

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Федоров Дмитрий Андреевич

Na^+/K^+ -зависимая регуляция экспрессии гена *FOS*

1.5.4. Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: **Климанова Елизавета Андреевна** – кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич** доктор биологических наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

Меньшиков Михаил Юрьевич доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» министерства здравоохранения Российской Федерации.

Калюжный Дмитрий Николаевич кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ДНК-белковых взаимодействий ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита диссертации состоится 26 декабря 2025 г. в 14 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

Е-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3706>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.,

Учёный секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



Киселевский Д.Б.

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Неравномерное распределение концентраций одновалентных катионов Na^+ и K^+ между вне- и внутриклеточными пространствами является фундаментальной особенностью клеток животных. Значения внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ в разных тканях животных лежат в пределах 3–10 и 60–140 мМ соответственно. Основным ферментом, поддерживающим такое соотношение, является Na,K-АТРаза. Создаваемый ею градиент одновалентных катионов используется клеткой для поддержания мембранного потенциала и объема клетки, а также обеспечения возбудимости клеток и активного транспорта веществ через цитоплазматическую мембрану.

В результате ряда физиологических или патофизиологических состояний внутриклеточное соотношение Na^+/K^+ может изменяться (например, показано, что в раковых клетках этот параметр может повышаться вплоть до 5 раз), что влияет на экспрессию ряда генов. Было показано, что Na^+/K^+ -чувствительные гены в основном являются генами раннего ответа, среди которых выделяется ген *FOS*, кодирующий субъединицу транскрипционного фактора AP-1. Однако природа сенсора внутриклеточных концентраций Na^+ или K^+ до сих пор не установлена.

Суммарно было выделено несколько свойств Na^+/K^+ -зависимой регуляции генов. Во-первых, было показано, что увеличение транскрипции гена *FOS* при диссипации Na^+/K^+ -градиента не подавляется в присутствии вне- и внутриклеточных хелаторов Ca^{2+} . Во-вторых, к увеличению экспрессии *FOS* приводит не только ингибирование Na,K-АТРаза убаином, но и инкубация в среде, не содержащей ионы K^+ (что обеспечивает ингибирование Na,K-АТРаза), а также присутствие Na^+ -ионофора монензина. Важно отметить, что не вполне установлена роль таких важных параметров, как активность каскадов митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), изменение объема клеток, внутриклеточного pH и концентрации активных форм кислорода (АФК) в Na^+/K^+ -зависимом механизме регуляции экспрессии генов. Кроме того, в геноме

человека обнаруживаются неканонические вторичные структуры нуклеиновых кислот – G-квадруплексы (G4). Эти структуры *in vitro* чувствительны к концентрациям Na^+ и K^+ , в связи с чем их можно рассматривать в качестве внутриклеточного сенсора этих параметров. Таким образом, изучение механизма $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -зависимой регуляции экспрессии генов является крайне актуальной задачей с прикладным и фундаментальным значением.

Целью этой работы было исследование механизма $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках человека.

Задачи работы:

1. Оценить влияние увеличения внеклеточной концентрации Na^+ на соотношение концентраций Na^+ и K^+ внутри клеток, а также на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.
2. Определить роль изменения клеточного объема на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.
3. Оценить независимое от изменения внутриклеточного $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -соотношения влияние убаина на экспрессию *FOS* в клетках HeLa.
4. Определить роль ERK1/2, JNK и p38 в активации транскрипции *FOS* при увеличении внутриклеточного $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -соотношения в клетках HeLa.
5. Оценить влияние $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -соотношения на внутриклеточный pH и окислительный стресс в клетках HeLa.
6. Оценить возможность формирования G-квадруплексов в промоторной области гена *FOS* человека в условиях *in vitro* и их чувствительность к изменению соотношения концентраций одновалентных катионов.

Объект исследования. *In cellulo* часть исследования проведена с использованием клеток аденокарциномы HeLa и первичной культуры клеток эндотелия пупочной вены HUVEC. При выполнении *in vitro* экспериментов в качестве объекта исследования использовали олигонуклеотиды, формирующие G4. Работа выполнена с использованием современных биохимических, молекулярно-биологических и биофизических подходов.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

Обнаружено, что увеличение внеклеточной концентрации Na^+ в рамках физиологической нормы не приводит к увеличению $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения в клетках HUVEC и не влияет на экспрессию *FOS*. При более существенном повышении осмолярности внеклеточной среды именно увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ , а не уменьшение объема клеток HUVEC влияет на транскрипцию гена *FOS*. Дальнейшее изучение $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимой регуляции экспрессии *FOS* с использованием модели ингибирования Na,K-ATPазы клеток HeLa показало, что такая индукция экспрессии *FOS* не опосредована неспецифическим действием ингибитора Na,K-ATPазы убаина, деполяризацией плазматической мембраны, действием MAPK и увеличением концентраций АФК в цитоплазме. Обнаружено, что увеличение внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения приводит к временному повышению внутриклеточного pH.

Проведен биоинформатический анализ промоторной области *FOS* человека, предсказано наличие в этой области как минимум трех последовательностей, потенциально формирующих G4 (PQS). Показано, что олигонуклеотиды, соответствующие этим PQS, формируют G4 в условиях *in vitro*. Обнаружено, что увеличение Na^+/K^+ -соотношения или присутствие ионов Li^+ различным образом изменяют конформацию этих PQS.

Полученные результаты развивают современные представления о феномене $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -зависимой регуляции экспрессии генов. Результаты работы можно использовать для разработки новых подходов к терапии заболеваний, связанных с нарушением ионного транспорта клеток. В их число входят крайне распространенные заболевания с высоким уровнем инвалидизации и смертности пациентов, включая онкологические, нейропатологические и сердечно-сосудистые.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Индукция экспрессии *FOS* в ответ на изменение объема клеток HUVEC обусловлена увеличением внутриклеточного $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ -соотношения.

2. Увеличение внеклеточной концентрации Na^+ в пределах физиологической нормы приводит к увеличению потока этого иона в клетки HUVEC через ENaC каналы, что вызывает активацию Na,K-АТФазы, при этом внутриклеточное содержание одновалентных катионов приходит в равновесие в течение 3 ч; индукции экспрессии *FOS* в таких условиях не наблюдается.
3. Увеличение экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K-АТФазы в клетках HeLa обусловлено увеличением внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения и не связано с неспецифическим действием ее ингибитора или с деполяризацией плазматической мембраны.
4. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa приводит к фосфорилированию ERK1/2, JNK и p38, при этом для Na^+/K^+ -зависимой индукции экспрессии *FOS* активация этих киназ не является обязательной.
5. Окислительный стресс не является необходимым условием для Na^+/K^+ -зависимой индукции транскрипции *FOS* в клетках HeLa.
6. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa приводит к временному росту внутриклеточного pH, который сменяется ацидозом.
7. В промоторе *FOS* существует как минимум три G-квадруплекса, формирование которых показано *in vitro*. Структура этих G-квадруплексов зависит от соотношения концентраций одновалентных катионов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Экспериментальная работа построена на основании обзора данных литературы. Эксперименты проводили в нескольких независимых повторях с использованием необходимых отрицательных и положительных контролей. Для оценки степени достоверности результатов использовали современные подходы статистики. Интерпретацию экспериментальных данных проводили с учетом возможных ограничений методов исследования.

