

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в научном центре Трансляционной медицины автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Научный руководитель:

Змятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, и.о. декана факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Защита состоится 7 июля 2026 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.3.11 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» <https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh>

Автореферат разослан « 5 » июля 2026 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Зверева С.Д

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. 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 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. Изменения активности или локализации этих ферментов связаны с различными патологиями, включая, 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.

Среди 15 протеиназ, CTSB представляет особый интерес. Он конститутивно экспрессируется в здоровых клетках, где участвует в клеточном метаболизме и опосредует апоптоз, индуцированный цитохромом С (Cyt C). В злокачественных новообразованиях он инициирует протеолитический каскад путем активации матриксных металлопротеиназ (ММП), например ММП–9. Таким образом, CTSB контролирует эпителиально–мезенхимальный переход (ЭМП). Это способствует инвазии и впоследствии метастазированию. Кроме индукции ЭМП, CTSB напрямую участвует в деградации белков межклеточных контактов, таких как E-кадгерин, что дополнительно усиливает подвижность опухолевых клеток.

В физиологических условиях протеолитическая активность CTSB регулируется его природными ингибиторами - цистатинами. Согласно литературным данным, стефийн А (STFA) способен связываться с CTSB в активном центре и ингибировать его активность, что было показано на клетках рака почки человека. 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.

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 769p.

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 769p 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. 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 гистоном H3. При повышении экспрессии CTSB, транслокация STFA в ядро увеличивается по сравнению с базальным уровнем.
4. Воздействие доxorубина (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.

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). Также автор принимал участие в интерпретации результатов экспериментов и в написании публикаций. Плазмиды, использованные в работе были получены в лаборатории ранее (Гороховец Неонила Васильевна).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

3.1 Гены *катепсина В* и *стефина А* ко-экспрессируются в нетрансформированных и опухолевых клетках

Дисбаланс *CTSB* в клетках связан с неблагоприятным прогнозом при различных формах злокачественных новообразований. Перспективной стратегией таргетной терапии является модуляция эндогенной активности *CTSB*, основанная на изучении молекулярных механизмов регуляции его экспрессии и функций.

Мы сфокусировались на изучение взаимодействия *CTSB* с его естественным ингибитором— *STFA*. Мы начали свое исследование с изучения корреляции на уровне мРНК. Для этого мы провели серию транзientных трансфекций с использованием плазмид, несущих целевые гены— *pCTSB* и *pSTFA* соответственно (Рисунок 1).

Ключевым результатом стало отсутствие статистически значимого увеличения уровня транскрипта гена *CTSB* в линии эмбриональных клеток почки человека Нек293Т 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 транзientная трансфекция плазмидой *pSTFA* не приводила к достоверным изменениям в количестве мРНК *CTSB*.

После трансфекции плазмидой, содержащей ген функционального *CTSB*, уровень мРНК *STFA* снижается во всех клеточных линиях. Поскольку структура транскрипта *STFA* исключает его деградацию через AU-зависимый и miR-опосредованные пути, наблюдаемый эффект, вероятно, реализуется через альтернативные механизмы контроля стабильности мРНК.. Также это может означать не только деградацию транскрипта, но и увеличение скорости трансляции мРНК *STFA* в функциональный полипептид. При этом трансфекция плазмидой *pSTFA* всегда приводила к достоверному увеличению транскрипта *STFA*.

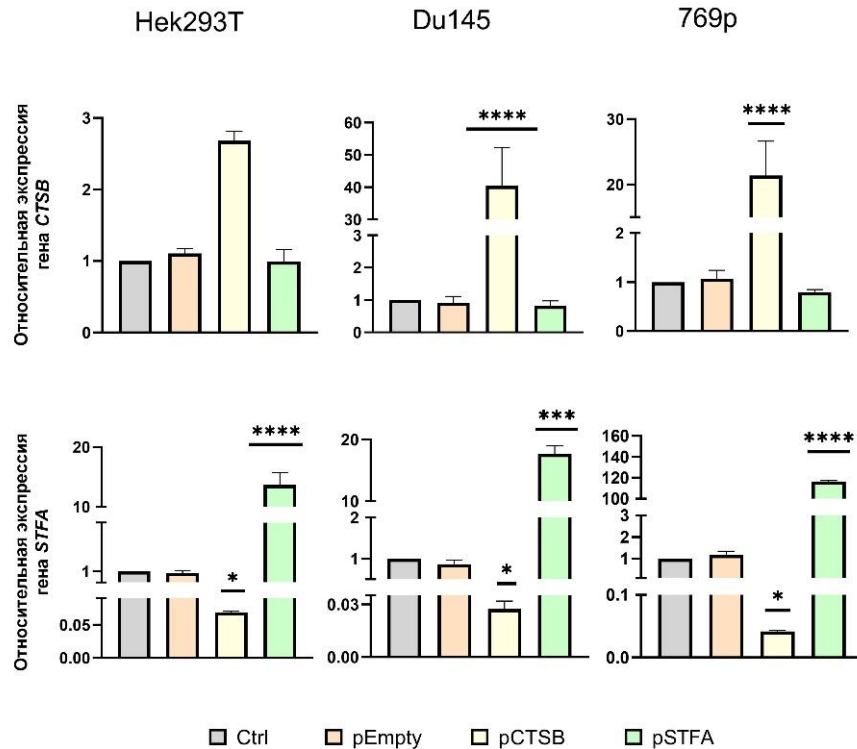


Рисунок 1. Изменение экспрессии генов *CTSB* и *STFA*: экспрессия мРНК *CTSB* и *STFA* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSБ 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 – pShCTSБ и pShSTFA соответственно (Рисунок 2).

Трансфекция конструкцией pShCTSБ 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

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*.

