

УДК 577.218

## РОЛЬ РЕЦЕПТОРА ПРОДУКТОВ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА

© 2013 г. А. Г. Соболева, С. А. Брускин, А. А. Николаев, В. В. Соболев, А. В. Мезенцев\*

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991*

Поступила в редакцию 22.04.2013 г.

Принята к печати 30.04.2013 г.

В обзоре обобщены сведения о роли рецептора продуктов неферментативного гликозилирования — одного из ключевых участников воспалительного процесса — в патогенезе псориаза. Рецептор способен взаимодействовать со множеством лигандов, активировать несколько сигнальных механизмов и регулировать экспрессию генов при участии транскрипционных факторов, включая NFκB и AP1. Рассмотрение данных литературы позволяет предположить, что данный рецептор участвует в патогенезе псориаза: его ген экспрессируется как в клетках иммунной системы, так и в клетках, с которыми они взаимодействуют. В отличие от других лиганд-рецепторных комплексов, комплексы данного рецептора обладают высокой стабильностью, а их образование увеличивает экспрессию лигандов по принципу обратной связи, что придает воспалительному процессу при псориазе хронический характер. Поскольку рецептор продуктов неферментативного гликозилирования имеет потенциал важного регуляторного фактора патологических процессов при псориазе, мы полагаем, что необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, которые могли бы объяснить, как данный рецептор придает устойчивость локальным воспалительным процессам, трансформируя их в хроническое состояние. Это позволило бы создать принципиально новые лекарства, воздействующие как на сам рецептор, так и на активируемые им сигнальные механизмы.

**Ключевые слова:** RAGE, псориаз, NFκB, AP1, иммунный ответ, альтернативный сплайсинг.

**ROLE OF RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS IN PATHOGENESIS OF PSORIASIS**, by *A. G. Soboleva, S. A. Bruskin, A. A. Nikolaev, V. V. Sobolev, A. V. Mezentsev\** (Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: mesentsev@vigg.ru). This review summarizes the existing knowledge regarding the role of receptor for advanced glycation end products which is a key participant of the inflammatory process, in pathogenesis of psoriasis. By interacting with multiple ligands and activating several signaling mechanisms, receptor for advanced glycation end products regulates gene expression *via* a group transcription factors; that includes NFκB and AP1. According to the published data the expression of receptor for advanced glycation end products in both immune cells and their targets, a high stability of this receptor in complexes with ligands as well as a positive feedback loop, upregulating the expression of its certain ligands, suggest receptor for advanced glycation end products as a possible principal factor that makes the inflammatory response in psoriasis sustainable. Considering receptor for advanced glycation end products as a potential master regulator of several processes that play a crucial role in development of psoriatic plaques, we believe that further experimental studies are needed to elucidate how exactly this receptor converts a transient inflammatory reaction to a sustainable inflammatory response. These studies are also needed for the development of novel medications that target receptor for advanced glycation end products and signaling mechanisms that this receptor activates.

**Keywords:** RAGE, psoriasis, NFκB, AP1, immune response, alternative splicing.

**DOI:** 10.7868/S0026898413050194

Принятые сокращения: AGE (Advanced Glycation End products) — продукты неферментативного гликозилирования; DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) — молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями; MARK (MAP-Kinase) — MAP-киназа; MnK 1/2 (MAP kinase-interacting serine/threonine kinase) — MAPK-взаимодействующая серин-треониновая киназа 1/2; MSK1 (Mitogen- and Stress-activated protein Kinase) — митоген- и стресс-активируемая протеинкиназа 1; PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; PASI (Psoriasis Area Severity Index) — индекс распространенности и тяжести псориаза; PKC-β (Protein Kinase C-β) — протеинкиназа C-β; RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) — рецептор продуктов неферментативного гликозилирования; RSK (Ribosomal S6 Kinase pp90rsk) — рибосомная S6-киназа pp90rsk; TLR (Toll-Like Receptors) — тюрникетные рецепторы; VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) — фактор роста эндотелия сосудов; MMP — матриксные металлопротеиназы.