По теме диссертационной работы опубликованы 4 статьи, все – в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук. Результаты данной работы были представлены на заседаниях

кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на международных и российских научных конференциях: 10-я международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” (Россия, Пущино, 2019), VI Съезд биохимиков России (Россия, Дагомыс, 2019), The 45th FEBS Congress (Словения, Любляна, 2021), IUBMB–FEBS–PABMB Congress (Португалия, Лиссабон, 2022), VIII Всероссийская школа-конференция по физиологии и патологии кровообращения (Россия, Москва, 2025).

Личный вклад автора. Все основные результаты были получены автором или при его участии. Автор лично анализировал и интерпретировал результаты и подготавливал статьи и тезисы для публикации.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана по стандартному плану и включает в себя введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключения, выводы, списка литературы. Материал представлен на 138 страницах, включает 5 таблиц, 22 рисунка и 3 формулы. Список литературы состоит из 175 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование клеток проводили при 37 °C и 5% CO₂, заменяя среду каждые 3 дня. В качестве ростовой среды для клеток HUVEC использовали Endothelial growth medium (Cell Applications, США), а для клеток HeLa использовали DMEM, содержащий 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS). Клетки HUVEC культивировали до 3 пассажа. Поскольку ген *FOS* содержит SRE элемент, обеспечивающий транскрипцию этого гена в присутствии сыворотки, за 24 ч до начала экспериментальных воздействий клетки помещали в среду, содержащую 0,1% FBS.

Для манипуляции клеточным объемом HUVEC клетки инкубировали в течение 30 мин в 0,5 мл изоосмотической (293 мОсм) среды А (135 мМ NaCl, 3,8 мМ KCl, 1,2 мМ MgSO₄, 1,3 мМ CaCl₂, 1,2 мМ KH₂PO₄, 10 мМ D-глюкозы, 10 мМ HEPES/NaOH, pH 7,4), изоосмотической (302 мОсм) среды Б, не содержащей

ионы Na^+ (изоосмотическая среда А, где NaCl был заменен на хлорид N-метил-D-глюкамина) или гипоосмотической (197 мОсм) среды В (изоосмотическая среда А, где концентрация NaCl снижена до 85 мМ). Гиперосмотическое сжатие проводили добавлением в изоосмотическую среду А или В равного объема той же среды, дополнительно содержащей 300 мМ маннитола (конечная осмолярность 435 мОсм), с последующей инкубацией в течение 30 мин. Для выполнения изоосмотического сжатия клетки инкубировали 30 мин в гипоосмотической среде В, после чего в лунки вносили NaCl до конечной концентрации 135 мМ и инкубировали 30 мин. Кроме того, клетки инкубировали в изоосмотической среде А с добавлением 0,1 мкМ убаина в течение 60 мин для ингибирования Na,K-ATPазы .

Для оценки влияния увеличения Na^+ на экспрессию гена *FOS* в клетках HUVEC заменяли среду на экспериментальную (с добавлением 15 мМ NaCl до конечной концентрации Na^+ 140 мМ) и инкубировали в течение 1-24 ч. За 10 мин до конца инкубации в среду вносили RbCl до конечной концентрации 2,4 мМ.

Для оценки объема клеток HUVEC их подвергали изо-/гиперосмотическому сжатию и получали изображения клеток в двух перпендикулярных плоскостях. На основе этих изображений строили модель поверхности клетки и рассчитывали ее объем в программном обеспечении MATLAB.

Для определения содержания одновалентных катионов в клетках планшеты помещали в лед, среду отбрасывали, а клетки промывали трижды ледяным раствором 0,1 М MgCl_2 . Затем в каждую лунку вносили 5% трихлоруксусной кислоты, после чего содержимое лунок соскабливали и центрифугировали в течение 20 мин при 18000 g, супернатант использовали для определения содержания ионов Na^+ , K^+ , Rb^+ и Li^+ в образцах методом атомно-абсорбционной спектрометрии, а осадок растворяли в 0,1 М NaOH и определяли концентрацию белка в нем методом Лоури.

Для расчета внутриклеточных концентраций одновалентных катионов оценивали внутриклеточное содержание свободно обмениваемой воды с использованием равновесного распределения проникающего в клетки осмолита [^{14}C]-мочевины. Клетки подвергали изо-/гиперосмотическому сжатию, как описано выше, но с добавлением [^{14}C]-мочевины до конечной концентрации в лунке 2 мКи/мл. Клетки лизировали, радиоактивность полученного лизата определяли на жидкостном сцинтилляторе. Полученные значения нормировали на концентрацию белка в лизате, определенную методом Лоури.

Для оценки неспецифического влияния убаина на клеточную сигнализацию в индукции экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K-ATPase клетки инкубировали в среде с соотношением внеклеточных концентраций Na^+/K^+ , близким к нормальному (92 мМ Na^+ /8 мМ K^+ : 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7,4, 88 мМ NaCl, 8 мМ KCl, 0,6 мМ MgCl_2 , 5 мМ глюкоза, 80 мМ маннитол, 50 мкМ ЭГТА), или в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения (8 мМ Na^+ /92 мМ K^+ : 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7,4, 4 мМ NaCl, 92 мМ KCl, 0,6 мМ MgCl_2 , 5 мМ глюкоза, 80 мМ маннитол, 50 мкМ ЭГТА) в течение 3 ч в присутствии или в отсутствие 3 мкМ убаина и/или ингибиторов протеинкиназ.

Для оценки редокс статуса цитоплазмы и внутриклеточного pH в клетках HeLa при повышении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения мы использовали генетически кодируемые сенсоры HyPer7 и SypHer3s, чувствительные к концентрации АФК и pH соответственно. Плазмиды на основе вектора pCS2+, кодирующие HyPer7 и SypHer3s, были любезно предоставлены Вероникой Алексеевной Катрухой. Трансфекцию проводили с использованием реагента Lipofectamine 2000. Через 48 ч после трансфекции клетки помещали в среды, содержащие 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ или 8 мМ Na^+ и 92 мМ K^+ и визуализировали в двух каналах при длинах волн возбуждения флуоресценции 395 и 470 нм и при длине волны эмиссии 510 нм.

Для оценки количества мРНК *FOS* клетки лизировали реагентом Trizol (Invitrogen, США). Выделение РНК проводили с помощью фенол-хлороформной экстракции с последующим нанесением водной фазы на спин-колонки

Quick-RNA MicroPrep (Zymo Research, США) и очисткой РНК на них. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, США) и случайных гексапраймеров. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения количественной полимеразной цепной реакции в присутствии SYBR-Green и Taq-полимеразы (Синтол, Россия) с использованием пар праймеров, специфичных к генам *FOS*, *GAPDH* и *RPLP0*. Результаты нормировали на количество мРНК референсных генов *GAPDH* и *RPLP0* в клетках HUVEC и HeLa соответственно по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Для определения уровня фосфорилирования протеинкиназ разделение белков клеточных лизатов проводили методом денатурирующего электрофореза по Лэммли. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с использованием мокрого электропереноса. Визуализацию белков осуществляли с помощью моноклональных антител кролика, специфичных к определенной протеинкиназе (ERK1/2, JNK и p38) в фосфорилированной и нефосфорилированной формах.