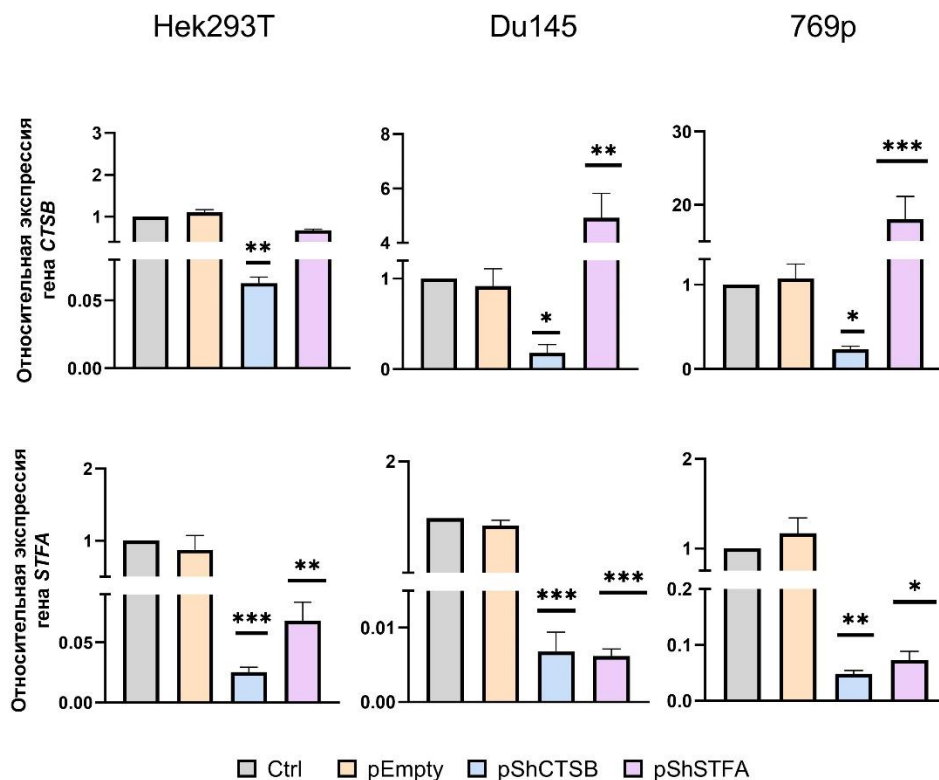


Рисунок 2. Изменение экспрессии генов *CTSB* и *STFA*: экспрессия мРНК *CTSB* и *STFA* в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими 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. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

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, что согласуется с опубликованными данными для рака почки человека. Таким образом, логическим продолжением работы явился анализ корреляции между уровнями соответствующих функциональных белков.

Как показано на рисунке 3, трансфекция конструкцией рСТSB 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. Во всех клеточных линиях наблюдается достоверное снижение белка CTSB после трансфекции рSTFA, что согласуется с моделью взаимодействия «белок-ингибитор», описанной в литературе.

Мы также оценили экспрессию STFA (Рисунок 3). 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 CTSB, уровень STFA 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.

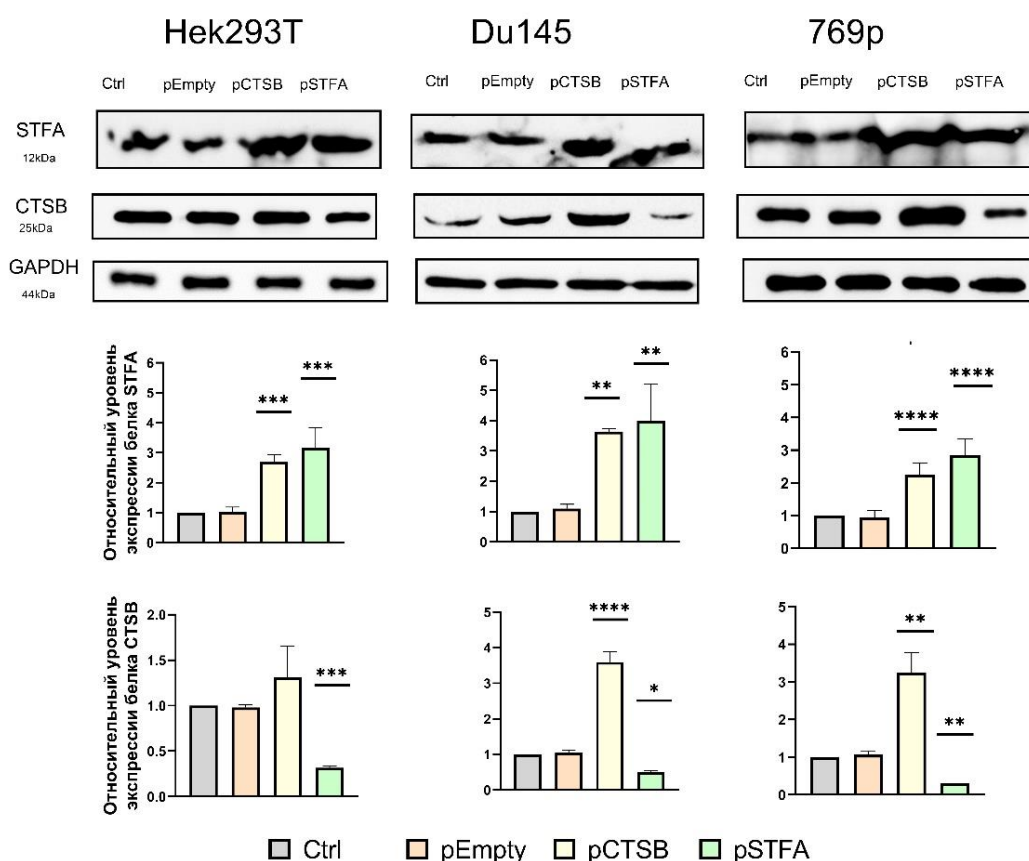


Рисунок 3. Изменение экспрессии белков CTSB и STFA: экспрессия STFA в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB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

Для выяснения функциональной роли исследуемых генов был применен метод нокдауна их экспрессии с использованием конструкций для сайленсинга целевых генов. (Рисунок 4).