\* Эл. почта: mesentsev@vigg.ru

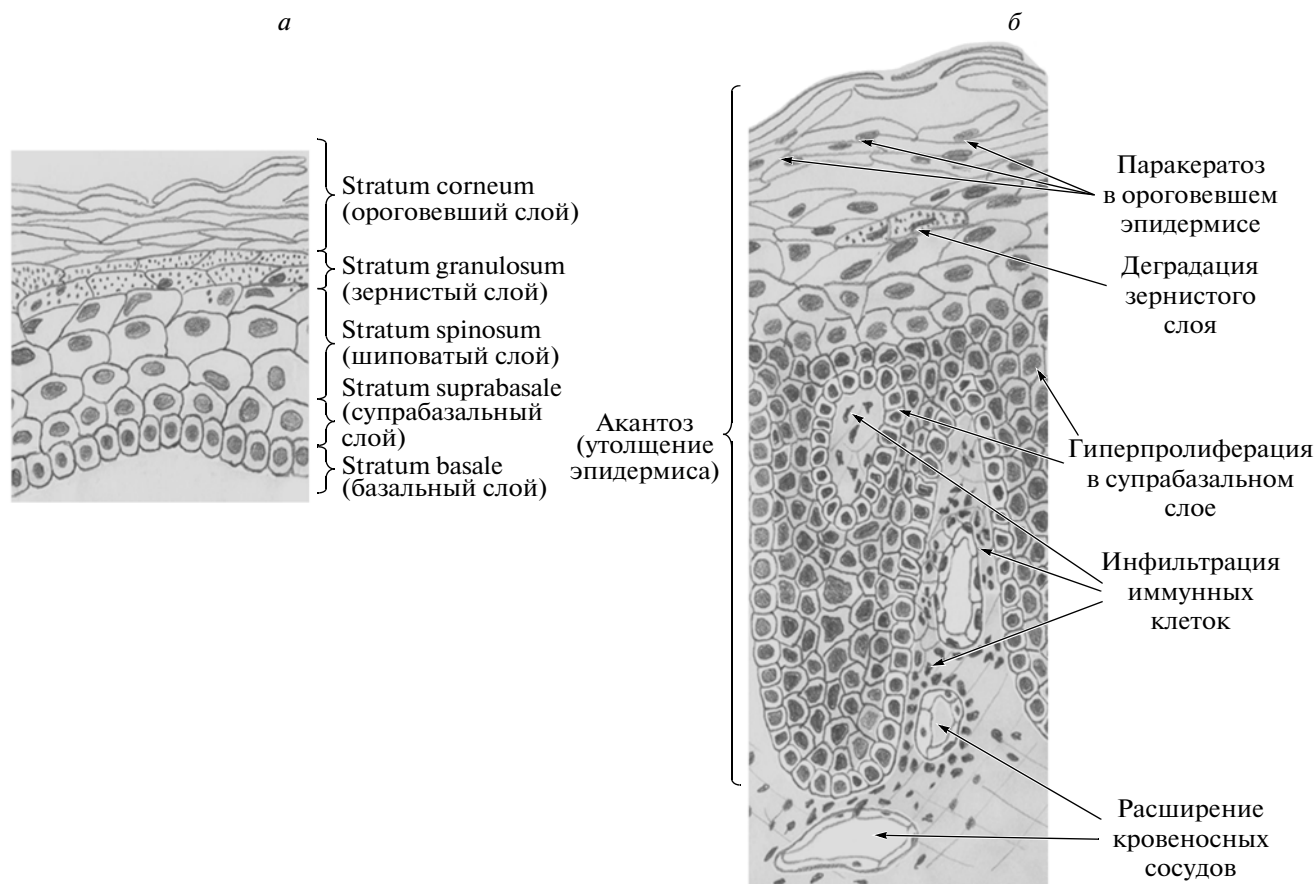
## ВВЕДЕНИЕ

Псориаз – хроническое кожное заболевание, от которого страдают примерно 2% населения планеты [1]. Для него характерны существенные гистопатологические изменения кожи: шиповатый слой пораженного эпидермиса утолщается (акантоз), удлиняются сети стреловидных эпидермальных отростков по направлению соединительных тканей, а также уменьшается или пропадает гранулярный слой эпидермиса [2] (рис. 1а, б). Кроме этого, утолщается ороговевший слой эпидермиса, в нем наблюдаются гиперкератоз (уплотнение) и паракератоз, при котором в ороговевшем слое эпидермиса присутствуют кератиноциты с ядрами, не деградировавшими в процессе дифференцировки [3]. При наиболее распространенной форме псориаза, psoriasis vulgaris, на коже больного появляются красные пятна, а также корка белого или серебристого цвета.

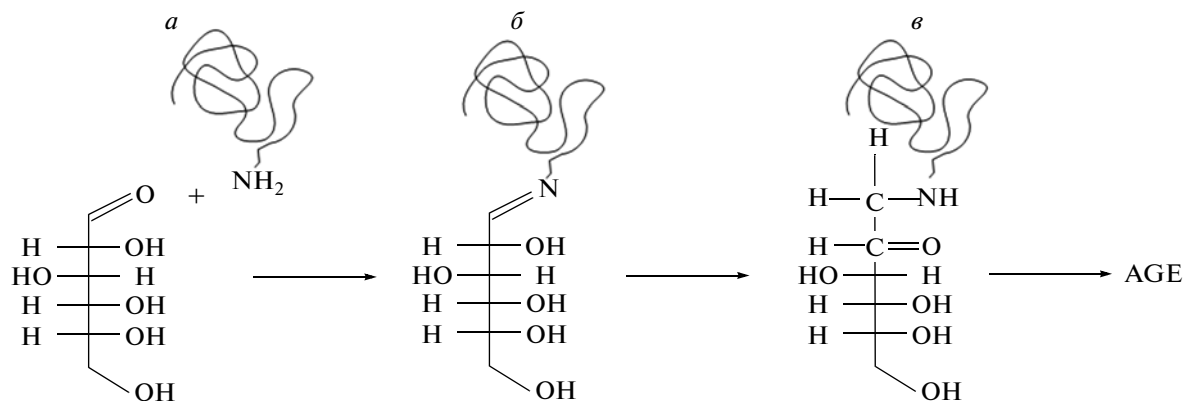
По мере обострения болезни формируются очаги воспаления. Папиллярные кровеносные сосуды в дерме расширяются, и наблюдается инфильтрация в эпидермис клеток иммунной системы (нейтрофилов, лейкоцитов, макрофагов и

других.). Инфильтрация вызывает так называемый “цитокиновый шторм” – массивную секрецию цитокинов и хемокинов. Цитокины активируют кератиноциты и другие клетки кожи. В свою очередь, кератиноциты продуцируют фактор VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), который стимулирует рост новых кровеносных сосудов (ангиогенез) [4]. Обострение псориаза сопровождается также гиперпролиферацией кератиноцитов, при которой изменяется программа их дифференцировки. Происходят структурные изменения кожи, отчасти обусловленные нарушением процесса деградации десмосом. Кроме того, у больных псориазом часто возникают сопутствующие заболевания, такие как болезни суставов [5] и сердечно-сосудистой системы [6], диабет типа II [6–8] и метаболический синдром [6, 9].

Данный обзор имеет целью обобщить литературные данные о роли рецептора продуктов ферментативного гликозилирования (RAGE) в патогенезе псориаза. Будет показано, как отдельные компоненты подконтрольных рецептору RAGE сигнальных каскадов взаимодействуют



**Рис. 1.** Сравнение морфологических характеристик здоровой кожи и псориазической бляшки. По сравнению со здоровой кожей (а), в псориазической бляшке (б) имеется ряд гистопатологических изменений, указанных на рисунке.



**Рис. 2.** Механизм реакции Майяра. Реакция Майяра начинается с формирования основания Шиффа (а) между свободной альдегидной группой глюкозы, находящейся в линейной конформации, и ε-аминогруппой остатка лизина. Затем основание Шиффа претерпевает перегруппировку в продукт Амадори (б), который, в свою очередь, преобразуется в продукт неферментативного гликозилирования (в).

между собой и как они связаны с конкретными проявлениями болезни.