Для оценки структуры G4 синтезировали олигонуклеотиды, потенциально формирующие G4 в составе промоторов генов *FOS*, *MYC* и *KIT*, теломерные G4 (22AG) (Таблица 1). Олигонуклеотиды (2 мкМ) плавили при 95°C в течение 5 мин в присутствии 10 мМ HEPES-Трис, pH 7,4, а также NaCl и KCl с суммарной концентрацией одновалентных катионов, равной 100 мМ, либо 2 мМ NaCl, 40 мМ KCl и 80 мМ LiCl, после чего охлаждали во льду 5 мин и оценивали их конформацию методом спектроскопии кругового дихроизма.

Для обработки результатов использовали программное обеспечение Graph Pad Prism 9.0, Origin 2021, R 4.5.1 и Microsoft Excel 2016. При статистической обработке проверяли нормальность распределения данных с помощью теста Шапиро-Уилка. Для нормально распределенных данных использовали t-тест Стьюдента или ANOVA с последующим тестом Тьюки. Для данных с ненормальным распределением проводили тест Манна-Уитни или тест Краскела-Уоллис.

Таблица 1. Последовательности синтетических олигонуклеотидов.

Название	Последовательность (5'→3')
FOS _{G4} 1	CTGTGTAAGGGGGGAGGGATTGACGGGAA
FOS _{G4} 2	GCGGGGGCAGGGAGCTGCGAGCGCTGGGGAC
FOS _{G4} 3	GAGGGGTGGCGCGCGGGCCTGGGGCG
MYC _{G4}	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA
22AG	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
KIT _{G4}	GGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Работа посвящена изучению явления Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках человека, она разбита на две части. Первая часть посвящена регуляции *FOS* в клетках эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) при изменении осмолярности внеклеточной среды. Эта часть работы дает ответ на следующий вопрос: может ли изменение внеклеточной осмолярности влиять на ионный баланс клетки эндотелия и может ли это приводить к индукции экспрессии *FOS*, а если может, то какой вклад в этот эффект вносит изменение клеточного объема? Вторая часть диссертации посвящена непосредственному изучению механизма Na^+/K^+ -зависимой регуляции гена *FOS* в клетках аденокарциномы человека HeLa. Мы выбрали эту культуру по двум причинам. Во-первых, в ранее упомянутой работе было показано, что индукция экспрессии *FOS* в ответ на увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa и HUVEC имеет схожий характер. Во-вторых, это более удобная и дешевая в работе культура, по сравнению с первичной культурой HUVEC.

Изменение объема клеток HUVEC приводит к индукции экспрессии FOS только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения

Известно, что внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение и объем клеток взаимосвязаны, поэтому мы разработали модель, которая позволяет манипулировать объемом клеток HUVEC и их внутриклеточным ионным

составом независимо друг от друга (Рис. 1 А). Во-первых, мы проводили ингибирование Na,K-АТФазы клеток HUVEC 0,1 мкМ уабаина в течение 1 ч. Важно отметить, что при этом объем клеток не изменялся (Рис. 1 Б), внутриклеточная концентрация Na^+ увеличивалась примерно в 2 раза, а уровень мРНК *FOS* возрастал в 3 раза (Рис. 1 В). Во-вторых, мы проводили изоосмотическое сжатие клеток. При этом клетки сначала переводили в гипоосмотическую среду (197 мОсм), что сопровождалось их быстрым набуханием вплоть до 175% от исходного объема (Рис. 1 Б). Далее объем клеток восстанавливался в результате регуляторных клеточных процессов в течение 30 мин. После этого в среду вносили NaCl до изоосмотических условий (302 мОсм), что приводило к сжатию клеток примерно в 2 раза по отношению к исходному объему (Рис. 1 Б). При таком типе сжатия внутриклеточные концентрации Na^+ и K^+ и количество мРНК *FOS* не изменялись по сравнению с контрольными образцами (Рис. 1 В). В-третьих, мы подвергали клетки HUVEC гиперосмотическому сжатию двумя способами: путем инкубации в течение 30 мин в среде, содержащей 135 mM Na^+ , а также в среде с полной заменой ионов Na^+ на ионы аминасахара. С целью увеличения осмолярности в эти среды добавляли 100 mM маннитола, что приводило к быстрому уменьшению объема клеток примерно в 2 раза (Рис. 1 Б). При этом инкубация клеток в среде, содержащей ионы Na^+ , приводила к увеличению внутриклеточной концентрации этого иона в 2 раза, что также сопровождалось увеличением уровня мРНК *FOS*. В случае гиперосмотического сжатия клеток в отсутствие ионов Na^+ во внеклеточной среде наблюдалось уменьшение внутриклеточной концентрации этого иона, а экспрессия *FOS* при этом не изменялась (Рис. 1 В). Таким образом, увеличение осмолярности внеклеточной среды приводит к индукции экспрессии *FOS* в клетках HUVEC только в случае увеличения внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения. Изменение клеточного объема без увеличения внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения не приводило к изменению количества мРНК *FOS*.

