

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего
образования

«НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

На правах рукописи



Сырочева Анастасия Олеговна

Исследование взаимной регуляции экспрессии катепсина В и стефина А в
процессе онкогенной трансформации клеток

1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Замятнин Андрей Александрович

Федеральная территория «Сириус» – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНАХ.....	11
1.1.1 Структура и биосинтез катепсина В.....	14
1.1.2 Функции катепсина В в здоровых клетках.....	18
1.1.3 Функции катепсина В в раковых клетках.....	21
1.2 МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ КАТЕПСИНА В В КЛЕТКЕ.....	24
1.2.1 Эпигенетическая регуляция экспрессии гена катепсина В.....	24
1.2.2 Регуляция экспрессии на уровне транскрипции.....	25
1.2.3 Посттранскрипционная регуляция катепсина В.....	27
1.2.4 Регуляция трансляции.....	29
1.2.5 Посттрансляционная регуляция катепсина В.....	30
1.3 РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В	31
1.3.1 Регуляция активности катепсина В при помощи цистатинов.....	31
1.3.2 Взаимодействие катепсина В и стефина А.....	33
1.4 ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРОДУКЦИЮ КАТЕПСИНА В.....	36
1.4.1 Изменение экспрессии катепсина В в ответе на химиотерапевтическое воздействие препаратами группы антрациклиновых антибиотиков.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Материалы исследования.....	40
2.1.1 Клеточные культуры	40
2.1.2 Растворы, использованные в работе.....	40
2.2. Методы исследования	43

2.2.1 Получение химически компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> (XL10 GOLD)	43
2.2.2 Трансформация бактерий <i>Escherichia coli</i> методом “теплового шока”	44
2.2.3 Трансфекция.	46
2.2.4 Выделение РНК и ОТ–ПЦР.	46
2.2.5 Вестерн блоттинг.	47
2.2.6 Иммуноцитохимическое окрашивание.	48
2.2.7 Анализ жизнеспособности клеток с использованием 3–(4,5–диметилтиазол–2–ил)–2,5–дифенилтетразолия бромид (МТТ).	49
2.2.8 Иммунопреципитация хроматина (ChIP).	50
2.3 Статистическая обработка данных.	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.	52
3.1 Гены <i>катепсина В</i> и <i>стефина А</i> ко-экспрессируются в нетрансформированных и опухолевых клетках.	52
3.2 Профили экспрессии белка катепсина В и стефина А демонстрируют положительную корреляцию.	57
3.3 Ядерно-цитоплазматическая колокализация катепсина В и стефина А.	63
3.4 Каталитическая активность катепсина В влияет на продукцию стефина А.	70
3.5 Доксорубин индуцирует изменения баланса катепсин В/стефинА.	78
3.6 Катепсин В и стефин А в ядрах раковых клеток взаимодействуют с хроматином	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	90
ВЫВОДЫ.	93
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смертности в мире.. Прогресс в области молекулярной диагностики и разработка таргетных терапевтических подходов обеспечили существенное улучшение показателей выживаемости пациентов при ряде злокачественных новообразований. Одним из перспективных направлений современной онкологии является идентификация и валидация новых молекулярных мишеней для противоопухолевой терапии. В этом контексте значительный интерес представляют катепсины (CTS).

Катепсины (CTS) представлены тремя типами лизосомальных протеиназ — цистеиновыми, аспаргатные и сериновыми, — которые выполняют разнообразные физиологические функции, включая регуляцию аутофагии, индукцию апоптоза, модуляцию иммунного ответа и контроль артериального давления [1]. Изменения активности или локализации этих ферментов связаны с различными патологиями, включая, сердечно–сосудистые заболевания [2,3], остеопороз и остеоартрит [4,5], нейродегенеративные заболевания [6,7], синдром Папийона–Лефевра [8] и аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка [9] . Также CTS вносят огромный вклад в развитие и прогрессирование опухолей – секретируясь во внеклеточное пространство, они способствуют инвазии и метастазированию рака, разрушая внеклеточный матрикс, нарушая межклеточные контакты и способствуя отсоединению опухолевых клеток от базальной мембраны [10,11].

Среди 15 протеиназ [12], CTSB представляет особый интерес. Он конститутивно экспрессируется в здоровых клетках, где участвует в клеточном метаболизме и опосредует апоптоз, индуцированный цитохромом C (Cyt C)[13]. В злокачественных новообразованиях он инициирует протеолитический каскад путем активации матриксных металлопротеиназ (ММП), например ММП–9. Таким

образом, CTSB контролирует эпителиально–мезенхимальный переход (ЭМП) [14]. Это способствует инвазии и впоследствии метастазированию. Кроме индукции ЭМП, CTSB напрямую участвует в деградации белков межклеточных контактов, таких как E-кадгерин[15], что дополнительно усиливает подвижность опухолевых клеток.

В физиологических условиях протеолитическая активность CTSB регулируется его природными ингибиторами - цистатинами. Согласно литературным данным, стефин А (STFA) способен связываться с CTSB в активном центре и ингибировать его активность. [16] , что было показано на клетках рака почки человека [17]. Однако закономерности корреляции между уровнями экспрессии и внутриклеточной локализацией CTSB и его ингибитора STFA в различных типах клеток остаются малоисследованными, как и молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействия CTSB и STFA при злокачественной трансформации клеток.

Цель и задачи работы

Целью работы является поиск и характеристика молекулярных механизмов взаимной регуляции экспрессии CTSB и STFA человека. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование взаимосвязи экспрессии генов *CTSB* и *STFA*
2. Исследование влияния протеолитической активности CTSB на биосинтез STFA
3. Исследование внутриклеточной локализации и изменения биораспределения CTSB и STFA
4. Анализ корреляции экспрессии CTSB и STFA в условиях терапевтического воздействия
5. Исследование взаимосвязи экспрессии CTSB и STFA в ядре

Научная новизна исследования

Научная новизна данного исследования заключается в установлении корреляционной взаимосвязи между уровнями экспрессии лизосомальной протеиназы CTSB и его природным ингибитором STFA, что показано с помощью комплексного анализа, включающим количественную ПЦР в реальном времени для оценки мРНК и вестерн-блоттинг для детекции соответствующих белков.

Впервые продемонстрирована ядерная локализация STFA, а также показано, что CTSB и STFA колокализуются как в цитоплазматическом, так и в ядерном компартментах. Также было показано, что CTSB и STFA образуют комплексы с гистоном 3 (H3) в линии рака почки человека 769р.

Кроме того, с применением ингибитора цистеиновых катепсинов (Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu- фторметил кетон (PLVE)), а также с использованием шпилечной конструкции для сайленсинга CTSB (pShCTSB), было показано, что протеолитическая активность CTSB играет важную роль в продукции белка STFA - ингибирование протеолитической функции CTSB сопровождается достоверным уменьшением уровня экспрессии STFA,

Впервые было исследовано влияние различных концентраций Dox на ось CTSB-STFA в клеточных линиях 769р и Hek293T.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования корреляции CTSB и STFA заключается в углублении понимания механизмов взаимной регуляции протеиназы и её ингибитора. Исследования влияния протеолитической активности CTSB на биосинтез STFA заключается в расширении представлений о механизмах обратной связи в системе протеиназа-ингибитор. Полученные данные также важны

для понимания динамики регуляции протеолиза в норме и при патологии. Результаты помогут раскрыть ранее неизвестные пути взаимодействия лизосомальной протеиназы с ее ингибитором на уровне транскрипционного и трансляционного контроля. Анализ динамики корреляционных взаимосвязей CTSB–STFA при терапии позволит углубить наши знания в понимании механизмов адаптивного ответа опухолевых клеток на лечение. Полученные данные могут расширить фундаментальные представления о роли дисбаланса CTSB/STFA.

Практическая значимость исследования корреляции экспрессии CTSB и STFA заключается в возможности использования их соотношения в качестве прогностического биомаркера ответа на терапию, разработке новых стратегий таргетного лечения, а также в создании персонализированных подходов к лечению на основе индивидуальных экспрессионных профилей пациентов. Исследования влияния протеолитической активности CTSB на биосинтез STFA заключается в перспективе разработки новых терапевтических стратегий, основанных на модуляции данной регуляторной оси, включая комбинированное применение ингибиторов CTSB с препаратами, регулирующими уровень STFA, что может повысить эффективность лечения онкологических заболеваний. Практическая значимость анализа динамики корреляционных взаимосвязей CTSB–STFA при терапии заключается в возможности разработки новых критериев оценки эффективности лечения на основе мониторинга изменений в соотношении этих белков, а также в оптимизации схем лечения путем изменения дозировок и комбинаций препаратов.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели и решения конкретных задач были использованы современные молекулярно–биологические методы исследования. В рамках работы проводились эксперименты на клеточных культурах – клетки эмбриональной почки человека (Hek293), клетки рака почки человека (769p), а

также клетки рака предстательной железы (Du145). Для анализа взаимодействий белков с ДНК применялся метод иммунопреципитации хроматина. Для детекции целевых белков и анализа их экспрессии использовались методы иммунного окрашивания с последующей детекцией методом вестерн-блоттинга, а также конфокальной микроскопии для визуализации внутриклеточной локализации. Количественная оценка уровня экспрессии генов проводилась с помощью ПЦР-анализа в реальном времени.

Обработку и анализ полученных данных осуществляли с использованием специализированного программного обеспечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Протеолитическая активность CTSB необходима для усиления продукции STFA
2. В исследуемых клеточных линиях STFA демонстрирует ядерно–цитоплазматическую локализацию и колокализован с CTSB.
3. Ядерные фракции CTSB и STFA образуют комплексы с гистонем H3. При повышении экспрессии CTSB, транслокация STFA в ядро увеличивается по сравнению с базальным уровнем.
4. Воздействие доксорубина (Dox) индуцирует дозозависимые изменения в уровнях экспрессии белков CTSB и STFA.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивалась комплексным подходом к их достижению. Были использованы современные молекулярно–биологические, иммунологические и биоинформатические методы, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах.

По теме научного исследования было опубликовано 5 научных работ в журналах индексируемые базами данных Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ:

Syrocheva, A. O., Ivanov, K. I., Laktyushkin, V. S., Gorokhovets, N. V., Parodi, A., & Zamyatnin, A. A., Jr (2025). Expression Interplay between Cathepsin B and Its Natural Inhibitor Stefin A in Cancer and Embryonic Cell Lines. *Cell Biol Int.* <https://doi.org/10.1002/cbin.70077>

Syrocheva, A.O.; Kolesova, E.P.; Parodi, A.; Zamyatnin, A.A., Jr. Stefin A Regulation of Cathepsin B Expression and Localization in Cancerous and Non-Cancerous Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 9321. <https://doi.org/10.3390/ijms26199321>

Syrocheva, A.O.; Volkova D.S.; Denisova E.R.; Streltsova V.V.; Marukhina P.S.; Parodi, A.; Zamyatnin, A.A., Jr. New Therapeutic Options Against Clinically Relevant Proteases in Cancer Progression *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2026 DOI: <https://doi.org/10.2174/0113895575426438251104072459>

Kolesova EP, Egorova VS, **Syrocheva AO**, et al. Proteolytic Resistance Determines Albumin Nanoparticle Drug Delivery Properties and Increases Cathepsin B, D, and G Expression. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12):10245. Published 2023 Jun 16. doi:10.3390/ijms241210245

Syrocheva AO, Gorbacheva VI, Egorova VS, Zamyatnin AA Jr, Parodi A, Kolesova EP. Inorganic Silica Nanoparticles Increase Lysosomal Biology and Protease Activity. *Int J Mol Sci.* 2025;26(17):8291. Published 2025 Aug 26. doi:10.3390/ijms26178291

Личное участие автора

Автор работы самостоятельно планировал и проводил эксперименты, в том числе работу на конфокальном микроскопе LSM 980 Airyscan на базе Axio Observer

7 (Carl Zeiss Micrography GmbH, Йена, Германия). Соискатель принимал непосредственное участие в планировании экспериментов, интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций по работе. Для проведения исследований были использованы плазмиды, предоставленные лабораторией (Гороховец Н.В.).

Структура и объём работы

Диссертация включает список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы. Материалы диссертации изложены на 110 страницах машинописного текста, содержат 32 рисунков и 8 таблицы. Список литературы включает 172 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНАХ

Термин «катепсин» (от греч. καθέψησις — переваривание) был предложен в начале XX века. Однако характеристика этих ферментов длительное время оставалась недоступной ввиду ограниченности существовавших методов. Систематическое изучение структуры и механизмов действия катепсинов стало возможным лишь с развитием белковой инженерии, геномики и протеомики во второй половине XX – начале XXI века.

Согласно базе данных MEROPS [12], катепсины экспрессируются у всех живых существ, от прокариот до млекопитающих. У человека идентифицировано всего 15 катепсинов. По строению активного центра их можно классифицировать, как сериновые CTS (CTSA и CTSG), аспартатные CTS (CTSD и CTSE) и цистеиновые CTS (CTS B, C, F, H, K, L, O, S, V, X и W) [18].

Цистеиновые CTS представляют собой наиболее многочисленную и функционально разнообразную группу. Повышенный интерес исследователей к этим ферментам обусловлен двумя ключевыми характеристиками. Во-первых, они проявляют высокую протеолитическую активность при кислых значениях pH (оптимум в диапазоне 5,0–6,5), что соответствует физиологической среде лизосом — основных компартментов внутриклеточного протеолиза. Во-вторых, при определённых условиях (в том числе при злокачественной трансформации, воспалении или гипоксии) эти ферменты способны секретироваться во внеклеточное пространство, где они участвуют в деградации компонентов внеклеточного матрикса и регуляции сигнальных путей. Также представители цистеиновых CTS могут проявлять активности эндопептидаз и экзопептидаз [19]. Кроме того, по крайней мере два фермента, CTSB и CTSH, обладают как эндо-, так и экзопептидазной активностью [20,21]. CTSB способен проявлять также карбоксипептидазную активность [22].

Локализация цистеиновых CTS не ограничена лизосомами. Они также присутствуют и выполняют различные функции и в других компартментах. Например, каталитически активные варианты CTSL локализованы в ядре и играют роль в регуляции клеточного цикла [23]. В клетках натуральных киллеров, CTSW, находящийся на мембранах эндоплазматической сети, может участвовать в модуляции их цитотоксической активности [24].

Большинство цистеиновых CTS не имеет тканеспецифичной экспрессии. Исключением являются CTSK, играющий существенную роль в резорбции костной ткани (6), CTSS преимущественно экспрессирующийся в антиген-презентирующих клетках (АПК) [25], а также CTSV и CTSW, принимающие участие в регуляции миграции и активности Т-клеток [26].

Долгое время считалось, что основная функция CTS заключается в неспецифической деградации белков. Будучи наиболее распространенными лизосомальными протеиназами, CTS играют важную роль в расщеплении белков в лизосомальном компартменте [27]. Помимо неспецифической деградации белков в лизосомах, CTS также участвуют в высокоспецифичной деградации белков. Например, CTSK, секретируемый остеокластами, разрушает фибриллы коллагена кости в процессе резорбции кости [4,28]. Аналогичным образом CTSS принимает участие в расщеплении белковых антигенов на пептиды в АПК для представления главными комплексами гистосовместимости (ГКГС) классов I и II [25,29-31].

Однако функции цистеиновых CTS не ограничиваются деградацией белка, они также играют роль в регуляции различных биологических процессов. CTS входит в состав обходной петли ренин-ангиотензиновой системы (РАС), перерабатывая проренин в ренин и превращая ангиотензиноген в ангиотензин I, а затем в ангиотензин II [32]. CTSC регулирует провоспалительные реакции путем протеолитической активации нейтрофильных сериновых протеаз (НСП) [33]. Мутации потери функции в гене CTSC, влияющие на активацию НСП, вызывают синдром Папийона-Лефевра, генетическое заболевание, характеризующееся

потерей зубов, гиперкератозом и предрасположенностью к рецидивирующим инфекциям [34]. Кроме того, цистеиновые CTS участвуют в реакции клеток на стресс. Классическим примером этого является быстрое высвобождение CTSB и CTSL во внеклеточный матрикс после повреждения клеток для облегчения восстановления плазматической мембраны [35]. В контексте нервной системы CTSL и CTSH регулируют нейротрансмиттерную сигнализацию путем протеолитической обработки предшественников нейропептидов в зрелые пептидные нейротрансмиттеры [36]. CTS также выполняют специфические функции в клетках иммунной системы. В Т-лимфоцитах CTSX стимулирует пролиферацию клеток, специфически разрушая пептид на С-конце $\beta 2$ -интегринового рецептора LFA-1 [37]. В АПК CTSS и CTSL расщепляют шаперон CD74 (инвариантную цепь), облегчая процесс презентации антигена [34,38-40]. Наконец, CTS играют важную роль в апоптотическом пути, расщепляя проапоптотические и антиапоптотические белки [41].

Подводя итог, можно сказать, что CTS — это многофункциональные ферменты, которые, помимо своей канонической роли в деградации лизосомальных белков, также участвуют в различных физиологических процессах.

Среди 11 цистеиновых катепсинов человека, CTSB представляет особый интерес ввиду многообразия выполняемых им функций. В здоровых клетках его активность направлена на поддержание гомеостаза, тогда как в трансформированных клетках она ассоциирована с приобретением ими инвазивного потенциала. Детальный анализ структуры и функций CTSB представлен в следующих главах.

1.1.1. Структура и биосинтез CTSB

Ген *CTSB* расположен в коротком плече 8 хромосомы, в регионе 23.1, и относится к локусу NG_009217. Его последовательность находится на минус-цепи ДНК и включает в себя приблизительно 45 000 пар оснований (точная длина может варьироваться в зависимости от используемой сборки генома). Ген *CTSB* состоит из 13 экзонов и 11 интронов [42]. Основной промотор *CTSB* расположен непосредственно перед экзоном 1. Также существуют дополнительные промоторные области, находящиеся выше экзонов 3 и 4, играющие роль в альтернативной регуляции экспрессии гена [43].

Транскрипт *CTSB* подвергается альтернативному сплайсингу, который приводит к образованию нескольких изоформ. В 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) альтернативный сплайсинг генерирует шесть различных изоформ. В 5'-транслируемой области альтернативный сплайсинг приводит к образованию двух основных транскриптов, что расширяет функциональное разнообразие белка. Однако в клетке *CTSB* представлен тремя изоформами: основной транскрипт, основной транскрипт без экзона 2 и основной транскрипт без экзона 2 и 3. Вариант без экзона 2 наиболее распространен в опухолевых клетках [20,44]. Вариант *CTSB* В без экзонов 2 и 3 не содержит сигнального пептида и пропептида, поэтому он не транспортируется из внутриклеточного пространства. Этот вариант считается преимущественно цитозольным. Также показано, что такие формы *CTSB* присутствуют в митохондриях [45].

Основная форма *CTSB* включает два структурных домена: левый (L-домен), состоящий из трёх α -спиралей, и правый (R-домен), организованный в виде β -бочонка. Эти домены формируют V-образную щель, в которой расположен активный центр фермента. В активном центре находятся два ключевых остатка — Cys25 и His159, образующие ионную пару тиолат-имидазоль (Рисунок 1). Эта пара играет центральную роль в каталитическом механизме *CTSB*, обеспечивая

разрыв пептидной связи в субстрате за счёт переноса протона между Cys25 и His159 [46]. Такой механизм дает CTSB возможность гидролизовать широкий спектр белковых субстратов.

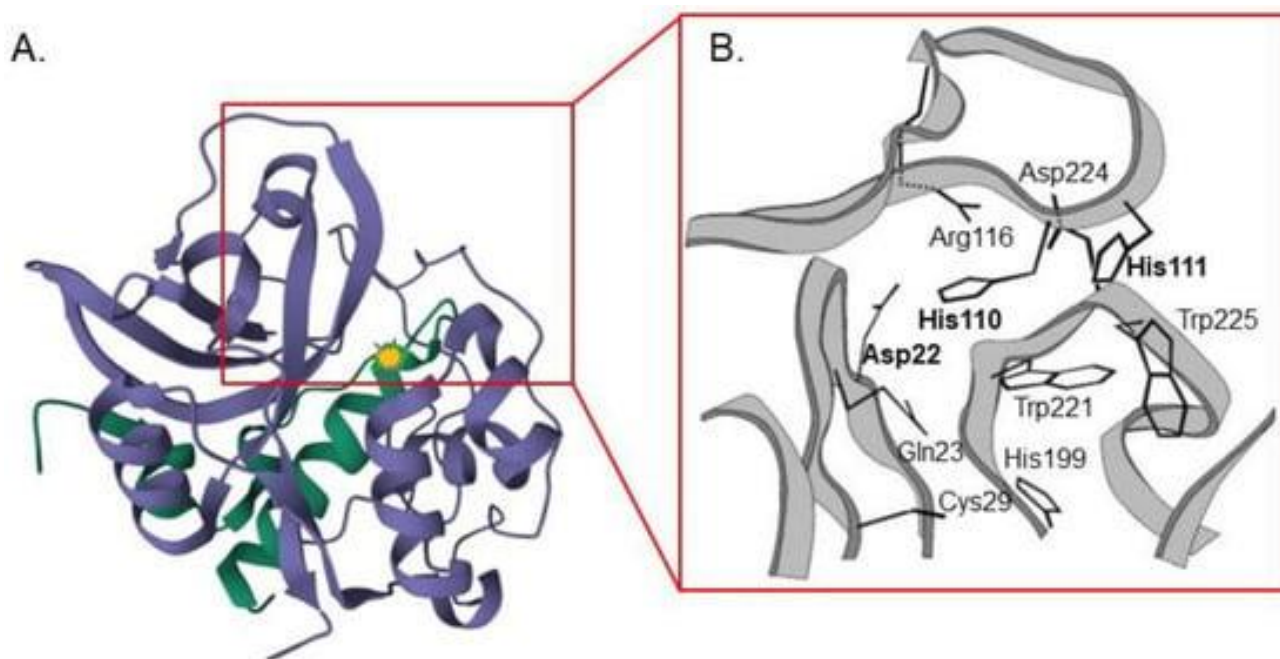


Рисунок 1 — Структура человеческого CTSB. (А). Тяжелая цепь показана синим цветом, а легкая цепь — зеленым. Желтая отметка указывает на остаток Cys29 в активном центре [47]. Оклюзионная петля человеческого катепсина. (Б) Каталитическая триада представлена Cys29 – His199–Asp219, Trp221 и Trp225 образуют гидрофобный карман вокруг активного центра [48]

Отличительной особенностью CTSB является наличие «окклюзионной петли», содержащей положительно заряженные остатки гистидина (H110 и H111). Эти остатки играют ключевую роль в связывании с отрицательно заряженным С-концевым карбоксилем субстрата, что способствует правильной ориентации субстрата в активном центре фермента. Кроме того, окклюзионная петля обеспечивает стабильность CTSB и повышает его устойчивость к эндогенным ингибиторам (Рисунок 2) [49].

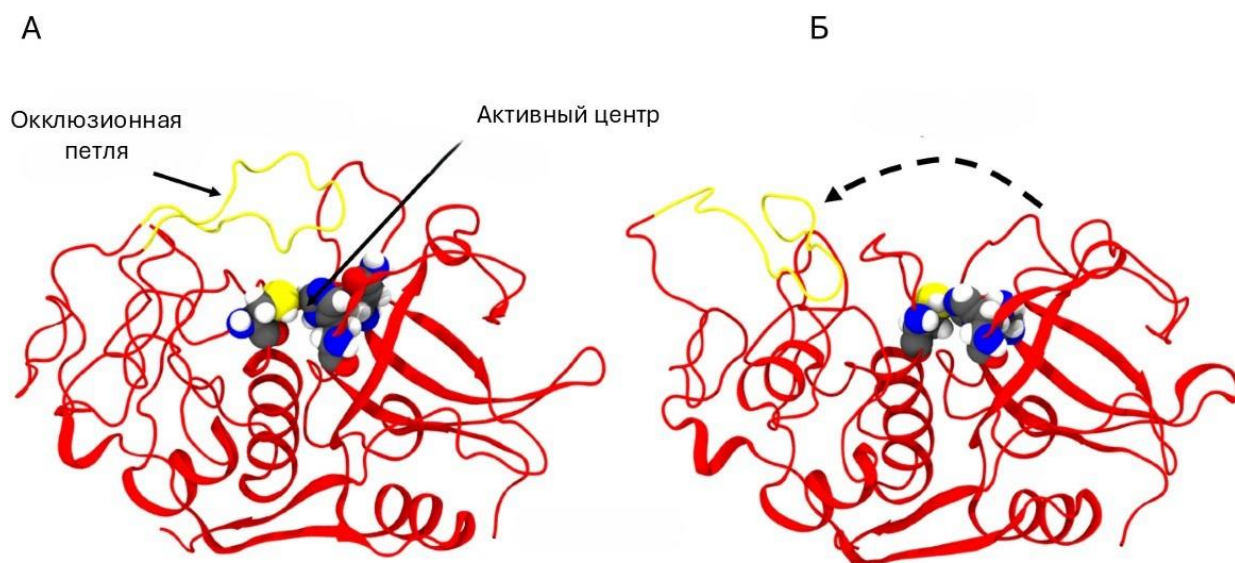


Рисунок 2 — Структура CTSB. А: Схематическое изображение структуры катепсина В (красный) с окклюдующей петлей (желтый) в закрытом положении. Остатки активного центра (С108, Н278, N298) показаны в виде сфер и окрашены по элементам (С: серый; N: синий; О: красный; S: желтый; Н: белый). Б: Схематическое изображение CTSB с открытой конформацией окклюдующей петли [50]

С момента синтеза и до приобретения активности, фермент претерпевает ряд трансформаций. Синтезируется CTSB на рибосомах шероховатой эндоплазматической сети (шЭПС) в виде пре-профермента. из 339 аминокислот с сигнальным пептидом из 17 аминокислот. После белок попадает в просвет шЭПС, где, путем удаления сигнального пептида, образуется неактивная форма-предшественник 43/46 кДа- proCTSB. Данная форма подвергается гликозилированию и транспортируется в аппарат Гольджи, где происходит дальнейшая модификация олигосахаридных цепей. В аппарате Гольджи к CTSB добавляются специфические маннозо-6-фосфатные остатки (М-6-Ф, которые служат метками для М-6-Ф-рецепторами на поверхности лизосом [51]. В кислой среде лизосом proCTSB подвергается автокаталитической активации путем диссоциации пропептида вместе с шестью аминокислотными остатками с С-конца, что приводит к образованию зрелой одноцепочечной формы CTSB массой 31 кДа. Протеолитическое расщепление между остатками 47 и 50 и вырезание дипептида приводит к образованию двухцепочечной формы, состоящей из тяжелой цепи 25

кДа и легкой цепи 5 кДа (Рисунок 3) [52]. Правильное созревание фермента критически важно для поддержания его стабильности, функциональной активности и регуляции его действия в клетке.

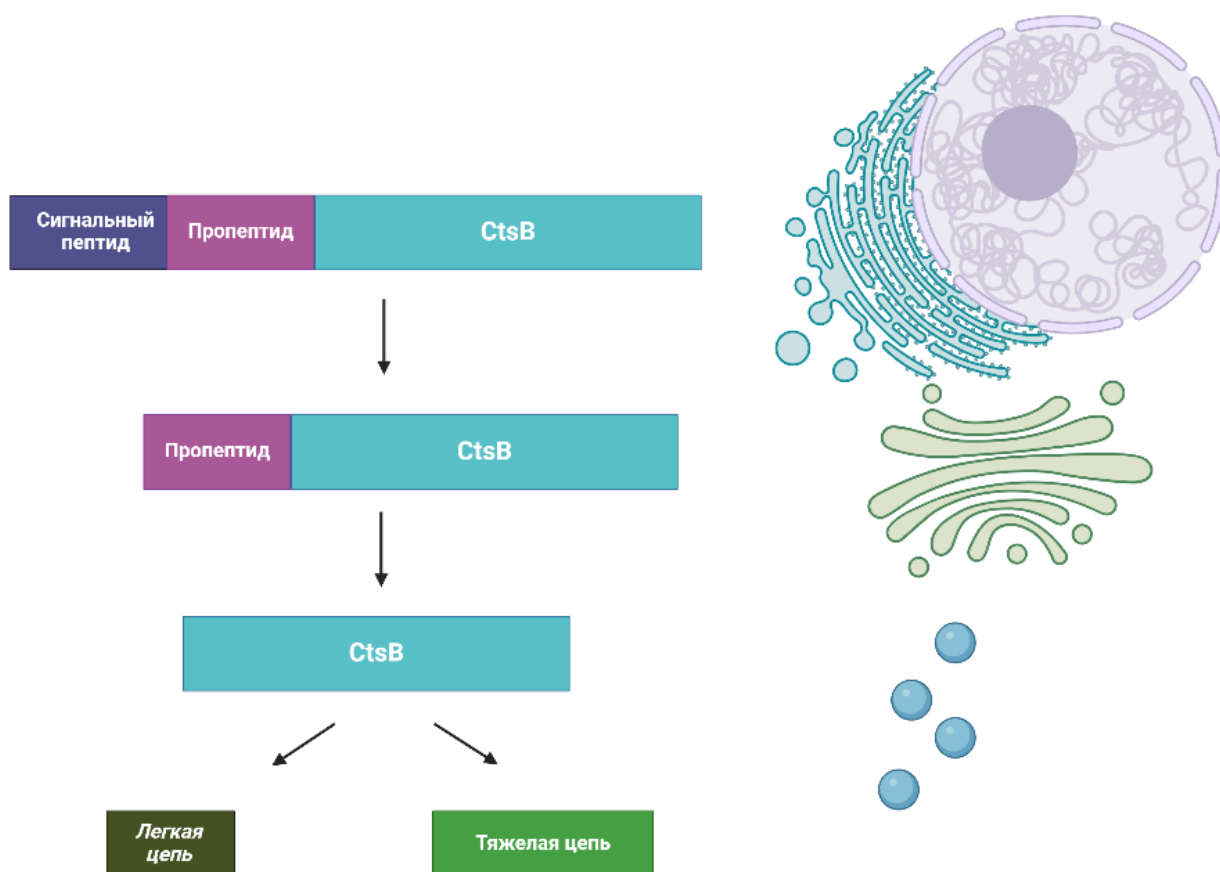


Рисунок 3 — Схема созревания CTSB. Pre-pro-CTS B синтезируется на шероховатой эндоплазматической сети. Расщепление сигнального пептида приводит к образованию ProCTS B, который попадает в аппарат Гольджи и, наконец, в лизосомы, где происходит его активация. Рисунок был создан с использованием сайта www.biorender.com

Локализация CTSB в клетке не ограничена лизосомами. Согласно данным UniProt [53], CTSB присутствует также на внешней стороне плазматической мембраны, в меланосомах, эндосомах, в перинуклеарном пространстве, а также во внуклеточном пространстве (Рисунок 4). Такая обширная локализация обусловлена уникальной способностью данного фермента – он стабилен и активен также и при нейтральном pH [54]. Именно эта особенность позволяет ему выполнять свои

функции в различных компартментах, а также делает его важным звеном в физиологических процессах.

