

На правах рукописи

Шляпина Виктория Львовна

Роль белка hTERP в регуляции аутофагии

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор химических наук **Рубцова Мария Петровна**

Официальные оппоненты:

Котелевцев Юрий Васильевич, доктор биологических наук, профессор Сколковского института науки и технологий

Лебедев Тимофей Дмитриевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Защита состоится «15» мая 2024 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «...»2024 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.ф.-м.н. **В.А. Олейников**



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Аутофагия является одним из фундаментальных клеточных процессов важных для дифференцировки, развития, выживания и поддержания гомеостаза клеток [Aman и др., 2021]. В процессе аутофагии формируются аутофагосомы, которые образуют после слияния с лизосомами аутолизосомы, в которых происходит деградация поврежденных органелл, белков, липидов и нуклеиновых кислот [Jiang и др., 2019]. Нарушения этого процесса и его регуляции могут привести к возникновению различных заболеваний, таких как рост и развитие опухолей (при повышенной активации аутофагии), нейродегенерация, а также могут происходить нарушения метаболизма и функционирования иммунной системы [Khandia и др., 2019]. Изучение аутофагии имеет большое значение, так как этот процесс регулирует клеточный метаболизм, а также оказывает влияние на функционирование всего организма, а снижение эффективности аутофагии ассоциировано с процессом старения [Song и др., 2018].

В настоящее время известны примеры неправильно аннотированных длинных некодирующих РНК (lncRNA), которые содержат в своей структуре открытые рамки считывания и способны кодировать короткие белки [Xing и др., 2021]. Долгое время теломеразную РНК считали некодирующей. Однако ряд ее свойств – длинный первичный транскрипт, который имеет открытую рамку считывания и m7G-кеп на 5'-конце, а также то, что небольшая часть теломеразной РНК в процессе биогенеза транспортируется в цитоплазму – позволили предположить, что данная РНК может кодировать белок, что было подтверждено в нашей лаборатории [Pakhomova и др., 2022; Rubtsova и др., 2018]. Оказалось, что теломеразная РНК человека кодирует белок – hTERP [Rubtsova и др., 2018], который выполняет защитные функции в клетках в условиях доксорубин-индуцированного апоптоза, а мутации, нарушающие N-конец hTERP, влияют на процессинг белка LC3, одного из основных участников формирования аутофагосомы [Rubtsova и др., 2018].

Однако, точная роль белка hTERP установлена не была. В связи с актуальностью изучения аутофагии и связью найденного белка с этим процессом поиск доказательств участия и выяснение роли белка hTERP в нем является актуальной задачей.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось определение роли белка hTERP в регуляции аутофагии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Подтвердить трансляцию теломеразной РНК человека.
2. Установить отсутствие влияния делеции нуклеотидов 184-188 в hTR на функционирование теломеразы.
3. Установить функциональную роль белка hTERP в регуляции аутофагии.

Научная новизна и практическая значимость

В исследовании впервые начато изучение роли hTERP в регуляции каскада киназ аутофагии. Впервые показано, что делеция нуклеотидов 184-188 в теломеразной РНК не оказывает влияния на функционирование теломеразы.

В настоящей работе показана роль белка hTERP в регуляции аутофагии и приведен предполагаемый механизм регуляции. В будущем полученные данные могут быть использованы при поиске новых противоопухолевых препаратов, исследовании проблем старения и долголетия.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях и конференциях: на XXXII зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 10.02 – 13.02.2020; на VII Съезд биохимиков и молекулярных биологов России, Сочи, 3.10 – 7.10.2022

По материалам работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключался в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментов с применением современных методов молекулярной биологии, биохимии и генной инженерии, а также в обработке, анализе и оформлении полученных результатов. Автор представлял результаты на научных конференциях и принимал участие в подготовке и написании публикаций.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы. Объем диссертации 119 страниц, материал иллюстрирован 33 рисунками. Список литературы включает 200 источников.

Положения, выносимые на защиту

- Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на функционирование теломеразы
- Белок hTERP принимает участие в регуляции аутофагии
- Белок hTERP участвует в регуляции активности АМПК

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В ходе настоящей работы требовалось подтвердить трансляцию теломеразной РНК человека, а также установить участие белка hTERP в регуляции аутофагии и выявить сигнальный каскад, в регуляции которого участвует белок hTERP.

Создание клеточной линии с белком hTERP тегированным HiBiT

Ранее мы столкнулись с проблемой получения антител против белка hTERP. Получаемые антитела обладали низкой специфичностью. Для решения проблемы детекции белка hTERP мы решили создать клеточную линию, в которой белок hTERP содержит дополнительный аффинный довесок на С-конце. В качестве аффинного довеска выбрали короткий пептид HiBiT, состоящий из 11 аминокислот.

Линия HEK293T, в которой на С-конец белка hTERP присоединена последовательность HiBiT, была создана с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. После трансфекции плазмидой, кодирующей гидовую последовательность для Cas9, и одноцепочечного олигонуклеотида-матрицы для гомологичной рекомбинации, клетки рассаживали на моноклоны, далее из них выделяли геномную ДНК, проводили ПЦР с праймерами, специфичными редактируемой области генома и анализировали длину продукта методом электрофореза в агарозном геле. Ожидали увидеть более длинный продукт ПЦР в случае встраивания в нужную область последовательности, кодирующей HiBiT. Среди всех проанализированных моноклонов был обнаружен один, где ожидали встраивание тега на С-конец и для которого наблюдали один ПЦР-продукт ожидаемой длины (больше, чем в диком типе), что свидетельствует о встраивании HiBiT-тега в оба аллеля геномной последовательности (Рис. 1). Встраивание HiBiT в нужную область геномной последовательности подтвердили при помощи секвенирования по Сэнгеру.