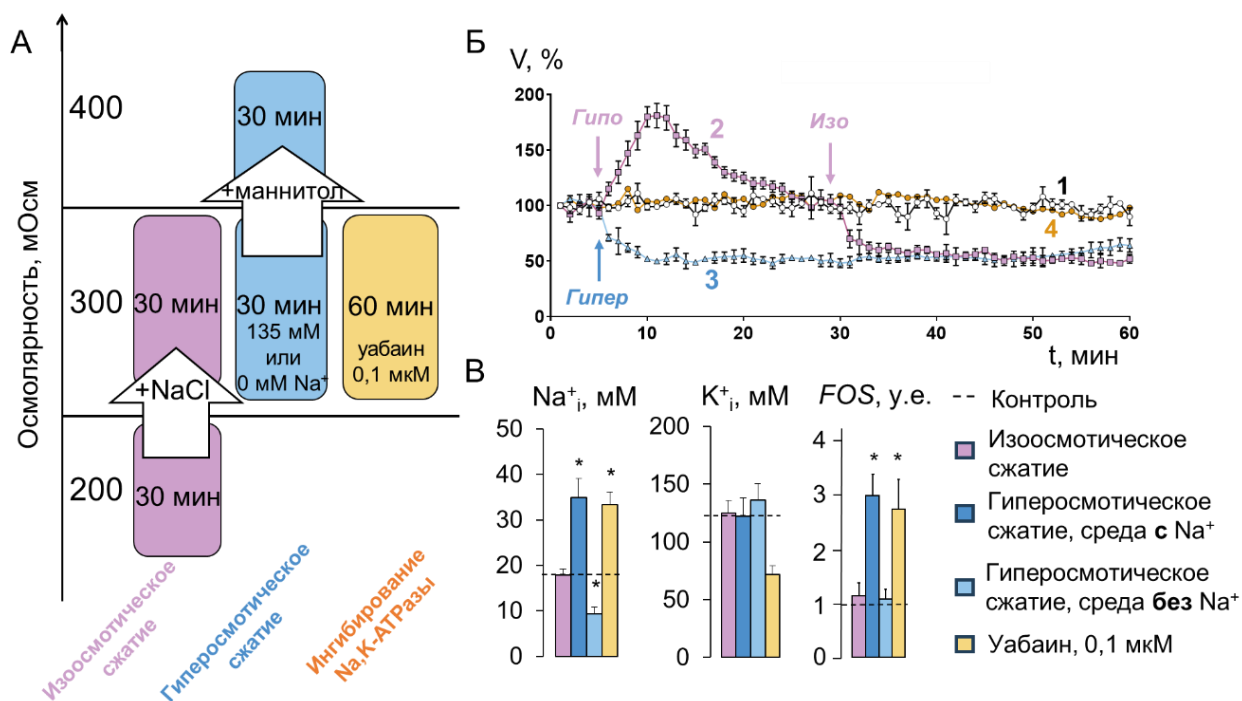


Рис. 1. Влияние изменения объема клеток HUVEC на содержание ионов Na⁺ и K⁺ и уровень мРНК FOS в этих клетках. А – схема экспериментов по манипуляции объемом клеток HUVEC; представлена ось, указывающая на осмолярность среды. Б – изменение объема клеток HUVEC, определенного методом DISUR, при разных вариантах сжатия: 1 – контроль, 2 – изоосмотическое сжатие, 3 – гиперосмотическое сжатие, 4 – убаин, 0,1 мкМ. Время перевода клеток в среды с определенной осмолярностью указано стрелками. В – влияние сжатия клеток HUVEC и ингибирования Na,K-АТФазы на внутриклеточные концентрации Na⁺ и K⁺ (Среднее ± стандартная ошибка среднего), а также на уровень мРНК FOS. Количество независимых экспериментов составляло 3-4. Статистически значимые отличия опытных образцов от контроля выявляли с помощью ANOVA с последующим тестом Тьюки, * – *p* value < 0,05

Далее мы оценили влияние умеренного увеличения внеклеточной концентрации Na⁺ (в физиологическом диапазоне этого параметра в крови человека) на внутриклеточный ионный баланс и экспрессию FOS в клетках HUVEC. Мы обнаружили, что при инкубации клеток в присутствии 140 mM Na⁺ (против 125 mM Na⁺ в контрольной среде) в течение 1 ч наблюдается небольшое, но статистически значимое уменьшение внутриклеточного содержания Na⁺_i на ~10%, после чего его содержание стабилизируется на уровне контроля (Рис. 2 А), что, скорее всего, связано с изменением активности Na,K-АТФазы. Для подтверждения роли Na,K-АТФазы в восстановлении ионного баланса мы

оценивали внутриклеточный вход Rb^{+} в условиях увеличения концентрации Na^{+} во внеклеточной среде. Нам удалось зарегистрировать статистически значимое увеличение входа Rb^{+} в клетку на 10-25% при 1 и 3 ч инкубации, что подтверждает наше предположение об активации Na,K-АТФазы. При этом увеличение внеклеточной концентрации Na^{+} на 15 мМ не влияло на количество мРНК *FOS* (Рис. 2 Б). Таким образом, увеличение внеклеточной концентрации Na^{+} , не приводящее к накоплению этого иона в клетках эндотелия вследствие увеличения выхода Na^{+} из клетки посредством работы Na,K-АТФазы, не индуцирует транскрипцию гена *FOS* в клетках HUVEC.

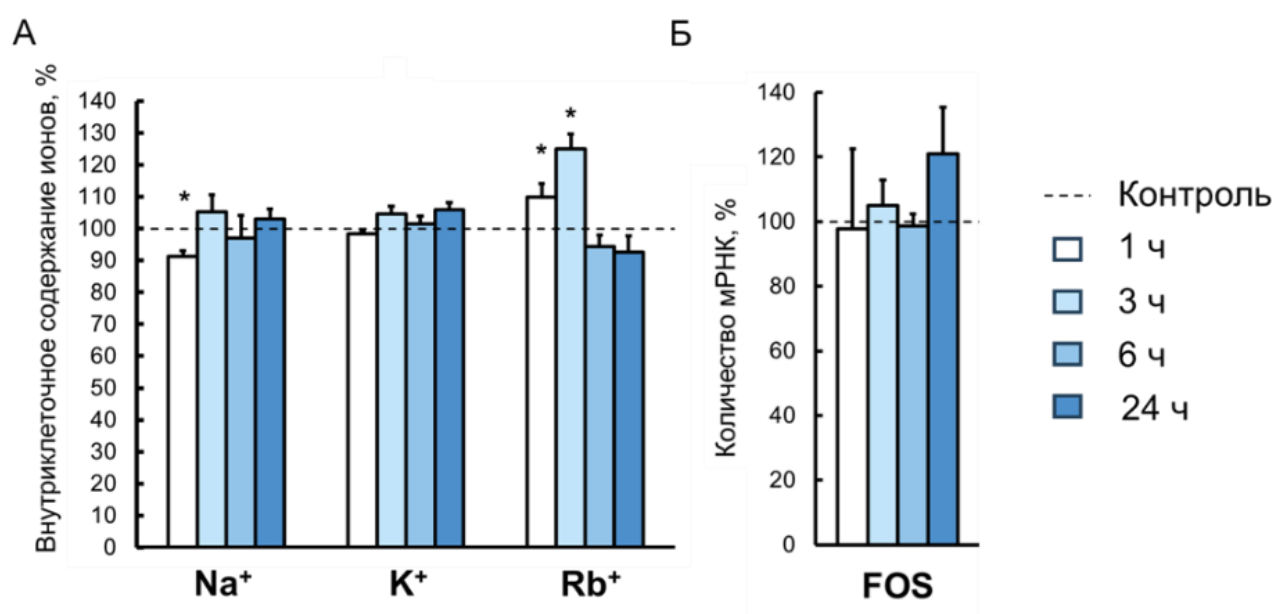


Рис. 2. Влияние увеличения внеклеточной концентрации NaCl на 15 мМ (до 140 мМ) в течение 1-24 часов на внутриклеточное содержание Na^{+} , K^{+} и вход Rb^{+} в клетку (А), а также на количество мРНК *FOS* (Б). На графике представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка в % от контрольного значения, которое принято за 100%. Количество независимых экспериментов составило 6-12 для А и 3 для Б. Статистически значимые отличия выявляли критерием Краскела Уоллеса, * – p value < 0,05 по сравнению с контрольными образцами.