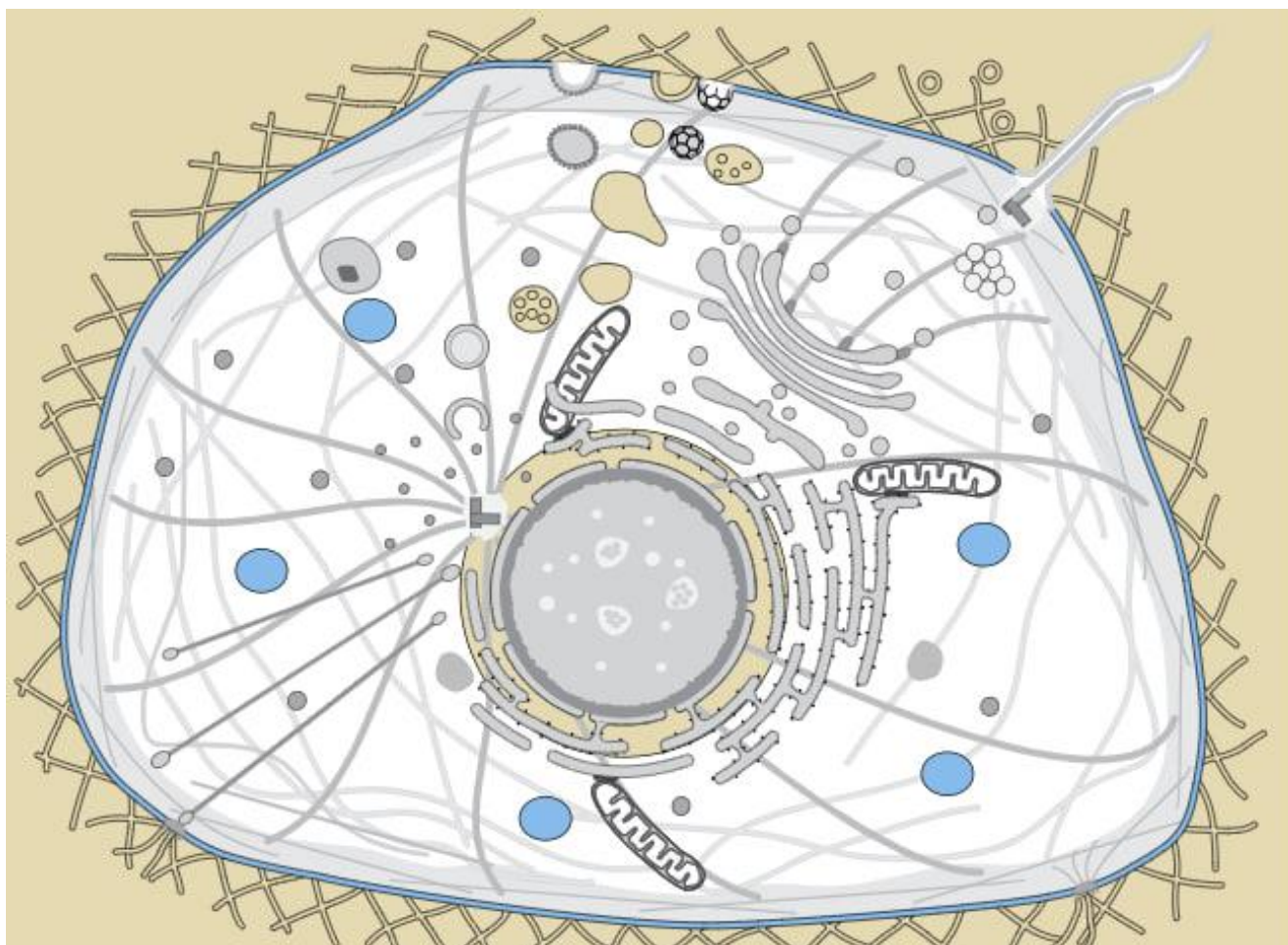


Рисунок 4 — Локализация CTSB в клетке. CTSB локализован как в кислых компартментах, таких как лизосомы и эндосомы, так и в компартментах с нейтральной средой – цитоплазме, перинуклеарном пространстве. Рисунок взят с ресурса UniProt (56)

1.1.2 Функции катепсина В в здоровых клетках

Значение CTSB для здоровых клеток трудно переоценить. Он играет ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза, обеспечивая баланс между синтезом и деградацией белков, а также участвует в регуляции жизненного цикла клетки.

Одной из его основных функций является поддержание клеточного гомеостаза. CTSB является важным компонентом лизосомальной системы, где он осуществляет неспецифический протеолиз белков [55], также он играет роль в процессе аутофагии [56]. Оба этих процесса направлены на переработку поврежденные или ненужные белков и органелл, что является частью клеточной защиты от стресса и поддержания ее в функциональном состоянии.

Если клетка не способна больше функционировать, то CTSB реализует еще одну свою функцию – запуск программ клеточной гибели. Увеличение проницаемость лизосомальной мембраны, под действием активных форм кислорода (АФК), может вызывать перемещение CTSB в цитоплазму. Там реализуется еще одна его функция – запуск клеточной гибели посредством активации каскада каспаз. CTSB способен расщеплять и активировать каспазу–1 и каспазу–11, которые участвуют в воспалительных процессах и пироптозе [57]. Также он способен активировать каспазу–3, ключевую эффекторную каспазу апоптоза [58]. Лизосомально–митохондриальная ось клеточной смерти также зависит от высвобождения CTSB. Вышедший из лизосом CTSB, способствует высвобождению цитохрома С из митохондрий. Дальнейшие процессы связаны с активацией каскада каспаз – расщеплению каспазы–9 и каспазы–3 и последующей индукции апоптоза [59]. CTSB является медиатором ферроптоза – железозависимой неапоптотической гибели клеток, вызванной чрезмерным перекисным окислением липидов и последующим повреждением мембраны [60] (Рисунок 5).

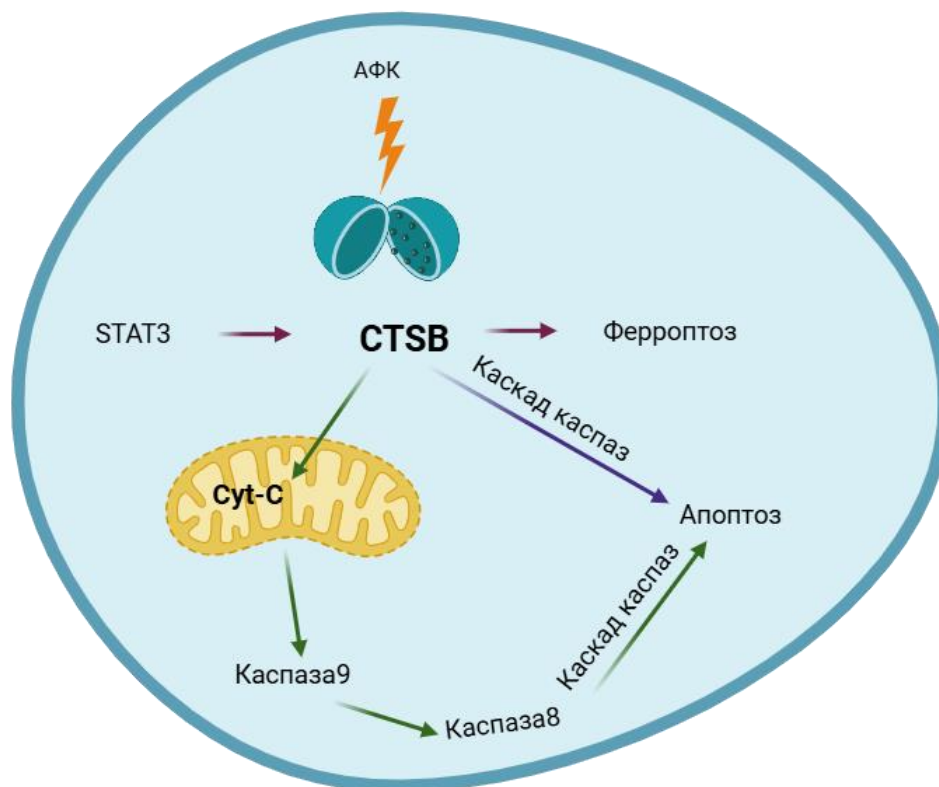


Рисунок 5 — Участие CTSB в процессах запуска клеточной гибели. Высвобождаясь в цитоплазму, CTSB способен запускать клеточную гибель как через митохондриальный Сyt–С. путь, так и самостоятельно запуская каскады реакций.. Рисунок был создан с использованием сайта www.biorender.com

CTSB играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа, обеспечивая эффективное распознавание патогенов и активацию защитных механизмов. В процессе активации врожденного иммунного ответа, лизосомальные CTS, включая CTSB, участвуют в процессинге эктодоменов Toll–подобных рецепторов (ТПР) 7 и 9. Эти рецепторы экспрессируются на эндосомальных и лизосомальных мембранах, где распознают нуклеиновые кислоты, происходящие из фагоцитированных микробов. После расщепления TLR7 и TLR9 приобретают способность взаимодействовать с адаптерным белком. Это взаимодействие запускает каскад сигнальных путей, что в конечном итоге приводит к индукции экспрессии провоспалительных цитокинов и интерферонов [61].

Еще одной жизненно важной функцией CTSB является его участие в регуляции клеточного цикла. Согласно литературным данным, CTSB способен перемещаться в ядро, где играет роль в процессе митоза, а именно — в разделении хромосом во время анафазы [62]. Ошибки в сегрегации хромосом во время митоза приводят к анеуплоидии — изменению числа хромосом, некратно гаплоидному набору [63].

Таким образом CTSB является незаменимым ферментом в процессе обеспечения правильного функционирования клеток. Его роль не ограничивается утилизацией белков в лизосомах. Влияние на процессы митоза и апоптоза подчеркивает его важность как для процессов жизнедеятельности клетки, так и всего организма.

1.1.3 Функции катепсина В в раковых клетках

Нарушение локализации, экспрессии и функционирования CTSB приводят к ряду патологических процессов, включая онкологическую трансформацию клетки. Это связано с тем, что при онкологической трансформации, CTSB секретируется из клетки в межклеточное пространство, где он остается активным и продолжает выполнять функции по деградации белков [45].

Расщепление белков клеточной адгезии, например, E-кадгерина, способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) и инвазии в соседние ткани и органы [64]. Помимо самостоятельного расщепления белков, CTSB способен активировать матриксные металлопротеиназы (ММП) [65]. Активация ММП-9 приводит к разрушению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), таких как коллаген, ламинин, фибронектин и эластин. Параллельно высвобождаются цитокины и факторы роста, стимулирующие развитие опухоли (Рисунок 6). Одним из таких факторов является трансформирующий фактор роста

бета (TGF-beta). Действие TGF-beta на окружающие клетки приводит к прогрессированию опухоли за счет усиления миграции, супрессии иммунного ответа и стимуляции ангиогенеза [66]. TGF-β1 стимулирует экспрессию CTSB, главным образом, путем ингибирования Smad1 [67]. CTSB в свою очередь высвобождает TGF-beta из белковых комплексов ВКМ.

Образование новых кровеносных сосудов является критически важным этапом онкогенеза. Благодаря развитию собственной сети кровеносных сосудов, опухоль получает возможность активно расти. Новообразованные сосуды не только снабжают опухоль необходимыми ресурсами, но и служат путями для миграции раковых клеток в другие органы и ткани, что приводит к образованию метастазов. CTSB может высвобождать фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) из ВКМ, увеличивая его доступность для эндотелиальных клеток. Влияя на сигнальные пути PI3K/AKT и MAPK/ERK, регулирующие пролиферацию, миграцию и выживаемость эндотелиальных клеток, CTSB вносит вклад в ангиогенез (Рисунок 6) [68].

CTSB, секретируемый фибробластами, оказывает опосредованное влияние на метаболизм липидов в опухолевых клетках, что играет важную роль в их способности к метастазированию. Стеароил-КоА-десатураза 1 (SCD1) участвует в синтезе мононенасыщенных жирных кислот, которые критически важны для поддержания целостности клеточных мембран и регуляции сигнальных путей. CTSB посредством взаимодействия с аннексином А2 способен увеличивать уровень экспрессии SCD1. Увеличение экспрессии SCD1 в опухолевых клетках приводит к изменению липидного состава мембран, что, в свою очередь, усиливает их подвижность, инвазивность и способность к метастазам (Рисунок 6) [69].

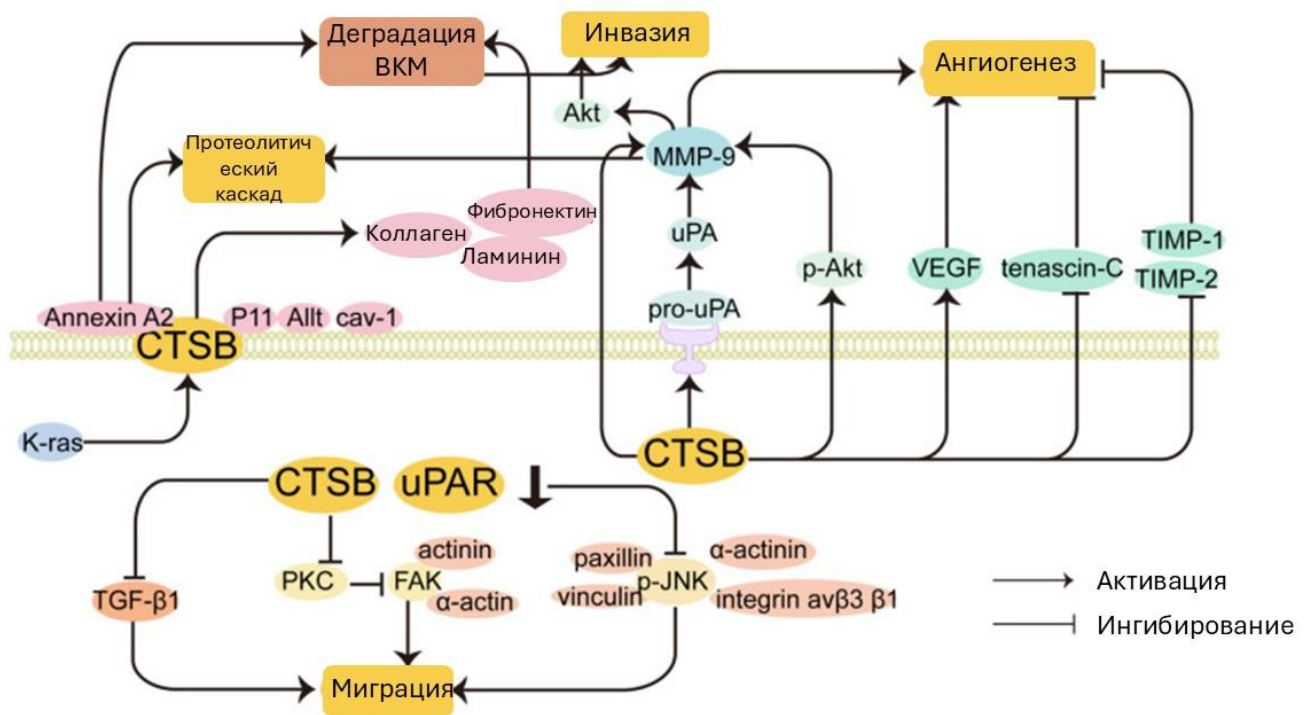


Рисунок 6 — Роль CTSB в онкогенной трансформации клетки. Аномальная активация экспрессии CTSB вносит вклад в формирование онкологического потенциала клетки. Ингибирование экспрессии CTSB может подавлять миграцию, ангиогенез и инвазию посредством снижения протеолитической деградации белков ВКМ, а также через воздействие на другие белки и сигнальные пути [14]

Повышенное содержание CTSB может способствовать снижению эффективности противораковой терапии. Примером является лечение темозоломидом, который широко используется для терапии глиом [70].

Таким образом, CTSB играет важную роль в онкологической трансформации клетки. Он является регулятором процессов, которые определяют агрессивность и прогрессирование опухоли. Его активность напрямую влияет на инвазию и метастазирование опухолевых клеток.

1.2 МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ КАТЕПСИНА В В КЛЕТКЕ

CTSB является действительно важным ферментом для правильного функционирования клетки. Поэтому его регуляция представляет собой сложный и многоуровневый процесс, который начинается с регуляции транскрипции и заканчивается посттрансляционными модификациями готового белка [71].

1.2.1 Эпигенетическая регуляция экспрессии гена катепсина В

Регуляторные последовательности генов *CTS*, в частности и *CTSB*, содержат кластеры динуклеотидов CpG, известные как CpG-островки (CGI). Метилирование 5'-цитозиновых остатков в этих островках играет ключевую роль в эпигенетической регуляции уровня экспрессии генов. Метилированный цитозин в составе CpG-островка привлекает белки, называемые метил-связывающими белками (MBP), которые способны подавлять транскрипцию различными способами. Один из способов — это взаимодействие MBP с модификаторами хроматина и их конкуренцию с факторами транскрипции [72]. Kaiso является членом семейства MBP, которое подавляет транскрипцию генов, повторно используя гистондеацетилазу 3 (HDAC3) [73]. Деацетилирование гистонов приводит к уплотнению хроматина, делая его менее доступным для транскрипционных факторов и РНК-полимеразы.

CGI располагаются не только в промоторной области, но и в теле гена [74]. При этом гипометилирование в промоторных областях нередко ассоциируется с активацией транскрипции [75]. Согласно данным бисульфитного секвенирования из библиотеки ENCODE [76], промоторная область, а также тело гена *CTSB* содержит CGI, которые могут быть метилированы в зависимости от типа клеток и состояния организма.

К эпигенетической регуляции также относятся ковалентные модификации гистонов — обратимые посттрансляционные изменения аминокислотных остатков в N-концевых хвостах гистонов [77], включающие ацетилирование [78], метилирование [79], фосфорилирование [80], убиквитинилирование [81], сумоилирование и АДФ-рибозилирование. Эти модификации катализируются специфическими ферментами (гистон-ацетилтрансферазами, метилтрансферазами, киназами и др.) и образуют так называемый «гистоновый код», который считывается эффекторными белками, определяя степень конденсации хроматина и доступность ДНК для транскрипционных факторов. В отличие от метилирования ДНК, ковалентные модификации гистонов являются более динамичными и могут быстро изменяться в ответ на внешние сигналы.

В базе данных ENCODE (80) имеются данные ChIP-seq для различных тканей и клеточных линий. Модификации гистонов вблизи гена *CTSB* также влияют на активность транскрипции. Например, метилирование гистона 3 лизина 4 (H3K4me) эволюционно является высококонсервативной меткой активного хроматина [82]. H3K36 также считается меткой активного хроматина, тогда как метилирование H3K9, H3K27, H3K79 и H4K20 может подавлять транскрипцию генов [83].

Модификации гистонов, как и метилирование CGI, оказывают влияние на доступность ДНК для дальнейшей транскрипции гена *CTSB*.

1.2.2 Регуляция экспрессии катепсина В на уровне транскрипции

Регуляция транскрипции во многом определяется промотором. Промотор *CTSB* не содержит ТАТА и СААТ боксов, однако содержит GC-богатые участки, которые и являются регуляторами экспрессии. GC-богатые участки часто встречаются в промоторах генов с конститутивной экспрессией и являются сайтами связывания транскрипционных факторов [84].

Транскрипционные факторы семейства специфичных белков (Sp), связываются с GC–богатыми последовательностями и инициируют транскрипцию *CTSB*. Было показано, что в этом задействованы Sp1, Sp3. Всего промотор *CTSB* содержит шесть сайтов связывания Sp1 (Рисунок 7) [85].

Помимо этого, имеются последовательность E–box (Рисунок 7) которая служит сайтом связывания для транскрипционных факторов, принадлежащих к семейству стимулирующих факторов (USF). Было показано, что транскрипция *CTSB* активируется такими представителями семейства USF, как USF1, USF2. Эти два белка способны связываться с последовательностью E–box как гетеродимер. Данная конформация максимально увеличивает активность промотора [86].

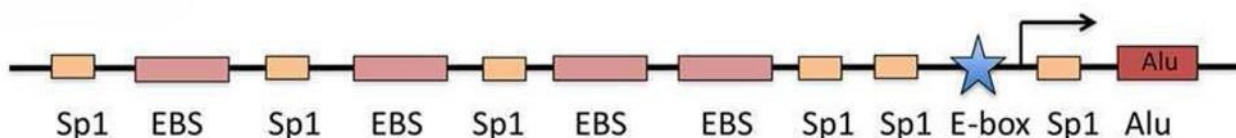


Рисунок 7 — Строение промоторной области гена *CTSB* [43]

Промоторная область *CTSB* также имеет четыре сайта связывания с факторами транскрипции семейства E26 (ETS). В том числе с ETS1, который экспрессируется в инвазивных опухолях и регулирует многочисленные гены, участвующие в пролиферации, ангиогенезе и метастазах [87].

Ядерный фактор каппа В (NF–κB) способен положительно регулировать экспрессию *CTSB* в условиях воспаления и онкогенеза, связываясь с сайтом в его промоторной области. Также следует отметить, что *CTSB* в свою очередь способен влиять на активацию NF–κB [88].

STAT3 опосредованная активация *CTSB* увеличивает гибель клеток, приводя как к ферроптозу, так и к лизосомально– опосредованной гибели клеток, которая не зависит от каспаз (STAT3 –регулируемый путь лизосомально–опосредованной клеточной гибели) [67,89-91].

Регуляция транскрипции *CTSB* также происходит по альтернативным многокомпонентным путям, которые активируются в ответ на стрессовые сигналы. Это подчеркивает важность стабильной экспрессии данного гена для клетки.

1.2.3 Посттранскрипционная регуляция катепсина В

Следующий уровень регуляции – посттранскрипционный. На этом этапе клетка может контролировать судьбу РНК, определяя ее стабильность, транспорт, локализацию и трансляцию.

Одним из возможных механизмов контроля является альтернативный сплайсинг. Как было упомянуто ранее, первичный транскрипт подвергается сплайсингу — процессу вырезания интронов и соединения экзонов. При альтернативном сплайсинге различные комбинации экзонов включаются в зрелую мРНК, что приводит к образованию нескольких изоформ белка из одного гена. Эти изоформы могут различаться по своей структуре, субклеточной локализации (функционируя в разных компартментах клетки) и функциональной активности, что значительно расширяет протеомное разнообразие без увеличения числа генов [43,44].

Помимо альтернативного сплайсинга, важную роль в посттранскрипционной регуляции играет редактирование РНК. В частности, редактирование аденозина в инозин (A-to-I) является одной из наиболее распространенных посттранскрипционных модификаций мРНК у многоклеточных организмов. Данный процесс катализируется ферментами семейства аденозин-деаминаз (ADAR) и приводит к изменению первичной последовательности РНК, поскольку инозин (I) распознается клеточными системами как гуанозин (G). Редактирование мРНК в 3'UTR (нетранслируемой области) влияет на стабильность мРНК, эффективность ее трансляции и взаимодействие с микроРНК (miRNA).

Опосредованное ADAR1 редактирование типа A-to-I в мРНК *CTSB* играет ключевую роль в регуляции стабильности транскрипта. Следует отметить, что *CTSB* обладает способностью самостоятельно регулировать редактирование собственной мРНК. S-нитрозилированный *CTSB* способен влиять на регуляторную ось ADD1/MATR3/ADAR1, создавая петлю обратной связи (Рисунок 8) [92].

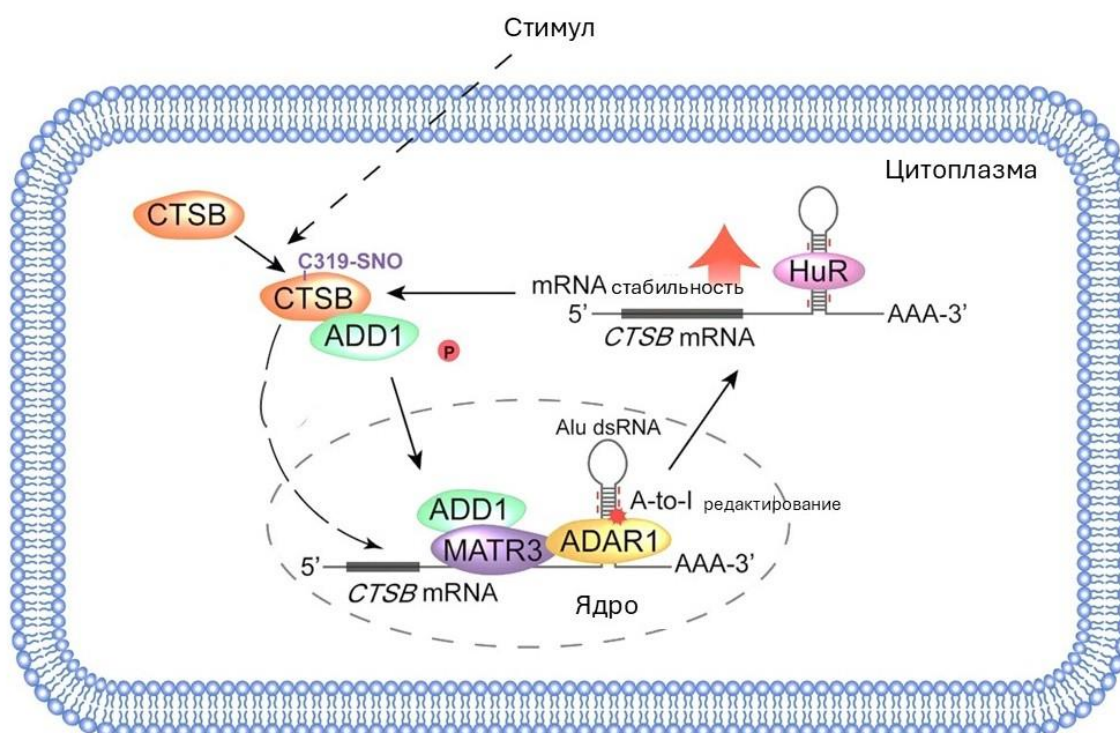


Рисунок 8 — Патологические стимулы вызывают транслокацию *CTSB* в цитоплазму и S-нитрозилирование в сайте Cys319. S-нитрозилированный *CTSB* способствует дефосфорилированию и ядерной транслокации ADD1. Затем ADD1 рекрутирует MATR3 и ADAR1 к мРНК *CTSB*, вызывая A-to-I РНК-редактирование мРНК *CTSB*. Наконец, отредактированная мРНК *CTSB* распознается HuR, что способствует стабильности мРНК *CTSB*, повышая стационарный уровень *CTSB*[92]

Посттранскрипционная регуляция обеспечивает стабильность, сплайсинг и транспорт мРНК *CTSB*, что позволяет клетке адаптировать экспрессию этого белка в ответ на изменяющиеся условия.

1.2.4 Регуляция трансляции

Регуляция трансляции осуществляется на нескольких этапах, включая в себя широкий спектр молекулярных механизмов, таких как взаимодействие с микроРНК (miRNA), РНК-связывающими белками (RBPs), а также модификации факторов трансляции.

Трансляция транскрипта *CTSB* регулируется miRNA. Сайт связывания miR-214-3p и мРНК *CTSB* был предсказан с использованием базы данных TargetScanHuman [93,94]. Ингибирующая способность этой miRNA была экспериментально показана в культуре клеток кардиомиоцитов AC16 (92). мРНК *CTSB* может взаимодействовать с miR-140-5p и miR-5089-5p, которые являются отрицательными регуляторами транскрипции [95,96].

Редактирование A-to-I, опосредованное ADAR1, изменяет структуру мРНК *CTSB*. В процессе редактирования создаются структурные мотивы (шпильки), которые служат сайтами связывания для Nu антигена R (NuR) — белка, стабилизирующего мРНК [92].

Эффективность трансляции мРНК *CTSB* регулируется сложным комплексом молекулярных механизмов, выходящих за рамки простого взаимодействия с самой мРНК. Ключевыми детерминантами данного процесса являются посттрансляционные модификации трансляционных факторов, такие как фосфорилирование эукариотического фактора инициации трансляции 2α (eIF2 α) [97] или активация mTOR-сигнального пути [98], которые могут существенно влиять на инициацию и элонгацию трансляции.

Кроме того, доступность рибосомальных субъединиц и их функциональная активность играют критическую роль в обеспечении эффективного синтеза белка. Энергетический статус клетки также оказывает значительное влияние на процесс трансляции. Таким образом, регуляция трансляции мРНК *CTSB* представляет собой

многофакторный процесс, требующий интеграции сигналов от различных клеточных систем.

1.2.5 Посттрансляционная регуляция катепсина В

Существует еще один уровень регуляции, который представляет собой набор биохимических изменений, вносимых в белковые молекулы после их синтеза на рибосомах. Посттрансляционные модификации позволяют клетке тонко регулировать функции белков, модулируя их активность, стабильность, субклеточную локализацию и взаимодействие с другими молекулами.

В ходе своего созревания, CTSB претерпевает гликозилирование [99]. Гликозилирование необходимо для транспортировки в лизосомы через M-6-F зависимый путь. Также это защита белка от деградации до его попадания в лизосомы [51].

Также CTSB подвергается S-нитрозилированию. Такая форма фермента ответственная за поддержание стабильности своего транскрипта, путем создания сайта посадки HuR [92]. Однако в нейрональных клетках данная модификация приводит к ингибированию активности протеиназы и накоплению агрегатов, что в конечном итоге приводит к нейродегенеративным заболеваниям [100].

Продукция CTSB находится под строгим многоуровневым контролем, начиная с эпигенетической регуляции и заканчивая посттрансляционными модификациями. Такая сложная система регуляции подчеркивает критическую роль CTSB для правильного функционирования клетки. Однако существует еще одна важная характеристика – активность. Поддержание баланса активного CTSB в клетке также является необходимым условием в контексте клеточного гомеостаза.

1.3 РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В

Учитывая вклад CTSB в различные патологические процессы, включая онкологию, исследовано множество ингибиторов его активности. К ним относят не только синтетические ингибиторы [101,102], но и ингибиторы природного происхождения. Известны примеры экзогенных ингибиторов, выделенных из других биологических видов [103] и эндогенных, которые вносят свой вклад в поддержание баланса клетки [14].