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

Наряду с ожидаемым снижением уровня экспрессии STFA при нокдауне гена *STFA*, было обнаружено статистически значимое уменьшение содержания STFA при нокдауне гена *CTSB* во всех клеточных линиях. 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 CTSB, вероятно, реализуемой через механизм отрицательной обратной связи.

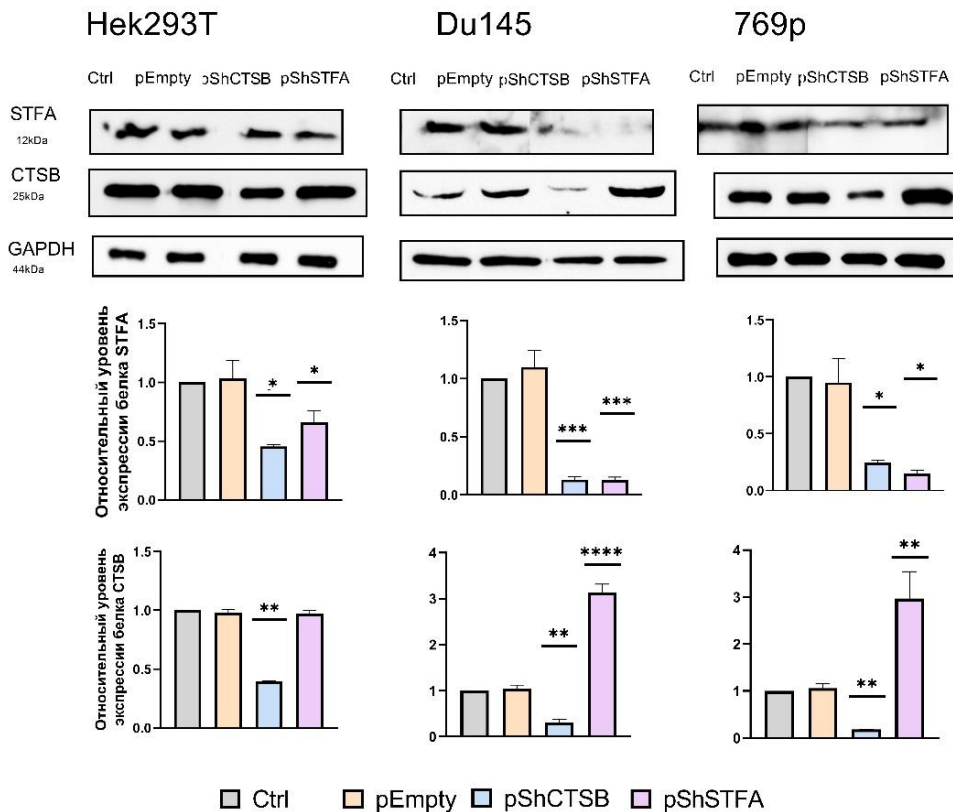


Рисунок 4. Изменение экспрессии белков CTSB и STFA: экспрессия CTSB в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими шпилечные конструкции 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. В то же время изменение его внутриклеточной локализации, например, переход из лизосом в цитозоль, индуцирует активацию проапоптотических каскадов и гибель клеток. 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.

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 как экспериментальными данными, так и данными из открытой базы данных GEPIA. Повышенная экспрессия CTSB в раковых клеточных линиях, по сравнению со здоровыми, также подтверждена экспериментально и клинически.

Как показано на рисунке 5, в случае с pCTSB в линии нераковых клеток Нек293Т 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. 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 5. Количественный анализ показал, что во всех исследуемых клеточных линиях интенсивность флуоресценции в канале, соответствующем STFA, достоверно возрастала 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.

Аналогичный анализ субклеточной локализации был проведен в экспериментах по нокдауну целевых генов.

На рисунке 6 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 только 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 6. Для всех исследуемых клеточных линий транзientная трансфекция плазмидой pShCTSB приводила к равномерному снижению сигнала как в цитоплазме, так и в ядре исследуемых клеточных линий. Уровень интенсивности флуоресценции в канале STFA достоверно снижался после использования pShSTFA.

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. 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.

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 в цитоплазме, но также активно аккумулируется в ядре. Количественный анализ коэффициента ко-локализации выявил значительную степень пространственного перекрытия сигналов STFA и CTSB в обоих клеточных компартментах, что является свидетельством их функционального взаимодействия.