## РЕЦЕПТОР RAGE И ЕГО АКТИВАЦИЯ ПРИ ПСОРИАЗЕ

### Физиологическая роль рецептора RAGE

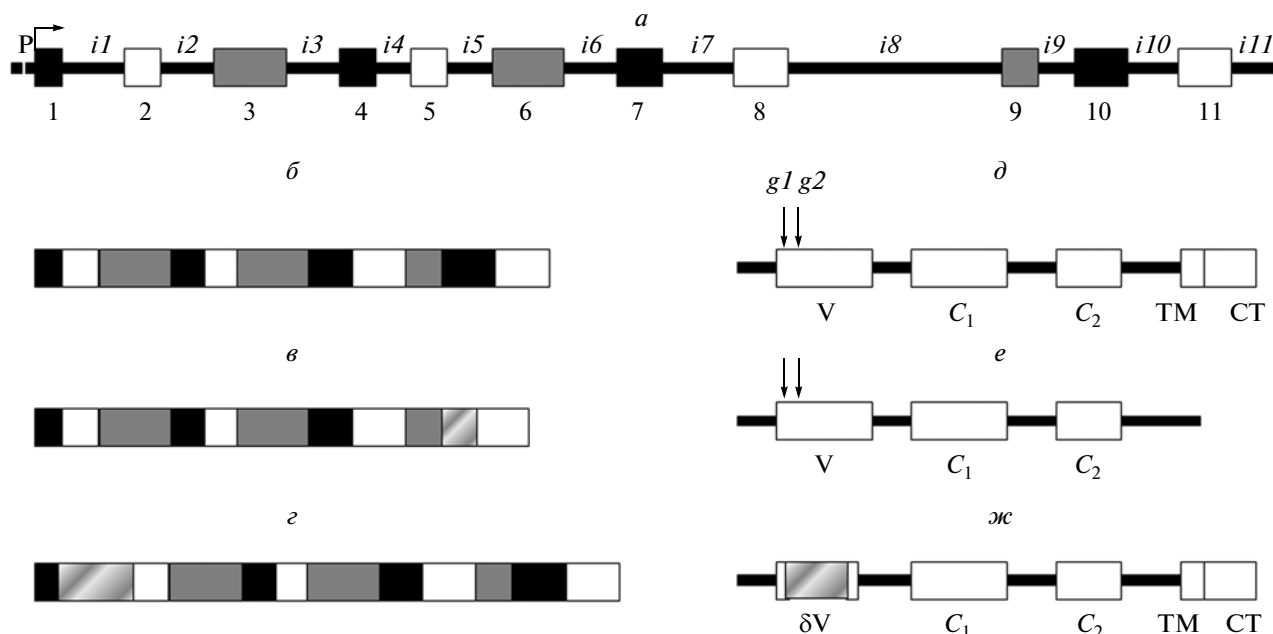
Фактор RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) рассматривают в качестве усилителя воспалительного ответа [10, 11]. Этот фактор принадлежит к семейству мультилигандных поверхностных рецепторных иммуноглобулинов. Его активация в кератиноцитах эпидермиса ведет к индукции провоспалительных цитокинов [12], молекул клеточной адгезии и некоторых металлопротеиназ (ММП) [13–15]. Рецептор RAGE индуцирует также экспрессию генов собственных лигандов, известных как “алармины”, которые привлекают иммунные клетки в эпидермис [16], а при стимуляции его самого в иммунных клетках он работает подобно принимающей антенне дистанционно управляемого устройства. Иммунные клетки мигрируют к очагу поражения по градиенту концентрации аларминов [14, 17]. В очаге поражения иммунные клетки взаимодействуют с клетками кожи и выбрасывают в межклеточный матрикс дополнительные порции медиаторов воспаления. В частности, интерферон-γ (IFNG), выделяемый Т-хелперами (Т<sub>H1</sub>), индуцирует пролиферацию кератиноцитов, изменяет ход их дифференцировки и стимулирует активный рост капилляров дермы [18]. В целом, активация рецептора RAGE способна вызвать структурную перестройку пораженного органа, подобную той, которую мы наблюдаем в эпидермисе при псориазе.

### Лиганды рецептора RAGE

В отличие от многих других рецепторов, связывание которых с лигандами приводит к быстрой деградации рецептор-лигандного комплекса, комплексы RAGE с лигандами активны и стабильны, что, в свою очередь, значительно усиливает тяжесть и длительность воспалительного процесса [19]. При активации RAGE-зависимых сигнальных механизмов координировано повышается содержание аларминов и цитокинов в межклеточном пространстве. Кроме этого, увеличивается экспрессия гена и самого рецептора [11, 20]. Таким образом, однажды активированный каскад реакций трудно остановить.

Лиганды рецептора RAGE относятся к группе веществ, называемых DAMP (Damage Associated Molecular Patterns). Они могут иметь экзогенное и эндогенное происхождение и различную структуру. К экзогенным принадлежат комплексы PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), такие, например, как бактериальные липополисахариды. К эндогенным относятся алармины, которые, в свою очередь, представлены тремя типами молекул. Это клеточные белки, такие как S100-белки, HMGB1 и амилоидный β-пептид; это продукты распада межклеточного матрикса (такие, как фрагменты фибронектина [21]), а также это AGE (Advanced Glycation End products).

Продукты, относящиеся к типу AGE, образуются в процессе, известном как реакция Майяра [22], или процесс неферментативного гликозилирования (рис. 2). На первой стадии реакции образуется основание Шиффа между реактивной альдегидной группой в открытой конформации глюкозы и, например, ε-аминогруппой лизина белка (рис. 2а). На второй стадии реакции происходит перегруппировка основания Шиффа в комплекс Амадори (рис. 2б) с образованием фруктозамина



**Рис. 3.** Структура гена *RAGE* и наиболее важные транскрипты этого гена. Ген, кодирующий рецептор *RAGE* (а), состоит из 11 экзонов (e1–e11) и 11 интронов (i1–i11), которые располагаются за промотором гена (P). Сплайсинг полноразмерной РНК приводит к образованию транскриптов разного строения, в том числе fl-*RAGE* (б); *RAGE\_v1* (в); *RAGE\_v2* (г), изображения которых представлены на рисунке. Упомянутым транскриптам мРНК соответствуют следующие изоформы белка: fl-*RAGE* (д); *RAGE\_v1* (е); *RAGE\_v2* (ж). Сайты гликозилирования в белках (g1 и g2) обозначены стрелками. См. объяснения в тексте.

либо фруктозиллизина. Примечательно, что вместо аминокислотной альдегидная группа может реагировать с тиольной или гуанидиновой группой белка, и, хотя образование комплекса Амадори можно обратить, его переход в AGE (третья и последняя стадия процесса) энзиматически необратим. Дальнейшие преобразования комплекса Амадори в AGE могут включать в себя дегидрирование, конденсацию, фрагментирование и образование поперечных сшивок [23].

Примечательно, что рецептор *RAGE* синтезируется как в клетках иммунной системы (Т-лимфоцитах, макрофагах, нейтрофилах и т.д.), так и в клетках других систем органов и тканей, например в клетках сосудистого эндотелия [24, 25]. Это соответствует представлениям о сенсорной роли рецептора и о его способности активировать разные типы клеток. Принимая во внимание гиперчувствительность кожи к повреждениям, как одну из важных характеристик псориаза, можно сказать, что рецептор, подобный *RAGE*, “удачно” вписывается в патогенез болезни – и как сенсор, и как усилитель изначального сигнала, и как его проводник.