Эндогенное ингибирование может осуществляться за счет изменения рН или окисления Cys, однако наибольший вклад вносят ингибиторы семейства цистатинов.

1.3.1 Регуляция активности катепсина В при помощи цистатинов

Цистатины являются широко представленным классом ингибиторов цистеиновых папаиноподобных (C1) протеиназ. Их ключевой особенностью является способность обратимо ингибировать активность этих ферментов за счёт стереохимического взаимодействия с каталитическим центром. Остаток Cys в активном центре фермента выступает в роли нуклеофила, а остаток His выполняет функцию общего основания, облегчая депротонирование тиольной группы ($-SH$) Cys и тем самым увеличивая его реакционную способность.

Цистатины классифицируются по количеству доменов и наличию дисульфидных связей [104]. В настоящее время в суперсемействе цистатины идентифицировано несколько подсемейств. Тип 1 (стефины) – низкомолекулярные белки (~11 кДа), лишённые дисульфидных связей и содержащие один цистатиновый домен (например, цистатин А и В). Тип 2 (цистатины) – более крупные белки (~13–14 кДа), содержащие два дисульфидных мостика и один

цистатиновый домен (например, цистатин С, S, SN). Тип 3 (кининогены) – высокомолекулярные белки, включающие несколько цистатиновых доменов и множественные дисульфидные связи (например, высокомолекулярный кининоген – НМВК) [105].

Далеко не все представители семейства цистатинов способны связываться с CTSB. Например, к подсемейству цистатинов типа 2 относится 10 белков. Из них только 2 представителя способны связываться с CTSB – hCC и hCE. При этом доказано, что только hCC способен ингибировать активность CTSB [106]. Это происходит благодаря способности hCC смещать окклюзионную петлю в активном центре CTSB [107]. Однако hCC содержится преимущественно в циркулирующих жидкостях, в то время как CTSB в нормальных условиях в основном локализован внутри клетки [105].

Во внутриклеточной регуляции активности CTSB задействованы цистатины типа 1– стефин А (STFA) и стефин Б (STFB). Стефины представляют собой одноцепочечные полипептиды из ~100 аминокислотных остатков и не содержат ни дисульфидных связей, ни боковых углеводных цепей. Стефины не имеют сигнального пептида, чем обусловлена преимущественно цитоплазматическая локализация [104].

Взаимодействия CTSB и STFB неоднозначны и зависят от типа клеток и заболевания. Имеющиеся данные показывают, что снижение экспрессии STFB сопровождается увеличением активности CTSB при синдроме Дауна [107] и эпилепсии [108]. Однако в контексте онкологических заболеваний, увеличение экспрессии STFB связывают с плохим прогнозом [109]. В литературе имеются данные о локализации STFB в лизосомах [110], где он способствует протеолитической активности CTSB и коррелирует с плохим прогнозом при раке поджелудочной железы [111]. Поэтому в настоящее время в контексте терапевтической мишени рассматривается ось CTSB–STFA.

1.3.2 Взаимодействие катепсина В и стефина А

Ген *STFA* располагается на хромосоме 3q21.1. и состоит из трех экзонов и двух интронов. Первый, второй и третий экзоны состоят из кодирующих последовательностей длиной 66, 102 и 126 пар оснований соответственно. Первый и второй интроны состоят из 14 и 3,6 пар оснований соответственно. Сайт инициации транскрипции расположен на 55 пар оснований выше первого сайта трансляции [112]. Зрелый STFA представляет собой полипептид массой ~11 кДа, не содержащий дисульфидных связей. На данный момент в литературе описана одна белковая форма длиной в 98 аминокислотных остатков [113]. Белок имеет глобальную структуру, состоящую из пяти антипараллельных β -слоев, обернутых вокруг центральной α -спирали. (Рисунок 9) [16,114].

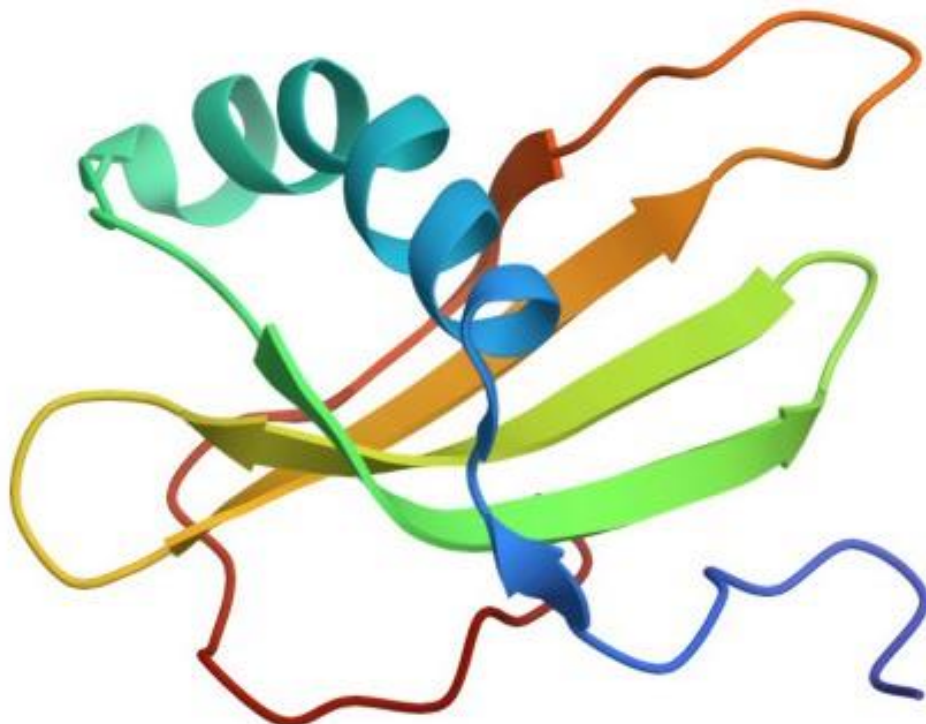


Рисунок 9 — Структура человеческого STFA. Пять β -слоев, изображенные в виде цветных стрелок, складываются в изогнутую β -складку, охватывающую центральную часть молекулы. Эта складка фланкирована с одной стороны короткой α -спиралью, представленной спиральным элементом, которая стабилизирует общую структуру [16]

Экспериментально было показано, что за связывание с цистеиновыми протеиназами ответственна N–концевая область [115]. Связывание происходит в два этапа – на первом этапе образуются шпильковые петли, на втором этапе N–концевые остатки цистатина взаимодействуют с протеиназами [116]. Второй связывающий петлевой домен STFA играет ключевую роль в стабилизации комплексов с протеиназами. Первостепенное значение имеет лейцин в положении 73 (Leu73), в то время как пролин в положении 74 (Pro74) вносит лишь незначительный вклад, и только в случае связывания с CTSB. Важно отметить, что вклад этого петлевого домена в общую энергию связывания достигает своего максимума при ингибировании CTSB [117].

Ингибирование CTSB происходит благодаря тому, что N–концевой участок STFA индуцирует конформационные изменения окклюзионной петли [118], обеспечивая тем самым взаимодействие остальной части ингибирующего клина с щелью активного центра фермента.. Данное взаимодействие стабилизируется системой водородных связей, включающей связи между амидной группой G4 и карбонилем P3 STFA с карбонильным атомом G198 и амидной группой G74 CTSB, а также дополнительной водородной связью между амидом A49 STFA и карбонилем G24 CTSB (Рисунок 10) [119].

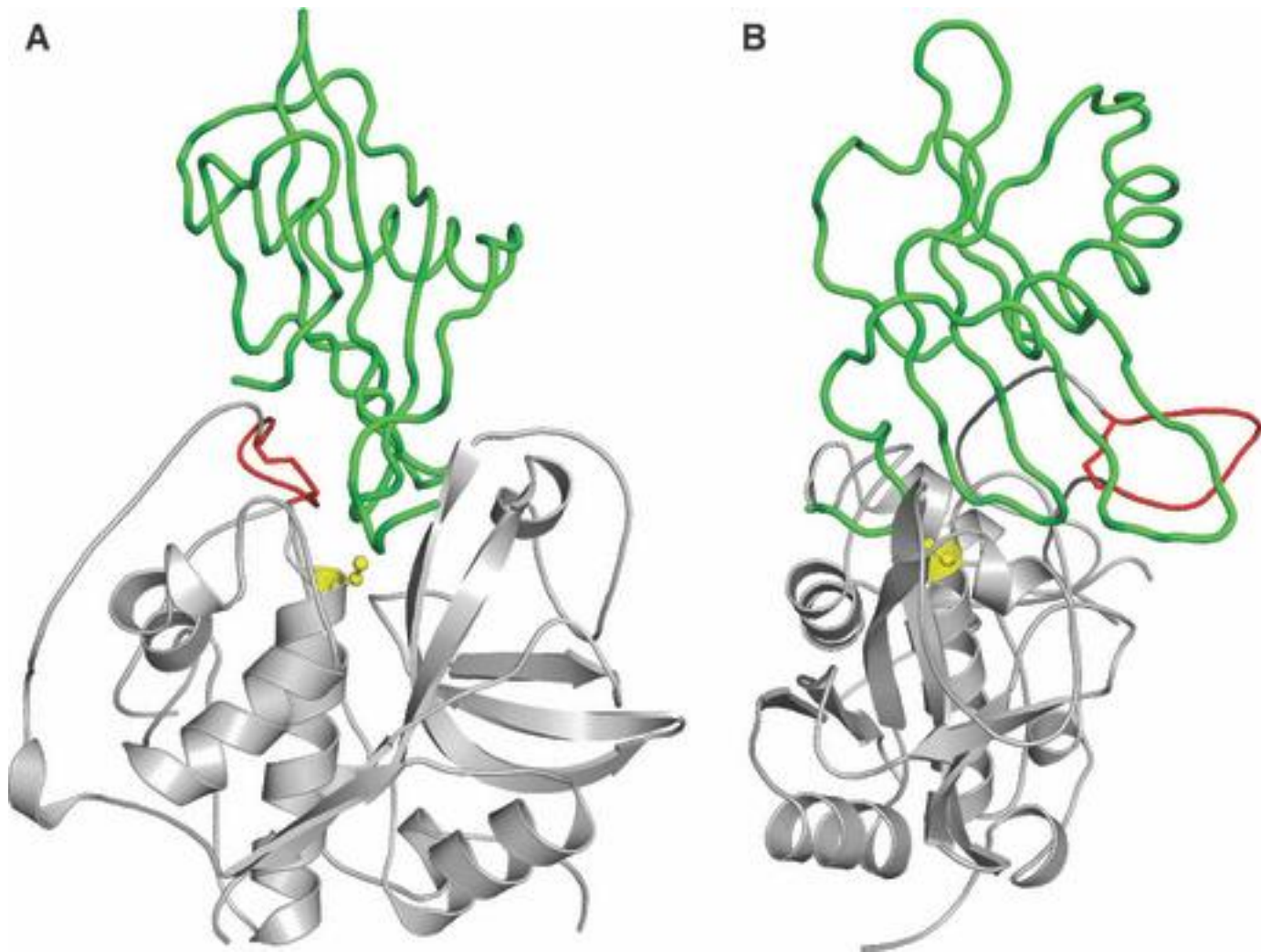


Рисунок 10 — Структура комплекса CTSB –STFA (A) Вид вдоль активного центра. (B) Вид перпендикулярно активному центру. CTSB показан серым цветом, а STFA — зеленым. Каталитический цистеин показан желтым цветом. Клиновидная структура STFA заполняет полость активного центра и смещает окклюзионную петлю («лассо» показано красным) [119]

STFA играет важную роль в подавлении апоптоза, вызванного выходом CTS из лизосом [120]. Также отмечено его положительное влияние на уменьшение скорости эпителиально–мезенхимального перехода, и как следствие, снижение скорости миграции и инвазии раковых клеток [121]. Дисбаланс между протеолитической активностью цистеиновых катепсинов, включая CTSB, и STFA представляет собой ключевой фактор опухолевой прогрессии, способствуя инвазии, ангиогенезу и метастазированию за счет дестабилизации протеолитического гомеостаза [122-126].

На сегодняшний день соотношение CTSB/STFA представляет собой перспективный маркер для диагностики патологических состояний, включая онкологическую трансформацию клеток [126]. Важность определения данного соотношения также может играть ключевую роль в выборе тактики терапии, оценке ее эффективности и прогнозировании ответа на лечение.

1.4 ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРОДУКЦИЮ КАТЕПСИНА В

Несмотря на активное развитие медицины и появление новых терапевтических подходов, химиотерапия по-прежнему остается основным методом лечения для многих онкологических заболеваний. При некоторых формах рака ее применение — будь то перед операцией, после хирургического вмешательства или в комбинации с другими методами лечения — демонстрирует высокую эффективность, обеспечивая пациентам увеличение продолжительности жизни и стойкую ремиссию. Примером успешного использования химиотерапии являются химиолучевое лечение при раке пищевода [127] или адъювантная терапия при злокачественных поражениях толстой кишки [128], где этот метод показал свои преимущества в улучшении показателей выживаемости.

Химиотерапевтические препараты традиционно классифицируются в соответствии с их молекулярными мишенями и механизмами цитотоксического действия. Алкилирующие агенты (например, циклофосфамид) и производные платины (цисплатин, оксалиплатин) индуцируют образование ковалентных связей между нитями ДНК, приводя к формированию меж- и внутрицепочечных сшивок, что нарушает репликацию и транскрипцию, запуская апоптоз [129]. Антиметаболиты (метотрексат, 5-фторурацил) структурно имитируют естественные метаболиты, конкурентно ингибируя ключевые ферменты синтеза пуринов и пиримидинов, тем самым блокируя пролиферацию клеток [130].

Ингибиторы топоизомераз I и II стабилизируют ковалентные комплексы фермента с ДНК, препятствуя религированию разрывов и вызывая накопление летальных повреждений генома [131]. Микротрубочковые ингибиторы (паклитаксел, винкристин) либо стабилизируют, либо деполимеризуют микротрубочки, нарушая сборку митотического веретена и индуцируя митотическую катастрофу [132].

Существуют химиотерапевтические препараты, которые сочетают в себе несколько механизмов действия, что повышает их эффективность и расширяет спектр противоопухолевой активности. Одним из таких препаратов является доксорубицин (Дох) – представитель класса антрациклиновых антибиотиков. Это уникальный химиотерапевтический агент, сочетающий несколько механизмов действия: как ингибитор топоизомеразы II он стабилизирует ДНК–ферментный комплекс, вызывая двунитевые разрывы ДНК, одновременно проявляя свойства ДНК–интеркалирующего агента, что усиливает его цитотоксичность [133,134]. Кроме того, Дох специфически связывает фосфолипид кардиолипид, расположенный во внутренней митохондриальной мембране, что приводит к накоплению препарата в митохондриях, нарушению цепи переноса электронов путем ингибирования комплексов I и II, и, как следствие, генерации АФК [135,136]. Побочным эффектом препарата является кардиотоксичность, обусловленная накоплением в кардиомиоцитах и индукцией окислительного стресса в митохондриях, что приводит к необратимому повреждению сердечной ткани [137]. Несмотря на это, Дох представляет собой один из наиболее эффективных и широко применяемых в клинической онкологии цитостатиков, для лечения широкого спектра злокачественных новообразований [138,139].

1.4.1 Изменение экспрессии катепсина В в ответе на химиотерапевтическое воздействие препаратами группы антрациклиновых антибиотиков

Дох индуцирует изменения экспрессии генов посредством интеркаляции в ДНК и ингибирования топоизомеразы II α [134], что приводит к блокированию

транскрипции и активации пути p53 [140], сопровождающейся up-регуляцией проапоптотических [141] генов и down-регуляцией антиапоптотических факторов [142]. Одновременно генерация АФК модулирует экспрессию генов антиоксидантной защиты и провоспалительных цитокинов [143], в то же время эпигенетические изменения, включая гипометилирование ДНК и модификацию гистонов, способствуют реактивации генов-супрессоров опухолей и репрессии онкогенов [144]. Комплексное воздействие на транскриптом приводит к остановке клеточного цикла и инициации путей клеточной гибели (Рисунок 11) [145].

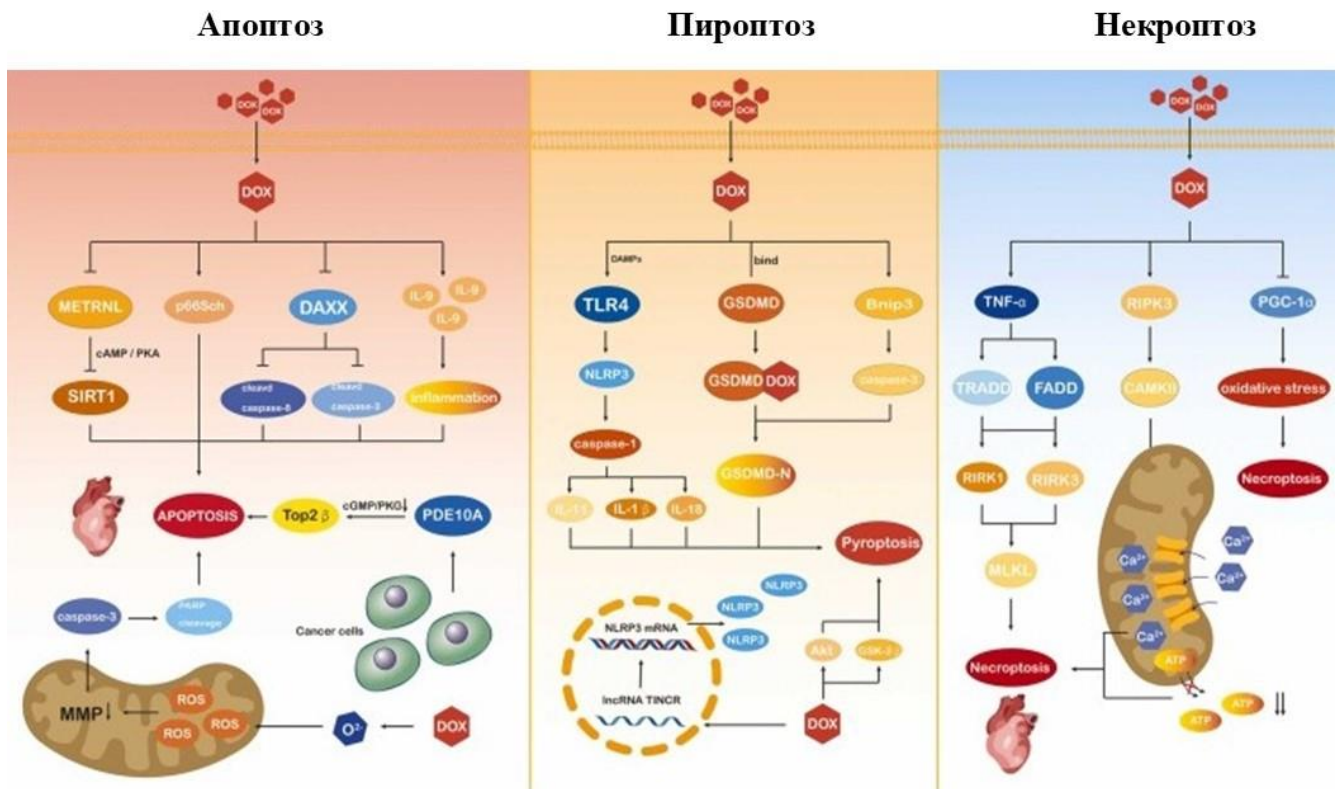


Рисунок 11— Схематическая диаграмма Dox-индуцированных апоптоза, пироптоза и некроптоза. Использованные сокращения: METRN– метеориноподобный белок, SIRT1– сиртуиндеацетилаза, DAXX – белок, ассоциированный с доменом смерти, IL– интерлейкин, TOP-2β – топоизомераза 2β, PDE10A – фосфодиэстераза 10A, PARP– ядерный фермент поли(АДФ–рибоза)полимераза, ROS–активные формы кислорода, MMP– митохондриальный мембранный потенциал, TLR4– толл–подобный рецептор 4, GSDMD– гасдермин D, Brip3– белок 3, взаимодействующий с BCL2, NLRP3– инфламмосома белка NOD–подобного рецептора 3, GSK-3β – гликогенсинтазная киназа 3β, TNF-α – фактор некроза опухоли-альфа, CAMKII– кальций/кальмодулин-зависимый протеинкиназный домен II, RIPK– серин/треонинпротеинкиназа, PGC-1α– коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа, MLKL– смешанный белок, подобный домену киназы, TRADD– белок домена смерти, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли типа 1,

FADD– Fas–ассоциированный белок с доменом смерти, Bcl–2– белок семейства В–клеточной лимфомы–2 [143]

Исследования показывают, что антрациклины способны индуцировать повышение экспрессии катепсина В, что ассоциировано с активацией путей клеточного стресса, апоптоза и аутофагии, а также с усилением инвазивного потенциала злокачественных клеток через протеолитическую деградацию внеклеточного матрикса. Как было сказано ранее, CTSB имеет сайт посадки для NF–κB [88]. Активация NF–κB под действием Dox происходит через генерацию АФК и приводит к увеличению экспрессии CTSB [88]. В контексте противоопухолевой терапии это усиливает апоптоз [146], но также может способствовать воспалению, метастазированию и резистентности [82]. В некоторых случаях наблюдается подавление активности этой цистеиновой протеиназы, что может быть связано с особенностями типа опухоли, дозировкой препарата или активацией альтернативных механизмов клеточной гибели [145,147].

Эти противоречивые данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований для уточнения роли CTSB в ответе на терапию антрациклинами и его потенциала в качестве биомаркера или мишени для комбинированного лечения.

Несмотря на наличие экспериментальных данных, подтверждающих важную роль оси CTSB–STFA в контексте онкологической трансформации, этот механизм остается недостаточно изученным. Хотя известно, что их дисбаланс влияет на процесс онкогенеза, до сих пор неясны многие аспекты их взаимодействия, включая точные молекулярные пути регуляции экспрессии, тканеспецифичные вариации и потенциальные компенсаторные механизмы. Кроме того, остаются открытым вопрос о возможности терапевтической модуляции этой оси без значительных побочных эффектов. Таким образом, несмотря на перспективность изучения CTSB–STFA, требуется дальнейшее углубленное исследование этой системы для разработки эффективных диагностических и терапевтических стратегий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Клеточные культуры

В работе использовались клеточные линии человека – рака почки 769р, рака простаты Du145 и клетки эмбриональной почки Нек293Т. Клеточные линии были приобретены из Американской коллекции типовых культур. Клетки выращивали в рекомендованной среде (DMEM или RPMI), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой и 1% смесью антибиотиков пенициллин–стрептомицин (Gibco, Уолтем, Массачусетс, США) во влажной атмосфере. содержание 5 % CO₂. Клеточные линии проверяли с помощью MycoReport (Евроген, Москва, Россия) и они не имели контаминации.

2.1.2 Растворы, использованные в работе

Таблица 1 — Растворы, используемые для приготовления денатурирующего полиакриамидного геля для анализа белков в глициновой буферной системе (SDS-PAGE)..

Компоненты стока	Количество на 10мл/4мл
Разделяющий гель 12%	
H ₂ O	2,08 мл
Трис–HCl 1,5 М рН 8,8 \	4,13 мл
Акриламид–бисакриламид 30%	4,58 мл
SDS 10%	100 мкл
Персульфат аммония 10%	100 мкл
ТЕМЕД	10 мкл

Продолжение таблицы 1

Концентрирующий гель 4%	
H ₂ O	1,4 мл
Трис–HCl 1,5 М рН 6,8	250 мкл
Акриламид–бисакриламид 30%	300 мкл
SDS 10%	20 мкл
Персульфат аммония 10%	20 мкл
ТЕМЕД	4 мкл

Таблица 2 — Растворы, используемые для приготовления денатурирующего полиакриламидного геля для анализа белков в трициновой буферной системе (SDS-PAGE)..

Компоненты стока	Количество на 10мл/4мл
Разделяющий гель 16%	
H ₂ O	1 мл
Трис–HCl 2,5 М рН 8,8	4,8 мл
Акриламид–бисакриламид 30%	6 мл
Персульфат аммония 3%	200 мкл
ТЕМЕД	20 мкл
Концентрирующий гель 4%	
H ₂ O	1,7 мл
Трис–HCl 2,5 М рН 8,8	330 мкл
Акриламид–бисакриламид 30%	380 мкл
Персульфат аммония 3%	100 мкл
ТЕМЕД	10 мкл

Таблица 3 — Растворы, используемые для приготовления Chip-лизис буфера

Реагент	Конечная концентрация	Количество на 500 мл
HEPES-КОН pH 7,5	50 мМ	1 М HEPES 25 мл
NaCl	140 мМ	5 М NaCl 14 мл
ЭДТА pH 8,0	1 мМ	0,5 М ЭДТА 1 мл
Тритон X-100	1%	Тритон X-100 5 мл
Дезоксихолат натрия	0,1%	Дезоксихолат натрия 0,5 г
SDS	0,1%	SDS 0,5 г

Таблица 4 — Растворы, используемые для приготовления Chip буфера для промывки

Реагент	Конечная концентрация	Количество на 1 л
NaCl	150 мМ	5 М NaCl 30 мл
ЭДТА pH 8,0	2 мМ	0,5 М ЭДТА 4 мл
Тритон X-100	1%	Тритон X-100 10 мл
SDS	0,1%	SDS 1 г
Трис-НСl	20 мМ	1 М Трис-НСl 20 мл

Таблица 5 — Растворы, используемые для приготовления Chip буфера для окончательной промывки

Реагент	Конечная концентрация	Количество
NaCl	500 мМ	5 М NaCl 50 мл
ЭДТА pH 8,0	2 мМ	0,5 М ЭДТА 2 мл
Тритон X-100	1%	Тритон X-100 5 мл
SDS	0,1%	SDS 0,5 г
Трис-НСl	20 мМ	1 М Трис-НСl 10 мл

Таблица 6— Растворы, используемые для приготовления Chip буфера для эллюции

Реагент	Конечная концентрация	Количество
SDS	1%	1 г
NaHCO ₃	100 мМ	0,84 г

2.2 Методы исследования

2.2.1. Получение химически компетентных клеток *Escherichia coli* (XL10 GOLD.)

Компетентные клетки из ранее полученной аликвоты переносили в 5 мл питательной среды LB (Amresco, США) без антибиотика для получения ночной культуры, которую выращивали в течение всей ночи при 37°C на шейкере-инкубаторе (Eppendorf, Германия) с постоянным перемешиванием для получения оптимальной плотности (OD600 = 0,6).

Ночную культуру с необходимой оптической плотностью разводили в конических стеклянных колбах в соотношении 1:100 с питательной средой LB и инкубировали при 37°C до достижения оптической плотности OD600 = 0,4–0,5. Затем клетки охлаждали во льду с постоянным перемешиванием в течение 30 минут, переносили в 50-миллилитровые пробирки и центрифугировали (Eppendorf, Германия) при 4000 об/мин в течение 20 минут. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 40 мл охлажденного раствора 100 мМ CaCl₂ (Amresco, США) и выдерживали во льду 30 минут. Центрифугирование повторяли при 4 000 об/мин в течение 20 минут. В финальном этапе осадок ресуспендировали в 10 мл 100 мМ CaCl₂, добавляли глицерин (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия) до концентрации 10%, распределяли по 100 мкл в охлажденные пробирки, сразу же замораживая в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

2.2.2 Трансформация бактерий *Escherichia coli* методом “теплового шока”

Для проведения трансформации использовали химически компетентные клетки *Escherichia coli* XL10Gold.. Аликвоту объемом 100-200 мкл предварительно размораживали на ледяной бане в течение 15 минут до полного оттаивания. К оттаявшей суспензии клеточной культуры добавляли плазмидную ДНК в количестве, не превышающем 100 нг. После тщательного, но аккуратного перемешивания реакционную смесь выдерживали на льду в течение получаса для обеспечения оптимального взаимодействия плазмиды с клеточной мембраной.

Ключевым этапом процедуры являлся тепловой шок, который осуществляли путем кратковременного (90 секунд) прогрева образца при 42°C с последующим немедленным охлаждением на ледяной бане на протяжении 2-5 минут. Данная процедура способствовала повышению проницаемости клеточной стенки для чужеродной ДНК.

Для восстановления клеточной мембраны и активации механизмов антибиотикорезистентности к трансформированным клеткам добавляли 1 мл предварительно подогретой до 37°C жидкой среды LB. Последующую инкубацию проводили в термостатируемом шейкере при постоянной температуре 37°C в течение 60 минут.

Далее все содержимое пробирки переносили в 5 мл питательной среды LB (Amresco, США) с селективным антибиотиком для получения ночной культуры, которую выращивали в течение всей ночи при 37°C на шейкере-инкубаторе (Eppendorf, Германия) с постоянным перемешиванием для получения оптимальной плотности ($OD_{600} = 0,6$).

После чего плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Midi Prep (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя.

В таблице 7 представлены плазмиды, использованные в работе.

Таблица 7— Плазмиды, использованные в работе

Название плазмиды	Функции	Информация о плазмиде
pcDNA-3.1-CTSB	оверэкспрессия CTSB	Человеческая кДНК CTSB была субклонирована в эукариотический вектор экспрессии pcDNA3.1-CTSB в смысловой ориентации
pcDNA3.1-STFA	оверэкспрессия STFA	была предоставлена доктором Юань Ченом, Universitätsklinikum J07747, Йена, Германия.
pCI-neo-ShCTSB	Подавление CTSB	Последовательности shRNA, используемая для подавления, CTSB: F-5'-TGAATTCCCAACACGTCACCGGAGAGATAAGATСТААТ-3', R-5'-ATAGTCGACCCAACACGTCACCGGAGAGATTAGАТСТТАТ-3',
pcDNA-3.1	Пустая плаزمида	ThermoFisher, Waltham, MA, США
pSecTag2B-mutCTSB C108A	оверэкспрессия неактивного CTSB	Для создания неактивного варианта CTSB были введены мутации в последовательность активного сайта. Цистеин в позиции 108 был заменен на аланин, что устранило ферментативную активность CTSB. Эта последовательность затем была субклонирована в вектор pSecTag2B
pCI-neo-ShSTFA	Подавление STFA	Последовательности shRNA, используемая для подавления, STFA:F-5'-TGAATTCAGGTACGAGCAGGTGATAATAAGATCTТАТТ-3', R-5'-ATAGTCGACAGGTACGAGCAGGTGATAATAAGATCTТАТТ-3'.