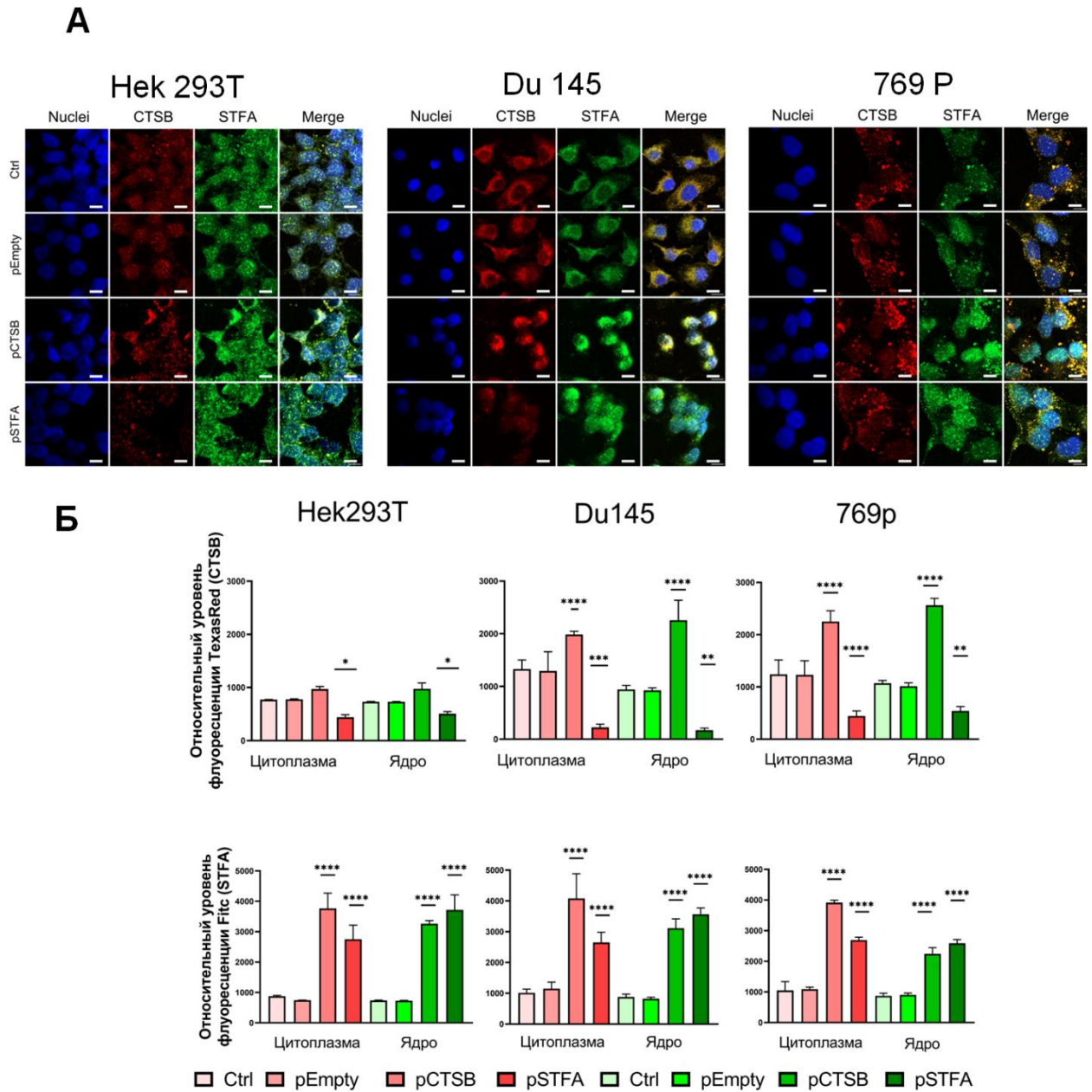


Рисунок 5. Изменение локализации CTSB и STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими гены интереса (pCTSB и pSTFA): А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно 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. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