Убаин увеличивает уровень мРНК *FOS* именно за счет повышения Na^{+}/K^{+} -соотношения в клетках HeLa

Для последующих экспериментов мы разработали модель, позволяющую оценить неспецифическое влияние убаина на клеточную сигнализацию. Мы инкубировали клетки HeLa в среде с соотношением внеклеточных концентраций

Na^+/K^+ , близким к нормальному (92 mM Na^+ и 8 mM K^+), или в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения (8 mM Na^+ и 92 mM K^+), которая приводит к деполяризации плазматической мембраны клеток, в течение 3 ч. Чтобы исключить влияние входа Ca^{2+} через Ca-каналы при деполяризации мембраны, все экспериментальные воздействия проводили в отсутствие Ca^{2+} , добавляя в среду 50 мкМ ЭГТА. Соотношение $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ в клетках после инкубации в обеих средах составляло $\sim 0,1$ (Рис. 3 А). Обработка клеток 3 мкМ убаина в среде, содержащей 92 mM Na^+ и 8 mM K^+ , в течение 3 ч приводила к увеличению внутриклеточного содержания Na^+_{i} (с 74 ± 6 до $592 \pm 66 \text{ нмоль/мг белка}$), уменьшению внутриклеточного содержания K^+_{i} (с 727 ± 81 до $166 \pm 19 \text{ нмоль/мг белка}$) и повышению уровня мРНК *FOS* в 42 раза. В то же время инкубация клеток в среде с инверсией Na^+/K^+ в присутствии убаина обеспечивала небольшое увеличение внутриклеточного содержания Na^+_{i} (с 90 ± 6 до $133 \pm 6 \text{ нмоль/мг белка}$) и не оказывала достоверного влияния на внутриклеточное содержание K^+_{i} и количество мРНК *FOS* (Рис. 3 А, Б).

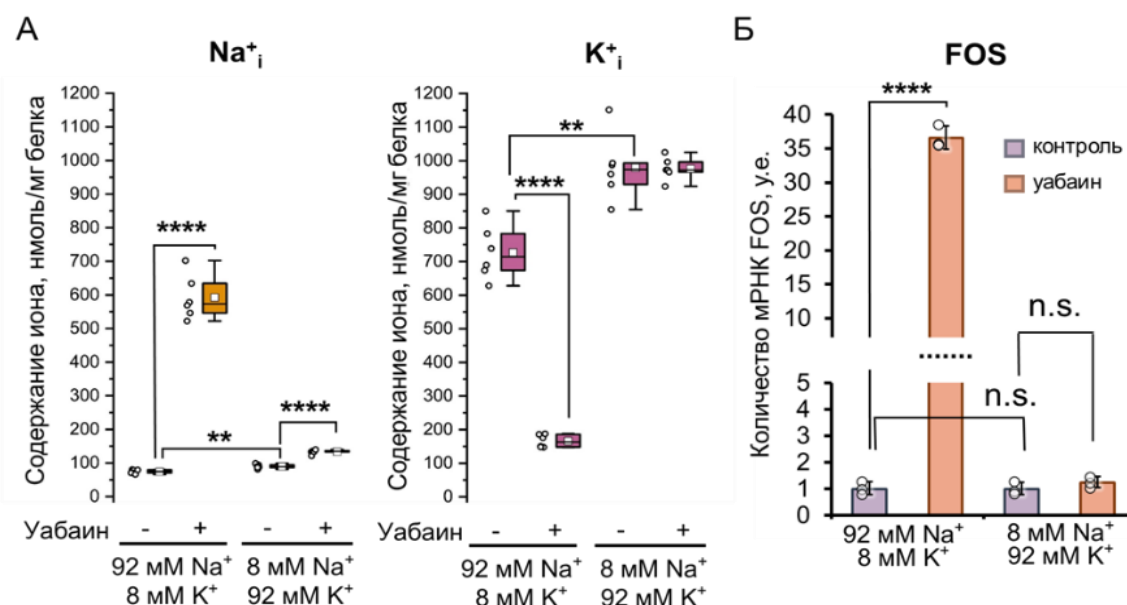


Рис. 3. Влияние ингибирования Na,K-ATPase клеток *HeLa* 3 мкМ убаином в средах с различным соотношением внеклеточных концентраций Na^+/K^+ в течение 3 ч на внутриклеточное содержание Na^+_{i} и K^+_{i} (А) и количество мРНК *FOS*, нормированное на контроль (Б). Результаты представлены в виде «ящиков с усами» (А), либо геометрических средних $\pm$ стандартное отклонение (Б). Количество независимых экспериментов составляло 6 (А) или 3 (Б), индивидуальные значения представлены в виде кругов. Статистически значимые отличия выявляли методом ANOVA с последующим тестом Тьюки, n.s. – $p\text{-value} > 0,05$; ** – $p\text{-value} < 0,01$; **** – $p\text{-value} < 0,0001$.

Эти результаты указывают на то, что индукция экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K-АТФазы скорее всего не связана с деполяризацией мембраны и не обусловлена неспецифическим влиянием убаина на сигнальные системы клетки.

Повышение внутриклеточного Na^+_i/K^+_i -соотношения приводит к активации MAPK, что не является необходимым для индукции FOS

Поскольку экспрессия гена *FOS* тесно связана с активностью MAPK, мы определили уровень их фосфорилирования в разработанной нами модели. После инкубации клеток HeLa в присутствии 3 мкМ убаина в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , в течение 0,5 ч уровень фосфорилирования ERK1/2, JNK1/2 и p38 не изменялся, тогда как после 3 ч инкубации наблюдалось значительное фосфорилирование ERK1/2, JNK1/2 и p38. В среде с инвертированным Na^+/K^+ -соотношением убаин не влиял на фосфорилирование этих киназ (Рис. 4 А). Таким образом, по-видимому, именно увеличение внутриклеточного Na^+_i/K^+_i -соотношения приводит к фосфорилированию MAPK.

Затем мы оценили вклад MAPK в активацию транскрипции гена *FOS*. Для этого клетки инкубировали в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , в присутствии 3 мкМ убаина и селективных ингибиторов этих киназ: 20 мкМ BVD-523 (ингибитор ERK1/2), 20 мкМ SP600125 (ингибитор JNK), 20 мкМ SKF-86002 (ингибитор p38). Инкубация клеток в присутствии SP600125 не оказала влияния на экспрессию *FOS*, в то время как эффект BVD-523 и SKF-86002 выражался в уменьшении количества мРНК этого гена до 23 и 39% соответственно по сравнению с контрольными образцами (Рис. 4 Б). Одновременное присутствие SP600125, BVD-523 и SKF-86002 в среде обеспечивало уменьшение уровня мРНК *FOS* до 6% по сравнению с количеством мРНК *FOS* в контрольных образцах. Несмотря на это, ингибиторы MAPK не оказали влияния на величину активации экспрессии *FOS* убаином, которая составила 2,4, 2,9, 2,3, 2,2 и 2,1 в случае контроля, BVD-523, SP600125, SKF-86002 и одновременного внесения 3-х ингибиторов соответственно (Рис. 4 Б). Таким образом, невзирая на активацию MAPK в ответ на увеличение

внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ , наличие их активности не является необходимым условием для обеспечения Na^+/K^+ -зависимой регуляции *FOS*.