Создание клеточной линии hTERP-HiBiT было необходимо для подтверждения трансляции теломеразной РНК человека, в процессе которой образуется белок hTERP. После подтверждения

встраивания нуклеотидной последовательности в нужную область генома необходимо было убедиться, что химерный белок синтезируется в клетках.

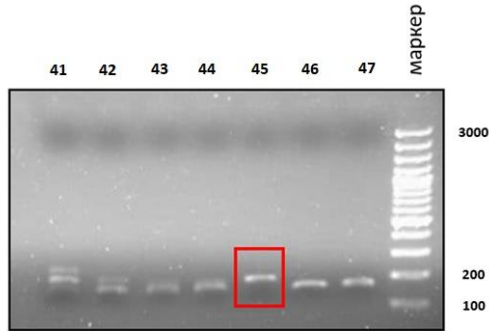


Рисунок 1. Анализ результатов геномного редактирования при помощи ПЦР. Фотография агарозного геля после разделения продуктов ПЦР. 41-47 – номера анализируемых моноклонов. Моноклон, выбранный для дальнейшего анализа отмечен красной рамкой.

Для этого нами были проведены эксперименты по определению hTERP-HiBiT меченного белка в клетках. Определение общего тегированного белка проводили в клеточных лизатах с использованием коммерческого набора Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega). Интенсивность люминесценции, образующейся в результате активности люциферазы, прямо пропорциональна количеству тегированного белка в клетках. Отрицательным контролем выступали образцы, содержащие лизаты клеток НЕК293Т дикого типа. В качестве положительного контроля использовали, созданную нами, клеточную линию НЕК293Т, в которую случайным образом интегрировали в геном последовательность, кодирующую химерный белок GFP-HiBiT.

На Рис. 2 приведен график с результатами измерения люминесценции. Статистически значимых различий в люминесценции между клетками дикого типа и клетками, содержащими тегированный HiBiT белок, выявлено не было. Эти

результаты можно объяснить малым количеством белка hTERP в клетках.

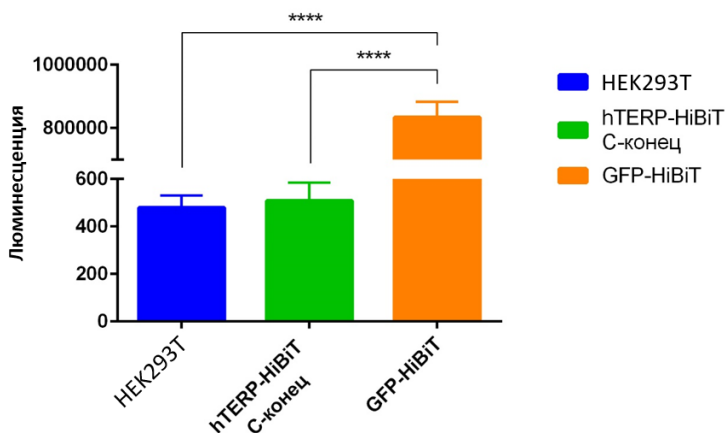


Рисунок 2. Сравнение интенсивности люминесценции в клетках HEK293T дикого типа, содержащих hTERP-HiBiT тегированный белок (С-конец), и клетках, содержащих GFP-HiBiT белок. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Сравнения проведены с использованием однофакторного дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad. $***p < 0,0001$. Каждый столбик отражает результаты трех независимых экспериментов с двумя техническими повторностями.

Далее для подтверждения синтеза химерного белка в клетках мы решили использовать метод блоттинга. Детекцию сигнала осуществляли при помощи коммерческого набора Nano-Glo HiBiT Blotting System (Promega) без использования антител, а присутствие HiBiT определяется по активности люциферазы при добавлении LgBiT и субстрата. Этим способом можно увеличить время накопления сигнала фермента, а также определить молекулярную массу белка, тегированного HiBiT. Сигнал накапливался в течение 30 часов. В результате установлено, что химерный белок hTERP-HiBiT синтезируется в полученной клеточной линии (Рис. 3).

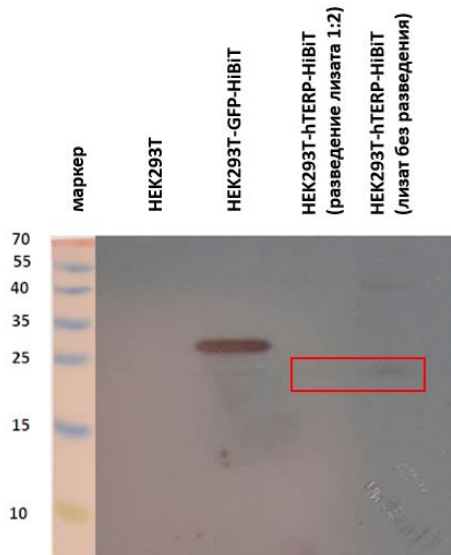


Рисунок 3. Результаты блоттинга лизатов полученной клеточной линии, в которой присутствует hTERP-HiBiT. Красным выделен фрагмент мембраны, где наблюдается исследуемый белок. Лизат готовили из клеток выращенных в лунке 6-ти луночной плашки (конфлюентность 90%) в 70 мкл лизирующего буфера; нанесение на дорожку – 20 мкл.