#### Доменная структура фактора *RAGE* и его изоформы

Молекула рецептора *RAGE* (рис. 3а) состоит из трех доменов: N-концевого V-типа и двух до-

менов C-типа (C1 и C2). [26, 27]. Кроме них в молекуле имеется небольшой трансмембранный домен и высокополярный цитоплазматический “хвост” (41 а.о.). Имеются также два сайта N-гликозилирования, один из которых расположен в непосредственной близости от N-конца молекулы, а другой – внутри V-домена [28]. Последний необходим для связывания лигандов, тогда как цитоплазматический хвост необходим для передачи сигнала внутри клетки [10, 29]. Поскольку имеется генетическая предрасположенность к заболеванию псориазом, важно отметить, что в схеме транскрипции гена *RAGE* (рис. 3б) имеются разные варианты [30]. Поддержание правильного баланса между этими вариантами транскриптов необходимо для предотвращения обострения болезни. Показано физиологическое значение трех изоформ белка *RAGE*, названия которых соответствуют рекомендациями Международного Комитета по Номенклатуре в Генетике Человека [31]. Это полноразмерная форма *RAGE* (fl-*RAGE*, рис. 3в), это первый вариант секреторной формы, *RAGE\_v1* (прежде обозначавшийся как es-*RAGE*, рис. 3г), и это концевая усеченная изоформа *RAGE\_v2* (обозначавшаяся как Nt-*RAGE*, рис. 3д). Важно отметить, что в этом списке имеется растворимая, или секреторируемая, форма (*RAGE\_v1*), которая является естественным ингибитором полноформатного рецептора (fl-*RAGE*) и препятствует его активации [32].

Последовательность гена данной изоформы содержит часть последовательности интрона 9 и в ней смешана рамка считывания. Кроме того, в форме RAGE\_v1 отсутствует кодируемая последовательность десятого экзона и, как следствие, трансмембранный домен. При этом С-концевой (цитоплазматический) домен, также благодаря смещению рамки, имеет последовательность, которая отличается от формы fl\_RAGE. У изоформы RAGE\_v2, которая прежде обозначалась как Nt-RAGE, имеется делеция в области внешнего V-домена. Последовательность данной изоформы включает последовательность первого интрона. Таким образом, белковый продукт транскрипта Nt-RAGE должен быть трансмембранным белком. Однако белок, соответствующий форме Nt-RAGE, найти в клетке не удалось, поскольку его мРНК подвергается избирательной деградации как бессмысленная.

Секретируемая форма RAGE может образоваться в результате как альтернативного сплайсинга, так и протеолитического расщепления при участии одного из следующих ферментов: ADAM10 [19, 33], MMP9 [34], MMP3 и MMP13 [35]. Потерявшая связь с С-концевым доменом N-концевая часть молекулы не может передавать сигнал и становится так называемым “молчащим” рецептором [33]. Синтез отдельных изоформ RAGE тканеспецифичен. Например, экспрессия мРНК белка fl-RAGE максимальна в легких и клетках гладкой мускулатуры аорты, тогда как содержание мРНК белка RAGE\_v1 наиболее высоко в эндотелиальных клетках [36–38].

#### ***Олигомеризация рецептора RAGE и его взаимодействие с другими рецепторами***

Иногда фактор RAGE рассматривают как неканонический рецептор TLR, поскольку RAGE и TLR имеют много общих лигандов, а их сигнальные механизмы в значительной степени перекрываются [39]. Предполагают также активное участие RAGE в иммунном ответе, как и рецепторов, подобных TLR, участие которых в иммунном ответе уже доказано [40]. Во всяком случае, хотя (–/–)-мыши, не содержащие гена *Rage*, и обладают нормальным адаптивным иммунным ответом, его развитие можно подавить при помощи инъекции секретируемой формы RAGE [33].

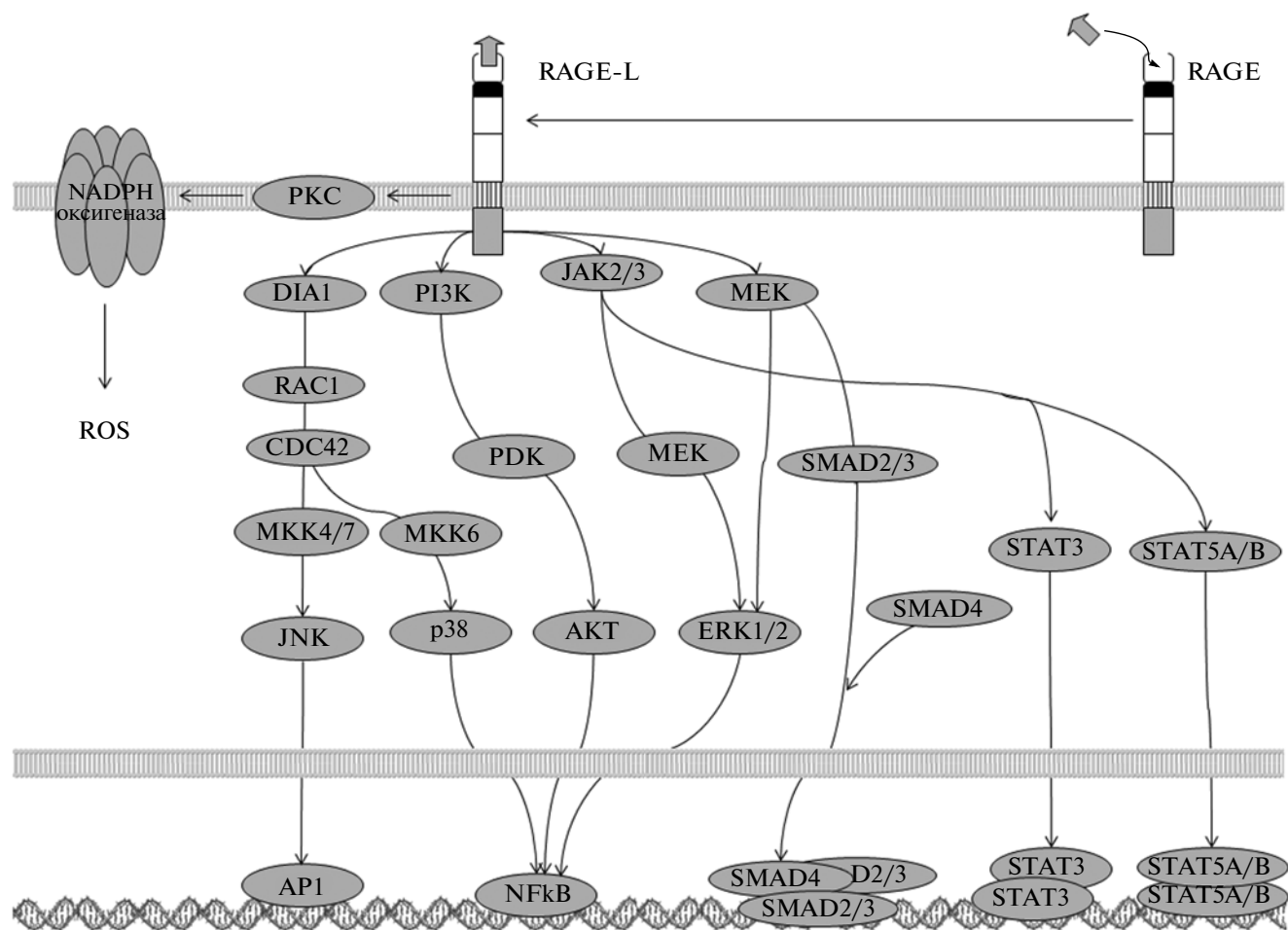
Молекулы RAGE могут взаимодействовать между собой, образуя олигомеры [41, 42]. Кроме того, этот рецептор может взаимодействовать с другими рецепторами, например с рецептором MAC-1, и образовавшийся таким образом гетеродимер сохраняет способность запускать воспалительный процесс [43]. В качестве дополнительных примеров взаимодействия рецептора RAGE с другими рецепторами можно назвать образование гетеродимеров с  $\beta$ 2-интегринами, с белками p95 и