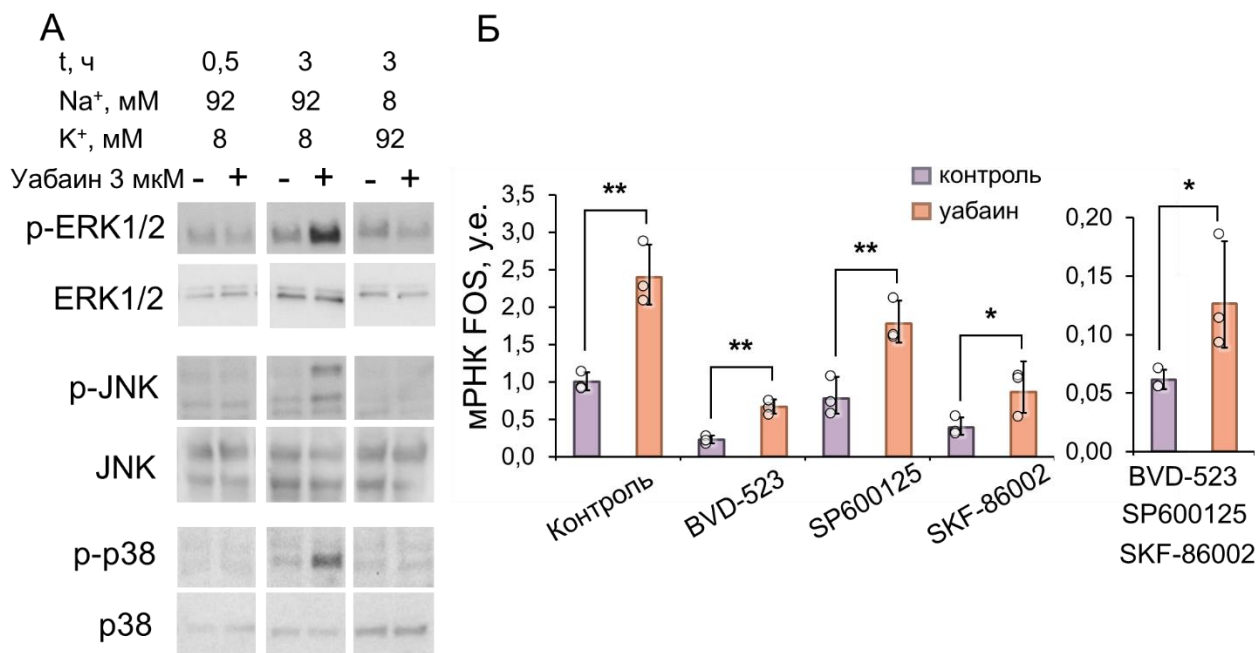


Рис. 4. Роль MAPK в индукции экспрессии *FOS* при ингибировании Na,K -АТФазы в клетках HeLa. Клетки инкубировали в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , или в среде с инверсией Na^+/K^+ -соотношения в присутствии и в отсутствие 3 мкМ уабаина в течение 0,5 и 3 ч. Уровень фосфорилирования *ERK1/2*, *JNK1/2* и *p38* определяли методом Вестерн блоттинга. А – репрезентативные изображения мембран после визуализации комплексов антиген-антитело. Б – уровень мРНК *FOS* в отсутствие или в присутствии 20 мкМ ингибиторов MAPK ($n = 3$, геометрическое среднее $\pm$ стандартное отклонение, индивидуальные значения представлены в виде кругов). Статистически значимые отличия выявляли *t*-тестом, * – p value < 0,05; ** – p value < 0,01.

Увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ приводит к увеличению внутриклеточного рН и не стимулирует генерацию АФК

Поскольку внутриклеточное соотношение Na^+/K^+ может быть связано с внутриклеточным рН, а также гипотетически способно влиять на генерацию АФК, мы трансфицировали клетки HeLa генетически кодируемыми сенсорами HyPer7, который чувствителен к редокс-статусу клетки, и SypHer3s, который чувствителен к внутриклеточному рН.

Мы обнаружили что сигнал HyPer7 в среде, содержащей 92 мМ Na^+ и 8 мМ K^+ , был постоянным (Рис. 5 А, левая панель), в то время как в среде, содержащей

8 мМ Na⁺ и 92 мМ K⁺, он увеличивался со временем (Рис. 5 Б, левая панель). Внесение 3 мкМ убаина в среду инкубации не влияло на сигнал HyPer7 как в присутствии 92 мМ Na⁺ : 8 мМ K⁺, так и в присутствии 8 мМ Na⁺ : 92 мМ K⁺. В качестве положительного контроля мы добавляли 200 мкМ H₂O₂ после 3 ч инкубации клеток в присутствии убаина, что обеспечивало более чем 10-кратный рост сигнала.