2.2.3 Трансфекция

Клеточные линии человека (рака почки 769p, рака простаты Du145 и клетки эмбриональной почки Нек293Т) выращивали до 70% конfluenceности после чего трансфецировали плазмидами (Таблица 7). Трансфекции проводились с использованием реактива GenJect в соответствии с протоколом производителя (Molekta, Москва, Россия). Все эксперименты проводились через 48 часов после трансфекции

2.2.4 Выделение РНК и ОТ–ПЦР

Для оценки уровней экспрессии целевых генов, тотальную РНК экстрагировали из клеток с использованием набора PureLink™ RNA Kit (Invitrogen, Waltham, Массачусетс, США) в соответствии с протоколом производителя. Далее комплементарную ДНК (кДНК) транскрибировали с мРНК с помощью набора кДНК MMLV («Евроген», Москва, Россия). Количественную оценку экспрессии генов человека проводили методом RT–qPCR с использованием кДНК в качестве матриц в реакциях, содержащих ДНК–специфичный краситель 5X qPCRmix–HS («Евроген», Москва, Россия) и специфические олигонуклеотидные праймеры. В качестве референсного гена был выбран ген глицеральдегид–3–фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) (Таблица 8)..

Таблица 8— Последовательности ген-специфичных праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>CTSB</i>	TTCTTGCGACTCTGGGACTTC	TGACGAGGATGACAGGGAACT A
<i>STFA</i>	TCTTCCCGGACAAAATGAGG	GACTCAGTAGCCAGTTGAAGG
<i>GAPD</i> <i>H</i>	CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTGTT CG	ACCAGGCGCCCAATACGACCA AAT

Реакции ПЦР проводили в трех технических повторностях при следующих условиях: 95 °C/30 с, 40 циклов по 95 °C/5 с, 60 °C/15 с и 72 °C/10 с в системе ПЦР в реальном времени StepOne. (Applied Biosystems, Уолтем, Массачусетс, США). Для каждого образца было проведено 3 биологических повтора. Уровни экспрессии оценивали с помощью метода ddCT.

2.2.5 Электрофорез белков в денатурирующем полиакриламидном геле и вестерн блот

После трансфекции клетки дважды промывали холодным PBS, собирали при помощи скребка и ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1% Triton X-100 и 1× коктейль ингибиторов протеаз (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс, США). Концентрации белка в клеточных лизатах определяли количественно методом Брэдфорда, с использованием реактива Bradford Assay (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США).

Затем 50 мкг образцов разделяли на 12% Tris-глициновых гелях для детекции CTSB и 16% Tris-глициновых гелях для детекции STFA, после переносили на

PVDF мембраны (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США). Экспрессия CTSB и STFA определялась с использованием специфических кроличьих поликлональных первичных антител для CTSB (Cloud-Clone Corp., Ухань, Китай). и STFA (Affinity Biosciences, Цинциннати, США). После промывки мембраны инкубировали с вторичными антителами козы против кролика IgG (HRP) (Abcam, Великобритания) в 5% обезжиренном молоке с TBST.

Сигналы визуализировали с помощью усилителя хемилюминесценции ECL (Bio-Rad, США). GAPDH использовали в качестве контроля загрузки образца, обнаружение проводили с помощью первичных поликлональных антител кролика анти-GAPDH (Cloud-Clone Corp., Ухань, Китай) и вторичных антител коза-антикролик IgG (HRP) (Abcam, Великобритания).

Для каждого образца было проведено 3 биологических повтора.

2.2.6 Иммуноцитохимическое окрашивание

Через 48 часов после трансфекции, клетки промывали PBS, фиксировали 4% PFA/PBS в течение 15 минут и пермеабелизировали 0,25% Triton® X-100/PBS в течение 10 минут.

Для блокировки неспецифических участков связывания использовали 2% BSA/PBS. Клетки инкубировали в течение 4 часов с первичными антителами: кроличьими поликлональными анти-CTSB (Cloud-Clone Corp., Ухань, Китай). После промывали клетки PBS, затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с вторичными антителами, меченными флуорофором. Для обнаружения CTSB использовали вторичные антителами, меченные TexasRed (FineTest Corp. Wuhan Fine Biotech Co., Ltd). Далее промывали клетки PBS и приступали к окрашиванию кроличьими поликлональными анти-STFA (Affinity Biosciences, Цинциннати, США). Окрашивание проводили также в течение 4 часов

при комнатной температуре. После следовала отмывка клеток PBS и инкубация со вторичными антителами. STFA определяли с помощью вторичных антител, меченых FITC (Cloud-Clone Corp., Ухань, Китай). Ядра окрашивали DAPI (Bio-Rad, США).

Конфокальные флуоресцентные изображения получали с помощью инвертированного сканирующего конфокального микроскопа (LSM 980 Airyscan на Axio Observer 7, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Йена, Германия), оснащенного моторизованным пьезоэлементом и объективами с масляной иммерсией 63× (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Йена, Германия).

Для каждого образца было проведено 3 биологических повтора, для каждого повтора были получены изображения с 3 различных областей препарата. Анализ интенсивности флуоресценции проводили на изображениях с увеличением 20x в программе CellProfiler. Обработка данных после конфокальной микроскопии для изображений 63x проводилась в программе Fiji с использованием плагина e2fig.

2.2.7 Анализ жизнеспособности клеток с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид

Оценку жизнеспособности клеточной линии 769p под действием свободного доксорубина в концентрациях 1,75 мкг/мл (x), 8,75 мкг/мл (5x), 17,5 мкг/мл (10x), 26,25 мкг/мл (15x) проводили по истечению 20 часов инкубации методом МТТ-теста.

Клетки высевали в 96-луночный планшет (3×10^4 клеток/лунку в 200 мкл DMEM), инкубировали с препаратом, после лунки промывали PBS, затем добавляли 100 μ l среды на лунку с конечной концентрацией разведённого тетразолиевого красителя МТТ 1 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 1 часа при 37°C. По истечению часа лунки трижды промывали PBS, и после этого добавляли

100 μ l диметилсульфоксида (DMSO) для растворения кристаллов формазана. В течение 15 минут проводили перемешивания планшета на шейкере при 300 об/мин, а затем анализировали оптическую плотность при 570 нм на микропланшетном анализаторе (CLARIOstar Plus, Ортенберг, Германия).

Жизнеспособность рассчитывали относительно необработанного контроля. Все эксперименты проводились в 3 биологических и 6 технических повторностях.

2.2.8 Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

Клетки рака почки человека 769p, через 48 часов после трансфекции плазмидами для сайленсинга целевых генов – ShCTSB и ShSTFA, промывали PBS и фиксировали 1% PFA/PBS в течение 15 минут при температуре 37°C. Фиксацию останавливали добавлением 1:20 2,5 М раствора глицина при 37°C 5 минут. После чего клетки снимали с поверхности чашек при помощи скребка и осаждали, центрифугируя при 1000 \times g в течение 5 минут при 4°C. Осадок трижды промывали холодным PBS, не меняю условий осаждения клеток. По окончании промывок, PBS заменяли на ChIP буфер для лизиса со свежим коктейлем ингибиторов протеаз.

Для достижения фрагментов 200-600 пар оснований, образцы подвергались ультразвуковой обработке на приборе QSONICA q2000 (QSONICA, Коннектикут, США) и состояла из 25 циклов (10 сек включения, 10 сек выключения, мощность 25%, на льду). Проверку фрагментации осуществляли в 1% агарозном геле с использованием бромистого этидия.

Для проведения иммунопреципитации, к 1 мл образца добавляли 2 мкг первичных антител к гистону H3 (Affinity Biosciences, Цинциннати, США) и перемешивали в течение ночи при 4°C. После чего добавляли заблокированные и отмытые магнитные частицы SileksMag-Protein A с белком A (Sileks, Москва, Россия) и инкубировали два часа при 4°C. После шарики трижды промывали

буфером для промывки, после промывали буфером для финальной промывки добавляли элюирующий буфер и инкубировали 30 минут при 65°C, затем добавляли NaCl и оставляли на ночь в тех же условиях. Далее образец очищали от магнитных шариков и проводили вестерн-блот анализ с последующей детекцией хемилюминесценции.

2.3. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили в GrafPad 9.5 для Windows, (программное обеспечение GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США). Для сравнения независимых групп использовались ANOVA. Результаты анализа относительной экспрессии представлены как среднее \pm стандартное отклонение для нормального распределения. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Гены катепсина *B* и *стефина A* ко-экспрессируются в нетрансформированных и опухолевых клетках

Установлено, что дисбаланс *CTSB* в клетках связан с неблагоприятным прогнозом при различных формах злокачественных новообразований. Существует предположение о ключевой роли данного протеолитического фермента в процессах онкогенной трансформации и опухолевой прогрессии. В подтверждение данной гипотезы, результаты ряда экспериментальных исследований демонстрируют, что искусственное подавление экспрессии *CTSB* в клеточных моделях приводит к достоверному снижению их инвазивного потенциала, что, в свою очередь, коррелирует с уменьшением способности к метастазированию [43,148]. Именно поэтому он считается потенциальной терапевтической мишенью.

Ингибиторы *CTSB* были выделены из различных источников, таких как бактерии, морские губки, растения, а также получены путем органического синтеза в лабораториях [101-103]. Однако часть из них показала низкую терапевтическую эффективность [149]. В связи с этим, перспективной альтернативной стратегией таргетной терапии является модуляция эндогенной активности *CTSB*, основанная на углубленном изучении молекулярных механизмов регуляции его экспрессии и функций [150]. Мы сфокусировались на изучение взаимодействия *CTSB* с его естественным ингибитором – *STFA*.

На первом этапе работы была изучена взаимосвязь между экспрессией генов *CTSB* и *STFA* на транскрипционном уровне. Для проведения анализа использовали модель транзientной экспрессии: клетки трансфицировали плазмидными конструкциями *pCTSB* и *pSTFA*, кодирующими соответствующие целевые гены (Рисунки 10-11).

Ключевым результатом стало отсутствие статистически значимого увеличения уровня транскрипта гена *CTSB* в линии эмбриональных клеток почки человека Hek293T после трансфекции конструкцией pCTSB. Полученные данные позволяют предположить, что в нетрансформированных клетках существуют более строгие механизмы посттранскрипционного и/или трансляционного контроля экспрессии *CTSB*, обеспечивающие поддержание нормального фенотипа. Наблюдаемый феномен может служить свидетельством нарушения подобных регуляторных механизмов в злокачественно трансформированных клетках. Что касается *STFA*, то транзистентная трансфекция плазмидой pSTFA не приводила к достоверным изменениям в количестве мРНК *CTSB* (Рисунок 12).

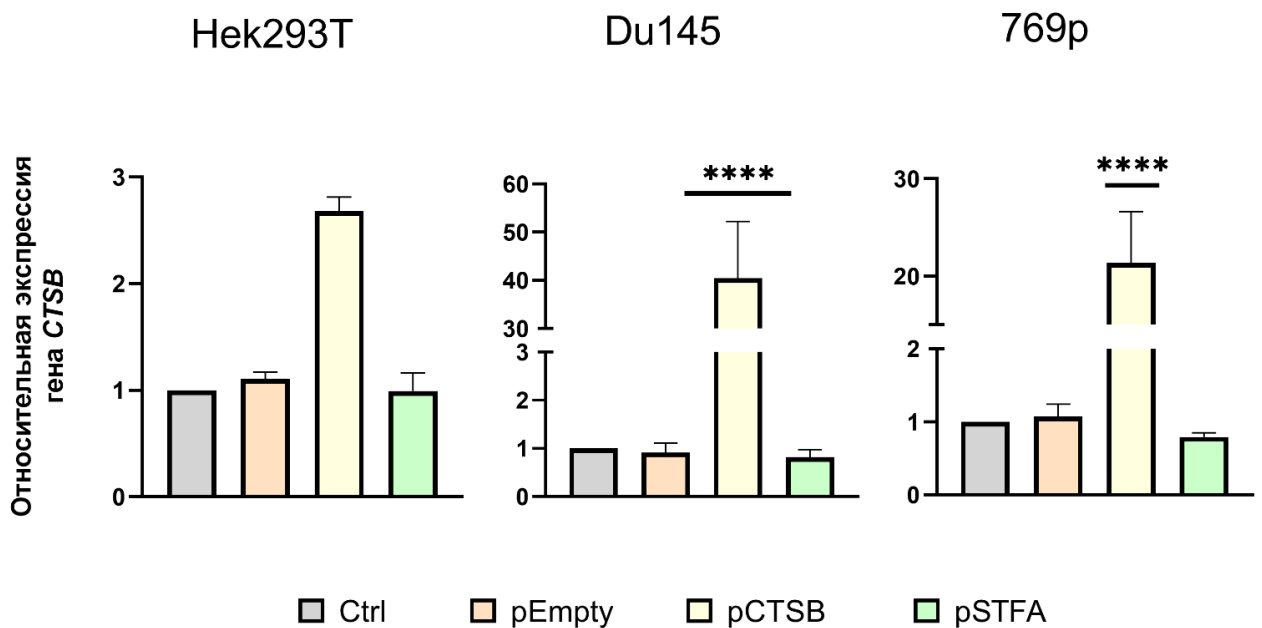


Рисунок 12— Изменение экспрессии гена *CTSB*: экспрессия мРНК *CTSB* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB и pSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Как показано на рисунке 9, после трансфекции плазмидой, содержащей ген функционального *CTSB*, уровень мРНК *STFA* снижается во всех клеточных линиях. Ускорение деградации транскрипта может быть опосредовано различными

механизмами. Классический путь деградации через белки типа тристетрапролинов возможен при наличии AU-богатых элементов. Однако не все транскрипты имеют их в составе своей 3'-UTR. Отсутствие их у *STFA* исключает этот механизм [151]. В базе TargetScanHuma [93] нет предсказанных miR-RNA для *STFA*, что снижает вероятность miR-RNA зависимой деградации. Однако в клетке существуют и другие механизмы ускорения деградации транскриптов, включающие в себя как наличие регуляторных элементов, так и альтернативные пути. Также это может означать не только деградацию транскрипта, но и увеличение скорости трансляции мРНК *STFA* в функциональный полипептид. При этом трансфекция плазмой pSTFA всегда приводила к достоверному увеличению транскрипта *STFA* (Рисунок 13).

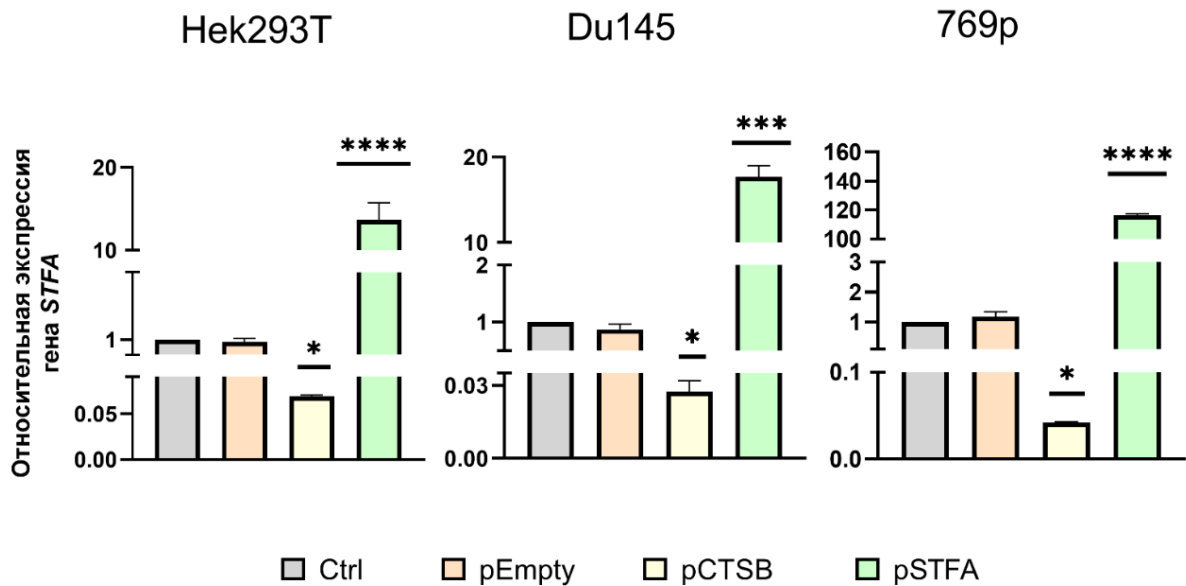


Рисунок 13— Изменение экспрессии гена *STFA*: экспрессия мРНК *STFA* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB и pSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

На следующем этапе работы была проведена оценка корреляции на уровне мРНК после нокдауна целевых генов. Для ингибирования экспрессии использовали плазмидные конструкции, экспрессирующие шпилечные РНК (shRNA) для

направленного сайленсинга генов – pShCTSB и pShSTFA соответственно (Рисунки 14-15).

Трансфекция конструкцией pShCTSB привела к ожидаемому снижению уровня мРНК гена *CTSB* во всех протестированных клеточных линиях. Однако результаты трансфекции pShSTFA оказались не столь однозначными. Важно отметить, что в линии нетрансформированных клеток Hek293T, в отличие от злокачественных клеточных линий, сайленсинг *STFA* не вызывал увеличения количества транскрипта *CTSB*. Данное наблюдение является дополнительным свидетельством в пользу гипотезы о существовании фундаментальных различий в механизмах регуляции экспрессии этой цистеиновой протеиназы между нормальными и опухолевыми клеткам (Рисунок 14).

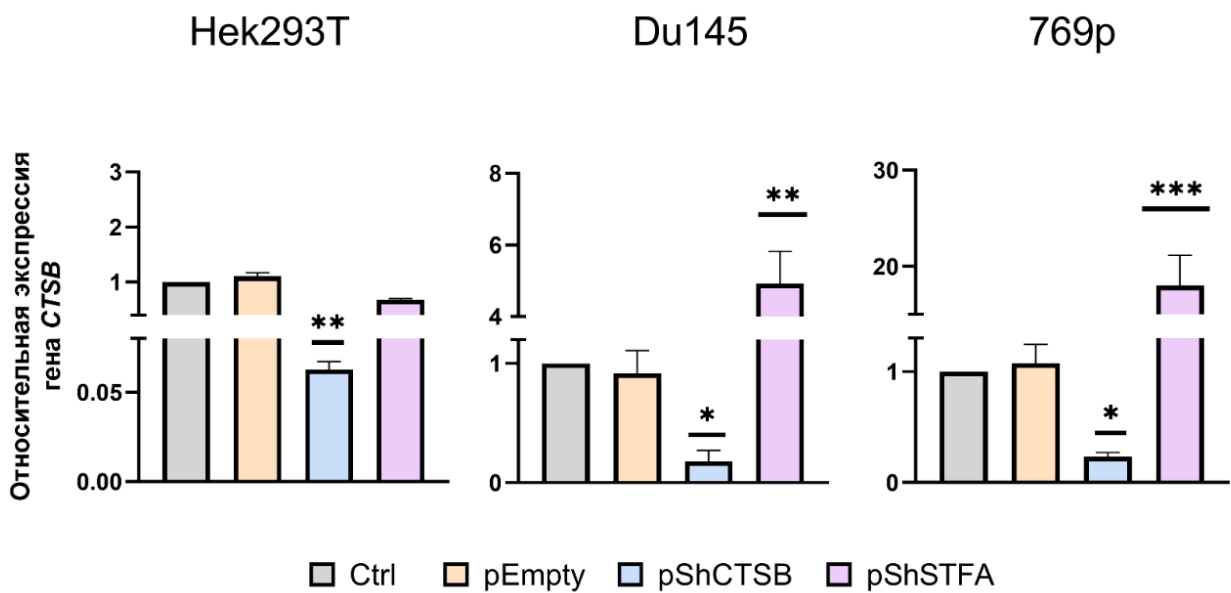


Рисунок 14— Изменение экспрессии гена *CTSB*: экспрессия мРНК *CTSB* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Проведенный анализ эффективности сайленсинга показал, что трансфекция плазмидной конструкцией pShSTFA приводила к значительному снижению уровня мРНК целевого гена *STFA* во всех использованных в работе клеточных линиях. Наиболее значимым результатом явилось обнаружение достоверного подавления уровня мРНК гена *STFA* на фоне нокдауна гена *CTSB*. Полученные данные указывают на существование ранее не описанного регуляторного взаимодействия между экспрессией данных генов. Результаты позволяют предположить наличие механизмов ко-регуляции или каскадных сигнальных путей, через которые *CTSB* может опосредованно влиять на транскрипционную активность гена *STFA*. (Рисунок 15).

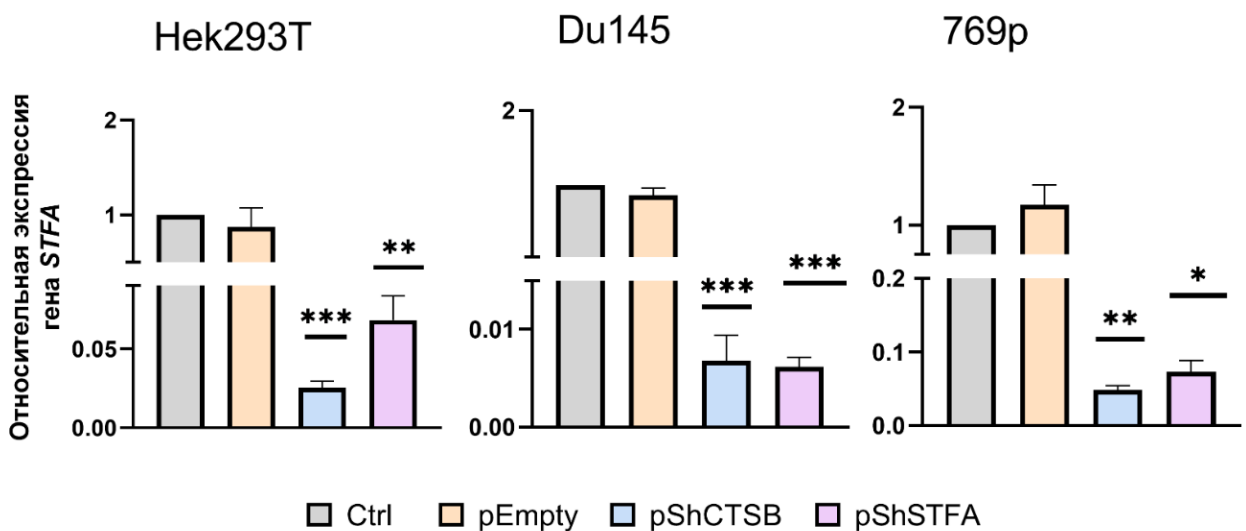


Рисунок 15— Изменение экспрессии гена *STFA*: экспрессия мРНК *STFA* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плаزمидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Итогом данной главы явилось выявление закономерности во взаимосвязи между экспрессией протеазы *CTSB* и её эндогенного ингибитора *STFA*. Была установлена статистически значимая корреляция между уровнями их мРНК, что

свидетельствует о вероятном существовании сложной системы их ко-регуляции на транскрипционном уровне. Особый научный интерес представляет обнаруженное различие в механизмах контроля экспрессии *CTSB* между нетрансформированными и злокачественными клетками. Полученные данные указывают на вероятную дерегуляцию системы контроля протеолитической активности в раковых клетках, что может вносить вклад в формирование их инвазивного и метастатического потенциала и иметь ключевое значение для понимания молекулярных основ опухолевой прогрессии.

3.2 Профили экспрессии белка катепсина В и стефина А демонстрируют положительную корреляцию

Поскольку уровень мРНК не всегда коррелирует с уровнем функционального белка, анализ транскриптома не позволяет в полной мере охарактеризовать клеточные процессы. Для получения более комплексной картины в современных исследованиях применяется детекция экспрессии белков. Как показал протеомный анализ, уровень белка *CTSB* был статистически значимо повышен в образцах рака щитовидной железы по сравнению с нормальной тканью [152], что согласуется с опубликованными данными для рака почки человека [17]. Таким образом, логическим продолжением работы явился анализ корреляции между уровнями соответствующих функциональных белков.

Мы провели аналогичную трансфекцию плазмидами *pCTSB* и *pSTFA*. (Рисунки 16-17). Как показано на рисунке 16, трансфекция конструкцией *pCTSB* приводила к различным результатам в эмбриональных и злокачественных клетках. В нетрансформированных клетках линии Нек293Т введение данной конструкции не вызывало достоверного увеличения уровня функционального белка *CTSB*. При этом во всех исследованных раковых клеточных линиях наблюдалась статистически значимая оверэкспрессия данной протеиназы. Эти данные

согласуются с литературными сведениями о том, что гиперэкспрессия CTSB является характерным признаком многих типов злокачественных новообразований. [17,45].

Во всех клеточных линиях наблюдается достоверное снижение содержания белка CTSB после трансфекции pSTFA (Рисунок 16), что согласуется с моделью взаимодействия «белок–ингибитор», описанной в литературе [16].

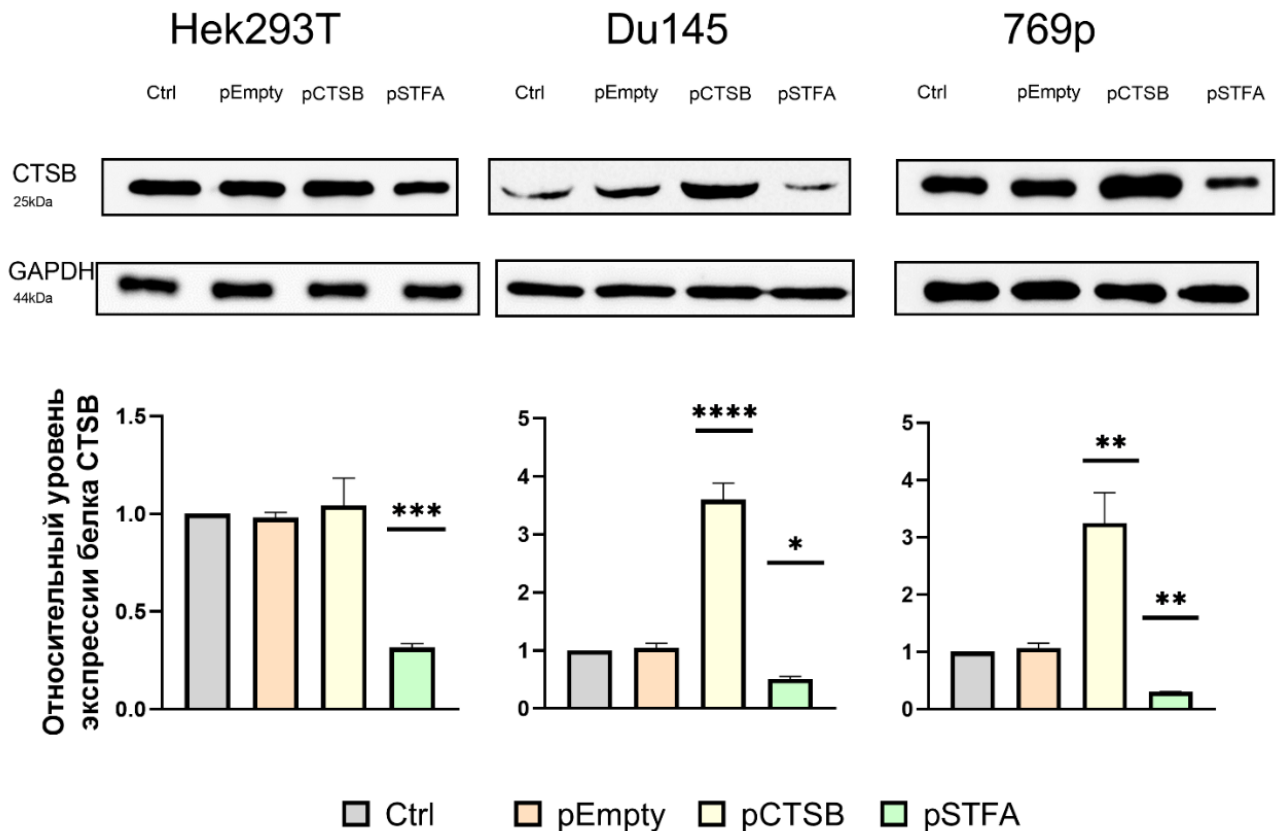


Рисунок 16— Изменение экспрессии белка CTSB: экспрессия CTSB в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB и pSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Мы также оценили экспрессию STFA (Рисунок 17). Для всех исследуемых клеточных линий было характерно увеличение экспрессии STFA в обоих случаях.

Примечательно, что в клетках Нек293Т, где трансфекция рСТSB не приводила к детектируемому накоплению белка СТSB (Рисунок 16), уровень STFА также повышался. Мы предполагаем, что наблюдаемый феномен может быть описан в рамках модели клеточного гомеостаза, где потенциальная угроза нарушения протеолитического баланса компенсируется усилением синтеза эндогенного регулятора по принципу отрицательной обратной связи. Такие механизмы мало распространены в природе, однако в литературе имеются примеры таких петель обратной связи в организме человека [153,154].

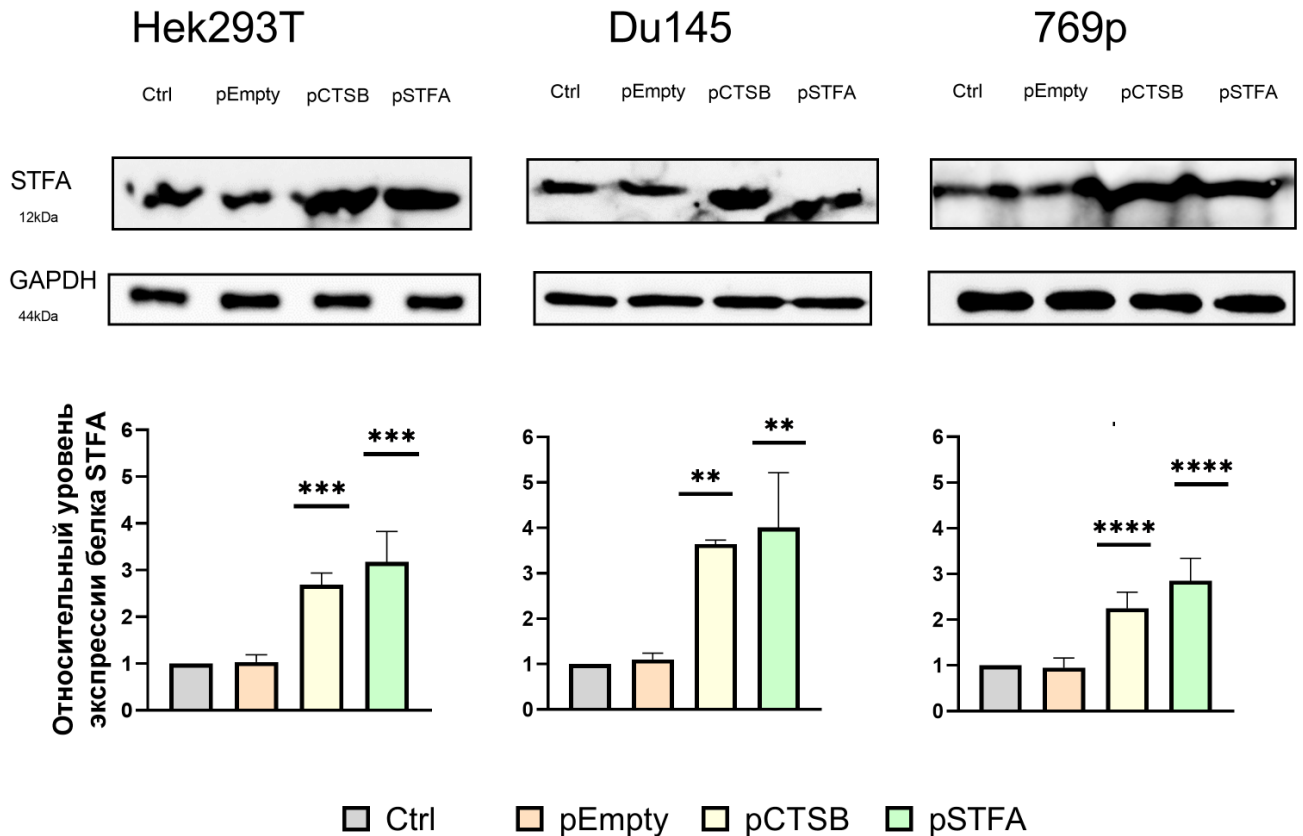


Рисунок 17— Изменение экспрессии белка STFА: экспрессия STFА в клеточной линии эмбриональной почки человека Нек293Т, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769р через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (рСТSB и рSTFА). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Для выяснения функциональной роли исследуемых генов был применен метод нокдауна их экспрессии с использованием конструкций, кодирующих малые шпилечные РНК (short hairpin RNA, shRNA). (Рисунки 18-19)..