Таким образом, мы доказали, что белок hTERP является продуктом трансляции теломеразной РНК человека. В дальнейшей работе мы сосредоточились на выяснении роли белка hTERP в функционировании клеток, для чего использовали, полученную ранее в лаборатории при помощи редактирования генома клеточную линию HEK293T, в которой белок hTERP отсутствует.

Влияние делеции нуклеотидов 184-188 в hTR на функционирование теломеразы

В результате редактирования в клетках линии HEK293T методом CRISPR/Cas9 были удалены 5 нуклеотидов в положении 184-188 гена *hTERC* и получена клеточная линия dTERP HEK293T, в которой биосинтез белка hTERP невозможен из-за делеции

стартового кодона открытой рамки считывания. Данные нуклеотиды входят в состав спирали P1, которая образуется за счет комплементарных взаимодействий между участками hTR и способствует формированию структуры псевдоузла [Chen, Blasco, Greider, 2000]. Так как спираль P1 имеет ключевую роль в обеспечении точности обратной транскрипции, нельзя было исключить, что такая мутация будет влиять на функционирование теломеразы [Воу и др., 2012].

Для нашей дальнейшей работы важно удостовериться, что вносимая в hTR мутация не будет оказывать влияние на функционирование теломеразы, т.к. нарушения в теломерах приводят к изменениям метаболической активности клеток. Для выполнения этой задачи сравнили уровень активности теломеразы, а также количество и локализацию каталитической субъединицы теломеразы в hTERP-дефицитных клетках и клетках дикого типа.

Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на активность теломеразы

Определение активности теломеразы проводили методом TRAP (протокол амплификации теломерных повторов) с использованием ПЦР в реальном времени (Рис. 4). Для определения влияния мутаций в hTR на активность теломеразы мы использовали клетки линии HEK293T дикого типа и клетки dhTERP HEK293T. Статистически значимых различий в активности теломеразы между клетками дикого типа и мутантными клетками выявлено не было.

Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на экспрессию hTERT

Для определения количества hTERT в клетках дикого типа HEK293T и клетках dhTERP HEK293T использовали метод иммуноблоттинга (Рис. 5). В качестве контроля нормировки проводили анализ количества GAPDH. Статистически значимых различий в уровне экспрессии hTERT между клетками дикого типа и мутантными клетками выявлено не было.

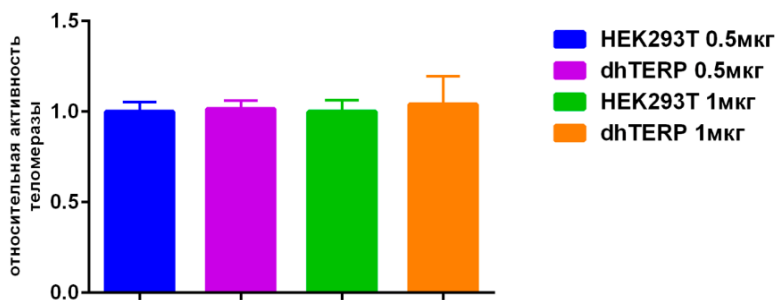


Рисунок 4. Делеция нуклеотидов 184-188 теломеразной РНК человека не влияет на активность теломеразы. Гистограмма, демонстрирующая уровень активности теломеразы в клетках дикого типа (HEK293T) и dhTERP HEK293T (dhTERP), согласно результатам RQ-TRAP анализа. Каждый столбик отражает результаты трех независимых экспериментов с тремя техническими повторностями.

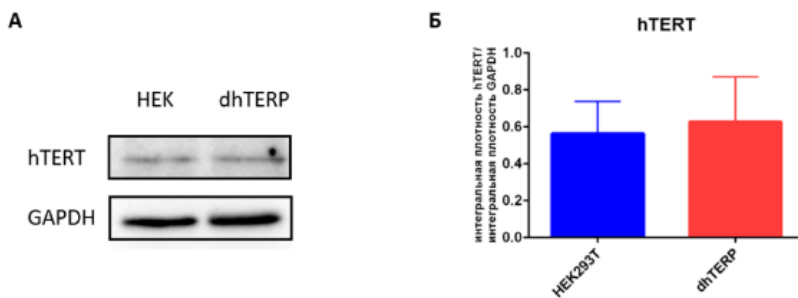


Рисунок 5. Экспрессия hTERT в клетках дикого типа HEK293T (HEK) и dhTERP HEK293T (dhTERP). А) Иммуноблоттинг лизатов из клеток дикого типа HEK293T и dhTERP HEK293T Б) Количественная оценка уровня экспрессии. Столбцы отражают отношение интегральной плотности hTERT к интегральной плотности GAPDH; данные получены в трех независимых экспериментах

Делеция нуклеотидов 184-188 в hTR не влияет на локализацию hTERT

По данным из литературных источников, hTERT имеет и ядерную, и цитоплазматическую локализацию [Куо и др., 2003]. Сравнение локализации hTERT в клетках HEK293T дикого типа, и клетках dhTERT HEK293T осуществляли методом цитохимии (Рис. 6). В качестве отрицательного контроля в данных экспериментах использовали образцы, окрашенные только вторичными антителами. Различий в локализации hTERT между клетками HEK293T дикого типа и клетками dhTERT HEK293T не выявлено.

Из полученных нами данных видно, что уровень экспрессии, локализация hTERT и активность теломеразы не отличается в клетках HEK293T дикого типа и в клетках dhTERT HEK293T. Данные результаты позволяют утверждать, что делеция нуклеотидов 184-188 спирали P1 не приводит к глобальным пространственным перестройкам вторичной структуры hTR – матрица для синтеза теломерных повторов остается доступной для фермента и нет пространственных затруднений для сборки теломеразного комплекса.