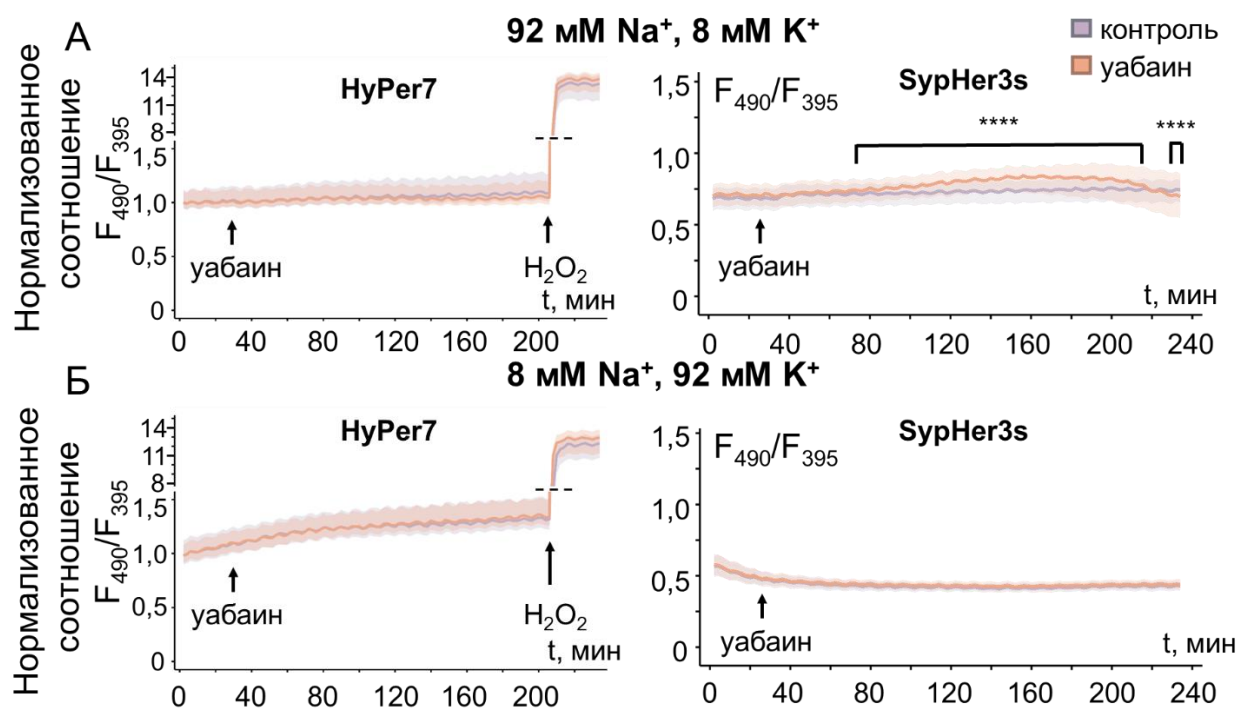


Рис. 5. Динамика редокс статуса клетки и pH в клетках HeLa. Клетки, экспрессирующие HyPer7 или SypHer3s, помещали в среды, содержащие 92 мМ Na⁺ и 8 мМ K⁺ (А) или 8 мМ Na⁺ и 92 мМ K⁺ (Б). После записи базовой линии флуоресценции в среду вносили убаин до конечной концентрации 3 мкМ и вели съемку клеток в течение 3 ч с интервалом 2 мин. В контрольные образцы убаин не вносили. Затем в лунки с клетками, экспрессирующими HyPer7, добавляли 200 мкМ H₂O₂. Для SypHer3s представлено соотношение флуоресценции при длинах волн возбуждения 490 и 395 нм, для HyPer7 представлено соотношение, нормализованное на базовую линию. Увеличение сигнала HyPer7 соответствует повышению уровня окислителей. Увеличение сигнала SypHer3s соответствует росту внутриклеточного pH. Представлены медианы ± интерквартильный размах, количество клеток составило 805 – 1102, количество независимых лунок 3. Статистически значимые отличия выявляли тестом Манна-Уитни, **** – *p*-value < 0.001.

При микроскопии клеток, экспрессирующих SypHer3s, мы обнаружили, что в присутствии 8 мМ Na⁺ : 92 мМ K⁺ сигнал сенсора падает со временем,

указывая на возможное закисление цитоплазмы (Рис. 5 Б, правая панель). В этой среде внесение 3 мкМ убаина не влияло на флуоресценцию сенсора в течение 3 ч. В присутствии 92 мМ Na^+ : 8 мМ K^+ сигнал сенсора был стабилен на протяжении всего времени съемки, а внесение 3 мкМ убаина приводило к постепенному повышению сигнала, достигающего пика при 2 ч инкубации, и последующему его падению вплоть до значений ниже уровня контроля (Рис. 5 А, правая панель).

Таким образом, увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения не приводит к увеличению концентрации АФК в цитоплазме клетки, но приводит к временному повышению внутриклеточного pH.

В промоторной области гена FOS человека обнаруживается как минимум три G4, обладающих чувствительностью к Na^+/K^+ -соотношению

G4 являются перспективным кандидатом на роль сенсора одновалентных катионов. Любопытным фактом является их крайне высокая встречаемость в промоторах протоонкогенов. Гены *MYC* и *KIT* уже давно рассматривают как классические модели генов, имеющих в составе своих промоторов G4. Хотя *FOS* также относится к протоонкогенам, нам не удалось найти в литературе четких указаний на присутствие G4 в его промоторной области. В связи с этим мы провели биоинформатический анализ промоторного региона *FOS* человека и обнаружили как минимум три PQS.

Далее мы синтезировали олигонуклеотиды, соответствующие PQS в промоторе гена *FOS* (Рис. 6 А) и с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма оценили структуру этих олигонуклеотидов в присутствии разных соотношений K^+/Na^+ : 100 мМ : 0 мМ, 80 мМ : 20 мМ, 50 мМ : 50 мМ, 20 мМ : 80 мМ и 0 мМ : 100 мМ. Кроме того, мы использовали среду, которая содержит 2 мМ Na^+ , 40 мМ K^+ и 80 мМ Li^+ . Этот состав отражает концентрации одновалентных катионов в клетках HeLa при замене внеклеточных ионов Na^+ на ионы Li^+ . Кроме того, мы использовали G4 из промоторов *KIT* и *MYC*, а также 22AG, который является G4 теломерной ДНК человека.

В первую очередь следует отметить, что все изучаемые нами последовательности в присутствии 100 мМ K^+ имели спектры, характерные для сформированных G4, однако эти G4 формировали структуры разных типов (Рис. 6 Б). FOS_{G41} во всех используемых средах образовывал параллельную структуру G4. Увеличение концентрации Na^+ в растворе приводило к падению амплитуды пиков примерно на 30%, однако этот эффект наблюдался только при полной замене K^+ на Na^+ ; присутствие Li^+ снижало амплитуду пиков на 40%.