Трансфекция плазмидой pShCTSB подтвердила специфичность системы нокдауна, вызвав значительное снижение уровня содержания белка CTSB во всех клеточных линиях. При этом сайленсинг гена *STFA* (pShSTFA) оказал различный эффект на экспрессию CTSB. В эмбриональных клетках почки человека Hek293T значимых изменений экспрессии CTSB зафиксировано не было. Напротив, во всех раковых клеточных линиях нокдаун *STFA* приводил к статистически значимому увеличению экспрессии CTSB (Рисунок 18).

Полученные результаты подчеркивают двойственную биологическую роль регуляторной оси CTSB/STFA. С одной стороны, они подтверждают критическую значимость белка STFA в качестве физиологического ингибитора CTSB. С другой стороны, данные свидетельствуют о фундаментальной важности поддержания низкого базального уровня экспрессии CTSB для сохранения нормального фенотипа нетрансформированных клеток, что согласуется с его вкладом в формирование онкогенного потенциала. Наблюдаемое отсутствие наработки CTSB в клетках Hek293T при трансфекции pCTSB, несмотря на индукцию экспрессии STFA, позволяет предположить существование в данной клеточной линии дополнительных механизмов подавления активности этой протеиназы. Поскольку STFA является не единственным эндогенным ингибитором CTSB, можно допустить, что в нераковых клетках может активироваться альтернативная или комплексная система негативной регуляции.

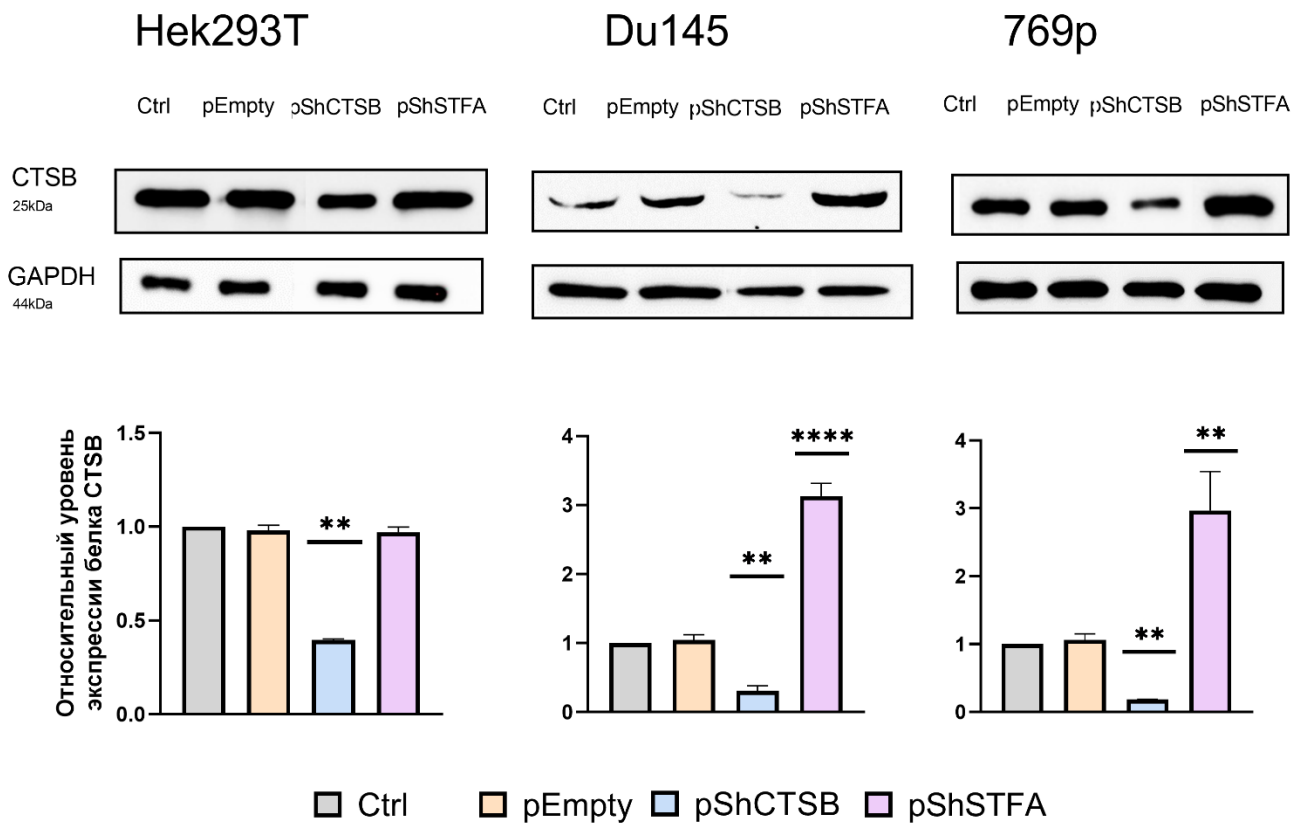


Рисунок 18— Изменение экспрессии белка CTBS: экспрессия CTBS в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,001$

Результаты анализа экспрессии STFA представлены на рисунке 19. Наряду с ожидаемым снижением его уровня при нокдауне гена *STFA*, было обнаружено статистически значимое уменьшение содержания STFA при нокдауне гена *CTSB*. Таким образом, подавление экспрессии мишени приводило к сопутствующему снижению уровня её ингибитора. Это противоречит парадигме автономной регуляции компонентов протеолитической системы и, напротив, подтверждает ранее предложенную гипотезу о взаимной регуляции STFA и CTBS, вероятно, реализуемой через механизм отрицательной обратной связи.

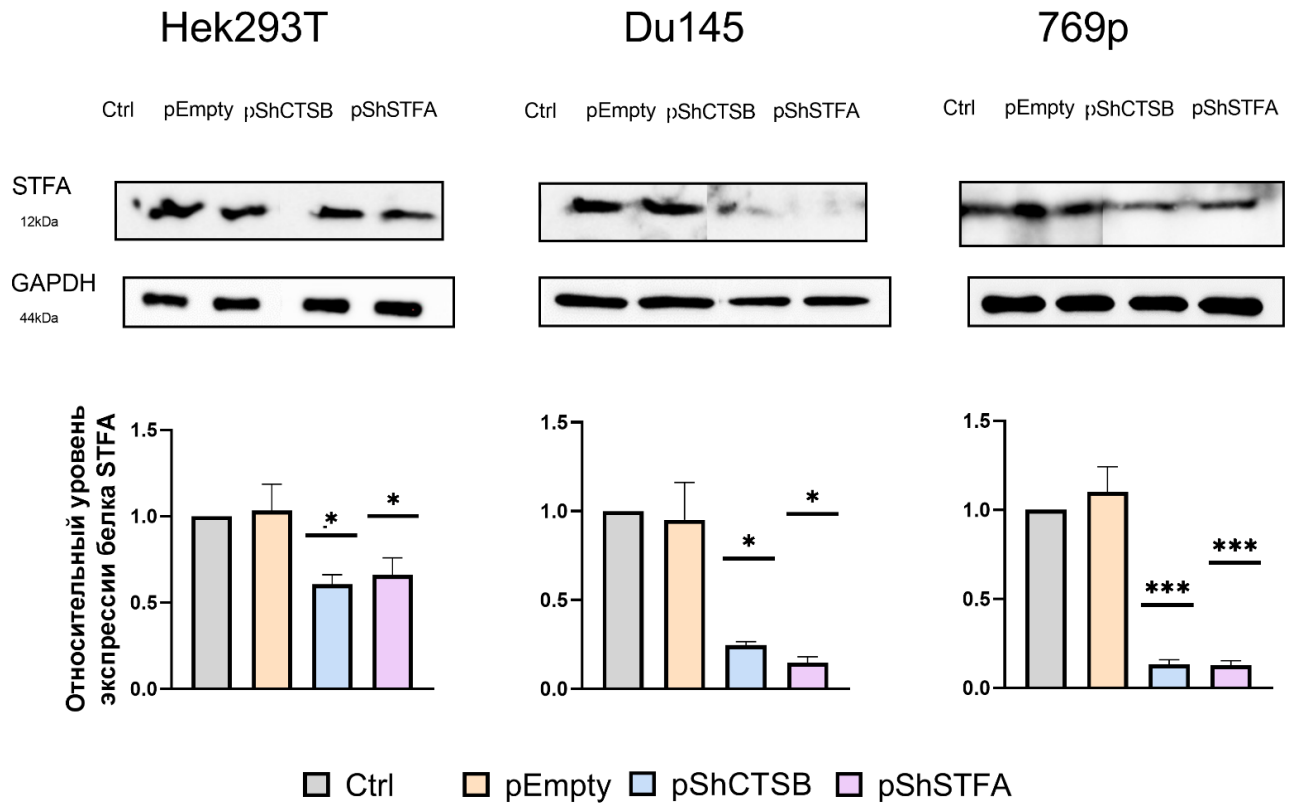


Рисунок 19— Изменение экспрессии белка STFA: экспрессия STFA в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Данный раздел был посвящен исследованию взаимосвязи между уровнями экспрессии CTSB и его ингибитора STFA. В результате исследования было установлено, что повышение уровня экспрессии CTSB сопряжено с увеличением содержания STFA, тогда как увеличение экспрессии STFA, напротив, приводит к снижению количества CTSB. Особый интерес представляет обнаружение более жесткого контроля над продукцией функционально активного CTSB в эмбриональных клеточных линиях (на модели Hek293T) по сравнению с исследованными раковыми линиями. Этот вывод, подтвержденный данными количественной ПЦР, указывает на существование клеточно-специфических механизмов регуляции протеолитического баланса.

3.3 Ядерно-цитоплазматическая колокализация катепсина В и стефина А

Согласно современным представлениям, внеклеточная секреция CTSB способствует прогрессированию патологических процессов. [155]. В то же время изменение его внутриклеточной локализации, например, переход из лизосом в цитозоль, индуцирует активацию проапоптотических каскадов и гибель клеток [156]. Поэтому пространственное распределение CTSB имеет важное значение для жизнеспособности клетки. Однако в литературе практически отсутствует информация о локализации STFA, а также о колокации двух белков в различных компартментах.

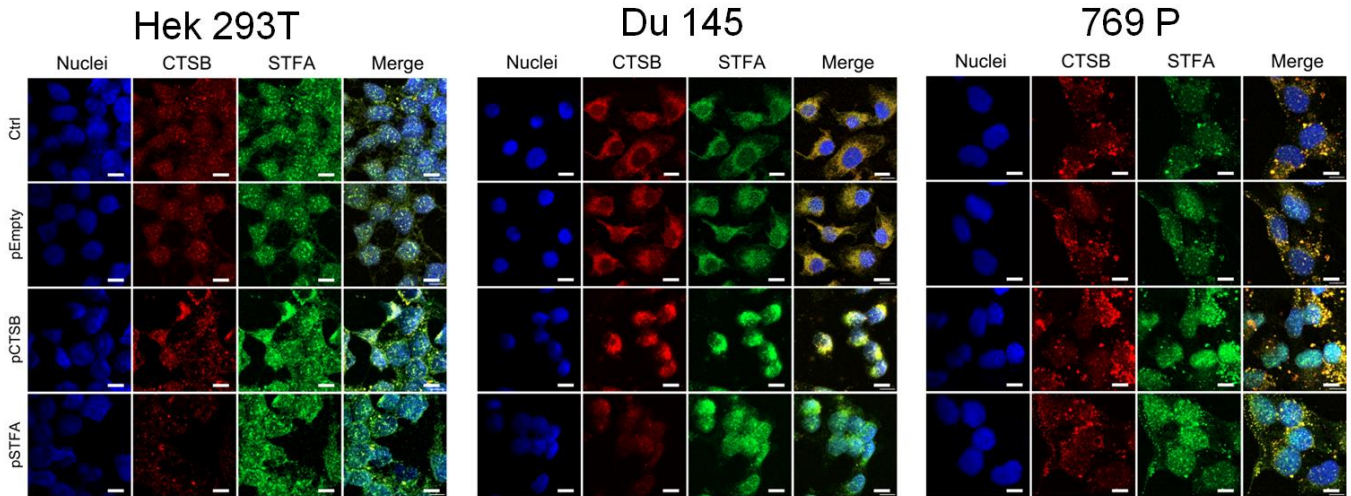
Соответственно, одной из задач исследования являлся анализ субклеточной локализации целевых белков в цитоплазматическом и ядерном компартментах. Для решения этой задачи клетки фиксировали, обрабатывали специфическими первичными и мечеными флуорохромами вторичными антителами и проводили конфокальную микроскопию. На полученных изображениях выполняли количественную оценку распределения белков путем измерения относительной интенсивности флуоресценции в соответствующих регионах интереса, которая в данной методике служит показателем относительного количества целевого антигена. (Рисунки 20-21).

Хочется отметить, что для всех клеточных линий характерна как цитоплазматическая, так и ядерная локализация исследуемых белков. В контрольных образцах интенсивность флуоресценции ядерного сигнала ниже по сравнению с цитоплазматическим. Кроме того, базальный уровень экспрессии CTSB в клеточной линии Нек293Т достоверно ниже, чем в исследуемых раковых клеточных линиях, что подтверждается данными из открытой базы данных GEPiA [157], а также экспериментально [158]. Повышенная экспрессия CTSB в раковых клеточных линиях, по сравнению со здоровыми, также подтверждена экспериментально и клинически [17,45,159].

Как показано на рисунке 20, в случае с pCTSB в линии нераковых клеток Nek293T не наблюдается существенного изменения локализации CTSB, уровень интенсивности сигнала не отличается от контрольных клеток. Однако в раковых клеточных линиях как в цитоплазме, так и ядре наблюдается увеличение количества CTSB более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой. При этом сохраняется тенденция более сильного ядерного сигнала. В случае с pSTFA мы наблюдаем достоверное снижение интенсивности сигнала в красном канале CTSB исследуемых клеточных линий. Интенсивность сигнала при этом не имеет статистических различий между компартментами.

Изменение локализации белка STFA представлено на рисунке 20. Количественный анализ показал, что во всех исследуемых клеточных линиях интенсивность флуоресценции в канале, соответствующем STFA (зеленый канал), достоверно возросла по сравнению с контролем. Примечательно, что данный эффект не зависел от типа использованной для трансфекции плазмиды (pCTSB или pSTFA), поскольку статистически значимых различий между этими экспериментальными группами выявлено не было. Рост сигнала от STFA наблюдался равномерно как в ядерном, так и в цитоплазматическом компартментах клетки.

A



Б

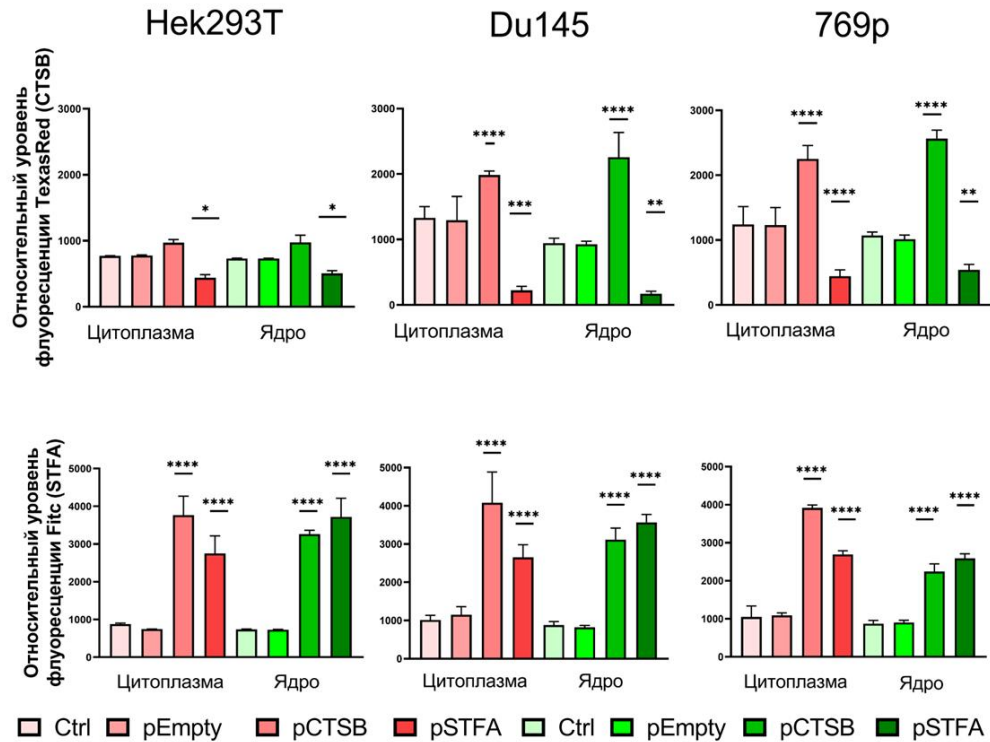
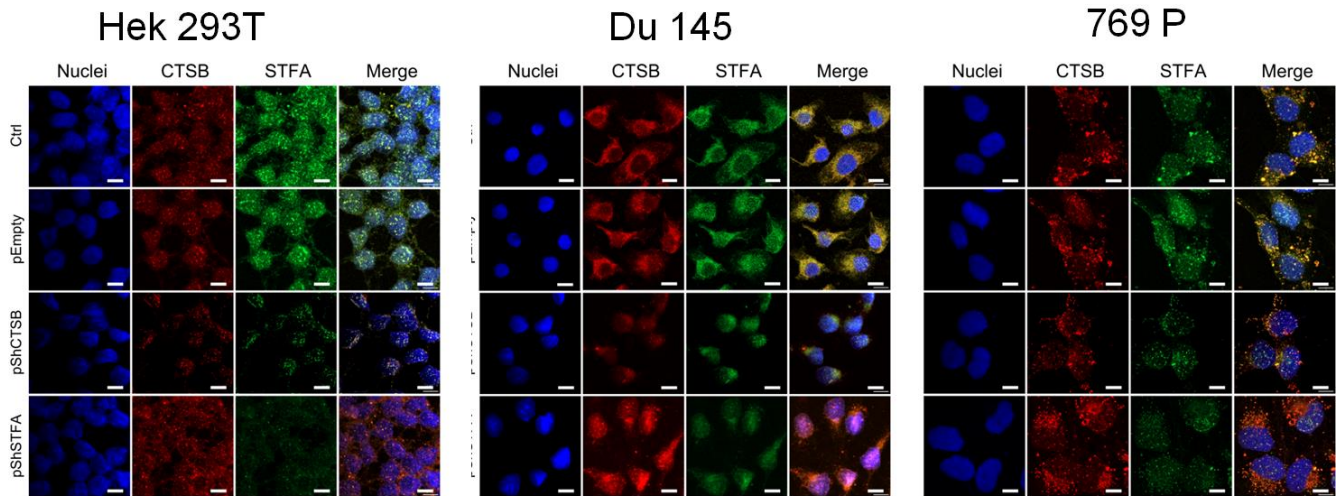


Рисунок 20— Изменение локализации CTSB и STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB и pSTFA): А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно меченными вторичными антителами. В красном канале детектировали TexasRed (CTSB), в зеленом канале— Fitc (STFA), в синем канале представлены ядра, окрашенные Dapi. Колокализация отмечена желтым при наложении каналов в Merge. Масштаб линейки – 10 мкм. Б) Относительный уровень флуоресценции TexasRed (CTSB) и Fitc (STFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Аналогичный анализ субклеточной локализации был проведен в экспериментах по нокдауну целевых генов. На рисунке 21 представлены данные о распределении белка *CTSB* в исследуемых клеточных линиях после трансфекции плазмидами, экспрессирующими *shRNA*. Транзиентная трансфекция конструкцией *pShCTSB*, направленной на нокдаун *CTSB*, приводила к равномерному снижению уровня этого белка как в цитоплазме, так и в ядре во всех проанализированных клеточных линиях. В отличие от этого, нокдаун гена *STFA* с помощью плазмиды *pShSTFA* не вызывал изменений в уровне белка *CTSB* лишь в нераковых клетках линии *Hek293T*. В то же время во всех исследованных раковых клеточных линиях подавление экспрессии *STFA* сопровождалось достоверным увеличением интенсивности флуоресценции, соответствующей *CTSB*, как в цитоплазматическом, так и в ядерном компартментах.

Изменения локализации *STFA* представлены на рисунке 21. Для всех исследуемых клеточных линий транзиентная трансфекция плазмидой *pShCTSB* приводила к равномерному снижению сигнала как в цитоплазме, так и в ядре исследуемых клеточных линий. Уровень интенсивности флуоресценции в зеленом канале *STFA* достоверно снижался после использования *pShSTFA*.

A



Б

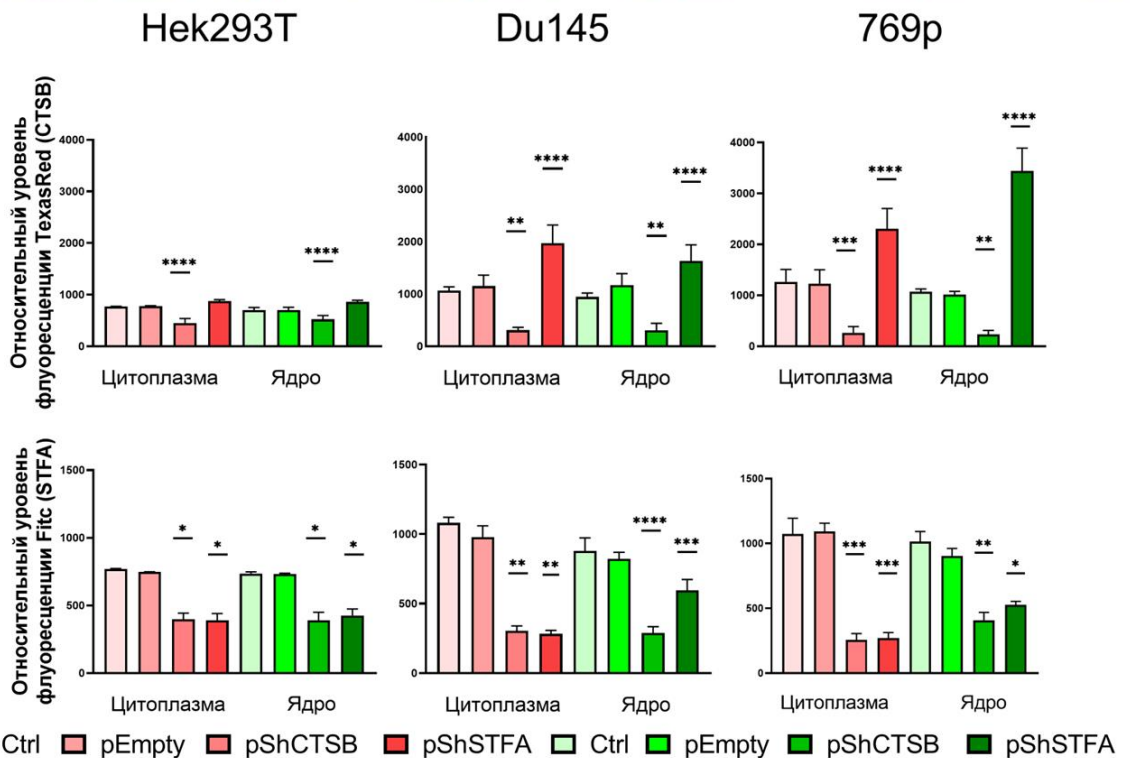


Рисунок 21— Изменение локализации CTSB и STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA): А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно мечеными вторичными антителами. В красном канале детектировали TexasRed (CTSB), в зеленом канале— Fitc (STFA), в синем канале представлены ядра, окрашенные Dapi. Колокализация отмечена желтым при наложении каналов в Merge. Масштаб линейки – 10 мкм. Б) Относительный уровень флуоресценции TexasRed (CTSB) и Fitc (STFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Для количественной оценки ко-локализации белков CTSB и STFA в различных клеточных компартментах был использован метод анализа совместной локализации с расчётом коэффициента Мандера. Полученные результаты выявили выраженную зависимость пространственного распределения белков от направленной модуляции их экспрессии. Как в ядерной, так и в цитоплазматической фракциях наблюдалось согласованное изменение коэффициента колокализации: его значение достоверно повышалось при сверхэкспрессии (pCTSB, pSTFA) и значимо снижалось при нокдауне (pShCTSB, pShSTFA) соответствующих генов по сравнению с контролем (рисунок 22). Эти данные служат прямым подтверждением гипотезы о функциональной связи между CTSB и STFA и указывают на то, что их взаимодействие не ограничено одним клеточным компартментом.

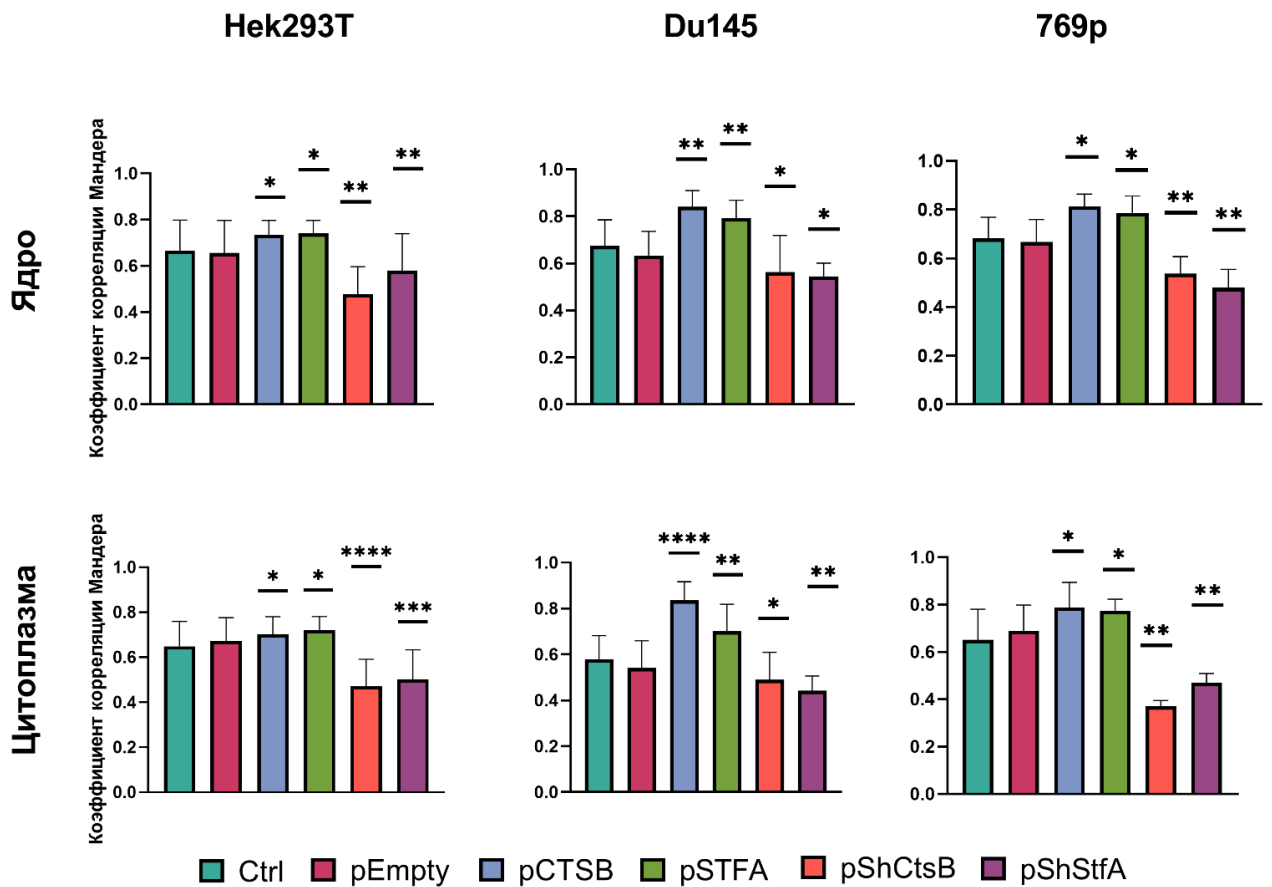


Рисунок 22— Значения коэффициента корреляции Мандера . Корреляция красного сигнала TexasRed (CTSB) и зеленого сигнала FITC (STFA) в ядре и цитоплазме клеточных линий Hek293T, Du145 и 769p после трансфекции пустой плазмидой, плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB и pSTFA) и плазмидами для сайленсинга целевых генов (p ShCTSB и pShStfA). Для каждого эксперимента было проанализировано 3 биологических повтора.. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

В рамках данной главы была установлена ядерно-цитоплазматическая локализация белка STFA и доказана его ко-локализация с CTSB. С помощью конфокальной микроскопии показано, что STFA распределен не только в цитоплазме, но также активно аккумулируется в ядре. Количественный анализ коэффициента ко-локации выявил значительную степень пространственного перекрытия сигналов STFA и CTSB в обоих клеточных компартментах, что является свидетельством их функционального взаимодействия

3.4 Каталитическая активность катепсина В влияет на продукцию стефина А

В настоящее время активно изучаются варианты противоопухолевой терапии с помощью ингибиторов CTSB. Данный подход продемонстрировал хорошие показатели в снижении метастатической активности опухолевых клеток за счет подавления протеолитической деградации внеклеточного матрикса, угнетения инвазивных свойств злокачественных клеток и модуляции микроокружения опухоли, что подтверждается данными исследований *in vitro* и *in vivo*, указывающими на уменьшение частоты метастазирования при различных типах рака [149,160]. Ранее в лаборатории был синтезирован и запатентован пептидный ингибитор цистеиновых катепсинов Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu- фторметил кетон (PLVE)[101]. Механизм его действия заключается в необратимом алкилировании активного центра фермента: фторметильная группа ($-CF_3$) взаимодействует с тиольной группой ($-SH$) каталитического Cys29, образуя устойчивый тиоэфирный комплекс, что блокирует протеолитическую активность CTSB (Рисунок 23) [161].