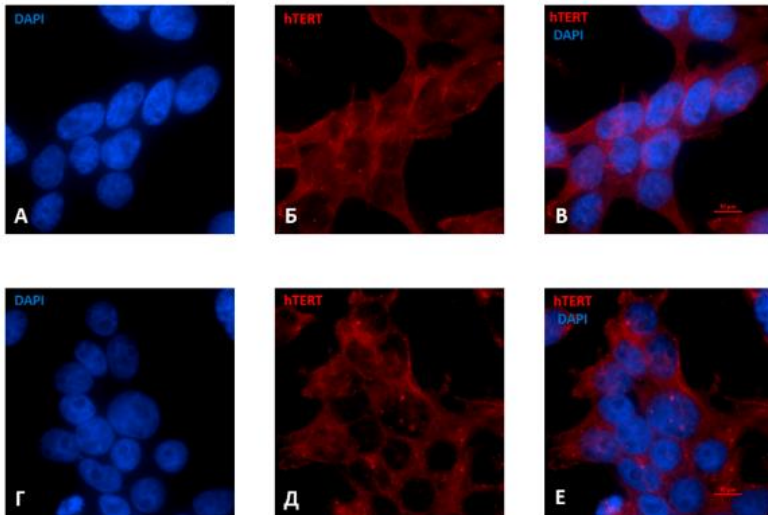


Рисунок 6. Иммунолокализация hTERT в клетках HEK293T дикого типа и клетках dhTERT HEK293T. Окраска клеток HEK293T (А), (Б), (В) и клеток dhTERT HEK293T (Г), (Д), (Е) первичными антителами на hTERT и вторичными антителами с Cy5 меткой; синий – ядра, окрашенные DAPI; красный – hTERT; бар – 10 мкм

Все это позволяет заключить, что все эффекты, наблюдаемые в клетках dhTERP HEK293T, вызваны именно отсутствием белка hTERP, а не изменениями в функционировании теломеразы, которые могли возникнуть из-за модификаций hTR.

Участие белка hTERP в процессе аутофагии

В предыдущих работах показано, что мутации нарушающие N-конец hTERP оказывают влияние на базальный уровень аутофагии [Rubtsova и др., 2018]. Чтобы исследовать, участвует ли и как именно участвует hTERP в регуляции сигнальных путей, мы использовали клеточную линию dhTERP HEK293T, дефицитную по hTERP, клеточную линию HEK293T дикого типа, а также клеточные линии HEK293T и теломеразы-негативные U2OS с эктопической оверэкспрессией белка.

Клеточные линии с эктопической экспрессией конструкции, кодирующей белок hTERP, тегированный HA-тагом, были получены с использованием системы с транспозазой Sleeping Beauty [Kowarz, Löscher, Marschalek, 2015]. Мы получили клеточные линии с индуцированной доксициклином экспрессией hTERP-3HA и только 3HA в качестве контроля путем интеграции экспрессирующей кассеты в геном клеток. После трансфекции клетки культивировали в среде с антибиотиком для отбора модифицированных клеток. Отобранные клетки обрабатывали доксициклином для индукции экспрессии hTERP-3HA и 3HA. Экспрессия hTERP-3HA была подтверждена вестерн-блоттингом с использованием антител, специфичных к HA-эпиту.

Развитие аутофагии оценивали по отношению форм LC3I и LC3II. Превращение LC3I в LC3II в результате конъюгации фосфатидилэтаноламина к LC3I во время аутофагии анализировали вестерн-блоттингом в условиях ингибирования слияния аутофагосомы с лизосомой за счет добавления хлорохина [Kabeva и др., 2000].

Чтобы исследовать роль hTERP в прогрессии аутофагии, мы помещали клетки в условия недостатка аминокислот или обрабатывали 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибонуклеотидом (AICAR). Каждое из этих условий оказывает влияние на сигнальные

пути, связанные с инициацией аутофагии и пролиферацией клеток (Рис. 7). В условиях недостатка аминокислот происходит ингибирование mTORC1 и стимуляция аутофагии. Добавление AICAR активирует AMPK и вызывает аутофагию [Kim и др., 2016]. Более того, AMPK-индуцированная активация АКТ приводит к стимуляции компенсаторных механизмов обеспечения выживания и ингибированию аутофагии [Leclerc и др., 2010; Zhao и др., 2017].

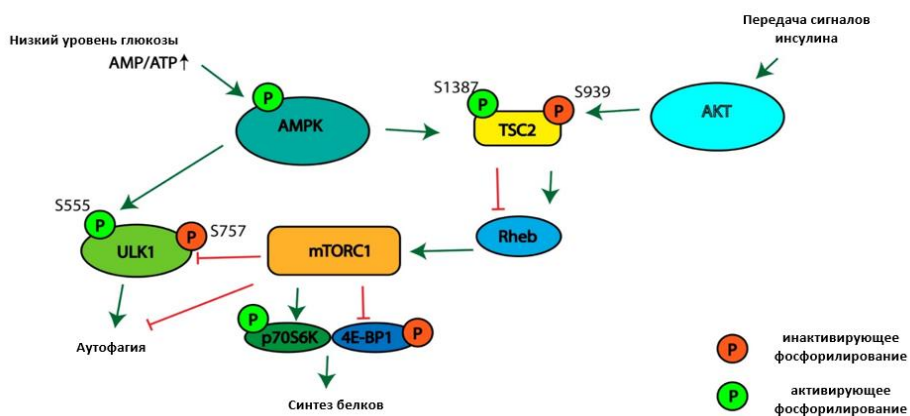


Рисунок 7. Схема, иллюстрирующая сигнальные пути, участвующие в регуляции активности mTORC1, аутофагии и синтезе белка.