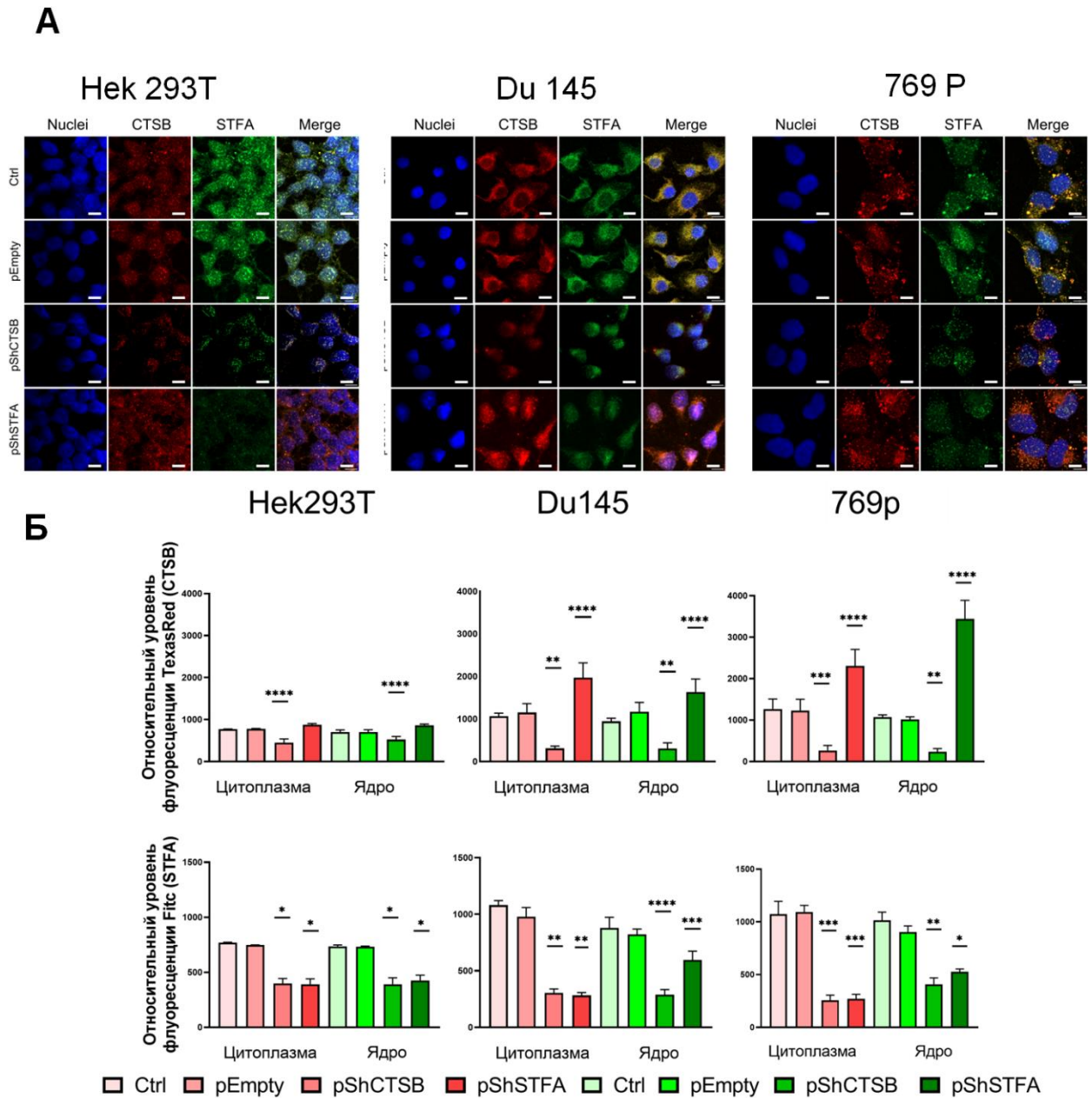


Рисунок 6. Изменение локализации CTSB и STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после трансфекции пустой плазмидой и плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSБ и pShSTFA): А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно мечеными вторичными антителами. В красном канале детектировали TexasRed (CTSБ), в зеленом канале- Fитс (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 (CTSБ) и Fитс (STFA). Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

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. Ранее в лаборатории был синтезирован и запатентован пептидный ингибитор цистеиновых катепсинов Acetyl-Pro-Leu-Val-Glu- фторметил кетон (PLVE). Механизм его действия заключается в необратимом алкилировании активного центра фермента. В предыдущих главах мы показали удивительную обратную корреляцию уровня CTSB и его природного ингибитора STFA. Поэтому нашей следующей задачей стала проверка влияния активности CTSB на продукцию STFA. Для этого клетки обрабатывали ингибиторным пептидом PLVE в концентрации 20 мкМ и через 48 часов проводили соответствующие эксперименты.

Нашим первым шагом стала оценка мРНК целевых генов. Для всех клеточных линий характерно снижение уровня мРНК CTSB и STFA. Полученные данные свидетельствуют о наличии функциональной взаимосвязи между протеолитической активностью CTSB и регуляцией транскрипции как собственной мРНК, так и мРНК STFA. Результаты вестерн-блот анализа согласуются с данными ПЦР анализа и демонстрируют выраженное влияние PLVE-пептида на уровни экспрессии CTSB и STFA в исследуемых клеточных линиях. Эти результаты согласуются с данными, представленными в разделе 3.1, что дополнительно подтверждает роль CTSB в продукции STFA.

Следующим нашим шагом стал анализ локализации с помощью метода конфокальной микроскопии. Как видно на Рисунке 7, 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.