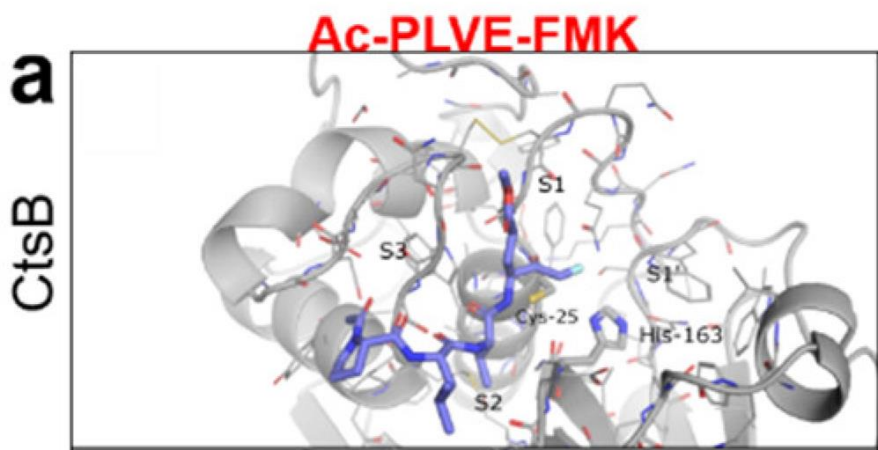


Рисунок 23— Схематичное изображение взаимодействия Acetyl–Pro–Leu–Val–Glu–фторметил кетон (PLVE) и CTSB. Ингибитор показан фиолетовым цветом. Места связывания обозначены S1-S3 и S1' [161]

В предыдущих главах мы показали удивительную обратную корреляцию экспрессии CTSB и его природного ингибитора STFА. Поэтому нашей следующей задачей стала проверка влияния активности CTSB на продукцию STFА. Для этого клетки обрабатывали ингибиторным пептидом PLVE в концентрации 20мкМ и через 48 часов проводили соответствующие эксперименты (Рисунки 24-26).

Нашим первым шагом стала оценка мРНК целевых генов (Рисунки 24-25). Как видно из представленных данных (Рисунок 24), во всех клеточных линиях наблюдается статистически значимое снижение уровня мРНК *CTSB* по сравнению с контрольными образцами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применяемое воздействие действительно

оказывает репрессирующий эффект на транскрипционную активность данного гена.

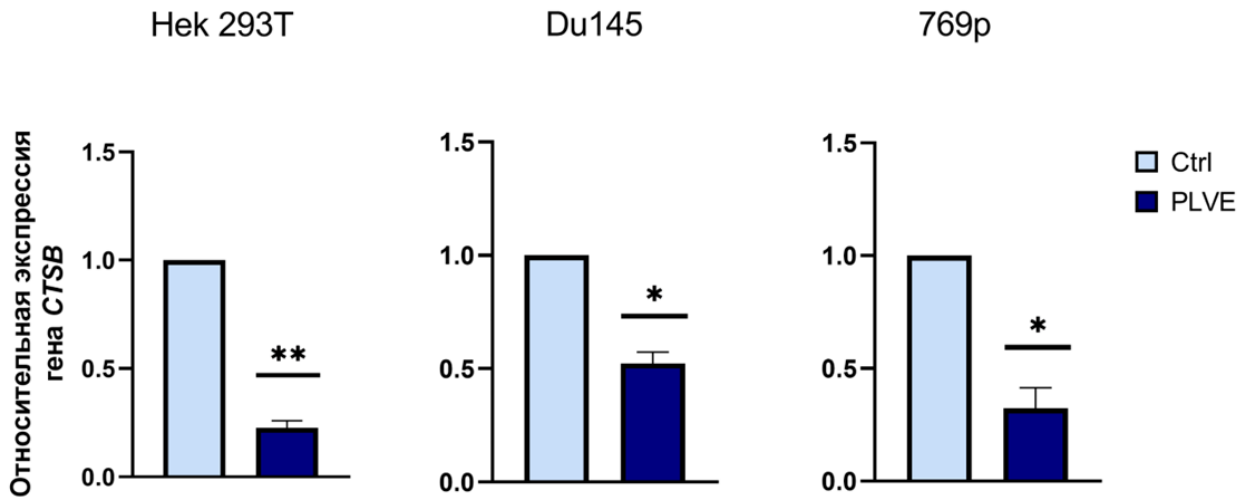


Рисунок 24— Изменение экспрессии гена *CTSB*: экспрессия мРНК *CTSB* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после обработки клеток синтетическим пептидным ингибитором цистеиновых катепсинов Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu- фторметил кетон (PLVE). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

На рисунке 25 представлены результаты анализа экспрессии *STFA*, демонстрирующие достоверное снижение уровня его мРНК во всех исследуемых клеточных линиях по сравнению с необработанным контролем.

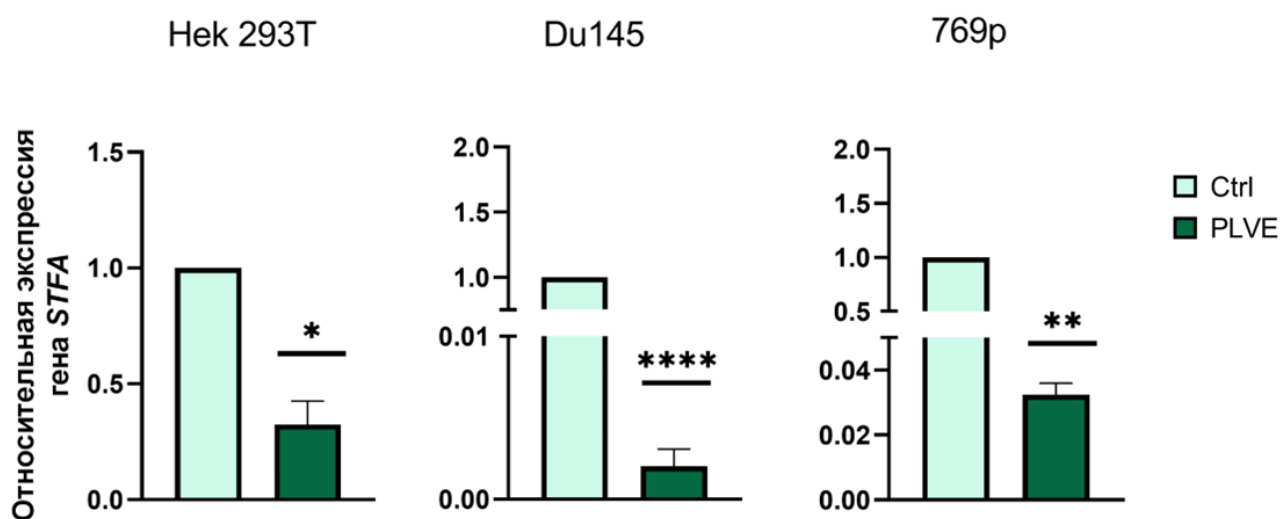


Рисунок 25— Изменение экспрессии гена *STFA*: экспрессия мРНК *STFA* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после обработки клеток синтетическим пептидным ингибитором цистеиновых катепсинов Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu- фторметил кетон (PLVE). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 3 технических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Полученные данные по экспрессии генов *CTSB* и *STFA* позволяют выдвинуть гипотезу о наличии функциональной связи между протеолитической активностью *CTSB* и регуляцией транскрипции как его собственного гена, так и гена *STFA*. Важно отметить, что полученные результаты находятся в полном соответствии с данными, представленными в разделе 3.1 (Рисунки 18-19), где для направленного нокадауна *CTSB* использовалась плазмидная конструкция pShCTSB. В обоих экспериментальных подходах ингибирование *CTSB* — будь то на уровне ферментативной активности или на уровне количества белка — приводило к сопоставимому снижению уровня мРНК *STFA*. Согласованность данных, полученных независимыми методами, подтверждает ключевую роль протеолитически активной формы *CTSB* в регуляции продукции *STFA* на транскрипционном уровне.

Результаты вестерн-блот анализа демонстрируют выраженное влияние PLVE-пептида на уровни экспрессии CTSB и STFA в исследуемых клеточных линиях. На качественном уровне в экспериментальных группах наблюдалось ослабление интенсивности иммунореактивных полос, соответствующих CTSB и STFA, по сравнению с контрольными образцами. Для объективной верификации визуальных наблюдений был проведен денситометрический анализ с последующей статистической обработкой (Рисунок 26). Количественные данные достоверно подтвердили качественную оценку: в клетках, инкубированных с PLVE-пептидом, содержание белков CTSB и STFA статистически значимо снижалось по сравнению с контролем.

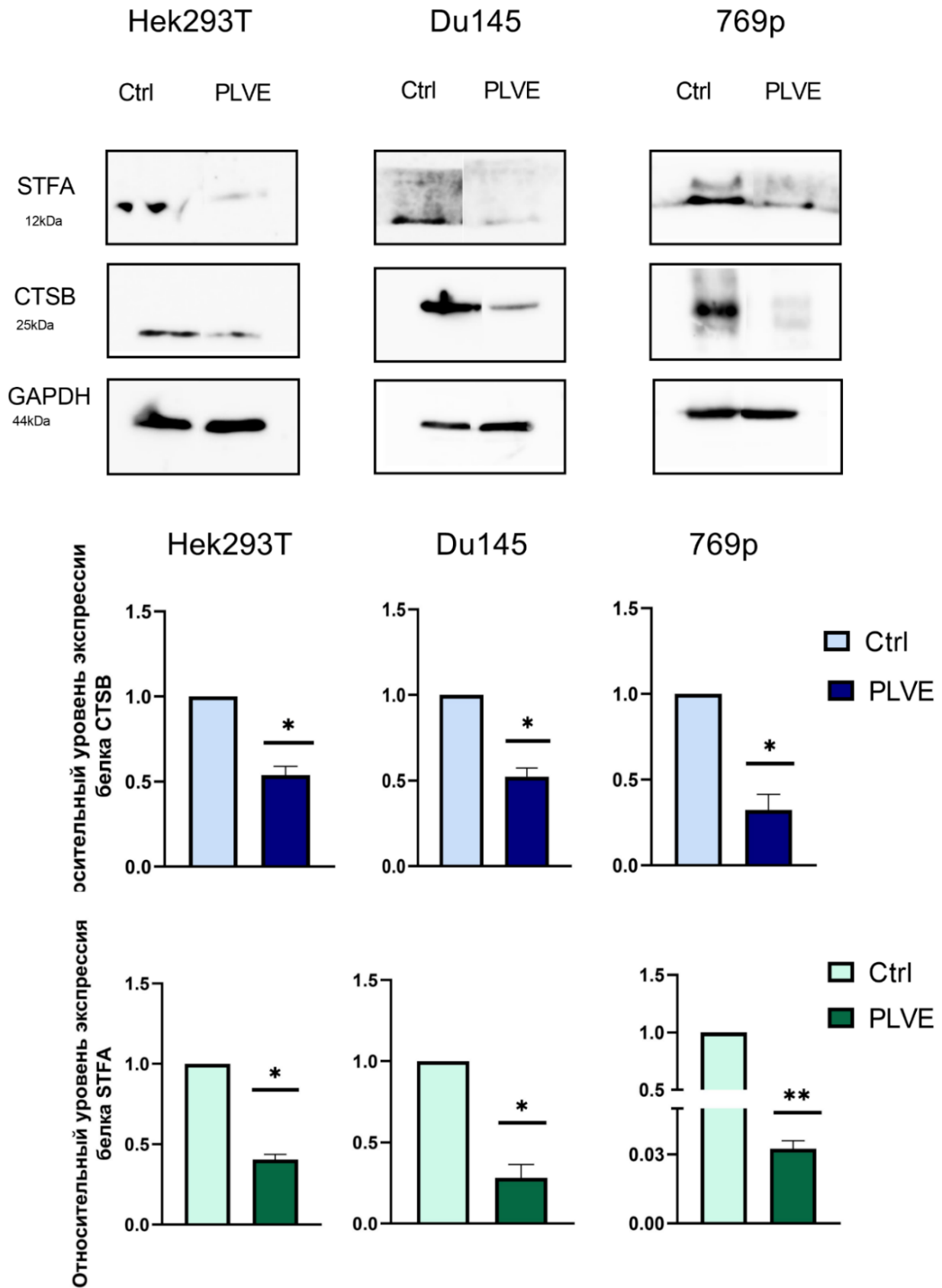


Рисунок 26— Изменение экспрессии белков CTSB и STFA: экспрессия белков CTSB и STFA в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака

простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769р через 48 часов после обработки клеток синтетическим пептидным ингибитором цистеиновых катепсинов Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu- фторметил кетон (PLVE). 1) Репрезентативные изображения. PVDF мембран после окрашивания вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена. 2) Статистический анализ интенсивности хемилюминисценции для детекции CTSB. 3) Статистический анализ интенсивности хемилюминисценции для детекции STFA. Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Таким образом, результаты вестерн-блотинга согласуются с данными, полученными на уровне мРНК, и указывают на то, что ингибиторный PLVE-пептид обладает способностью модулировать экспрессию как CTSB, так и STFA на трансляционном уровне. Это позволяет предположить, что наблюдаемый ранее эффект пептида на транскрипцию данных генов (Рисунки 24-25) реализуется в конечном итоге в снижении количества соответствующих функциональных белков.

Следующим этапом работы стала оценка влияния ингибирования CTSB на внутриклеточную локализацию и уровни целевых белков методом конфокальной микроскопии с иммунофлуоресцентным детектированием (Рисунок 27).

Как видно на Рисунке 27, обработка клеток PLVE-пептидом привела к статистически значимому снижению интенсивности флуоресцентного сигнала как в канале, соответствующем CTSB (красная флуоресценция), так и в канале, детектирующем STFA (зеленая флуоресценция), по сравнению с контрольными образцами. Помимо количественного снижения сигнала, качественный анализ микрофотографий не выявил существенных изменений в характерном паттерне субклеточной локализации исследуемых белков на фоне их общего сниженного пула.

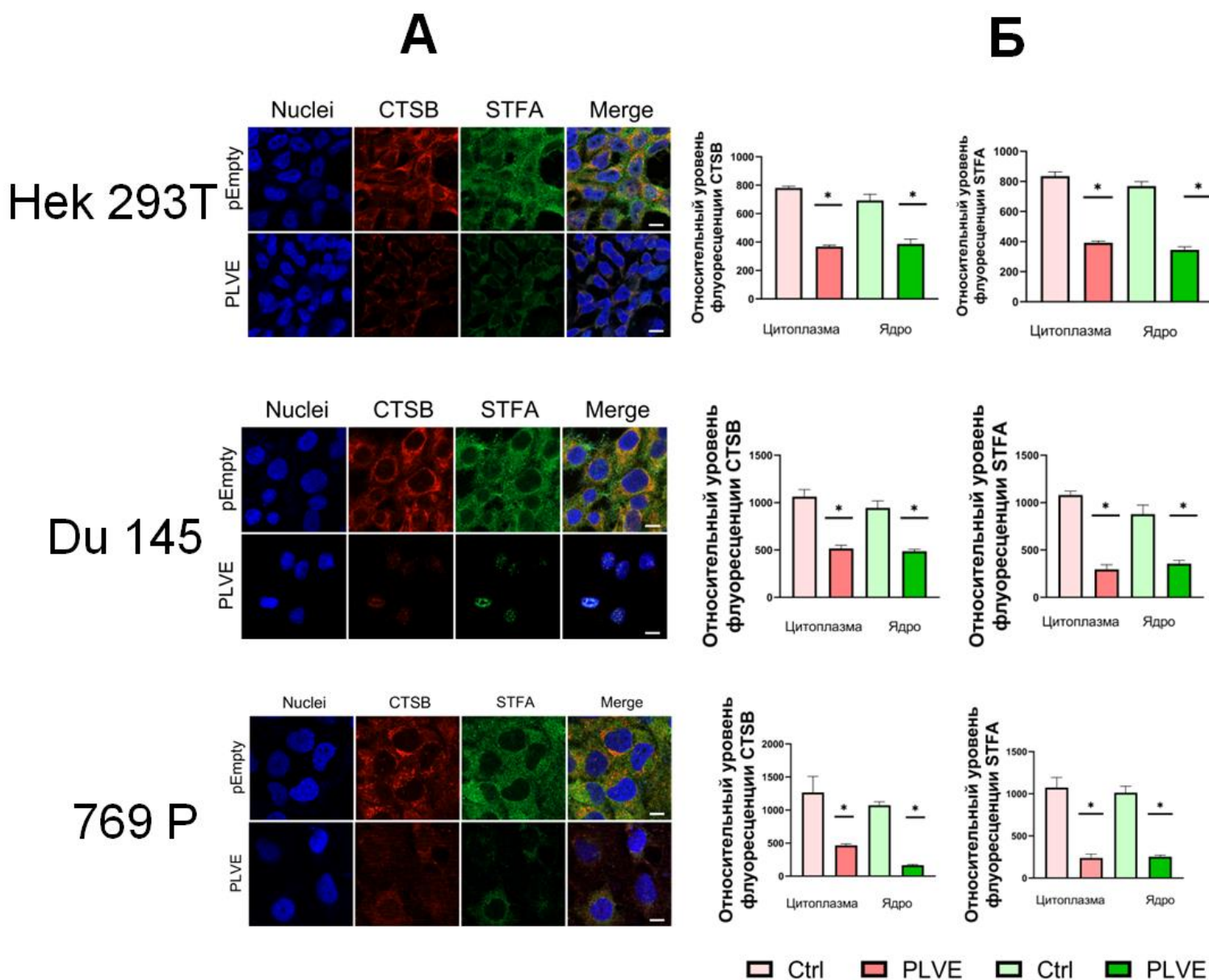


Рисунок 27— Изменение локализации CTSB и STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Нек293Т, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769р через 48 часов после обработки клеток синтетическим пептидным ингибитором цистеиновых катепсинов cetyl-Pro-Leu-Val-Glu-фторметил кетон (PLVE: А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно мечеными вторичными антителами. В красном канале детектировали TexasRed (CTSB), в зеленом канале– Fite (STFA)., в синем канале представлены ядра, окрашенные Dapi/ Масштаб линейки – 10 мкм. Б) Относительный уровень флуоресценции TexasRed (CTSB) и 3) Fite (STFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение

Полученные данные иммунофлуоресцентного анализа полностью согласуются с результатами вестерн-блоттинга и свидетельствуют о том, что ингибирование протеолитически активного CTSB приводит не только к снижению его собственного уровня, но и к сопутствующему уменьшению количества его ингибитора — белка STFA. При этом отсутствие выраженных изменений в субклеточной локализации обоих белков указывает на то, что наблюдаемый эффект обусловлен глобальным снижением их экспрессии, а не нарушением механизмов транспорта. Совокупность полученных данных однозначно свидетельствует о том, что протеолитическая активность CTSB выступает ключевым регуляторным фактором, необходимым для поддержания стабильного внутриклеточного пула белка STFA.

3.5 Доксорубин индуцирует изменения баланса катепсин В/стефина

CTSB представляет собой перспективного кандидата не только в качестве терапевтической мишени при различных патологических процессах, но и в роли биомаркера для их идентификации, что обусловлено его ключевой ролью в регуляции протеолиза, воспалении и апоптозе. В условиях химиотерапии, индукция окислительного стресса приводит к резкому увеличению продукции АФК [135,136], которые, в свою очередь, модулируют активность CTSB, способствуя его высвобождению из лизосом и активации каскада протеолитических реакций, что может служить индикатором клеточного повреждения и прогрессирования патологии. Показано, что увеличение CTSB в кардиомиоцитах может быть опосредовано Dox [147]. Поэтому в настоящее время большинство исследований, посвящённых изучению взаимосвязи между Dox и CTSB, проводится на моделях кардиомиоцитов. И крайне мало исследований посвящено изучению влияния

Dox на экспрессию и активность CTSB в опухолевых клетках. Также в данном контексте абсолютно не изучена ось CTSB–STFA.

Поэтому мы поставили перед собой задачу проанализировать корреляцию CTSB и STFA в условиях терапевтического воздействия.

Доказано, что Dox оказывает дозозависимый эффект, проявляющийся в увеличении цитотоксичности в опухолевых клетках [162]. При низких концентрациях препарат преимущественно активирует сигнальные пути, связанные с остановкой клеточного цикла и умеренным окислительным стрессом, тогда как высокие дозы приводят к массивному повреждению ДНК, необратимому нарушению митохондриальной функции и некротической гибели клеток [163]. Ключевым механизмом дозозависимости является накопление доксорубина в ядре и митохондриях, что коррелирует с усилением образования АФК, активацией каспаз и экспрессией проапоптотических белков (например, Вах и p53 [164]).

Опираясь на современные литературные данные, мы решили оценить влияние дозозависимости на экспрессию CTSB.

В предыдущих главах раковые линии Du145 и 769p вели себя сходным образом, поэтому для следующих исследований мы решили выбрать одну из них. Опираясь на высокий базальный уровень экспрессии CTSB, а также на более выраженные эффекты в корреляции CTSB и STFA, была выбрана линия рака почки человека 769p.

Нашим первым шагом стала оценка жизнеспособности клеток с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ – тест). Оценка проводилась для Dox с концентрациями 1,75 мкг/мл (X), 8,75 мкг/мл (5x), 17,5 мкг/мл (10x), 26,25 мкг/мл (15x) (Рисунок 28). Результаты продемонстрировали дозозависимость: при увеличении концентрации от X до 10x наблюдалось прогрессирующее снижение

выживаемости клеток. Однако при переходе от 10x к 15x значимого усиления эффекта не отмечалось, что свидетельствует о достижении плато цитотоксического действия и возможном перенасыщении системы. Также отмечено, что при концентрациях X и 5x сохранялась выживаемость клеток выше 50%, тогда как 10x и 15x вызывали снижение выживаемости ниже этого порога. Поэтому для дальнейшей работы мы выбрали концентрации X и 10x.

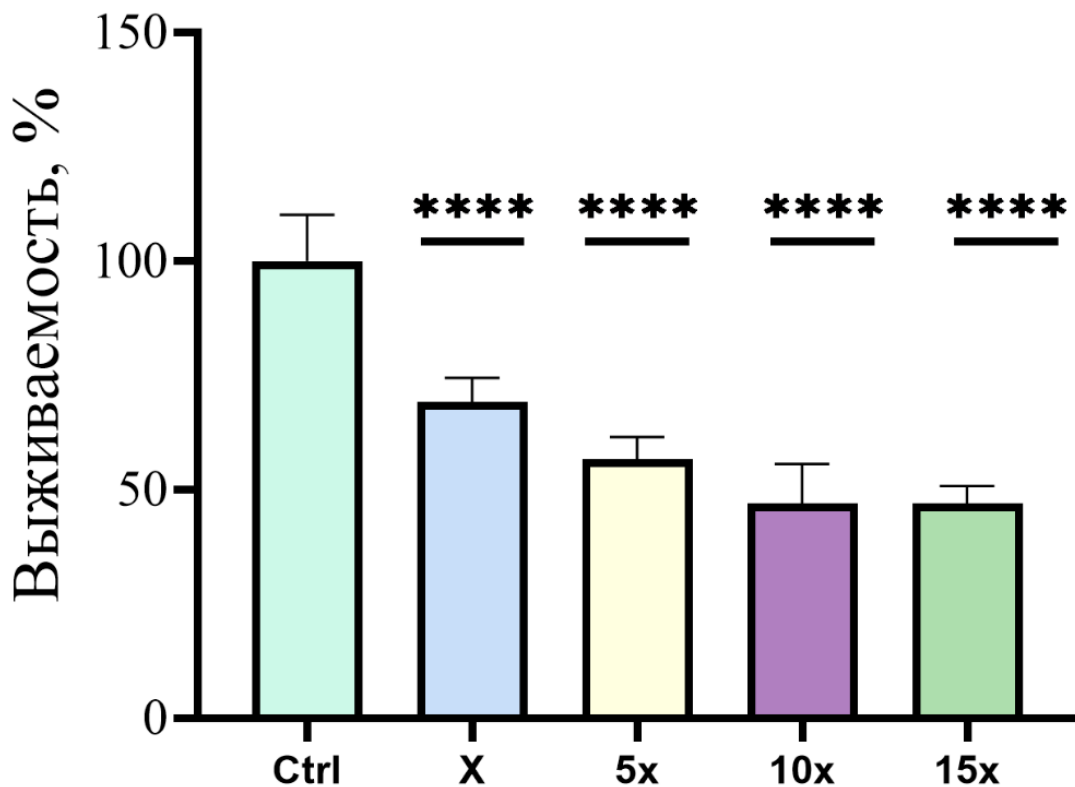


Рисунок 28— Оценка жизнеспособности клеточной линии 769p. МТТ–тест клеток 769p после инкубации с Dox в течение 20 часов. Концентрации Dox – 1,75 мкг/мл (X), 8,75 мкг/мл (5x), 17,5 мкг/мл (10x), 26,25 мкг/мл (15x) Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических и 6 технических повторностей. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Многочисленные исследования демонстрируют, что доксорубин оказывает различный эффект на злокачественные и нормальные клетки, что

обусловлено различиями в их метаболизме [165]. Поэтому для дальнейших экспериментов мы также взяли нераковые клетки Нек293Т.

Клетки 769р и Нек293Т обрабатывались Dox в двух концентрациях (1,75 мкг/мл (X) и 17,5 мкг/мл (10x)) и все дальнейшие эксперименты проводились через 20 часов после обработки клеток. На рисунке 29 представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие изменение экспрессии CTSB и STFA в исследуемых образцах.

В линии клеток Нек293Т во всех образцах экспрессия CTSB снижается более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Хочется отметить, что высокая дозировка вела к большему снижению экспрессии CTSB. Аналогичные данные были получены и для STFA. Такое изменение в экспрессии может быть связано с тем, что высокие концентрации Dox влияют на транскрипцию, а, следовательно, и на трансляцию. Снижение уровня белка может быть опосредовано как стрессовым ответом или повреждением ДНК, так и усиленным апоптозом [166].

В линии раковых клеток 769Р, экспрессия CTSB проявляет дозозависимость – при обработке клеток Dox в концентрации 17,5 мкг/мл (10x), экспрессия снижается, а при использовании концентрации в 10 раз меньше наоборот увеличивается. Для STFA мы наблюдали аналогичные результаты – при концентрации Dox 17,5 мкг/мл (10x) экспрессия STFA была наименьшей. В случае с более низкой дозировкой была выявлена статистически значимая оверэкспрессия.

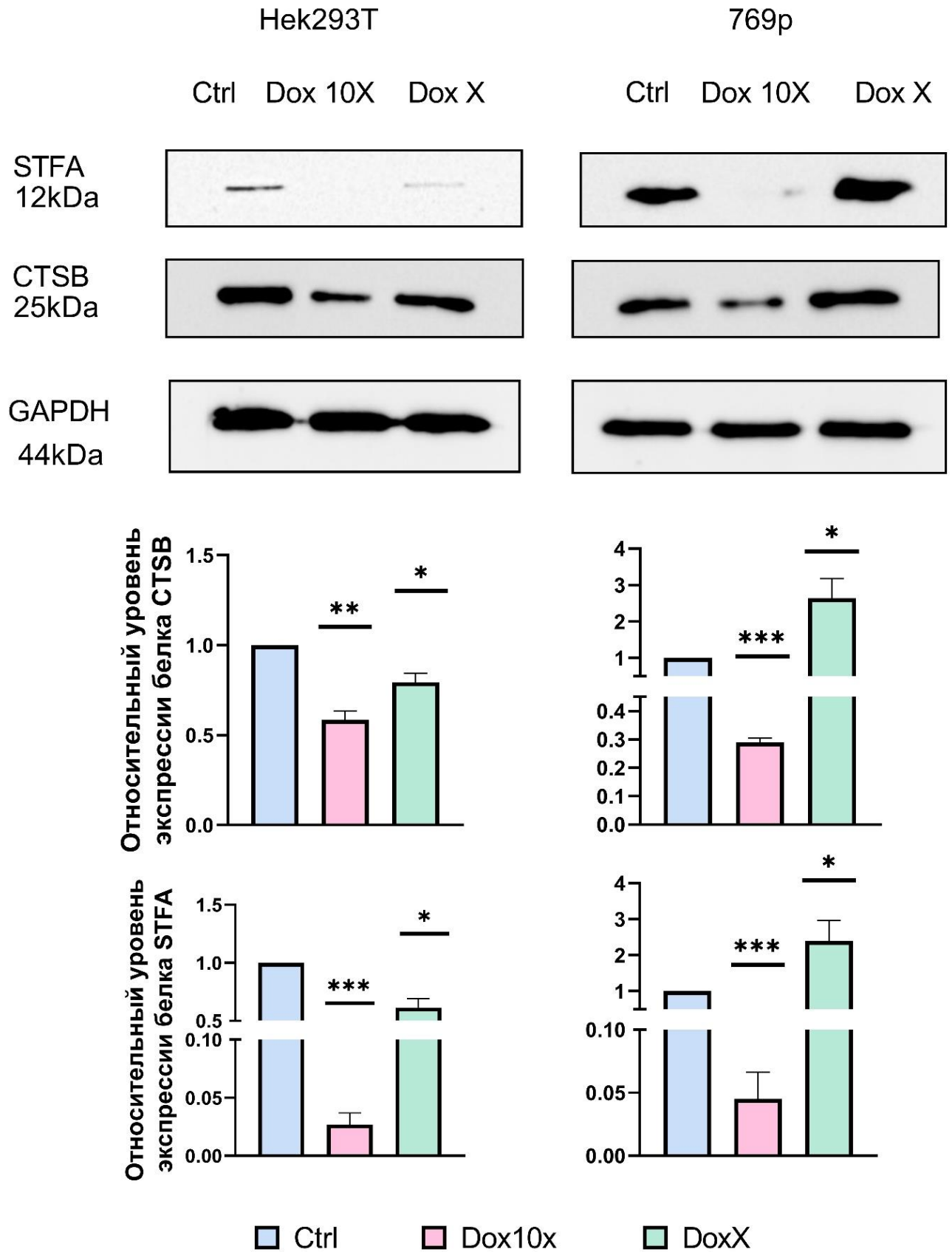


Рисунок 29— Изменение экспрессии белков CTSB и STFA: экспрессия белков CTSB и STFA в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T и клеточной линии рака почки человека 769p через 20 часов после обработки клеток Dox10x и Dox X. Для каждого

эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

В литературе остаются нераскрытыми аспекты, связанные с локализацией CTSB в условиях терапии. Поэтому нашей следующей задачей стало изучение распределения CTSB и STFA после обработки Dox с использованием метода иммунофлуоресцентной микроскопии. В данном эксперименте мы оценили не только локализацию, но и влияние дозозависимости на распределение целевых белков. Данные представлены на рисунках 30-31

Ранее было показано, что для исследуемых белков характерна как цитоплазматическая, так и ядерная локализация. При этом в контрольных образцах интенсивность флуоресценции ядерного сигнала ниже по сравнению с цитоплазматическим. В данном эксперименте для исследуемых клеточных линий мы получили аналогичные данные.