Мы помещали клетки НЕК293Т дикого типа, dhTERP НЕК293Т и сверхэкспрессирующие hTERP НЕК293Т в выбранные условия. Для оценки развития аутофагии находили соотношение LC3II к LC3I в обработанных хлорохином клетках, в условиях недостатка аминокислот (Рис.8 А, В), или в клетках, обработанных AICAR (Рис.8 Б, Г), нормализовали к отношению LC3II к LC3I в обработанных хлорохином клетках, культивируемых в нормальных условиях. Скорость конверсии LC3 для мутантных клеток нормировали по такому же отношению для клеток дикого типа.

Мы обнаружили, что недостаток аминокислот приводит к ингибированию аутофагии, в то время как обработка AICAR активирует аутофагию в клетках с дефицитом hTERP (Рис. 8 А, Б, Д). Оверэкспрессия hTERP в клетках HEK293T активировала аутофагию при дефиците аминокислот (Рис. 8 В, Д), и ингибировала ее в клетках, обработанных AICAR (Рис. 8 Г, Д). Оверэкспрессия hTERP в теломеразо-негативных клетках U2OS приводила к ингибированию аутофагии в условиях недостатка аминокислот (Рис. 28 А, В) и после обработки AICAR (данные показаны в тексте диссертации).

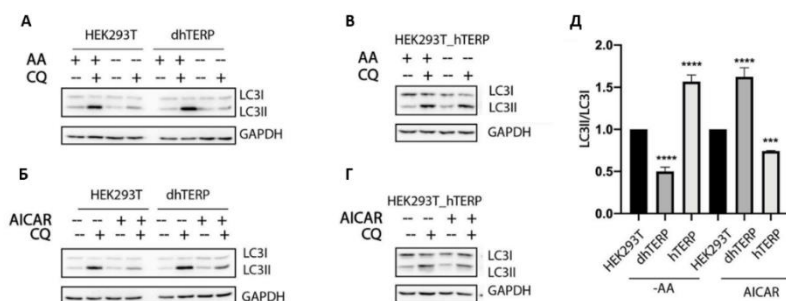


Рисунок 8. hTERP влияет на протекание аутофагии. (А, Б) Анализ содержания белка LC3 в лизатах клеток дикого типа и клеток dhTERP HEK293T в нормальных условиях (AA+) и в условиях недостатка аминокислот (AA-) методом иммуноблоттинга (А) в нормальных условиях и при обработке AICAR (Б). Слияние аутофагосом с лизосомами блокировали, обрабатывая клетки 10 мкМ хлорохина (CQ). GAPDH использовали в качестве контроля нанесения. (В, Г) Анализ содержания белка LC3 в лизатах клеток дикого типа и клеток оверэкспрессирующих hTERP-3НА методом иммуноблоттинга в нормальных условиях (AA+) и в условиях недостатка аминокислот (AA-) (В) в нормальных условиях и при обработке AICAR (Г). (Д) Количественная оценка степени превращения LC3I в LC3II в клетках HEK293T дикого типа, dhTERP и оверэкспрессирующих hTERP, в условиях недостатка аминокислот или обработанных AICAR. Скорость превращения LC3I в LC3II определяли по трем независимым экспериментам (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно

определяли с использованием программного обеспечения GraphPad. *** $p < 0,001$ по критерию множественных сравнений Данетта.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов мы установили, что белок hTERP принимает участие в регуляции процесса аутофагии. Далее мы сосредоточились на определении того, на каком именно этапе hTERP участвует в регуляции аутофагии. Для этого нами был проанализирован профиль фосфорилирования белков сигнальных путей AMPK и АКТ.

Выявление сигнального каскада, в регуляции которого участвует белок hTERP

Процесс аутофагии регулируется большим количеством киназ, которые находятся в сложных взаимосвязях друг с другом. Для того, чтобы понять на каком именно этапе белок hTERP может оказывать влияние на процесс аутофагии, сначала нам было необходимо проанализировать и оценить изменение активности киназ сигнальных путей AMPK и АКТ в клетках НЕК293Т дикого типа, клетках dhTERP НЕК293Т и клетках НЕК293Т с индуцируемой доксициклином оверэкспрессией hTERP.

Для сравнения активности киназ путей AMPK и АКТ, принимающих участие в сигнальных путях регулирующих mTORC1, использовали метод вестерн-блоттинга. Мы определяли отношение количества фосфорилированной формы киназы к общему количеству этой же киназы в клетках дефицитных по белку hTERP и клетках с оверэкспрессией hTERP в нормальных условиях культивирования. Оказалось, что уровень hTERP оказывает значительное влияние на фосфорилирование AMPK и p70S6K (Рис. 9 Г). И в нокаутных по белку клетках, и в клетках с оверэкспрессией hTERP наблюдали усиление фосфорилирования p70S6K (Рис. 9 Г). Уровень фосфорилированной формы p70S6K в клетках нокаутных по исследуемому белку восстанавливался до такого же уровня, как и в клетках НЕК293Т дикого типа при экзогенной оверэкспрессии hTERP (Рис. 9 В, Г). Уровень фосфорилированной формы AMPK повышался в клетках, нокаутных по hTERP, оверэкспрессия hTERP в нокаутных клетках приводила к восстановлению уровня фосфорилированной AMPK до такого же уровня, как в клетках

дикого типа. Оверэкспрессия hTERP в клетках НЕК293Т не выявила влияния на уровень фосфорилирования АМПК.

