces damage to glial cells remote from the transection site in the peripheral nervous system / A. B.Uzdensky // Neural Regen Res. – 2018. – Vol. 13. – P. 639-640.
- 160. Uzdensky A. Neurotrauma: expression of signaling proteins in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transaction / A. Uzdensky, V. Dzreyan, V. Guzenko, E. Berezhnaya, M. Neginskaya // Europ J Clin Invest. – Vol. 49, № 1. P. 178-179.
- 161. Wahane S. Epigenetic regulation of axon regeneration and glial activation in injury responses / S. Wahane, D. Halawani, X. Zhou, H. Zou // Front Genet. – 2019. – Vol. 10. – P. 640.
- 162. Wan C. Pivotal roles of p53 transcription-dependent and -independent pathways in manganese-induced mitochondrial dysfunction and neuronal apoptosis / C. Wan, X. Ma, S. Shi, J. Zhao, X. Nie, J. Han [et al.] // Toxicology and applied pharmacology. 2014. Vol. 281, № 3. P. 294-302.

- 163. Wang D. B. p53 and mitochondrial function in neurons / D. B. Wang, C. Kinoshita, Y. Kinoshita, R. S. Morrison // Biochim Biophys Acta. 2014. Vol. 1842, № 8. P. 1186-1197.
- 164. Wang H. C. Experimental models of traumatic axonal injury / H. C. Wang, Y. B. Ma // J Clin Neurosci. 2010. Vol. 17, № 2. P. 157-162.
- 165. Wang Z. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes / Z. Wang, C. Zang, K. Cui, D. E. Schones, A. Barski, W. Peng, K. Zhao // Cell. – 2009. – Vol. 138. – P. 1019-1031.
- 166. Weng Y. L. Epigenetic regulation of axonal regenerative capacity / Y. L. Weng, J. Joseph, R. An, H. Song, G. L Ming // Epigenomics. 2016. Vol. 8, № 10. P. 1429-1442.
- 167. Witiw C. D. Acute spinal cord injury / C. D. Witiw, M. G. Fehlings // J Spinal Disorder Techn. – 2015. – Vol. 28. – P. 202-210.
- 168. Wong J. K. Reshaping the chromatin landscape after spinal cord injury / J. K. Wong, H. Zou // Front Biol (Beijing). 2014. Vol. 9, № 5. P. 356-366.
- 169. Wong V. S. Epigenetic changes following traumatic brain injury and their implications for outcome, recovery and therapy / V. S. Wong, B. Langley // Neurosci Lett. – 2016. – Vol. 625. – P. 26-33.
- Woods S. J. The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy / S. J. Woods, K. M. Hannan, R. B. Pearson, R. D. Hannan // Biochim Biophys Acta. 2015. Vol. 1849, № 7. P. 821-829.
- 171. Wu J. Ablation of the transcription factors E2F1-2 limits neuroinflammation and associated neurological deficits after contusive spinal cord injury / J. Wu, B. Sabirzhanov, B. A. Stoica, M. M. Lipinski, Z. Zhao [et al.] // Cell Cycle (Georget. Tex.) 2015. Vol. 14. P. 3698-3712.
- 172. Wu M. E2F1 enhances glycolysis through suppressing Sirt6 transcription in cancer cells / M. Wu, E. Seto, J. Zhang // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – P. 11252-11263.

- 173. Xia C. Protein acetylation and deacetylation: An important regulatory modification in gene transcription (Review) / C. Xia, Y. Tao, M. Li, T. Che, J. Qu // Exp Ther Med. – 2020. – Vol. 20. – P. 2923-2940.
- 174. Yamauchi T. Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis / T. Yamauchi, J. Yamauchi, T. Kuwata, T. Tamura, T. Yamashita, N. Bae [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 11303-11306.
- 175. Yang X. Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover / X. Yang, L. Li, J. Liang, L. Shi, J. Yang, X. Yi [et al.] // J Biol Chem. 2013. Vol. 288. P. 18271-18282.
- 176. Yoon S. HDAC inhibitors: Therapeutic potential in fibrosis-associated human diseases / S. Yoon, G. Kang, G. H. Eom // Int J Mol Sci. 2019. Vol. 20. P. 1329.
- 177. York E. M. Epigenetics of neural repair following spinal cord injury / E. M. York, A. Petit, A. J. Roskams // Neurotherapeutics. 2013. Vol. 10. P. 757-770.
- 178. Yu J. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control / J. Yu, L. Zhang
  // Biochem Biophys Res Commun. 2005. Vol. 331, № 3. P. 851-8.
- 179. Yu X. Involvement of p53 acetylation in growth suppression of cutaneous T-cell lymphomas induced by HDAC inhibition / X. Yu, H. Li, M. Zhu, P. Hu, X. Liu, Y. Qing [et al.] // J Investig Dermatol. 2020. Vol. 140. P. 2009-2022.
- 180. Zhang W. ELL inhibits E2F1 transcriptional activity by enhancing E2F1 deacetylation via recruitment of histone deacetylase 1 / W. Zhang, W. Ji, X. Liu, G. Ouyang, W. Xiao // Mol Cell Biol. 2014. Vol. 34. P. 765-775.
- 181. Zhang Z. Z. Valproate promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush / Z. Z. Zhang, Y. Y. Gong, Y. H. Shi, W. Zhang, X. H. Qin, X. W. Wu // Neurosci. – 2012. – Vol. 224. – P. 282-293.
- 182. Zhao D. PTEN inhibition protects against experimental intracerebral hemorrhage-induced brain injury through PTEN/E2F1/β-catenin pathway / D.

Zhao, X.-P. Qin, S.-F. Chen, X.-Y. Liao, J. Cheng, R. Liu [et al.] // Front Mol Neurosci. – 2019. – Vol. 12. – P. 281.

- 183. Zhong J. BMP signaling in axon regeneration / J. Zhong, H. Zou // Curr Opin Neurobiol. – 2014. – Vol. 27. – P. 127-134.
- 184. Inoue K. Transcription factors that interact with p53 and Mdm2 / K. Inoue, E.
  A. Fry, D. P. Frazier // Int J Cancer. 2015. Vol. 138. P. 1577-1585.
- 185. Ma Y. A Small-molecule E2F inhibitor blocks growth in a melanoma culture model / Y. Ma, C. A. Kurtyka, S. Boyapalle, S.-S. Sung, H. Lawrence, W. Guida, W. D. Cress // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68. – P. 6292-6299.
- 186. Montigiani S. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by novel tetravalent peptides inhibiting DNA binding of E2F / S. Montigiani, R. Müller, R. E. Kontermann // Oncogene. – 2003. – Vol. 22. – P. 4943-4952.
- 187. Rosales-Hurtado M. Improved synthesis, resolution, absolute configuration determination and biological evaluation of HLM006474 enantiomers / M. Rosales-Hurtado, A. Lebeau, C. Bourouh, G. Cebrian-Torrejon, M. Albalat, M. Jean [et al.] // Bioorganic Med Chem Lett. 2018. Vol. 29. P. 380-382.
- Stanelle J. E2F1-induced apoptosis: Turning killers into therapeutics / J.
   Stanelle, B. M. Pützer // Trends Mol Med. 2006. Vol. 12. P. 177-185.
- 189. Wichmann A. E2F1 and E2F2 have opposite effects on radiation-induced p53-independent apoptosis in Drosophila / A. Wichmann, L. Uyetake, T. T. Su // Dev Biol. – 2010. – Vol. 346. – P. 80-89.