Распределение CTSB представлено на рисунке 30 В эмбриональных клетках Нек293Т происходит уменьшение интенсивности сигнала от CTSB по мере увеличения дозы Dox. Мы также наблюдали изменение локализации целевого белка – в контрольных образцах CTSB в основном локализован в цитоплазматическом компартменте, однако после обработки клеток Dox происходит изменение его распределения. После обработки клеток Dox 10x, мы наблюдаем практически двухкратное увеличение ядерного сигнала CTSB и при этом значительное уменьшение цитоплазматического сигнала. После добавления Dox X, сигнал CTSB увеличивается в ядре, при этом цитоплазматический сигнал не отличается от сигнала в контрольных образцах. В линии раковых клеток 769p мы также наблюдали изменение биораспределения CTSB. В контрольных образцах цитоплазматическая фракция превышала ядерную на 90%. После обработки клеток Dox 10x, мы

наблюдали аналогичную картинку изменения биораспределения CTSB. После обработки клеток Dox 10x величина ядерного сигнала выросла в 3 раза, а цитоплазматическая снизилась в 40 раз. После обработки клеток однократной дозой Dox, ядерный сигнал вырос в 4 раза, а цитоплазматический не изменился относительно контроля.

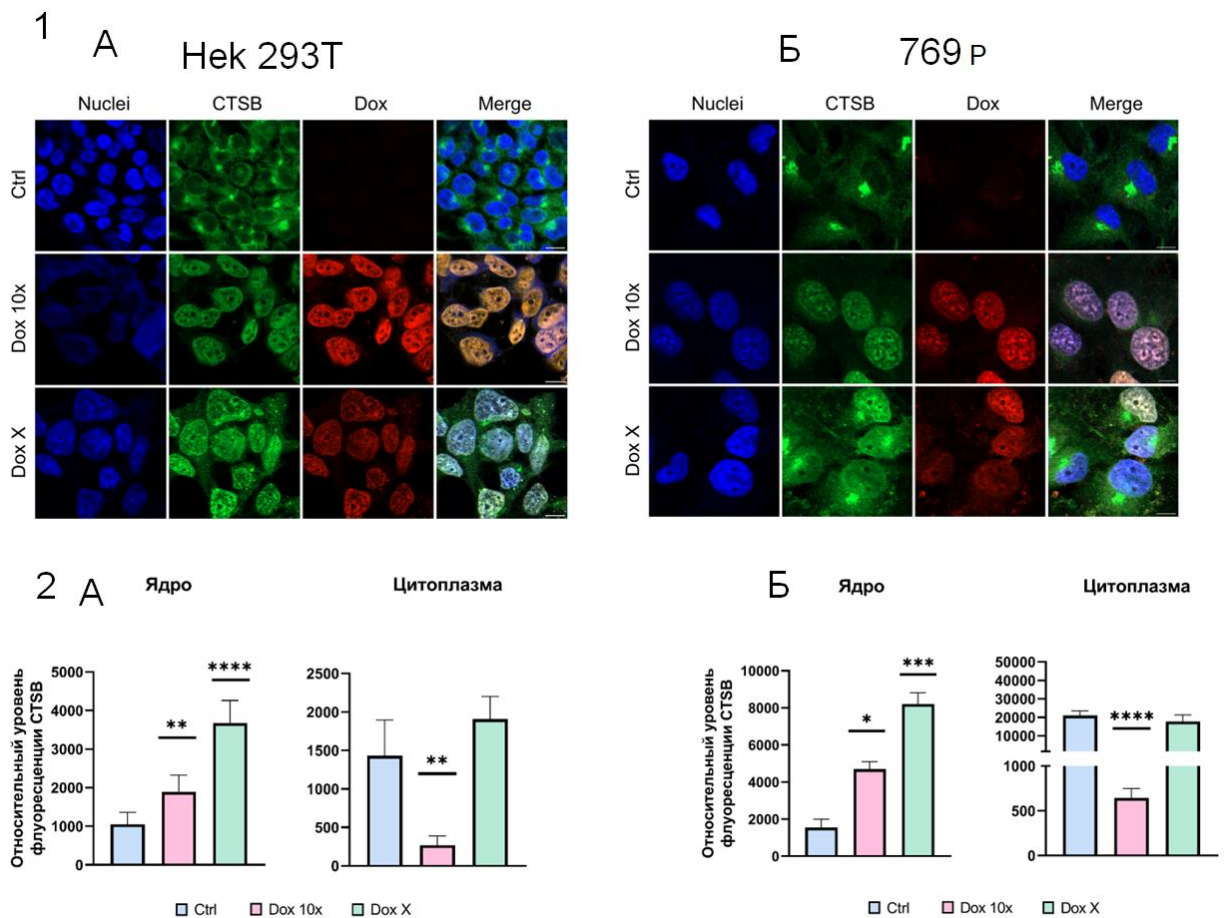


Рисунок 30— Изменение локализации CTSB в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Нек293Т и клеточной линии рака почки человека 769р через 20 часов после обработки клеток Dox10x и Dox X. А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно меченными вторичными антителами. В красном канале детектировали Dox в зеленом канале– Fitc (CTSB)., в синем канале представлены ядра, окрашенные Dapi. Колокализация отмечена желтым при наложении каналов в Merge. Масштаб линейки – 10 мкм. Б) Относительный уровень флуоресценции Fitc (CTSB). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Аналогичные данные были получены для STFA (Рисунок 31). В эмбриональных клетках Нек293Т, STFA локализован преимущественно в цитоплазме. Однако после обработки клеток десятикратной дозой Dox мы наблюдаем изменение биораспределения таким образом, что ядерная фракция начинает возрастает более чем в 4 раза, а цитоплазматическая – уменьшается примерно в 3 раза. После добавления Dox X, сигнал STFA увеличивается в ядре более чем в 4 раза, при этом цитоплазматический сигнал не отличается от сигнала в контрольных образцах. В линии раковых клеток 769р мы наблюдали аналогичные изменение STFA. В контрольных образцах цитоплазматическая фракция превышала ядерную. После обработки клеток различными исследуемыми концентрациями Dox, мы наблюдали аналогичную картинку изменения биораспределения STFA.

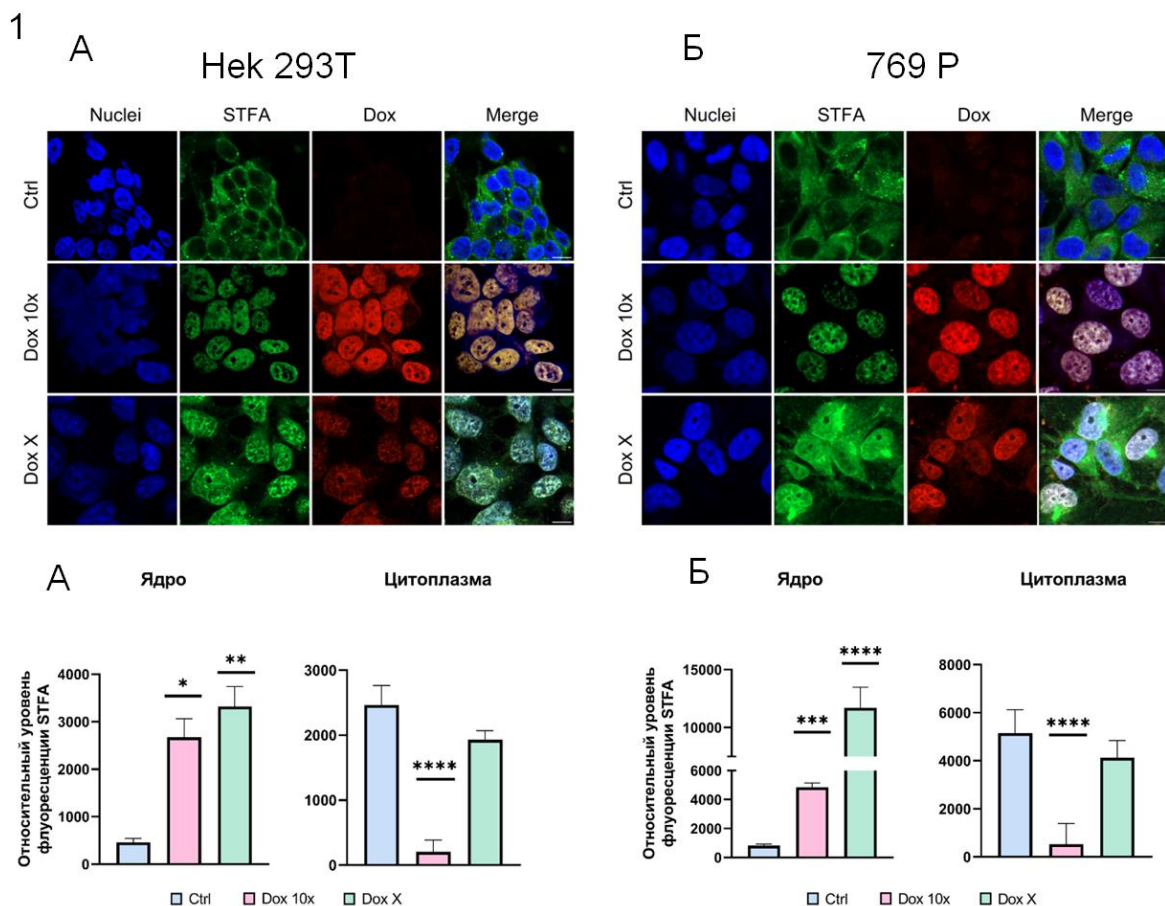


Рисунок 31— Изменение локализации STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Нек293Т и клеточной линии рака почки человека 769р через 20 часов после обработки клеток Dox10x и Dox X. А) Репрезентативные изображения

исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно меченными вторичными антителами. В красном канале детектировали Dox в зеленом канале– Fitc (STFA)., в синем канале представлены ядра, окрашенные Dapi. Колокализация отмечена желтым при наложении каналов в Merge. Масштаб линейки – 10 мкм. Б) Относительный уровень флуоресценции Fitc (STFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Хочется отметить, что раковая клеточная линия 769p имеет более высокий базальный уровень экспрессии CTSB, а также более интенсивное увеличение сигнала в ядерном компартменте. То же самое касается и STFA. Также хочется подчеркнуть факт того, что во всех экспериментах у нас сохраняется корреляция между уровнями экспрессии CTSB и STFA. Особенно ярко это проявляется в синхронном усилении ядерного сигнала от целевых белков после обработки однократной дозой Dox.

В этой главе мы показали, что раковые клетки 769p и эмбриональные клетки Нек293Т имеют разную чувствительность к Dox. В клетках 769p наблюдалось увеличение экспрессии CTSB и STFA при обработке Dox в концентрации 1,75 мкг/мл (X), тогда как в НЕК293Т подобного эффекта не зарегистрировано. При этом в обеих клеточных линиях минимальный уровень экспрессии исследуемых белков отмечался после воздействия Dox в концентрации 17,5 мкг/мл (10X), что может свидетельствовать о дозозависимом подавлении синтеза данных белков при высоких дозах препарата.

3.6 Катепсин В и цистатин А в ядрах раковых клеток взаимодействуют с хроматином

В последнее время появляются данные, раскрывающие ядерные функции CTS. В частности, установлено, что CTSL способен транслоцироваться в ядро, где участвует в эпигенетической регуляции клеточных состояний. Показана его дуальная роль: с одной стороны, он может выступать как стабилизатор гетерохроматина [167,168], необходимый для поддержания репрессивных гистоновых меток, таких как H3K9me₃; с другой — при определенных условиях стресса он опосредует ремоделинг хроматина путем специфического протеолитического расщепления N-концевого хвоста гистона H3 [169]. Поскольку данный гистоновый домен служит платформой для регуляторных посттрансляционных модификаций (метилирования, ацетилирования и др.), его необратимое удаление приводит к глубоким изменениям эпигенетического ландшафта и транскрипционного профиля клетки [170]. Важным аспектом регуляции этого процесса является наличие в ядре эндогенного ингибитора — STFB. Показано, что STFB способен образовывать тройной комплекс с гистонами и CTSL, тем самым подавляя протеолитическую активность ядерного CTSL и выполняя защитную функцию, предотвращая неконтролируемое расщепление гистонов и обеспечивая стабильность эпигенома в условиях клеточного стресса [171].

Не только CTSL, но и CTSB способен расщеплять хвост гистона H3, запуская перестройки хроматина и изменение экспрессии генов [172]. Поскольку в наших предыдущих экспериментах была выявлена корреляция между экспрессией CTSB и STFA, характерная для всех исследованных линий, включая условия терапии, возникло предположение, что наблюдаемая взаимосвязь может быть следствием их прямого функционального взаимодействия в ядре, аналогично CTSL и STFB. Поскольку клеточный ответ,

ключевым медиатором которого выступает CTSB, оказался наиболее характерным для раковых линий, в данной главе мы сосредоточили усилия на изучении возможных ядерных взаимодействий CTSB–STFA в линии клеток 769р. Для этого мы провели ChIP с использованием антител к гистону H3. Последующий анализ иммунопреципитатов методом вестерн-блоттинга позволил задетектировать и оценить ассоциацию с хроматином целевых белков — CTSB и STFA.

Проведенный ChIP-вестерн анализ выявил взаимодействие исследуемых белков с хроматином (Рисунок 32). Наблюдаемый паттерн экспрессии продемонстрировал корреляцию между уровнями хроматин-связанных форм обоих белков: снижение количества CTSB сопровождалось пропорциональным уменьшением содержания STFA в составе хроматина. Данный результат согласуется с полученными ранее данными и подтверждает гипотезу о функциональной связи между ядерным пулом CTSB и его ингибитором STFA.

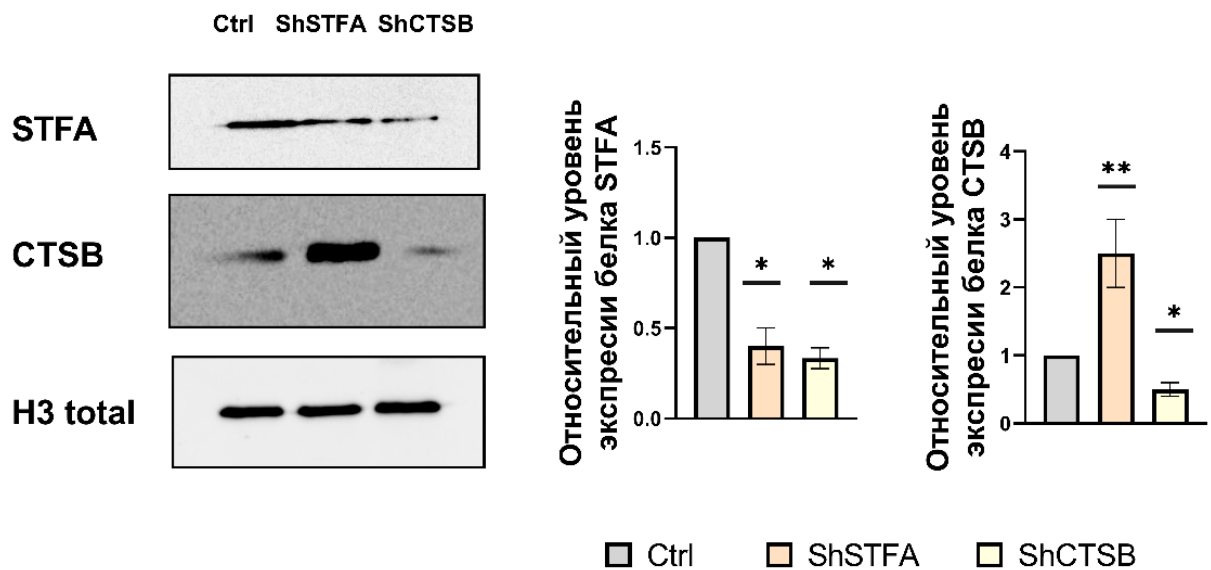


Рисунок 32— Изменение экспрессии белков CTSB и STFA в иммунопреципитатах: экспрессия белков CTSB и STFA в клеточной линии рака почки человека 769р через 48 часов после трансфекции плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA). Для каждого эксперимента было проведено 3

биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

В результате данной главы была экспериментально подтверждена способность CTSB и его ингибитора STFA образовывать комплексы с хроматином в ядре клеток карциномы почек 769р. Методом ChIP-вестерн блоттинга установлено, что уровни хроматин-связанных форм данных белков коррелируют между собой: снижение содержания CTSB сопровождается пропорциональным уменьшением количества STFA в хроматиновой фракции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование демонстрирует наличие двунаправленной регуляторной взаимосвязи между CTSB и STFA, проявляющейся на транскрипционном и трансляционном уровнях. Полученные данные свидетельствуют о функционировании системы ко-регуляции по принципу отрицательной обратной связи, где повышение экспрессии CTSB индуцирует увеличение уровня его эндогенного ингибитора STFA, в то время как возрастание концентрации STFA, в свою очередь, приводит к подавлению экспрессии CTSB.

Особый интерес представляют выявленные клеточно-специфические различия в регуляции данной системы: было показано, что в эмбриональных клетках Нек293Т механизм контроля экспрессии CTSB характеризуется значительно более высокой степенью точности по сравнению с трансформированными клеточными линиями. Эти наблюдения позволяют предположить, что нарушение тонкой регуляции системы CTSB-STFA может играть важную роль в процессах канцерогенеза.

Экспериментально установлено, что протеолитическая активность CTSB оказывает регуляторное влияние на биосинтез и продукцию STFA, что раскрывает ранее неизвестный механизм контроля уровня данного белка. Полученные данные свидетельствуют о существовании каскадной регуляторной взаимосвязи, в которой CTSB, выступая в качестве протеолитического модулятора, участвует в продукции STFA. Это имеет принципиальное значение для понимания молекулярных основ регуляции системы "протеиназа-ингибитор", поскольку демонстрирует, что ингибитор STFA не только контролирует активность CTSB по принципу отрицательной обратной связи, но и сам является мишенью для протеолитической модификации со стороны CTSB.

Применение конфокальной микроскопии позволило установить распределение исследуемых белков, а также показать присутствие STFA в ядерном компартменте. Количественный анализ флуоресцентных сигналов выявил колокализацию CTSB и STFA в цитоплазматическом и ядерном компартментах, что подтверждается коэффициентом Мандера. Полученные данные демонстрируют скоординированную пространственную организацию исследуемых белков, это показывает их функциональную взаимосвязь в различных клеточных процессах. Особый интерес представляет ядерная фракция CTSB, что может указывать на его потенциальное участие в регуляции транскрипционных процессов или ядерной протеолитической активности.

Настоящее исследование выявило значимые различия в чувствительности клеточных линий Нек293Т и 769р к Dox. Ключевое различие проявляется в характере клеточного ответа на дозировки Dox. Особенно интересным является контраст между клеточными линиями при обработке Dox в концентрации 1,75 мкг/мл (X) – в клетках 769р наблюдалось значительное повышение уровня исследуемых белков, в то время как в линии Нек293Т наблюдалось снижение их экспрессии. Эти данные демонстрируют, что механизмы регуляции системы CTSB–STFA кардинально различаются в нормальных и раковых клетках, что может иметь важное значение для понимания специфики действия противоопухолевых препаратов и разработки более селективных терапевтических стратегий.

Также в результате проведенного исследования впервые экспериментально установлено, что STFA способен взаимодействовать с хроматином в ядре раковых клеток. С помощью метода ChIP-вестерн блоттинга на модели клеточной линии 769р было продемонстрировано, что CTSB и его эндогенный ингибитор STFA, входят в состав хроматиновой фракции, взаимодействуя с гистонами H3. Ключевым результатом стало

выявление корреляции между уровнями хроматин-связанных форм этих белков: снижение количества CTSB приводило к пропорциональному уменьшению ассоциации STFA с хроматином.

Данная работа расширяет представлений о механизмах регуляции протеолитической активности CTSB и его ингибитора STFA, включая их координированную экспрессию и пространственное распределение в клетке. Результаты исследования открывают перспективы для дальнейшего изучения молекулярных основ взаимодействия CTSB и STFA, а также их роли в клеточных процессах в норме и при патологических состояниях.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что протеолитическая активность катепсина В модулирует экспрессию его ингибитора стефина А, что формирует петлю отрицательной обратной связи: повышение уровня активного катепсина В индуцирует экспрессию стефина А, который, в свою очередь, подавляет активность катепсина В.
2. Показано, что стефин А обладает ядерно-цитоплазматической локализацией и колокализуется с катепсином В в данных клеточных компартментах. Таким образом, формирование комплекса стефина А с катепсином В и его функционирование могут происходить как в цитоплазме, так и в ядре клетки
3. Обнаружено взаимодействие ядерных форм катепсина В и стефина А с гистоном H3. Выявленная положительная корреляция между уровнем экспрессии катепсина В и количеством стефина А, входящего в состав хроматина, указывает на их совместное участие в регуляции структуры хроматина.
4. Установлено, что обработка клеточных культур доксорубицином индуцирует дозозависимые изменения экспрессии катепсина В и стефина А. При действии низких концентраций доксорубицина на раковые клетки, экспрессия исследуемых белков повышается, тогда как в нераковых клетках наблюдается дозозависимое снижение их экспрессии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CTS – катепсин(ы)

CTSB – катепсин Б

STFA – стефин А

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – ДНК, комплементарная молекуле РНК

РНК – рибонуклеиновая кислота

ММП – металлопротеиназа

шЭПС – шероховатая эндоплазматическая сеть

ЭМП – эпителиально–мезенхимальный переход

АФК – активные формы кислорода

ВКМ – внеклеточный матрикс

UTR – нетранслируемая область

CGI – CpG–островки

МВР – метил–связывающие белки

АПК– антиген–презентирующие клетки

ГКГС – главный комплекс гистосовместимости

РАС – ренин–ангиотензиновая система

НСП – нейтрофильные сериновые протеазы

ЕК – естественные киллеры

М–6–Ф – маннозо–6–фосфат

ТПР – Toll–подобных рецепторов

TGF–beta – трансформирующий фактор роста бета

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

SCD1 – стеароил–КоА–десатураза 1

USF – семейство стимулирующих факторов

NF- κ B – ядерный фактор каппаБ

miRNA – микроРНК

Cys – цистеин

His – гистидин

STFB – стефин Б

Dox – доксорубицин

ОТ–ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reiser, J.; Adair, B.; Reinheckel, T. *The Journal of clinical investigation* **2010**, *120* (10), 3421-3431.
2. Liu, C.-L.; Guo, J.; Zhang, X.; Sukhova, G. K.; Libby, P.; Shi, G.-P. *Nature Reviews Cardiology* **2018**, *15* (6), 351-370.
3. Lutgens, S. P.; Cleutjens, K. B.; Daemen, M. J.; Heeneman, S. *The FASEB Journal* **2007**, *21* (12), 3029-3041.
4. Salminen-Mankonen, H.; Morko, J.; Vuorio, E. *Current drug targets* **2007**, *8* (2), 315-323.
5. Saftig, P.; Hunziker, E.; Everts, V.; Jones, S.; Boyde, A.; Wehmeyer, O.; Suter, A.; von Figura, K. Functions of cathepsin K in bone resorption: lessons from cathepsin K deficient mice. In *Cellular peptidases in immune functions and diseases 2*, Springer, 2000; pp 293-303.
6. Cermak, S.; Kosicek, M.; Mladenovic-Djordjevic, A.; Smiljanic, K.; Kanazir, S.; Hecimovic, S. *PloS one* **2016**, *11* (11), e0167428.
7. Vidoni, C.; Follo, C.; Savino, M.; Melone, M. A.; Isidoro, C. *Medicinal research reviews* **2016**, *36* (5), 845-870.
8. Hart, T. C.; Hart, P. S.; Bowden, D. W.; Michalec, M. D.; Callison, S. A.; Walker, S. J.; Zhang, Y.; Firatli, E. *Journal of medical genetics* **1999**, *36* (12), 881-887.
9. Rupanagudi, K. V.; Kulkarni, O. P.; Lichtnekert, J.; Darisipudi, M. N.; Mulay, S. R.; Schott, B.; Gruner, S.; Haap, W.; Hartmann, G.; Anders, H.-J. *Annals of the rheumatic diseases* **2015**, *74* (2), 452-463.
10. Rudzińska, M.; Parodi, A.; Soond, S. M.; Vinarov, A. Z.; Korolev, D. O.; Morozov, A. O.; Daglioglu, C.; Tutar, Y.; Zamyatnin Jr, A. A. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20* (14), 3602.
11. Khaket, T. P.; Kwon, T. K.; Kang, S. C. *Pharmacology & therapeutics* **2019**, *198*, 1-19.

12. Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Thomas, P. D.; Huang, X.; Bateman, A.; Finn, R. D. *Nucleic acids research* **2018**, *46* (D1), D624-D632.
13. Beena, J.; Rajeeve, S.; Mohan, J.; Praveen, K. S.; Mahendra, S.; Santhoshkumar, T. *Molecular carcinogenesis* **2010**, *49* (4), 324-336.
14. Wang, J.; Zheng, M.; Yang, X.; Zhou, X.; Zhang, S. *Journal of cancer* **2023**, *14* (12), 2344.
15. Gocheva, V.; Joyce, J. A. *Cell cycle* **2007**, *6* (1), 60-64.
16. Renko, M.; Požgan, U.; Majera, D.; Turk, D. *Febs j* **2010**, *277* (20), 4338-4345. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07824.x From NLM.
17. Rudzinska-Radecka, M.; Frolova, A. S.; Balakireva, A. V.; Gorokhovets, N. V.; Pokrovsky, V. S.; Sokolova, D. V.; Korolev, D. O.; Potoldykova, N. V.; Vinarov, A. Z.; Parodi, A. *Cells* **2022**, *11* (9), 1455.
18. Fonović, M.; Turk, B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-general subjects* **2014**, *1840* (8), 2560-2570.
19. Verma, S.; Dixit, R.; Pandey, K. C. *Frontiers in pharmacology* **2016**, *7*, 107.
20. Cavallo-Medved, D.; Moin, K.; Sloane, B. *AFCS Nat Mol Pages* **2011**, *2011*. From NLM.
21. Koga, H.; Mori, N.; Yamada, H.; Nishimura, Y.; Tokuda, K.; Kato, K.; OMOTO, T. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **1992**, *40* (4), 965-970.
22. Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N. *The EMBO journal* **1991**, *10* (9), 2321-2330.
23. Duncan, E. M.; Muratore-Schroeder, T. L.; Cook, R. G.; Garcia, B. A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Allis, C. D. *Cell* **2008**, *135* (2), 284-294.
24. Wex, T.; Bühling, F.; Wex, H.; Günther, D.; Malfertheiner, P.; Weber, E.; Brömme, D. *The Journal of Immunology* **2001**, *167* (4), 2172-2178.
25. Sadegh-Nasseri, S.; Kim, A. *Frontiers in immunology* **2015**, *6*, 372.
26. Kiuchi, S.; Tomaru, U.; Ishizu, A.; Imagawa, M.; Kiuchi, T.; Iwasaki, S.; Suzuki, A.; Otsuka, N.; Deguchi, T.; Shimizu, T. *Human Pathology* **2017**, *60*, 66-74.

27. Yadati, T.; Houben, T.; Bitorina, A.; Shiri-Sverdlov, R. *Cells* **2020**, *9* (7), 1679.
28. Drake, M. T.; Clarke, B. L.; Oursler, M. J.; Khosla, S. *Endocrine reviews* **2017**, *38* (4), 325-350.
29. Bennett, K.; Levine, T.; Ellis, J. S.; Peanasky, R. J.; Michael Samloff, I.; Kay, J.; Chain, B. M. *European journal of immunology* **1992**, *22* (6), 1519-1524.
30. Honey, K.; Rudensky, A. Y. *Nature Reviews Immunology* **2003**, *3* (6), 472-482.
31. Shen, L.; Sigal, L. J.; Boes, M.; Rock, K. L. *Immunity* **2004**, *21* (2), 155-165.
32. Kilmister, E. J.; Tan, S. T. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2021**, *69* (12), 835-847.
33. Korkmaz, B.; Horwitz, M. S.; Jenne, D. E.; Gauthier, F. *Pharmacological reviews* **2010**, *62* (4), 726-759.
34. Riese, R. J.; Mitchell, R. N.; Villadangos, J. A.; Shi, G. P.; Palmer, J. T.; Karp, E. R.; De Sanctis, G. T.; Ploegh, H. L.; Chapman, H. A. *J Clin Invest* **1998**, *101* (11), 2351-2363. DOI: 10.1172/jci1158 From NLM.
35. Castro-Gomes, T.; Corrotte, M.; Tam, C.; Andrews, N. W. *PLoS One* **2016**, *11* (3), e0152583. DOI: 10.1371/journal.pone.0152583 From NLM.
36. Lu, W. D.; Funkelstein, L.; Toneff, T.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Hook, V. *J Neurochem* **2012**, *122* (3), 512-522. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07788.x From NLM.
37. Kos, J.; Jevnikar, Z.; Obermajer, N. *Cell Adh Migr* **2009**, *3* (2), 164-166. DOI: 10.4161/cam.3.2.7403 From NLM.
38. Nakagawa, T.; Roth, W.; Wong, P.; Nelson, A.; Farr, A.; Deussing, J.; Villadangos, J. A.; Ploegh, H.; Peters, C.; Rudensky, A. Y. *Science* **1998**, *280* (5362), 450-453. DOI: 10.1126/science.280.5362.450 From NLM.
39. Nakagawa, T. Y.; Brissette, W. H.; Lira, P. D.; Griffiths, R. J.; Petrushova, N.; Stock, J.; McNeish, J. D.; Eastman, S. E.; Howard, E. D.; Clarke, S. R.; et al. *Immunity* **1999**, *10* (2), 207-217. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80021-7 From NLM.