Таким образом, наблюдаемые нами различия в уровне фосфорилирования отдельных киназ, входящих в сигнальные пути, регулирующие аутофагию, между клетками НЕК293Т дикого типа, клетками dhTERP НЕК293Т и клетками НЕК293Т с оверэкспрессией белка подтверждают участие hTERP в регуляции аутофагии.

Для дальнейшего определения возможного механизма действия hTERP нам было необходимо проанализировать профиль фосфорилирования киназ сигнальных путей АМПК и АКТ в условиях отличных от стандартных и оказывающих влияние на процесс аутофагии. При определении участия hTERP и его влияния на базальную аутофагию мы рассматривали условия аминокислотного голодания и обработки АICAR, каждое из которых модулирует активность АМПК [González и др., 2020; Hardie, Ross, Hawley, 2012]. Чтобы изучить возможные механизмы действия hTERP на процессы, регулирующие клеточные ответы на стрессоры, мы решили модулировать ингибирование гликолиза путем обработки клеток 2-деокси-D-глюкозой (2DG). 2DG является производным глюкозы и при фосфорилировании гексокиназой 2 образует 2DG-фосфат, который не может быть использован в дальнейших этапах гликолиза. Происходит накопление 2DG-фосфата, что приводит к ингибированию гексокиназы 2 и, как следствие, происходит ингибирование гликолиза и снижение содержания АТФ. Низкий уровень АТФ приводит к активации АМПК, стимуляции аутофагии и ингибированию синтеза белка. 2DG также индуцирует и фосфорилирование АКТ и ее мишеней независимо от АМПК способом [Zhong и др., 2008].

Для установления сигнального пути, в котором принимает участие hTERP, были проанализированы профили фосфорилирования белков в сигнальных путях, регулируемых АМПК и АКТ в клетках нокаутных по hTERP в условиях ингибирования гликолиза в условиях обработки клеток 2DG.

Для сравнения активности анализируемых киназ использовали метод вестерн-блоттинга и определяли отношение количества

фосфорилированных форм к общему количеству киназы. Полученное соотношение для клеток, обработанных 2DG, было нормировано к соотношению для необработанных клеток (Рис. 9 Д, черные столбцы соответствуют клеткам HEK293T дикого типа, а серые столбцы соответствуют клеткам dhTERP).

Чтобы подтвердить участие hTERP в регуляции активности анализируемых киназ, мы оверэкспрессировали hTERP в клетках HEK293T дикого типа и мутантных клетках. Клетки обрабатывали доксициклином для индукции экспрессии hTERP-3НА и 3НА и 2 мМ 2DG в течение 48 часов. Экспрессию hTERP-3НА подтверждали вестерн-блоттингом с антителами, специфичными к 3НА. Необработанные клетки, клетки, обработанные только доксициклином или только 2DG, использовали в качестве контроля. Количество фосфорилированной и тотальной форм киназ, участвующих в клеточном ответе на дефицит глюкозы, анализировали с помощью вестерн-блоттинга.

Для сравнения активности анализируемых белков определяли соотношение количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках с оверэкспрессией hTERP dhTERP HEK293T, обработанных доксициклином (doxy+), и 2DG, нормированным по соотношению для клеток с оверэкспрессией-3НА dhTERP HEK293T, обработанных доксициклином (doxy+/2DG+), или клеток, не обработанных 2DG (2DG-). Такая же количественная оценка была проведена для образцов, не обработанных доксициклином (doxy-) или обработанных 2DG, относительно соотношения для клеток, не обработанных доксициклином (doxy-/2DG+), или клеток, не обработанных 2DG (2DG-). Нормализованные данные использовали для количественной оценки изменений степени фосфорилирования целевого белка при экзогенной экспрессии hTERP [(doxy+, 2DG+/doxy+, 2DG-)/(doxy-, 2DG+/doxy-, 2DG-)] (Рис. 9Д, белые столбцы).

Из графиков на Рис. 9 видно, что клетки, дефицитные по hTERP, демонстрируют пониженную активацию AMPK по сравнению с клетками HEK293T дикого типа в ответ на обработку 2DG. Однако степень фосфорилирования прямых мишеней AMPK - ULK1_Ser 555 и TSC2_Ser 1387 - немного увеличивалась (Рис. 9 А,

Д) в клетках dhTERP по сравнению с клетками HEK293T дикого типа, что должно приводить к активации аутофагии в клетках, дефицитных по hTERP. Уровень фосфорилирования ULK1 по Ser555 и TSC2 по Ser1387 восстанавливался при оверэкспрессии hTERP-3HA. С другой стороны, фосфорилирование p70S6K и 4E-BP1 было повышено в клетках dhTERP, что обеспечивает активацию синтеза белка и стимуляцию клеточной пролиферации. Мы не наблюдали каких-либо значительных изменений в фосфорилировании киназы АКТ или ее мишени Ser939 TSC2.