p150, а также ICAM-1 [16]. Гетеродимеризация помогает обоим рецепторам расширить их лигандную специфичность. Например, в случае димеризации ICAM-1 и RAGE образуется функциональный RAGE-подобный рецептор, способствующий установлению специфических контактов между клетками. Примечательно, что в этом гетеродимере RAGE сохраняет присущие ему свойства провоспалительного рецептора. Наконец, при взаимодействии рецептора RAGE с двухвалентными лигандами (например, димерами белков S100) происходит кластеризация активированных рецептор-лигандных комплексов. Представляется весьма вероятным, что кластерообразование добавляет рецептор-лигандному комплексу дополнительный уровень стабильности, что хорошо согласуется с предполагаемой ролью белков S100 при псориазе [44].

Использование в терапии растворимых форм рецептора RAGE – не единственная возможность подавления вызванного им воспалительного процесса [32, 43, 45, 46]. Например, при высокоаффинном связывании белка HMGB1 с гепарином угнетается проявление биологических эффектов этого лиганда. HMGB1 также связывается с протеогликанами и сульфированными карбогидратными эпитопами гликолипидов и гликопротеинов [47]. Связывание тромбомодулина с HMGB1 приводит к его разрушению [48], а связывание белка CD24 подавляет контролируемые рецептором RAGE сигнальные механизмы, прерывая сигнал, идущий через белок NFKB [49].

#### ***Последствия активации гена RAGE при псориазе***

Несмотря на очевидное “перекрывание” потенциальных возможностей рецептора RAGE и клинической картины псориаза (гиперпролиферация, активация клеток иммунной системы и их инфильтрация в поврежденный орган, индукция металлопротеиназ, молекул клеточной адгезии и цитокинов), роль этого рецептора в патогенезе псориаза начали исследовать сравнительно недавно. Вначале авторы лишь регистрировали повышенную частоту полиморфизма *RAGE* у больных псориазом [50, 51]. По мере накопления экспериментальных данных стала проявляться физиологическая роль рецептора и его участие в сигнальных механизмах, а также в регуляции экспрессии генов, роль которых в патогенезе псориаза уже хорошо известна. Фойл (Foell) и соавт. [52] впервые обратили внимание на то, что в синовиальной ткани больных псориатическим артритом накапливается белок S100a12, и связали в единую картину начало воспалительного процесса, повышенный уровень S100a12 в макрофагах, находившихся в очаге поражения, и рост новых кровеносных сосудов. Затем Вольфу (Wolf) и соавт. [53] удалось симитировать клиническую картину псориаза на трансгенных мышцах с регу-



**Рис. 4.** Сигнальные механизмы, активируемые рецептором RAGE. Взаимодействие рецептора RAGE с одним из его многочисленных лигандов приводит к передаче сигнала от рецептора на киназы с последующей активацией транскрипционных факторов, которые играют важную роль в воспалительном процессе. Взаимодействие RAGE с лигандом приводит также к окислительному стрессу посредством активации NADPH-оксигеназы с последующим образованием свободных радикалов.

лируемым уровнем экспрессии гена одного из лигандов RAGE, белка mS100a7a15 в эпидермисе. Предварительно они показали, что в псориазическом эпидермисе человека повышено содержанием белков S100a7 и S100a15 [53]. Фактически, авторы воспроизвели феномен Кебнера, при котором синтезируются провоспалительные цитокины (и, прежде всего, TNF и IL23a), ассоциированные с клетками  $T_{H1}$  и  $T_{H17}$ , утолщается эпидермис (абсцесс Когойя и Монро) и наблюдается гиперкератоз. В поврежденной коже трансгенных мышей обнаружены другие характерные признаки псориаза, в частности, расширение кровеносных сосудов. Немаловажно также, что содержание белка mS100a7a15 в коже мышей увеличивается по мере развития воспаления. Таким образом, авторы показали важное значение рецептора RAGE для развития патологического процесса — хемотаксиса лимфоцитов и экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Эти результаты подтверждают на-

ши собственные выводы [54, 55] об активной роли RAGE в патогенезе псориаза. Можно надеяться, что в скором времени последуют аналогичные исследования.

#### ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ОТ РЕЦЕПТОРА RAGE К ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРАМ

Подобно многим другим рецепторам, рецептор RAGE передает сигнал на киназы и активирует их (рис. 4). Список киназ включает ERK1/2 [56, 57], JAK/STAT [58, 59], CDC42/RAC [17], RAS, IP3k, JNK, p38 [57] и SMAD [60]. В свою очередь, киназы активируют транскрипционные факторы, в числе которых NFκB и AP1. Эти факторы действуют синергично [61]. При псориазе активация NFκB приводит к индукции генов провоспалительных цитокинов: IL1, IL6, IL8 и TNF [62], молекул клеточной адгезии и металлопротеиназ [13–15]. В свою очередь, AP1 активируется за счет уве-

личения экспрессии гена *FOSL1*. При этом экспрессия генов, которые кодируют другие компоненты AP1 – JUNB, JUND, JUN, FOS и FOSL2, – в пораженной коже снижается [63]. Любопытно, что после курса фототерапии интенсивность синтеза компонентов AP1 изменяется: экспрессия гена *FOSL1* уменьшается, а экспрессия генов всех упомянутых белков – увеличивается. Это происходит на фоне снижения индекса PASI и предвещает скорое наступление периода ремиссии [64].

Между тем, передача сигнала с рецептора RAGE на киназы пока исследована далеко не полностью. Известно, например, что MAPK-киназы (ERK1/2), взаимодействуют с рецептором RAGE напрямую, связываясь с участком длиной 18 а.о., непосредственно следующим за трансмембранным доменом [56]. Последовательность двенадцати аминокислот этого региона (положения 362-374) сходна с последовательностью ERK-связывающего участка других киназ – киназы 1/2, взаимодействующей с MAPK (MNK1/2), митоген- и стресс-активируемой протеинкиназы 1 (MSK1) и рибосомной S6-киназы белка pp90rsk (RSK). Напротив, взаимодействие с рецептором RAGE белков CDC42 и RAC происходит не напрямую, а при участии белка DIA1, который передает сигнал с рецептора RAGE на GTPазы. Возможность непосредственного связывания DIA-1 и RAGE показана ранее [17], как и тот факт, что их взаимодействие необходимо для RAGE-зависимой миграции клеток. Кроме этого, рецептор RAGE активирует протеинкиназу C- $\beta$  (PKC $\kappa$ - $\beta$ ) и NADPH-оксидазу [65].