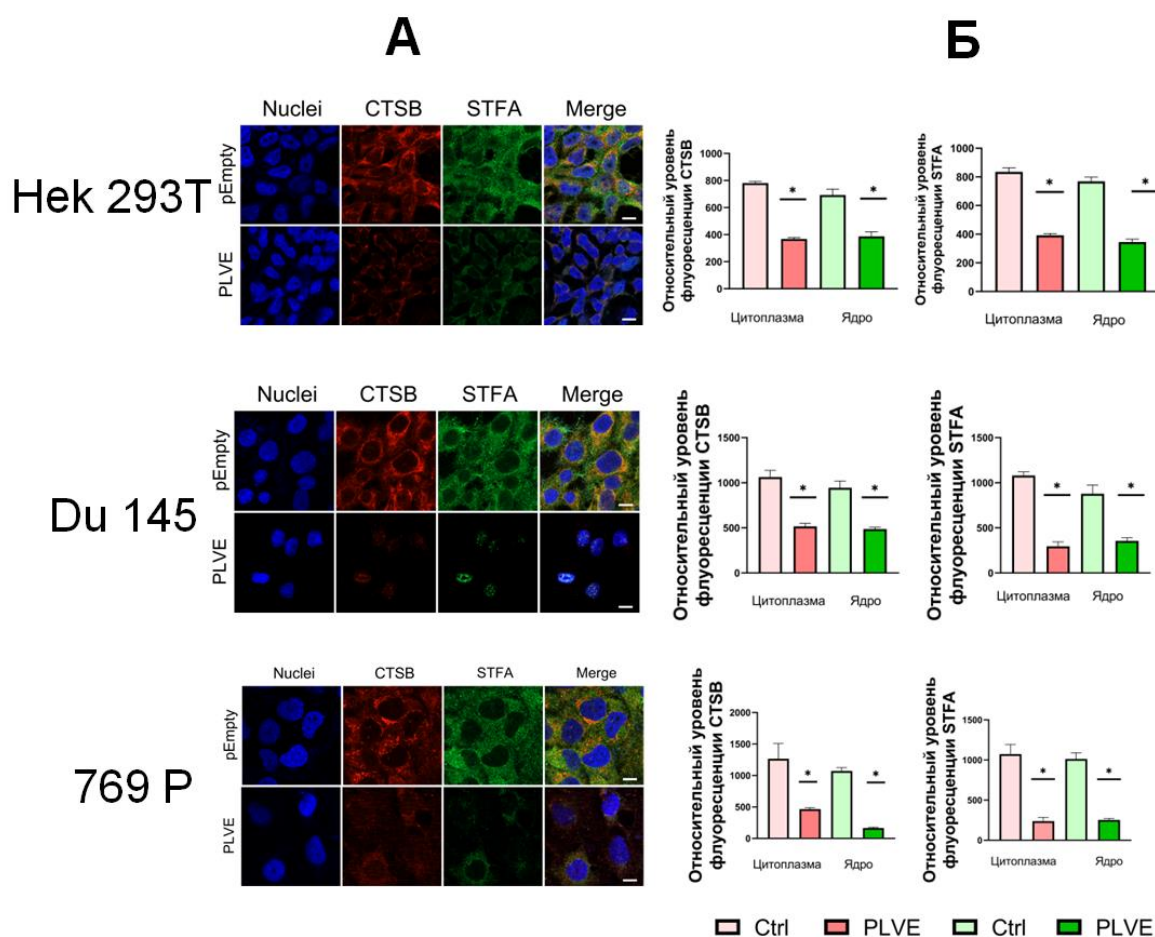


Рисунок 7. Изменение локализации CTSB и STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T, клеточной линии рака простаты человека Du145 и клеточной линии рака почки человека 769p через 48 часов после обработки клеток синтетическим пептидным ингибитором цистеиновых катепсинов cetyl-Pro-Leu-Val-Glu-фторметил кетон (PLVE: 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/ Масштаб линейки - 10 мкм. Б) Относительный уровень флуоресценции TexasRed (CTSB) и 3) Fitc (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 —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 Доксорубицин индуцирует изменения баланса катепсин В/стефинаА

В условиях химиотерапии, индукция окислительного стресса приводит к резкому увеличению продукции АФК, 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. 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 не изучена ось CTSB–STFA.

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

В предыдущих главах раковые линии Du145 и 769р 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 769р.

Нашим первым шагом стала оценка жизнеспособности клеток с использованием 3–(4,5–диметилтиазол–2–ил)–2,5–дифенилтетразолия бромида. 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). По результатам эксперимента для дальнейшей работы мы выбрали концентрации X и 10x.

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 8 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.

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.

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 9-10.

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 9. 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 увеличили ядерного сигнала CTSB. 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 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.

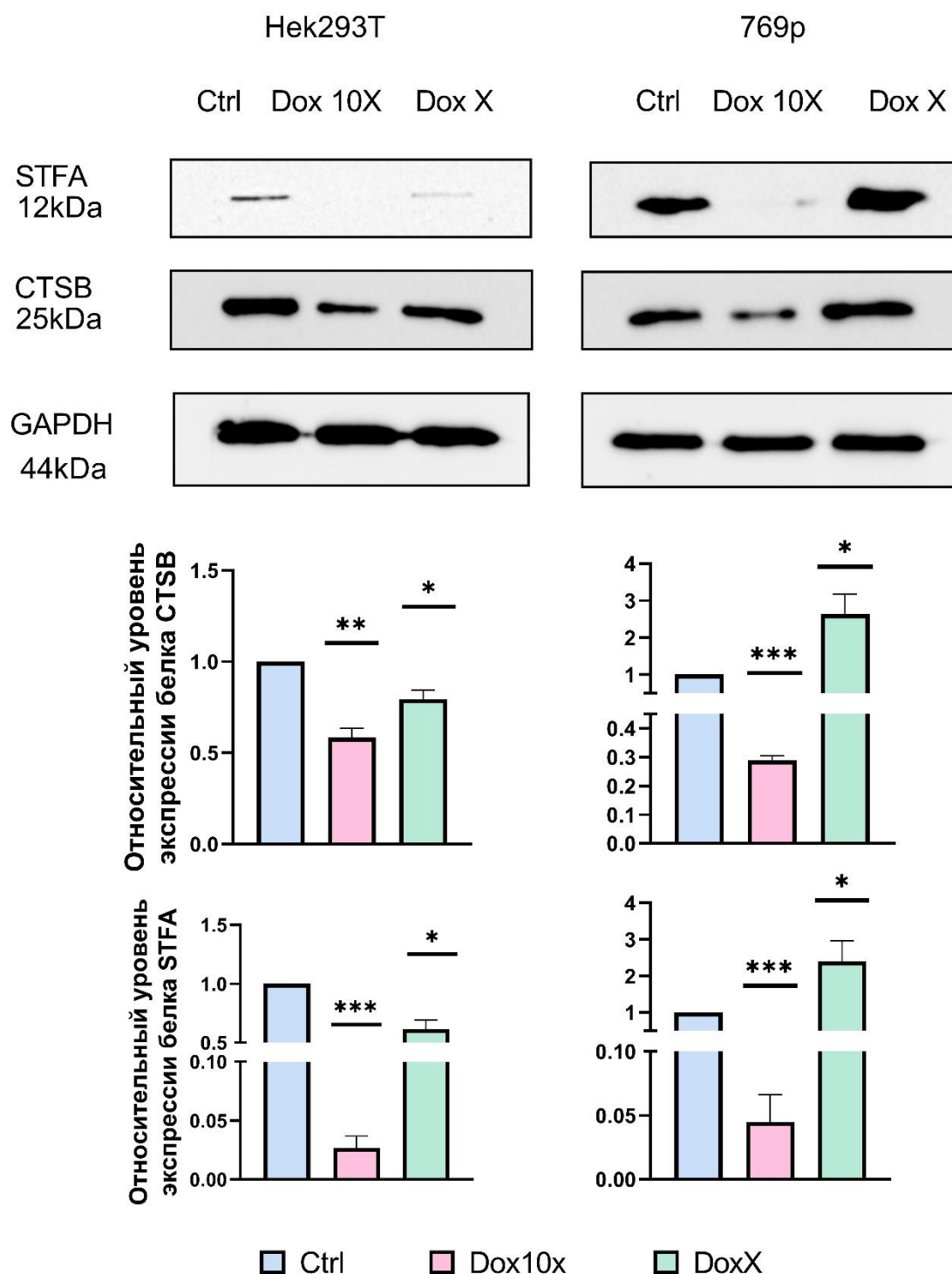


Рисунок 8. Изменение экспрессии белков CTSB и STFA: экспрессия белков CTSB и STFA в клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T и клеточной линии рака почки человека 769p через 20 часов после обработки клеток Dox10x и Dox X. Для каждого эксперимента было проведено 3 биологических повтора. Результаты представляют собой среднее значение \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