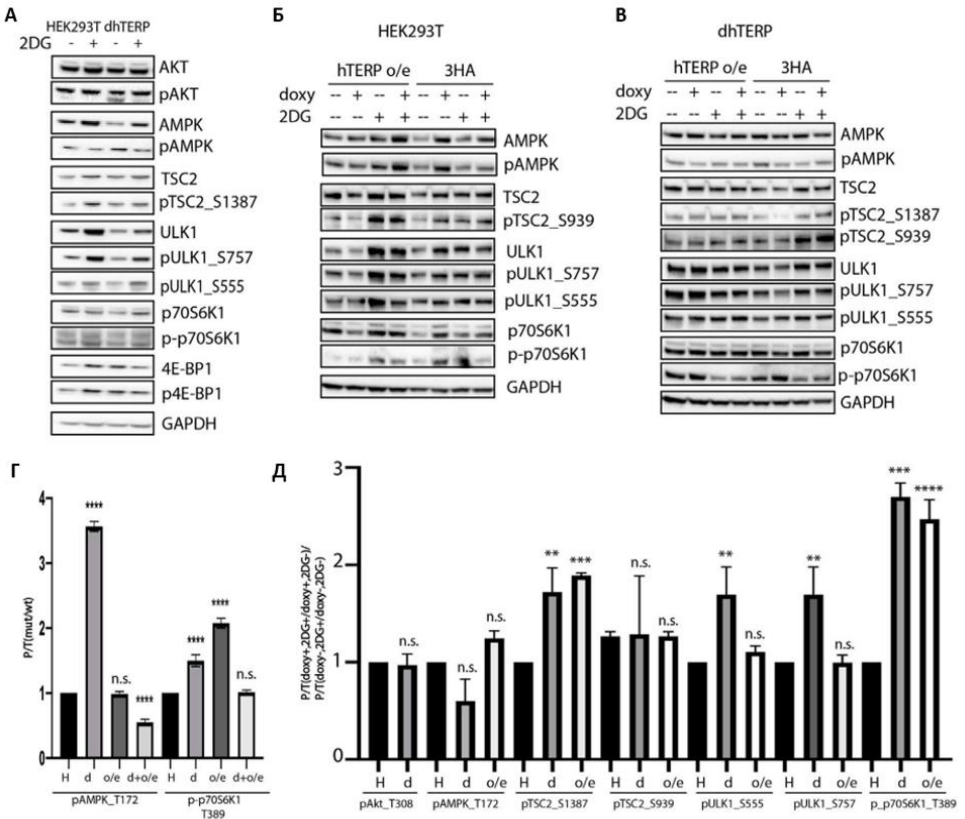


Рисунок 9. hTERP модулирует активность киназ соответствующих сигнальных путей в клетках HEK293T. (А) Анализ профиля фосфорилирования киназ в лизатах клеток дикого типа и клеток dhTERP HEK293T, обработанных 2 мМ 2-дезоксид-D-глюкозой (2DG) или без

обработки 2DG исследовали с помощью иммуноблоттинга. (Б, В). Анализ профиля фосфорилирования киназ в лизатах клеток HEK293T дикого типа (Б) и клеток dhTERP HEK293T (В), экзогенно экспрессирующих 3НА (НА) или hTERP-3НА (hTERP o/e) после обработки 2 мМ 2-DG или без обработки 2DG исследовали при помощи иммуноблоттинга указанными антителами. (Г) Количественная оценка уровней фосфорилирования указанных белков. Столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках HEK293T дикого типа (черные), dhTERP HEK293T (серые), в оверэкспрессирующих клетках hTERP HEK293T, обработанных доксициклином (темно-серые) и в оверэкспрессирующих клетках hTERP dhTERP HEK293T, обработанных доксициклином (светло-серые). Соотношение для модифицированных клеток нормировали по соотношению для клеток HEK293T дикого типа по трем независимым экспериментам вестерн-блоттинга (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно оценивали с использованием программного обеспечения GraphPad. **** $p < 0,0001$ по критерию множественных сравнений Данетта. (Д) Количественная оценка уровней фосфорилирования указанных белков. Столбцы соответствуют отношению количества фосфорилированной формы белка к общему количеству белка в клетках, обработанных 2DG, по сравнению с отношением в необработанных клетках – в клетках HEK293T дикого типа (черные), в клетках dhTERP HEK293T (серые). Белые столбцы соответствуют соотношению в клетках с оверэкспрессией hTERP dhTERP HEK293T (описание расчетов в тексте). Соотношение для клеток, обработанных 2DG, нормировали по соотношению для необработанных клеток по трем независимым экспериментам вестерн-блоттинга (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего) и количественно оценивали с использованием программного обеспечения GraphPad. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$ по критерию множественного сравнения Данетта.

Таким образом, можно заключить, что hTERP участвует в регуляции сигнального пути, ответственного за определение энергетического статуса клетки. Дефицит hTERP приводит к активации биосинтеза белка (повышенное фосфорилирование p70S6K1 и 4E-BP1) с одной стороны и к активации аутофагии (повышенное фосфорилирование ULK1 по Ser 555) с другой стороны. Мы наблюдали влияние hTERP на фосфорилирование нижестоящих мишеней mTORC1 - ULK1_S757, p70S6K1 и 4E-BP1, что позволяет предполагать участие hTERP в регуляции сигнального пути mTORC1.

Проведенные эксперименты были спланированы так, чтобы была возможность разделить функции hTERP и hTR. В клетках с мутацией в теломеразной РНК, инактивирующей трансляцию hTERP, не нарушается функция теломеразного комплекса, а восстановление экспрессии hTERP в нокаутных клетках мы проводили при помощи конструкции, кодирующей последовательность ORF hTERP, а не из полноразмерного *hTERC*. Аналогичные эффекты наблюдали как в теломеразо-положительных клетках HEK293T, так и в теломеразо-негативных клетках U2OS. Эти данные доказывают, что белок hTERP действительно принимает участие в регуляции передачи сигналов AMPK и mTORC1.