У мутантных мышей с повышенной экспрессией генов хотя бы одной из активируемых RAGE сигнальных молекул, таких как доминантно-активных генов *Ras* [66], *Mek1* [67] и *Sat3* [68, 69], наблюдаются повреждения кожных покровов, напоминающие псориазные бляшки у людей. К аналогичному результату приводит сверхэкспрессия гена *Tgfb1* [70], которая сопровождается и сверхэкспрессией различных форм гена *Smad*. При гистологическом анализе кожи трансгенных мышей обнаружены явления гиперпролиферации базальных кератиноцитов, а также акантоз и гиперкератоз [66–68, 70]. Другие, характерные для псориаза признаки, такие как кожные микроабсцессы, заполненные нейтрофилами [67, 68, 70], и паракератоз [68, 70], не наблюдаются в некоторых из упомянутых фенотипах. Гранулярного слоя клеток нет у мышей с повышенной экспрессией генов *Stat3*, *Tgfb1* и с активированной формой гена *Ras*. У мышей, трансгенных по гену *Mek1*, гранулярный слой клеток, напротив, утолщен – по сравнению с животными дикого типа [67]. Феномен Кебнера описан в случае двух типов мышей – трансгенных по *Stat3* и *Tgfb1* [68, 70].

Аналогичные данные получены при изучении изменений в программе дифференцировки кера-

тиноцитов [66–68, 70]: повышается содержание маркера гиперпролиферации МК167 [67, 68] и наблюдается характерный для псориаза высокий уровень цитокератинов KRT6 [68, 67], KRT17 [67], KRT1, [68] и KRT10 [66]. Примечательно, что, в отличие от трансгенных мышей с повышенной экспрессией гена RAGE-активируемых киназ, животные с повышенным синтезом одного из лигандов этого рецептора, белка MS100a7a15, характеризуются практически полным спектром изменений, наблюдаемых в коже людей, больных псориазом (см. выше). Наиболее вероятным объяснением этого факта представляется то, что рецептор RAGE у этих животных находится в активированном состоянии [53]. Это, в свою очередь, позволяет предполагать, что создание антагонистов RAGE для подавления активируемых им киназ может стать важной задачей при совершенствовании терапии псориаза.

### РОЛЬ РЕЦЕПТОРА RAGE В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Список активируемых рецептором RAGE генов включает в себя гены *PTGS2* [71, 72], *INOS*, гены, которые кодируют белки, ингибирующие апоптоз: XIAP, BCL-2, BCL-X [73], и собственно ген рецептора RAGE [74]. Кроме этого, транскрипционный фактор NF $\kappa$ B подавляет экспрессию генов, кодирующих проапоптозные белки p53, BAX и BAD [73]. Мы сравнили экспрессию генов в пораженном и незатронутом эпидермисе больных псориазом [63]. Расчеты показали, что при псориазе изменяется экспрессия более чем тысячи генов, причем неповрежденный эпидермис больных, по сути, является переходным звеном от пораженной ткани к здоровой [63]. Далее, используя протеомный анализ [55], мы показали, что белки, содержание которых повышено в псориазическом эпидермисе, регулируются сравнительно небольшой группой транскрипционных факторов, которая включает в себя NF $\kappa$ B, AP1, SMAD и STAT3. Каждый из них, в свою очередь, активируется рецептором RAGE посредством фосфорилирования одной из киназ MAPK – JAK2, ERK1/2, p38. Предлагаемый нами сигнальный каскад учитывает также существование ранее открытого регуляторного механизма, работающего по принципу обратной связи между белком S100a9 (лигандом и активируемым геном), RAGE-рецептором и транскрипционным фактором NF $\kappa$ B [55, 75]. Взаимосвязь отдельных компонентов этой сигнальной сети согласуется с результатами предыдущих исследований, которые показали, что при псориазе вышеупомянутые транскрипционные факторы и протеинкиназы активируются [18, 76–78].

По-видимому, в сигнальных путях, активируемых рецептором RAGE, могут также участвовать и другие транскрипционные факторы. Например,

при сравнении воспалительного ответа у мышей дикого типа и мышей с инактивированным геном *Rage* показаны различия в паттернах сайтов связывания для ряда транскрипционных факторов — E2f, EGR, MYC, SP1 и SP4, а также AP2/TCFAP2 и WT1. О некоторых из них, например об AP2, E2F, S31 и EGR, известно, что они участвуют в регуляции генов иммунного ответа на антимикробный пептид L1-37 в моноцитах [79], и то, что их биологическая активность хорошо синхронизирована с факторами NFκB и AP1, которые, в свою очередь, активируются через RAGE. Помимо этого, сайты связывания факторов SP1, AP2, и EGR обнаружены в промоторе гена *Rage* [74, 80]. Последнее обстоятельство делает возможным индуцировать рецептор RAGE этими транскрипционными факторами по принципу обратной связи.

Основной вклад рецептора RAGE в регуляцию сигнальных механизмов заключается в том, что он увеличивает продолжительность воспалительного ответа [81], и это обусловливается несколькими обстоятельствами. Во-первых, в отличие от большинства других лиганд-рецепторных комплексов, которые быстро разрушаются в клетке после их активации, лиганд-рецепторный комплекс RAGE только стабилизируется и сохраняет активность [33]. Во-вторых, сигнальные механизмы, контролируемые этим рецептором, активируют несколько транскрипционных факторов, участвующих в воспалительном процессе [55]. В-третьих, некоторые из транскрипционных факторов, например, NFκB и другие, стимулируют экспрессию гена *RAGE* по принципу обратной связи [40, 82]. Поэтому поиски способов инактивации RAGE посредством антагонистов следует рассматривать как принципиально новый подход при лечении болезней, которые сопровождаются хроническим воспалением, включая псориаз.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В предлагаемом обзоре нами рассмотрены опубликованные данные о роли рецептора RAGE в патогенезе псориаза. Наш интерес к проблеме объясняется тем, что этот рецептор потенциально способен контролировать наиболее важные из процессов патогенеза псориаза, такие как воспалительный ответ, ангиогенез и гиперпролиферация кератиноцитов. Результаты анализа убеждают нас, что создание медицинских препаратов, подавляющих активность рецептора RAGE и зависящих от него сигнальных механизмов должно стать делом ближайшего будущего.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований по конкурсу научных проектов, выполняемых молодыми учеными (№ 12-04-32009), а также федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям раз-