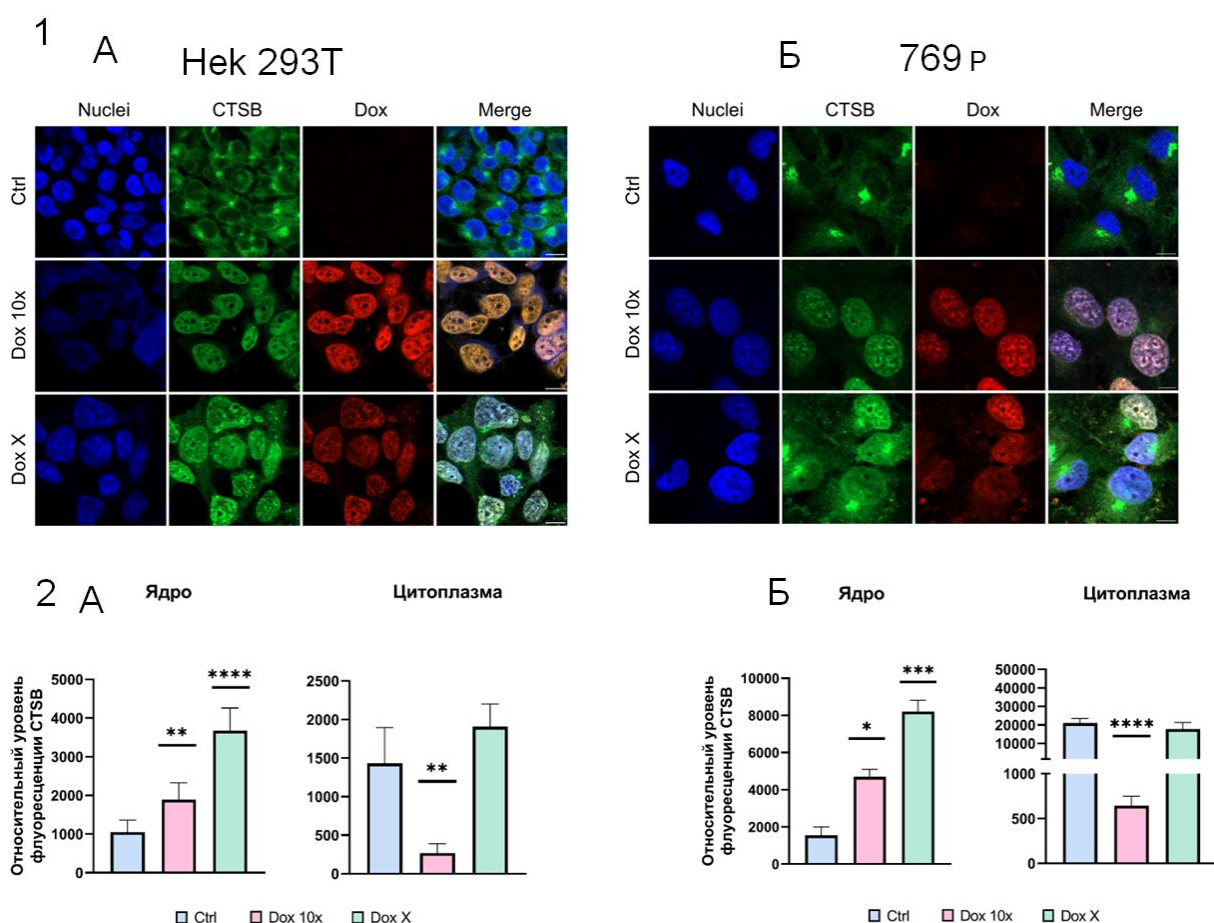


Рисунок 9. Изменение локализации CTSB в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T и клеточной линии рака почки человека 769p через 20 часов после обработки клеток Dox10x и Dox X. А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно мечеными 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 10). В эмбриональных клетках Hek293T, 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 769p 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.