40. Shi, G. P.; Villadangos, J. A.; Dranoff, G.; Small, C.; Gu, L.; Haley, K. J.; Riese, R.; Ploegh, H. L.; Chapman, H. A. *Immunity* **1999**, *10* (2), 197-206. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80020-5 From NLM.
41. Droga-Mazovec, G.; Bojic, L.; Petelin, A.; Ivanova, S.; Romih, R.; Repnik, U.; Salvesen, G. S.; Stoka, V.; Turk, V.; Turk, B. *J Biol Chem* **2008**, *283* (27), 19140-19150. DOI: 10.1074/jbc.M802513200 From NLM.
42. Dyer, S. C.; Austine-Orimoloye, O.; Azov, A. G.; Barba, M.; Barnes, I.; Barrera-Enriquez, V. P.; Becker, A.; Bennett, R.; Beracochea, M.; Berry, A.; et al. *Nucleic Acids Research* **2024**, *53* (D1), D948-D957. DOI: 10.1093/nar/gkae1071 (accessed 9/16/2025).
43. Aggarwal, N.; Sloane, B. F. *Proteomics Clin Appl* **2014**, *8* (5-6), 427-437. DOI: 10.1002/prca.201300105 From NLM.
44. Gong, Q.; Chan, S. J.; Bajkowski, A. S.; Steiner, D. F.; Frankfater, A. *DNA Cell Biol* **1993**, *12* (4), 299-309. DOI: 10.1089/dna.1993.12.299 From NLM.
45. Mijanović, O.; Branković, A.; Panin, A. N.; Savchuk, S.; Timashev, P.; Ulasov, I.; Lesniak, M. S. *Cancer Lett* **2019**, *449*, 207-214. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.02.035 From NLM.
46. Mort, J. S.; Buttle, D. J. *Int J Biochem Cell Biol* **1997**, *29* (5), 715-720. DOI: 10.1016/s1357-2725(96)00152-5 From NLM.
47. Turk, D.; Podobnik, M.; Popovic, T.; Katunuma, N.; Bode, W.; Huber, R.; Turk, V. *Biochemistry* **1995**, *34* (14), 4791-4797. DOI: 10.1021/bi00014a037.
48. Krupa, J. C.; Hasnain, S.; Nägler, D. K.; Ménard, R.; Mort, J. S. *Biochem J* **2002**, *361* (Pt 3), 613-619. DOI: 10.1042/0264-6021:3610613 From NLM.
49. Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R. A.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N.; et al. *Embo j* **1991**, *10* (9), 2321-2330. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07771.x From NLM.
50. Modenbach, J. M.; Möller, C.; Asgarbeik, S.; Geist, N.; Rimkus, N.; Dörr, M.; Wolfgramm, H.; Steil, L.; Susemihl, A.; Graf, L. *Nature Communications* **2025**, *16* (1), 1702.

51. Egorova, V. S.; Kolesova, E. P.; Lopus, M.; Yan, N.; Parodi, A.; Zamyatnin, A. A., Jr. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (7). DOI: 10.3390/pharmaceutics15071848 From NLM.
52. Baici, A.; Müntener, K.; Willimann, A.; Zwicky, R. *Biol Chem* **2006**, *387* (8), 1017-1021. DOI: 10.1515/bc.2006.125 From NLM.
53. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51* (D1), D523-d531. DOI: 10.1093/nar/gkac1052 From NLM.
54. Aisa, M. C.; Beccari, T.; Costanzi, E.; Maggio, D. *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1621* (2), 149-159. DOI: 10.1016/s0304-4165(03)00054-0 From NLM.
55. Patel, S.; Homaei, A.; El-Seedi, H. R.; Akhtar, N. *Biomed Pharmacother* **2018**, *105*, 526-532. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.148 From NLM.
56. Müller, S.; Dennemärker, J.; Reinheckel, T. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1824* (1), 34-43. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.07.003 From NLM.
57. Vancompernelle, K.; Van Herreweghe, F.; Pynaert, G.; Van de Craen, M.; De Vos, K.; Totty, N.; Sterling, A.; Fiers, W.; Vandenabeele, P.; Grooten, J. *FEBS Lett* **1998**, *438* (3), 150-158. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01275-7 From NLM.
58. Chwieralski, C. E.; Welte, T.; Bühling, F. *Apoptosis* **2006**, *11* (2), 143-149. DOI: 10.1007/s10495-006-3486-y From NLM.
59. Hishita, T.; Tada-Oikawa, S.; Tohyama, K.; Miura, Y.; Nishihara, T.; Tohyama, Y.; Yoshida, Y.; Uchiyama, T.; Kawanishi, S. *Cancer Res* **2001**, *61* (7), 2878-2884. From NLM.
60. Kuang, F.; Liu, J.; Li, C.; Kang, R.; Tang, D. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**, *533* (4), 1464-1469. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.10.035 From NLM.
61. Creasy, B. M.; McCoy, K. L. *Cell Immunol* **2011**, *267* (1), 56-66. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.11.004 From NLM.
62. Hämälistö, S.; Stahl, J. L.; Favaro, E.; Yang, Q.; Liu, B.; Christoffersen, L.; Loos, B.; Guasch Boldú, C.; Joyce, J. A.; Reinheckel, T.; et al. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 229. DOI: 10.1038/s41467-019-14009-0 From NLM.

63. Funk, L. C.; Zasadil, L. M.; Weaver, B. A. *Dev Cell* **2016**, *39* (6), 638-652. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.10.023 From NLM.
64. Gocheva, V.; Zeng, W.; Ke, D.; Klimstra, D.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Hanahan, D.; Joyce, J. A. *Genes Dev* **2006**, *20* (5), 543-556. DOI: 10.1101/gad.1407406 From NLM.
65. Padamsey, Z.; McGuinness, L.; Bardo, S. J.; Reinhart, M.; Tong, R.; Hedegaard, A.; Hart, M. L.; Emptage, N. J. *Neuron* **2017**, *93* (1), 132-146. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.11.013 From NLM.
66. Morikawa, M.; Derynck, R.; Miyazono, K. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8* (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a021873 From NLM.
67. Reisenauer, A.; Eickelberg, O.; Wille, A.; Heimburg, A.; Reinhold, A.; Sloane, B. F.; Welte, T.; Bühling, F. *Biol Chem* **2007**, *388* (6), 639-650. DOI: 10.1515/bc.2007.072 From NLM.
68. Li, X.; Wei, Z.; Yu, H.; Xu, Y.; He, W.; Zhou, X.; Gou, X. *Cancer Lett* **2021**, *523*, 10-28. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.09.036 From NLM.
69. Vasiljeva, O.; Papazoglou, A.; Krüger, A.; Brodoefel, H.; Korovin, M.; Deussing, J.; Augustin, N.; Nielsen, B. S.; Almholt, K.; Bogoyo, M.; et al. *Cancer Res* **2006**, *66* (10), 5242-5250. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-05-4463 From NLM.
70. Ho, K. H.; Cheng, C. H.; Chou, C. M.; Chen, P. H.; Liu, A. J.; Lin, C. W.; Shih, C. M.; Chen, K. C. *Pharmacol Res* **2019**, *147*, 104390. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104390 From NLM.
71. Podgorski, I.; Sloane, B. F. *Biochem Soc Symp* **2003**, (70), 263-276. DOI: 10.1042/bss0700263 From NLM.
72. Fournier, A.; Sasai, N.; Nakao, M.; Defossez, P. A. *Brief Funct Genomics* **2012**, *11* (3), 251-264. DOI: 10.1093/bfgp/elr040 From NLM.
73. Yoon, H. G.; Chan, D. W.; Reynolds, A. B.; Qin, J.; Wong, J. *Mol Cell* **2003**, *12* (3), 723-734. DOI: 10.1016/j.molcel.2003.08.008 From NLM.

74. Cain, J. A.; Montibus, B.; Oakey, R. J. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *10*, 832348. DOI: 10.3389/fcell.2022.832348 From NLM.
75. Jones, P. A. *Nat Rev Genet* **2012**, *13* (7), 484-492. DOI: 10.1038/nrg3230 From NLM.
76. Luo, Y.; Hitz, B. C.; Gabdank, I.; Hilton, J. A.; Kagda, M. S.; Lam, B.; Myers, Z.; Sud, P.; Jou, J.; Lin, K.; et al. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48* (D1), D882-d889. DOI: 10.1093/nar/gkz1062 From NLM.
77. Malone, K. L.; Singh, A. K.; Lignos, J. M.; Cook, E. D.; Phillips, M.; Boyle, B. W.; Kressy, I. A.; Vulikh, M.; Lathrop, A. K.; McKay, K. T. *Genome Biology* **2026**.
78. Fernández-Serrano, M.; Winkler, R.; Santos, J. C.; Le Pannérer, M.-M.; Buschbeck, M.; Roué, G. *International journal of molecular sciences* **2021**, *23* (1), 253.
79. Herranz, M.; Esteller, M. *Target Discovery and Validation Reviews and Protocols: Volume 2: Emerging Molecular Targets and Treatment Options* **2007**, 25-62.
80. Thompson, L. L.; Guppy, B. J.; Sawchuk, L.; Davie, J. R.; McManus, K. J. *Cancer and Metastasis Reviews* **2013**, *32* (3), 363-376.
81. Vaughan, R. M.; Kupai, A.; Rothbart, S. B. *Trends in biochemical sciences* **2021**, *46* (4), 258-269.
82. Yu, H.; Lesch, B. J. *Mol Cell Biol* **2024**, *44* (11), 505-515. DOI: 10.1080/10985549.2024.2388254 From NLM.
83. Li, J.; Tao, X.; Shen, J.; Liu, L.; Zhao, Q.; Ma, Y.; Tao, Z.; Zhang, Y.; Ding, B.; Xiao, Z. *Int J Med Sci* **2019**, *16* (7), 922-930. DOI: 10.7150/ijms.34322 From NLM.
84. Mohamed, M. M.; Sloane, B. F. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6* (10), 764-775. DOI: 10.1038/nrc1949 From NLM.
85. Szpaderska, A. M.; Silberman, S.; Ahmed, Y.; Frankfater, A. *Anticancer Res* **2004**, *24* (6), 3887-3891. From NLM.

86. Yan, S.; Jane, D. T.; Dufresne, M. J.; Sloane, B. F. *Biol Chem* **2003**, *384* (10-11), 1421-1427. DOI: 10.1515/bc.2003.157 From NLM.
87. Switzer, C. H.; Cheng, R. Y.; Ridnour, L. A.; Glynn, S. A.; Ambs, S.; Wink, D. A. *Breast Cancer Res* **2012**, *14* (5), R125. DOI: 10.1186/bcr3319 From NLM.
88. Bien, S.; Ritter, C. A.; Gratz, M.; Sperker, B.; Sonnemann, J.; Beck, J. F.; Kroemer, H. K. *Mol Pharmacol* **2004**, *65* (5), 1092-1102. DOI: 10.1124/mol.65.5.1092 From NLM.
89. Gao, H.; Bai, Y.; Jia, Y.; Zhao, Y.; Kang, R.; Tang, D.; Dai, E. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *503* (3), 1550-1556. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.078 From NLM.
90. Kreuzaler, P. A.; Staniszewska, A. D.; Li, W.; Omidvar, N.; Kedjouar, B.; Turkson, J.; Poli, V.; Flavell, R. A.; Clarkson, R. W.; Watson, C. J. *Nat Cell Biol* **2011**, *13* (3), 303-309. DOI: 10.1038/ncb2171 From NLM.
91. You, L.; Wang, Z.; Li, H.; Shou, J.; Jing, Z.; Xie, J.; Sui, X.; Pan, H.; Han, W. *Autophagy* **2015**, *11* (5), 729-739. DOI: 10.1080/15548627.2015.1017192 From NLM.
92. Lin, Z.; Zhao, S.; Li, X.; Miao, Z.; Cao, J.; Chen, Y.; Shi, Z.; Zhang, J.; Wang, D.; Chen, S.; et al. *Cell Res* **2023**, *33* (7), 546-561. DOI: 10.1038/s41422-023-00812-4 From NLM.
93. McGeary, S. E.; Lin, K. S.; Shi, C. Y.; Pham, T. M.; Bisaria, N.; Kelley, G. M.; Bartel, D. P. *Science* **2019**, *366* (6472). DOI: 10.1126/science.aav1741 From NLM.
94. Yan, W.; Feng, Y.; Lei, Z.; Kuang, W.; Long, C. *Folia Biol (Praha)* **2022**, *68* (2), 78-85. DOI: 10.14712/fb2022068020078 From NLM.
95. Zhang, L.; Qiu, J.; Shi, J.; Liu, S.; Zou, H. *Bioengineered* **2021**, *12* (2), 9949-9964. DOI: 10.1080/21655979.2021.1985342 From NLM.
96. Lan, X.; Liu, X.; Sun, J.; Yuan, Q.; Li, J. *Biochem Biophys Res Commun* **2019**, *516* (2), 357-364. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.06.044 From NLM.

97. Pathak, V. K.; Schindler, D.; Hershey, J. W. *Mol Cell Biol* **1988**, *8* (2), 993-995. DOI: 10.1128/mcb.8.2.993-995.1988 From NLM.
98. Thoreen, C. C.; Chantranupong, L.; Keys, H. R.; Wang, T.; Gray, N. S.; Sabatini, D. M. *Nature* **2012**, *485* (7396), 109-113. DOI: 10.1038/nature11083 From NLM.
99. Iacobuzio-Donahue, C. A.; Shuja, S.; Cai, J.; Peng, P.; Murnane, M. J. *J Biol Chem* **1997**, *272* (46), 29190-29199. DOI: 10.1074/jbc.272.46.29190 From NLM.
100. Kim, K. R.; Cho, E. J.; Eom, J. W.; Oh, S. S.; Nakamura, T.; Oh, C. K.; Lipton, S. A.; Kim, Y. H. *Cell Death Differ* **2022**, *29* (11), 2137-2150. DOI: 10.1038/s41418-022-01004-0 From NLM.
101. Rudzińska, M.; Parodi, A.; Maslova, V. D.; Efremov, Y. M.; Gorokhovets, N. V.; Makarov, V. A.; Popkov, V. A.; Golovin, A. V.; Zernii, E. Y.; Zamyatnin, A. A. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (5). DOI: 10.3390/cancers12051310 From NLM.
102. Raghav, N.; Jangra, S.; Kumar, A.; Bhattacharyya, S. *Int J Biol Macromol* **2017**, *94* (Pt A), 719-727. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.001 From NLM.
103. Frlan, R.; Gobec, S. *Curr Med Chem* **2006**, *13* (19), 2309-2327. DOI: 10.2174/092986706777935122 From NLM.
104. Turk, V.; Stoka, V.; Turk, D. *Front Biosci* **2008**, *13*, 5406-5420. DOI: 10.2741/3089 From NLM.
105. Abrahamson, M.; Alvarez-Fernandez, M.; Nathanson, C. M. *Biochem Soc Symp* **2003**, (70), 179-199. DOI: 10.1042/bss0700179 From NLM.
106. Nycander, M.; Estrada, S.; Mort, J. S.; Abrahamson, M.; Björk, I. *FEBS Lett* **1998**, *422* (1), 61-64. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01604-9 From NLM.
107. Lindahl, P.; Ripoll, D.; Abrahamson, M.; Mort, J. S.; Storer, A. C. *Biochemistry* **1994**, *33* (14), 4384-4392. DOI: 10.1021/bi00180a036 From NLM.
108. Alakurtti, K.; Weber, E.; Rinne, R.; Theil, G.; de Haan, G. J.; Lindhout, D.; Salmikangas, P.; Saukko, P.; Lahtinen, U.; Lehesjoki, A. E. *Eur J Hum Genet* **2005**, *13* (2), 208-215. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201300 From NLM.

109. Breznik, B.; Mitrović, A.; T, T. L.; Kos, J. *Biochimie* **2019**, *166*, 233-250. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.05.002 From NLM.
110. Zhang, D.; Sun, B. Y.; Wu, J. F.; Wang, Z. T.; Zheng, S. S.; Sun, G. Q.; Gao, X. K.; Zhou, J.; Fan, J.; Hu, B.; et al. *Curr Oncol* **2025**, *32* (2). DOI: 10.3390/currenol32020056 From NLM.
111. Jiang, Y.; Han, L.; Xue, M.; Wang, T.; Zhu, Y.; Xiong, C.; Shi, M.; Li, H.; Hai, W.; Huo, Y.; et al. *Clin Transl Med* **2022**, *12* (12), e1126. DOI: 10.1002/ctm2.1126 From NLM.
112. Takahashi, H.; Asano, K.; Kinouchi, M.; Ishida-Yamamoto, A.; Wuepper, K. D.; Iizuka, H. *J Biol Chem* **1998**, *273* (28), 17375-17380. DOI: 10.1074/jbc.273.28.17375 From NLM.
113. Yamazaki, M.; Ishidoh, K.; Kominami, E.; Ogawa, H. *DNA Seq* **1997**, *8* (1-2), 71-76. DOI: 10.3109/10425179709020888 From NLM.
114. Martin, J. R.; Craven, C. J.; Jerala, R.; Kroon-Zitko, L.; Zerovnik, E.; Turk, V.; Waltho, J. P. *J Mol Biol* **1995**, *246* (2), 331-343. DOI: 10.1006/jmbi.1994.0088 From NLM.
115. Pol, E.; Olsson, S. L.; Estrada, S.; Prasthofer, T. W.; Björk, I. *Biochem J* **1995**, *311* (Pt 1) (Pt 1), 275-282. DOI: 10.1042/bj3110275 From NLM.
116. Estrada, S.; Olson, S. T.; Raub-Segall, E.; Björk, I. *Protein Sci* **2000**, *9* (11), 2218-2224. DOI: 10.1110/ps.9.11.2218 From NLM.
117. Pavlova, A.; Björk, I. *Eur J Biochem* **2002**, *269* (22), 5649-5658. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03273.x From NLM.
118. Estrada, S.; Pavlova, A.; Björk, I. *Biochemistry* **1999**, *38* (22), 7339-7345. DOI: 10.1021/bi990003s From NLM.
119. Illy, C.; Quraishi, O.; Wang, J.; Purisima, E.; Vernet, T.; Mort, J. S. *J Biol Chem* **1997**, *272* (2), 1197-1202. DOI: 10.1074/jbc.272.2.1197 From NLM.
120. Takahashi, H.; Komatsu, N.; Ibe, M.; Ishida-Yamamoto, A.; Hashimoto, Y.; Iizuka, H. *J Dermatol Sci* **2007**, *46* (3), 179-187. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2007.02.003 From NLM.

121. Ma, Y.; Chen, Y.; Li, Y.; Grün, K.; Berndt, A.; Zhou, Z.; Petersen, I. *Oncotarget* **2018**, *9* (18), 14084-14098. DOI: 10.18632/oncotarget.23505 From NLM.
122. Strojnik, T.; Zajc, I.; Bervar, A.; Zidanik, B.; Golouh, R.; Kos, J.; Dolenc, V.; Lah, T. *Pflugers Arch* **2000**, *439* (3 Suppl), R122-123. From NLM.
123. Gole, B.; Huszthy, P. C.; Popović, M.; Jeruc, J.; Ardebili, Y. S.; Bjerkgvig, R.; Lah, T. T. *Int J Cancer* **2012**, *131* (8), 1779-1789. DOI: 10.1002/ijc.27453 From NLM.
124. Habič, A.; Novak, M.; Majc, B.; Lah Turnšek, T.; Breznik, B. *J Histochem Cytochem* **2021**, *69* (12), 775-794. DOI: 10.1369/00221554211035192 From NLM.
125. Budihna, M.; Strojjan, P.; Smid, L.; Skrk, J.; Vrhovec, I.; Zupevc, A.; Rudolf, Z.; Zargi, M.; Krasovec, M.; Svetic, B.; et al. *Biol Chem Hoppe Seyler* **1996**, *377* (6), 385-390. DOI: 10.1515/bchm3.1996.377.6.385 From NLM.
126. Withana, N. P.; Blum, G.; Sameni, M.; Slaney, C.; Anbalagan, A.; Olive, M. B.; Bidwell, B. N.; Edgington, L.; Wang, L.; Moin, K.; et al. *Cancer Res* **2012**, *72* (5), 1199-1209. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-11-2759 From NLM.
127. van Hagen, P.; Hulshof, M. C.; van Lanschot, J. J.; Steyerberg, E. W.; van Berge Henegouwen, M. I.; Wijnhoven, B. P.; Richel, D. J.; Nieuwenhuijzen, G. A.; Hospers, G. A.; Bonenkamp, J. J.; et al. *N Engl J Med* **2012**, *366* (22), 2074-2084. DOI: 10.1056/NEJMoa1112088 From NLM.
128. Achilli, P.; Crippa, J.; Grass, F.; Mathis, K. L.; D'Angelo, A. D.; Abd El Aziz, M. A.; Day, C. N.; Harmsen, W. S.; Larson, D. W. *Int J Cancer* **2021**, *148* (1), 161-169. DOI: 10.1002/ijc.33203 From NLM.
129. Kelland, L. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (8), 573-584. DOI: 10.1038/nrc2167 From NLM.
130. Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (5), 330-338. DOI: 10.1038/nrc1074 From NLM.

131. Pommier, Y. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6* (10), 789-802. DOI: 10.1038/nrc1977 From NLM.
132. Dumontet, C.; Jordan, M. A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9* (10), 790-803. DOI: 10.1038/nrd3253.
133. Tewey, K. M.; Rowe, T. C.; Yang, L.; Halligan, B. D.; Liu, L. F. *Science* **1984**, *226* (4673), 466-468. DOI: 10.1126/science.6093249 From NLM.
134. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. *Chem Biol* **2010**, *17* (5), 421-433. DOI: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012 From NLM.
135. Gorini, S.; De Angelis, A.; Berrino, L.; Malara, N.; Rosano, G.; Ferraro, E. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, 7582730. DOI: 10.1155/2018/7582730 From NLM.
136. Gilliam, L. A.; Moylan, J. S.; Patterson, E. W.; Smith, J. D.; Wilson, A. S.; Rabbani, Z.; Reid, M. B. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012**, *302* (1), C195-202. DOI: 10.1152/ajpcell.00217.2011 From NLM.
137. Octavia, Y.; Tocchetti, C. G.; Gabrielson, K. L.; Janssens, S.; Crijns, H. J.; Moens, A. L. *J Mol Cell Cardiol* **2012**, *52* (6), 1213-1225. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006 From NLM.
138. Nielsen, O. S.; Dombernowsky, P.; Mouridsen, H.; Daugaard, S.; Van Glabbeke, M.; Kirkpatrick, A.; Verweij, J. *Sarcoma* **2000**, *4* (1-2), 31-35. DOI: 10.1155/s1357714x00000062 From NLM.
139. Wallace, K. B.; Sardão, V. A.; Oliveira, P. J. *Circ Res* **2020**, *126* (7), 926-941. DOI: 10.1161/circresaha.119.314681 From NLM.
140. Lowe, S. W.; Ruley, H. E.; Jacks, T.; Housman, D. E. *Cell* **1993**, *74* (6), 957-967. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90719-7 From NLM.
141. Yi, X.; Bekeredjian, R.; DeFilippis, N. J.; Siddiquee, Z.; Fernandez, E.; Shohet, R. V. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2006**, *290* (3), H1098-1102. DOI: 10.1152/ajpheart.00832.2005 From NLM.
142. Tsang, W. P.; Chau, S. P.; Kong, S. K.; Fung, K. P.; Kwok, T. T. *Life Sci* **2003**, *73* (16), 2047-2058. DOI: 10.1016/s0024-3205(03)00566-6 From NLM.

143. Simůnek, T.; Stérba, M.; Popelová, O.; Adamcová, M.; Hrdina, R.; Gersl, V. *Pharmacol Rep* **2009**, *61* (1), 154-171. DOI: 10.1016/s1734-1140(09)70018-0 From NLM.
144. Tantawy, M.; Pamittan, F. G.; Singh, S.; Gong, Y. *Clin Transl Sci* **2021**, *14* (1), 36-46. DOI: 10.1111/cts.12857 From NLM.
145. Li, Y.; Yan, J.; Yang, P. *Cell Stress Chaperones* **2024**, *29* (5), 666-680. DOI: 10.1016/j.cstres.2024.09.001 From NLM.
146. Liu, C.; Cai, Z.; Hu, T.; Yao, Q.; Zhang, L. *Molecular medicine reports* **2020**, *22* (6), 4848-4856.
147. Li, D. L.; Wang, Z. V.; Ding, G.; Tan, W.; Luo, X.; Criollo, A.; Xie, M.; Jiang, N.; May, H.; Kyrychenko, V.; et al. *Circulation* **2016**, *133* (17), 1668-1687. DOI: 10.1161/circulationaha.115.017443 From NLM.
148. Palermo, C.; Joyce, J. A. *Trends Pharmacol Sci* **2008**, *29* (1), 22-28. DOI: 10.1016/j.tips.2007.10.011 From NLM.
149. Gondi, C. S.; Rao, J. S. *Expert Opin Ther Targets* **2013**, *17* (3), 281-291. DOI: 10.1517/14728222.2013.740461 From NLM.
150. Koblinski, J. E.; Ahram, M.; Sloane, B. F. *Clin Chim Acta* **2000**, *291* (2), 113-135. DOI: 10.1016/s0009-8981(99)00224-7 From NLM.
151. Lo Giudice, C.; Zambelli, F.; Chiara, M.; Pavesi, G.; Tangaro, M. A.; Picardi, E.; Pesole, G. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51* (D1), D337-d344. DOI: 10.1093/nar/gkac1016 From NLM.
152. Srisomsap, C.; Subhasitanont, P.; Otto, A.; Mueller, E. C.; Punyarit, P.; Wittmann-Liebold, B.; Svasti, J. *Proteomics* **2002**, *2* (6), 706-712. DOI: 10.1002/1615-9861(200206)2:6<706::Aid-prot706>3.0.Co;2-e From NLM.
153. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S. C. *Signal Transduct Target Ther* **2017**, *2*, 17023-. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23 From NLM.
154. Krebs, D. L.; Hilton, D. J. *Stem Cells* **2001**, *19* (5), 378-387. DOI: 10.1634/stemcells.19-5-378 From NLM.

155. Zamyatnin, A. A., Jr.; Gregory, L. C.; Townsend, P. A.; Soond, S. M. *Expert Opin Ther Targets* **2022**, *26* (11), 963-977. DOI: 10.1080/14728222.2022.2161888 From NLM.
156. Xie, Z.; Zhao, M.; Yan, C.; Kong, W.; Lan, F.; Narengaowa; Zhao, S.; Yang, Q.; Bai, Z.; Qing, H.; et al. *Cell Death Dis* **2023**, *14* (4), 255. DOI: 10.1038/s41419-023-05786-0 From NLM.
157. Tang, Z.; Kang, B.; Li, C.; Chen, T.; Zhang, Z. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (W1), W556-w560. DOI: 10.1093/nar/gkz430 From NLM.
158. Matarrese, P.; Ascione, B.; Ciarlo, L.; Vona, R.; Leonetti, C.; Scarsella, M.; Mileo, A. M.; Catricalà, C.; Paggi, M. G.; Malorni, W. *Mol Cancer* **2010**, *9*, 207. DOI:10.1186/1476-4598-9-207 From NLM.
159. Frolova, A. S.; Tikhomirova, N. K.; Kireev, II; Zernii, E. Y.; Parodi, A.; Ivanov, K. I.; Zamyatnin, A. A., Jr. *Biochemistry (Mosc)* **2023**, *88* (7), 1034-1044. DOI: 10.1134/s0006297923070143 From NLM.
160. Strojjan, P.; Budihna, M.; Smid, L.; Svetic, B.; Vrhovec, I.; Kos, J.; Skrk, J. *Clin Cancer Res* **2000**, *6* (3), 1052-1062. From NLM.
161. Rasnick, D. *Anal Biochem* **1985**, *149* (2), 461-465. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90598-6 From NLM.
162. Swain, S. M.; Whaley, F. S.; Ewer, M. S. *Cancer* **2003**, *97* (11), 2869-2879. DOI: 10.1002/cncr.11407 From NLM.
163. Guo, Y.; Tang, Y.; Lu, G.; Gu, J. *Nutrients* **2023**, *15* (10). DOI: 10.3390/nu15102259 From NLM.
164. Zhang, Y. W.; Shi, J.; Li, Y. J.; Wei, L. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2009**, *57* (6), 435-445. DOI: 10.1007/s00005-009-0051-8 From NLM.
165. Wang, S.; Konorev, E. A.; Kotamraju, S.; Joseph, J.; Kalivendi, S.; Kalyanaraman, B. *J Biol Chem* **2004**, *279* (24), 25535-25543. DOI: 10.1074/jbc.M400944200 From NLM.

166. Stamm, P.; Kirmes, I.; Palmer, A.; Molitor, M.; Kvandova, M.; Kalinovic, S.; Mihalikova, D.; Reid, G.; Wenzel, P.; Münzel, T.; et al. *Life Sci* **2021**, *284*, 119879. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119879 From NLM.
167. Bulynko, Y. A.; Hsing, L. C.; Mason, R. W.; Tremethick, D. J.; Grigoryev, S. A. *Molecular and cellular biology* **2006**, *26* (11), 4172-4184.
168. Chang, S.; Moon, R.; Nam, D.; Lee, S.-W.; Yoon, I.; Lee, D.-S.; Choi, S.; Paek, E.; Hwang, D.; Hur, J. K. *Nucleic acids research* **2025**, *53* (3), gkae1210.
169. Li, Z.; Peluffo, G.; Stevens, L. E.; Qiu, X.; Seehawer, M.; Tawawalla, A.; Huang, X.-Y.; Egri, S. B.; Raval, S.; McFadden, M. *Nature Genetics* **2025**, *57* (6), 1463-1477.
170. Duncan, E. M. *Journal of Biological Chemistry* **2025**, *301* (7).
171. Čeru, S.; Konjar, Š.; Maher, K.; Repnik, U.; Križaj, I.; Benčina, M.; Renko, M.; Nepveu, A.; Žerovnik, E.; Turk, B. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (13), 10078-10086.
172. Li, C.; Sun, S.; Zhuang, Y.; Luo, Z.; Ji, G.; Liu, Z. *Molecular Biotechnology* **2024**, *66* (9), 2583-2594.