вития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (16.512.11.2049).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gudjonsson J.E., Elder J.T. 2007. Psoriasis: epidemiology. *Clin. Dermatol.* **25**, 535–546.
- Bowcock A.M., Cookson W.O. 2004. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum. Mol. Genet.* **13**, R43–R55.
- Schon M.P., Boehncke W.H. 2005. Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1899–1912.
- Ghazizadeh R., Shimizu H., Tosa M., Ghazizadeh M. 2010. Pathogenic mechanisms shared between psoriasis and cardiovascular disease. *Int. J. Med. Sci.* **7**, 284–289.
- Zachariae H. 2003. Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. *Am. J. Clin. Dermatol.* **4**, 441–447.
- Davidovici B.B., Sattar N., Prinz J., et al. 2010. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 1785–1796.
- Christophers E. 2001. Psoriasis—epidemiology and clinical spectrum. *Clin. Exp. Dermatol.* **26**, 314–320.
- Cheng J., Kuai D., Zhang L., Yang X., Qiu B. 2012. Psoriasis increased the risk of diabetes: a meta-analysis. *Arch. Dermatol. Res.* **304**, 119–125.
- Azfar R.S., Gelfand J.M. 2008. Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Rheumatol.* **20**, 416–422.
- Clynes R., Moser B., Yan S.F., Ramasamy R., Herold K., Schmidt A.M. 2007. Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr. Mol. Med.* **7**, 743–751.
- Schmidt A.M., Yan S.D., Yan S.F., Stern D.M. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* **108**, 949–955.
- Andersson U., Wang H., Palmblad K., et al. 2000. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 565–570.
- Fiuza C., Bustin M., Talwar S., Tropea M., Gerstenberger E., Shelhamer J.H., Suffredini A.F. 2003. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* **101**, 2652–2660.
- Rouhiainen A., Kuja-Panula J., Wilkman E., Pakkanen J., Stenfors J., Tuominen R.K., Lepäntalo M., Carpén O., Parkkinen J., Rauvala H. 2004. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood.* **104**, 1174–1182.
- Cipollone F., Iezzi A., Fazia M., et al. 2003. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation.* **108**, 1070–1077.
- Chavakis T., Bierhaus A., Al-Fakhri N., et al. 2003. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counter-receptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J. Exp. Med.* **198**, 1507–1515.



17. Hudson B.I., Kalea A.Z., Del Mar Arriero M., Harja E., Boulanger E., D'Agati V., Schmidt A.M. 2008. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* **283**, 34457–34468.
18. Ghoreschi K., Mrowietz U., Rocken M. 2003. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J. Mol. Med (Berl)*. **81**, 471–480.
19. Galichet A., Weibel M., Heizmann C.W. 2008. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 1–5.
20. Buhimschi C.S., Baumbusch M.A., Dulay A.T., et al. 2009. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100beta in inflammation-induced preterm birth and fetal tissue injury. *Am. J. Pathol.* **175**, 958–975.
21. Al-Hazmi N., Thomas G.J., Speight P.M., Whawell S.A. 2007. The 120 kDa cell-binding fragment of fibronectin up-regulates migration of alphavbeta6-expressing cells by increasing matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion. *Eur. J. Oral Sci.* **115**, 454–458.
22. Rabbani N., Thornalley P.J. 2012. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino acids*. **42**, 1087–1096.
23. Sell D.R., Monnier V.M. 2012. Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation. *Gerontology*. **58**, 227–237.
24. Hofmann M.A., Drury S., Fu C., et al. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. **97**, 889–901.
25. Kislinger T., Fu C., Huber B., Qu W., Taguchi A., et al. 1999. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 31740–31749.
26. Schmidt A.M., Vianna M., Gerlach M., Brett J., Ryan J., Kao J., Esposito C., Hegarty H., Hurley W., Clauss M. 1992. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* **267**, 14987–14997.
27. Neeper M., Schmidt A.M., Brett J., Yan S.D., Wang F., Pan Y.C., Elliston K., Stern D., Shaw A. 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 14998–15004.
28. Srikrishna G., Huttunen H.J., Johansson L., Weigle B., Yamaguchi Y., Rauvala H., Freeze H.H. 2002. N-Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphoterin binding and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* **80**, 998–1008.
29. Yan S.F., Ramasamy R., Schmidt A.M. 2008. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 285–293.
30. Sterenczak K., Nolte I., Escobar H. 2013. RAGE splicing variants in mammals. In: *Calcium-Binding Proteins and RAGE. Methods in Molecular Biology*, Vol. 963. Ed. Heizmann C.W. N.Y.: N.Y. Humana Press, pp. 265–276.
31. Hudson B.I., Carter A.M., Harja E., Kalea A.Z., Arriero M., Yang H., Grant P.J., Schmidt A.M. 2008. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* **22**, 1572–1580.
32. Geroldi D., Falcone C., Emanuele E. 2006. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1971–1978.
33. Raucci A., Cugusi S., Antonelli A., Barabino S.M., Monti L., Bierhaus A., Reiss K., Saftig P., Bianchi M.E. 2008. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* **22**, 3716–3727.
34. Zhang L., Bukulin M., Kojro E., Roth A., Metz V.V., Fahrenholz F., Nawroth P.P., Bierhaus A., Postina R. 2008. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **283**, 35507–35516.
35. Yamakawa N., Uchida T., Matthay M.A., Makita K. 2011. Proteolytic release of the receptor for advanced glycation end products from in vitro and in situ alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **300**, L516–L525.
36. Yan S.D., Schmidt A.M., Anderson G.M., Zhang J., Brett J., Zou Y.S., Pinsky D., Stern D. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 9889–9897.
37. Lyngdorf L.G., Gregersen S., Daugherty A., Falk E. 2003. Paradoxical reduction of atherosclerosis in apoE-deficient mice with obesity-related type 2 diabetes. *Cardiovasc. Res.* **59**, 854–862.
38. Cheng C., Tsuneyama K., Kominami R., Shinohara H., Sakurai S., Yonekura H., Watanabe T., Takano Y., Yamamoto H., Yamamoto Y. 2005. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod. Pathol.* **18**, 1385–1396.
39. Lin L. 2006. RAGE on the Toll Road? *Cell. Mol. Immunol.* **3**, 351–358.
40. Bierhaus A., Nawroth P.P. 2009. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*. **52**, 2251–2263.
41. Moroz O.V., Dodson G.G., Wilson K.S., Lukanidin E., Bronstein I.B. 2003. Multiple structural states of S100A12: A key to its functional diversity. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 581–592.
42. Xie J., Reverdatto S., Frolov A., Hoffmann R., Burz D.S., Shekhtman A. 2008. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Biol. Chem.* **283**, 27255–27269.
43. Pullerits R., Brisslert M., Jonsson I.M., Tarkowski A. 2006. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheum.* **54**, 3898–3907.