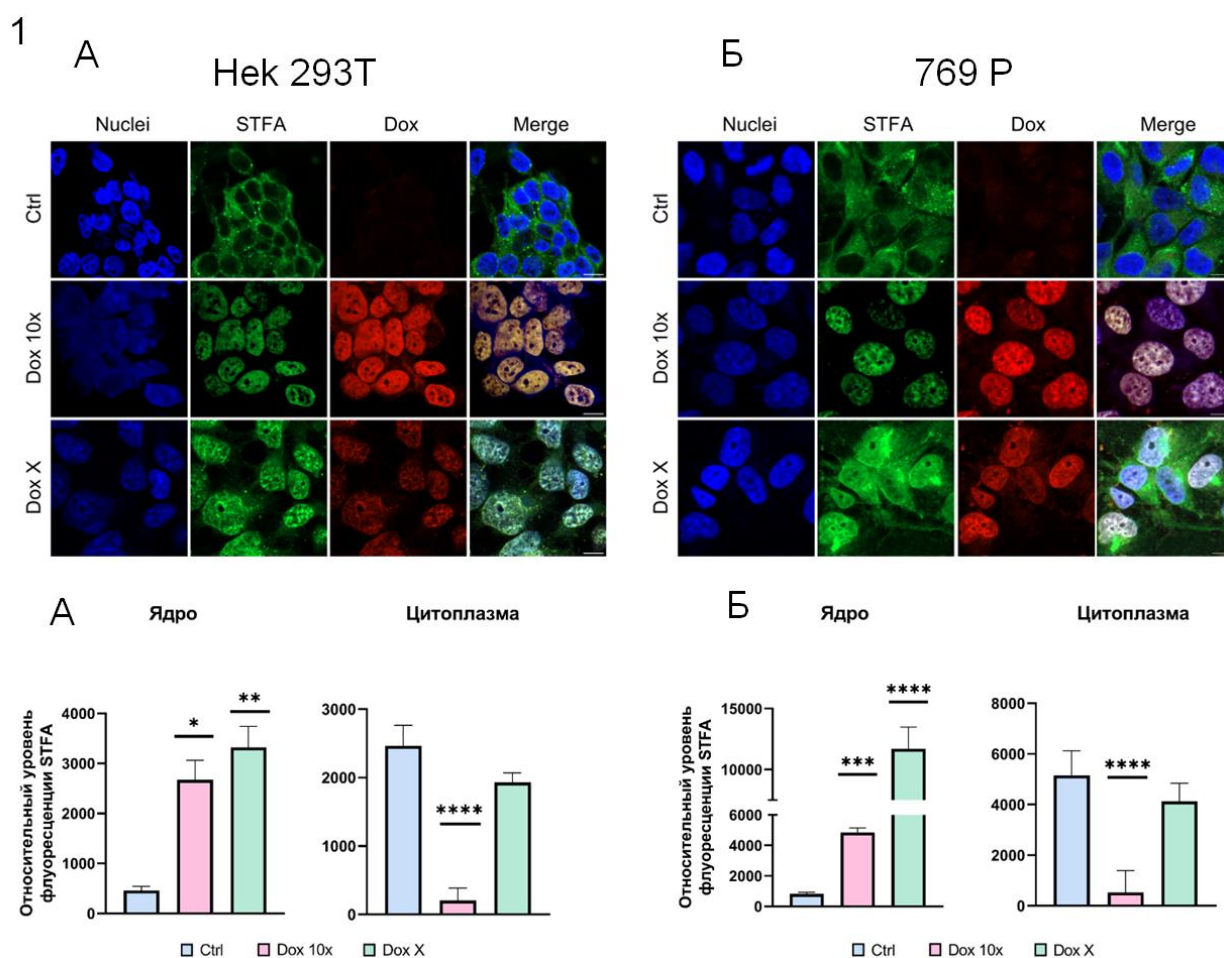


Рисунок 10. Изменение локализации STFA в цитоплазме и ядре клеточной линии эмбриональной почки человека Hek293T и клеточной линии рака почки человека 769p через 20 часов после обработки клеток Dox10x и Dox X. А) Репрезентативные изображения исследуемых клеточных линий, окрашенных флуоресцентно мечеными 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 CTSSB, а также более интенсивное увеличение сигнала в ядерном компартменте. Тоже самое касается и STFA. Также хочется подчеркнуть факт того, что во всех экспериментах у нас сохраняется корреляция между уровнями экспрессии CTSSB 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 Hek293T 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 HEK293T подобного эффекта не зарегистрировано. При этом во всех 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, 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. Поскольку данный гистоновый домен служит платформой для регуляторных посттрансляционных модификаций (метилования, ацетилирования и др.), его необратимое удаление приводит к глубоким изменениям эпигенетического ландшафта и транскрипционного профиля клетки. 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.

Не только CTSL, но и CTSB способен расщеплять хвост гистона H3, запуская перестройки хроматина и изменение экспрессии генов. 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 769p. 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 27). 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.

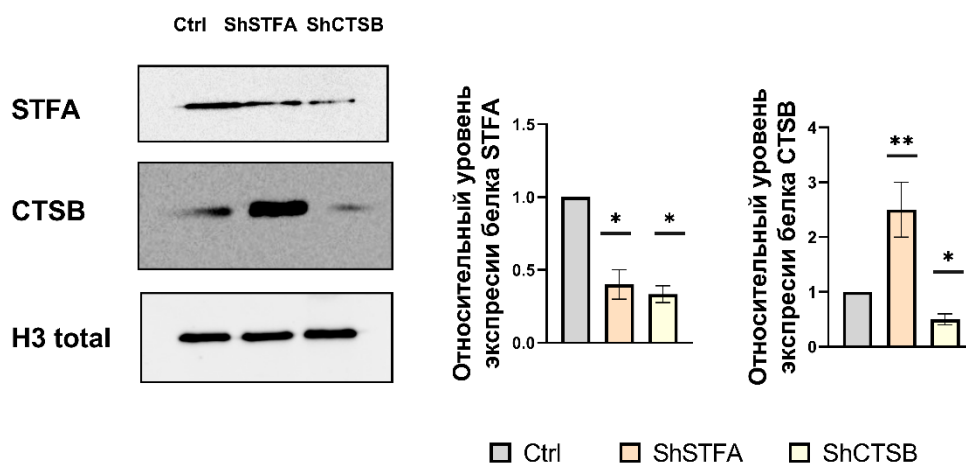


Рисунок 11. Изменение экспрессии белков CTSB и STFA в иммунопреципитатах: экспрессия белков CTSB и STFA в клеточной линии рака почки человека 769р через 48 часов после трансфекции плазмидами, несущими шпилечные конструкции для замалчивания целевых генов (pShCTSB и pShSTFA). Для каждого эксперимента было 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 гистоном 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 работ, опубликованных автором по теме диссертации.

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