Предполагаемый механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1

На основании полученных данных мы предполагаем механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1.

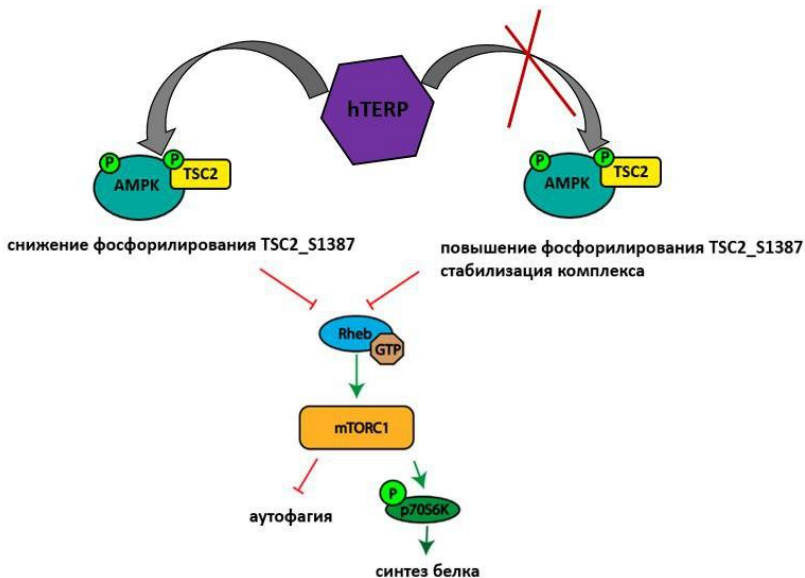


Рисунок 10. Схема, иллюстрирующая роль hTERP в регуляции AMPK-зависимого пути активации аутофагии.

Мы обнаружили разнонаправленное действие hTERP на аутофагию и биосинтез белка и предполагаем, что происходит нарушение оси сигнального пути. Активация AMPK должна приводить к фосфорилированию TSC2 по Ser1387 и ингибированию mTORC1 с последующим снижением уровня фосфорилирования p70S6K1. Мы продемонстрировали активацию mTORC1 и повышенное фосфорилирование p70S6K1 в клетках без hTERP или с его повышенным содержанием. Однако уровень фосфорилирования AMPK был снижен в отсутствие hTERP и повышен, когда hTERP был оверэкспрессирован, но профиль фосфорилирования TSC2 по Ser1387 противоположен ожидаемому. Он был снижен в клетках с оверэкспрессией hTERP и повышен в клетках, где hTERP отсутствовал. Суммируя эти данные, мы предполагаем, что hTERP регулирует фосфорилирование TSC2 по Ser1387 с помощью AMPK и последующее взаимодействие и активацию Rheb (Рис. 10). Мы предполагаем, что hTERP может участвовать в регуляции взаимодействия между AMPK и TSC2, что приводит к снижению степени фосфорилирования последнего. В то же время отсутствие hTERP стимулирует взаимодействие белков (AMPK и TSC2) и фосфорилирование TSC2, что приводит к стабилизации комплекса. Стабильное взаимодействие TSC2 с AMPK приведет к неспособности TSC2 стимулировать ГТФазную активность Rheb и, как следствие, к активации mTORC1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы показали, что мутация, вносимая нами в P1 спираль теломеразной РНК, не оказывает влияния на функционирование и локализацию теломеразы. Также установлено, что ранее обнаруженный белок hTERP, кодируемый теломеразной РНК, принимает участие в регуляции процесса аутофагии, модулируя сигнальный путь AMPK. Полученные нами результаты позволяют приблизиться к пониманию связи между биогенезом и функцией теломеразной РНК, а также предположить механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1. Изучение молекулярного механизма действия hTERP является многообещающим направлением для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

- 1) Введение HiBiT пептида на С-конец белка hTERP при помощи метода геномного редактирования подтвердило трансляцию теломеразной РНК человека.
- 2) Делеция нуклеотидов 184-188 теломеразной РНК человека инактивирует открытую рамку считывания hTERP, но не влияет на функционирование теломеразы.
- 3) Процессинг белка LC3 – основного маркера аутофагии – зависит от содержания hTERP. Белок hTERP участвует в регуляции индуцированной аутофагии.
- 4) Профиль фосфорилирования белков, участвующих в регуляции аутофагии, меняется при изменении содержания hTERP в клетке. Белок hTERP участвует в передаче сигналов AMPK и mTORC1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. **Shliapina V**, Koriagina M, Vasilkova D, Govorun V, Dontsova O, Rubtsova M. Human Telomerase RNA Protein Encoded by Telomerase RNA is Involved in Metabolic Responses. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9, P.754611.

2. **Шляпина В.Л.**, Юртаева С.В., Рубцова М.П., Донцова О.А. На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*, 2021, 13(2), с.106-115.

3. **Шляпина В.Л.**, Донцова О.А., Рубцова М.П. Делеция нуклеотидов 184–188 теломеразной РНК человека не влияет на функционирование теломеразы. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*, 2023, 510(1), с.322-328.

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. **Шляпина В.Л.**, Корягина М.А., Рубцова М.П., Донцова О.А. «Роль белка hTERP в процессах аутофагии» (стендовый, XXXII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», ИБХ РАН, 2020)

2. **Шляпина В.Л.**, Корягина М.А., Донцова О.А., Рубцова М.П. «Роль hTERP в модуляции сигнальных путей, регулирующих аутофагию» (стендовый, VII Съезд биохимиков России, Сочи, 2022)