44. Wolf R., Howard O.M., Dong H.F., et al. 2008. Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J. Immunol.* **181**, 1499–1506.
45. Ostendorp T., Weibel M., Leclerc E., Kleinert P., Kroenke P.M., Heizmann C.W., Fritz G. 2006. Expression and purification of the soluble isoform of human receptor for advanced glycation end products (sRAGE) from *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 4–11.
46. Kumano-Kuramochi M., Xie Q., Sakakibara Y., Niimi S., Sekizawa K., Komaba S., Machida S. 2008. Expression and characterization of recombinant C-terminal biotinylated extracellular domain of human receptor for advanced glycation end products (hsRAGE) in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **143**, 229–236.
47. Huttunen H.J., Rauvala H. 2004. Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease. *J. Intern. Med.* **255**, 351–366.
48. Abeyama K., Stern D.M., Ito Y., et al. 2005. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J. Clin. Invest.* **115**, 1267–1274.
49. Chen G.Y., Tang J., Zheng P., Liu Y. 2009. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*. **323**, 1722–1725.
50. Vasku V., Kankova K., Vasku A., Muzik J., Izakovicová Hollá L., Semrádová V., Vácha J. 2002. Gene polymorphisms (G82S, 1704G/T, 2184A/G and 2245G/A) of the receptor of advanced glycation end products (RAGE) in plaque psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **294**, 127–130.
51. Kankova K., Vasku A., Hajek D., Záhajský J., Vasku V. 1999. Association of G82S polymorphism in the RAGE gene with skin complications in type 2 diabetes. *Diabetes care*. **22**, 1745.
52. Foell D., Kane D., Bresnihan B., Vogl T., Nacken W., Sorg C., Fitzgerald O., Roth J. 2003. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **42**, 1383–1389.
53. Wolf R., Mascia F., Dharamsi A., et al. 2010. Gene from a psoriasis susceptibility locus primes the skin for inflammation. *Sci. Transl. Med.* **2**, 61ra90.
54. Пирузян Э.С., Ишкин А.А., Никольская Т.А., Абдеев Р.М., Брускин С.А. 2009. Сравнительный анализ молекулярно-генетических процессов при патогенезе псориаза и болезни Крона. *Молекуляр. биология*. **43**, 175–179.
55. Piruzian E., Bruskin S., Ishkin A., et al. 2010. Integrated network analysis of transcriptomic and proteomic data in psoriasis. *BMC Syst. Biol.* **4**, 41.
56. Ishihara K., Tsutsumi K., Kawane S., Nakajima M., Kasaoka T. 2003. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett.* **550**, 107–113.
57. Zhang F., Banker G., Liu X., Suwanabol P.A., Lengfeld J., Yamanouchi D., Kent K.C., Liu B. 2011. The novel function of advanced glycation end products in regulation of MMP-9 production. *J. Surg. Res.* **171**, 871–876.
58. Brizzi M.F., Dentelli P., Gambino R., Cabodi S., Cassader M., Castelli A., Defilippi P., Pegoraro L., Pagano G. 2002. STAT5 activation induced by diabetic LDL depends on LDL glycation and occurs via src kinase activity. *Diabetes*. **51**, 3311–3317.
59. Shaw S.S., Schmidt A.M., Baner A.K., Wang X., Stern D.M., Marrero M.B. 2003. S100B-RAGE-mediated augmentation of angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. *Diabetes*. **52**, 2381–2388.
60. Chung A.C., Zhang H., Kong Y.Z., Tan J.J., Huang X.R., Kopp J.B., Lan H.Y. 2010. Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF-beta-independent Smad3 signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 249–260.
61. Ma S., Rao L., Freedberg I.M., Blumenberg M. 1997. Transcriptional control of K5, K6, K14, and K17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr.* **6**, 361–370.
62. Zeh H.J., 3rd, Lotze M.T. 2005. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J. Immunother.* **28**, 1–9.
63. Пирузян Э.С., Никольская Т.А., Абдеев Р.М., Брускин С.А. 2007. Компоненты транскрипционного фактора AP-1 как гены-кандидаты на участие в развитии псориазического процесса. *Молекуляр. биология*. **41**, 1069–1080.
64. Соболев В.В., Золотаренко А.Д., Соболева А.Г., Саутин М.Е., Ильина С.А., Саркисова М.К., Голухова Е.З., Елкин А.М., Брускин С.А., Абдеев Р.М. 2010. Экспрессия гена *FOSL1* при псориазе и атеросклерозе. *Генетика*. **46**, 104–110.
65. Wautier M.P., Chappey O., Corda S., Stern D.M., Schmidt A.M., Wautier J.L. 2001. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E685–E694.
66. Gunderson A.J., Mohammed J., Horvath F.J., Podolsky M.A., Anderson C.R., Glick A.B. 2013. CD8(+) T cells mediate RAS-induced psoriasis-like skin inflammation through IFN-gamma. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 955–963.
67. Hobbs R.M., Silva-Vargas V., Groves R., Watt F.M. 2004. Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 503–515.
68. Sano S., Chan K.S., Carbajal S., Clifford J., Peavey M., Kiguchi K., Itami S., Nickoloff B.J., DiGiovanni J. 2005. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med.* **11**, 43–49.
69. Nakajima K., Kanda T., Takaishi M., et al. 2011. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J. Immunol.* **186**, 4481–4489.
70. Li A.G., Wang D., Feng X.H., Wang X.J. 2004. Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J.* **23**, 1770–1781.
71. Guzhova I., Margulis B. 2006. Hsp70 chaperone as a survival factor in cell pathology. *Int. Rev. Cytol.* **254**, 101–149.

72. Asea A. 2003. Chaperokine-induced signal transduction pathways. *Exp. Immunol Rev.* **9**, 25–33.
73. Kundu J.K., Surh Y.J. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**, 15–30.
74. Li J., Schmidt A.M. 1997. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **272**, 16498–16506.
75. Schreiber J., Jenner R.G., Murray H.L., Gerber G.K., Gifford D.K., Young R.A. 2006. Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 5899–5904.
76. Tsuruta D. 2009. NF-kappaB links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis. *Recent Pat Inflamm. Allergy Drug Discov.* **3**, 40–48.
77. Sano S., Chan K.S., Di Giovanni J. 2008. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J. Dermatol. Sci.* **50**, 1–14.
78. Arnold I., Watt F.M. 2001. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr. Biol.* **11**, 558–568.
79. Chang J.S., Wendt T., Qu W., Kong L., Zou Y.S., Schmid A.M., Yan S.F. 2008. Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. *Circ. Res.* **102**, 905–913.
80. Reynolds P.R., Kasteler S.D., Cosio M.G., Sturrock A., Huecksteadt T., Hoidal J.R. 2008. RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294**, L1094–L1101.
81. Riehl A., Bauer T., Brors B., et al. 2010. Identification of the RAGE-dependent gene regulatory network in a mouse model of skin inflammation. *BMC Genomics.* **11**, 537.
82. Riehl A., Nemeth J., Angel P., Hess J. 2009. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun. Signal.* **7**, 12.