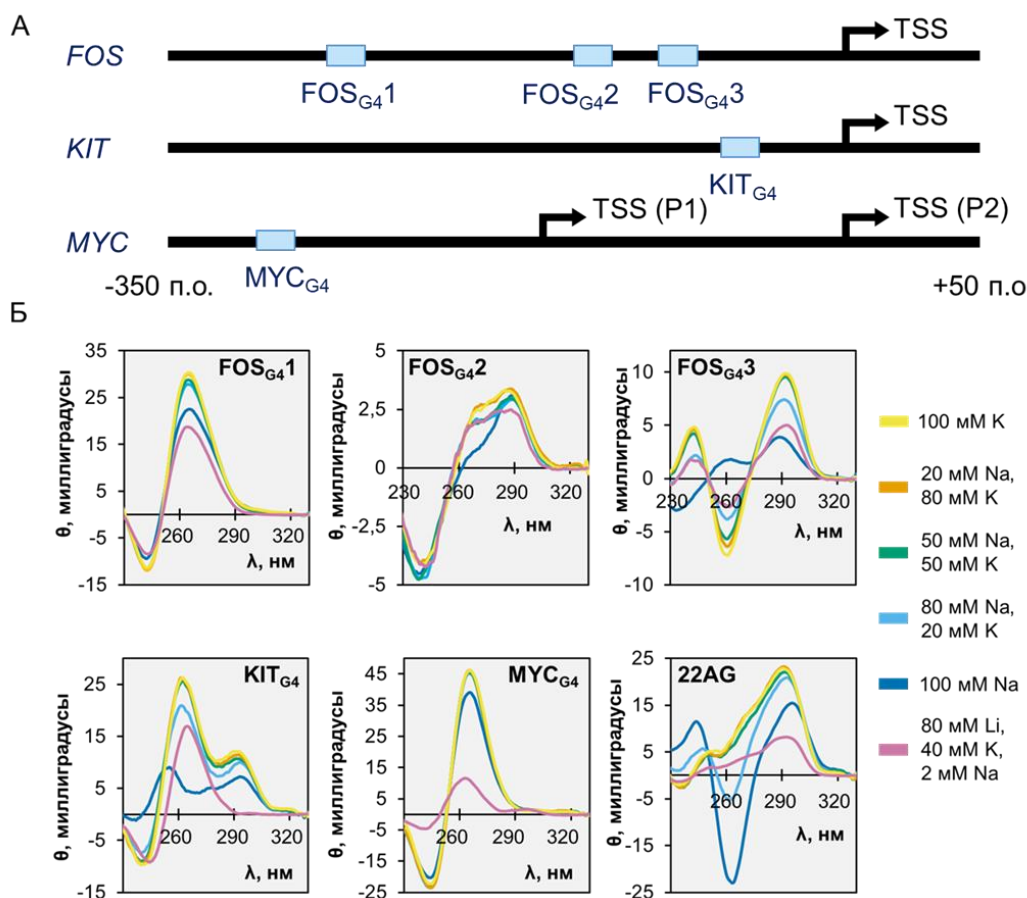


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма последовательностей, потенциально формирующих G квадруплексы (PQS). А – относительное расположение PQS в промоторах генов FOS, KIT и MYC (от -350 до +50 п.о. относительно старта транскрипции). Б – спектры кругового дихроизма PQS в присутствии различных соотношений концентраций одновалентных катионов.

Спектр FOS_{G42} во всех растворах соответствовал гибридному G4. Существенное изменение спектра наблюдалось только в присутствии 100 мМ Na^+ и проявлялось в виде падения эллиптичности при 260 нм до 0 миллиградусов. Спектр FOS_{G43} в присутствии ионов K^+ соответствовал антипараллельной

структуре G4. При увеличении Na^+/K^+ -соотношения до 80:20 наблюдалось уменьшение амплитуды пиков на 20-50%, наличие Li^+ в среде оказывало схожий эффект. В присутствии 100 мМ Na^+ спектр не являлся характерным для G4 структур.

KIT_{G4} в присутствии K^+ и в отсутствие Li^+ образовывал гибридный G4, амплитуда пиков его спектра уменьшалась на 0-20% при повышении соотношения Na^+/K^+ до 80:20. В присутствии только ионов Na^+ спектр приобретал не характерные для G4 свойства. В присутствии Li^+ G4 имел параллельную структуру.

Спектр MYC_{G4} соответствовал параллельному G4. Полная замена K^+ на Na^+ снижала амплитуду пиков на 15%, а присутствие Li^+ – на 80%. При Na^+/K^+ -соотношении, равном 50:50 и меньше, спектр 22AG соответствовал гибридной структуре G4. В присутствии Li^+ амплитуда пиков падала на 75%. Повышение Na^+/K^+ -соотношения до 80:20 и более приводило к изменению типа G4 на антипараллельный.

Таким образом, все изучаемые нами олигонуклеотиды, в том числе 3 PQS из промотора *FOS*, формировали G4 структуры разных типов в условиях *in vitro*. Все эти последовательности характеризуются разной чувствительностью к соотношениям концентраций одновалентных катионов.

Заключение

Суммируя все результаты, полученные в ходе выполнения этой работы, мы можем заключить, что в клетке существует сенсор концентраций одновалентных катионов, который может регулировать экспрессию гена *FOS*. Работа этого сенсора не зависит от повышения концентраций ионов Ca^{2+} или АФК в цитоплазме, изменения объема клетки, активности MAPK (Рис. 7). Кроме того, влияние этого сенсора на экспрессию гена *FOS* не обусловлено изменением мембранного потенциала (Рис. 7).

Мы обнаружили, что увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения сопровождается временным повышением внутриклеточного pH, которое сменяется закислением цитоплазмы. В дальнейшем необходимо изучить роль

повышения этого параметра в регуляции экспрессии *FOS*. Кроме того, мы впервые показали, что в промоторе *FOS* человека существует как минимум три последовательности, формирующие G4 в условиях *in vitro* и обладающие разной чувствительностью к одновалентным катионам. Однако для подтверждения вовлеченности этих структур в Na^+/K^+ -зависимую регуляцию экспрессии *FOS*, необходимы дальнейшие исследования.

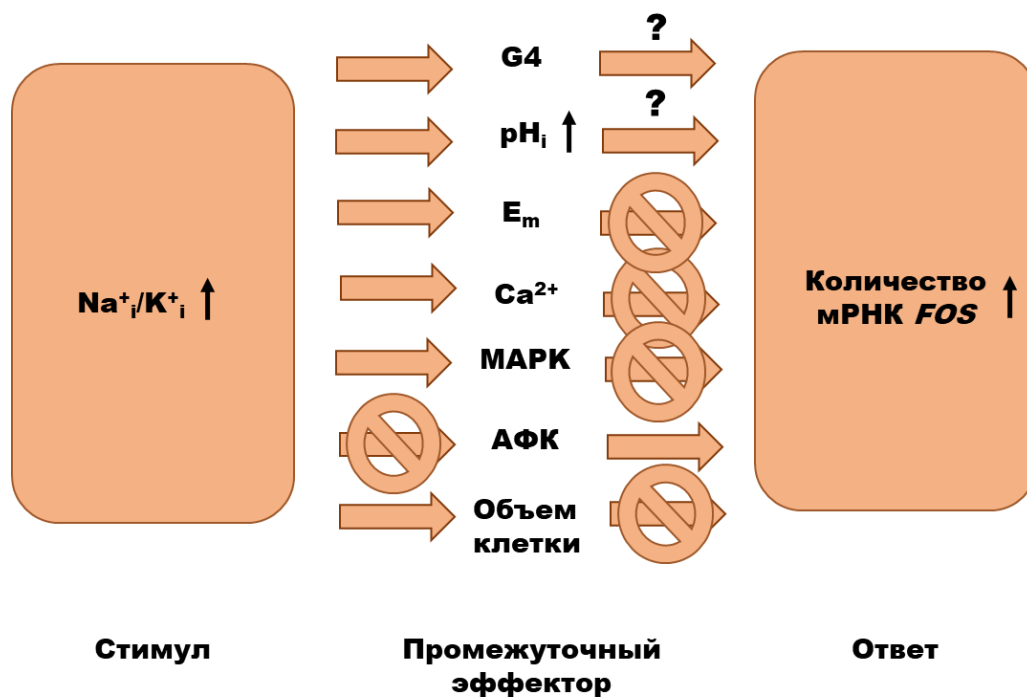


Рис. 7. Возрастание внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения увеличивает количество мРНК *FOS* через механизм, не связанный с изменением потенциала плазматической мембраны клетки (E_m), повышением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, увеличением активности MAPK, увеличением генерации АФК или изменением объема клетки. Результаты диссертационной работы указывают на возможное участие двух промежуточных эффекторов в Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии *FOS*: изменение внутриклеточного pH и/или структуры G4 в геноме клетки.

Внутриклеточное Na^+/K^+ -соотношение вопреки расхожему мнению не является постоянным параметром в клетках животных, оно может изменяться в ответ на различные стимулы. Это делает изучение Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии генов крайне важным для понимания механизмов патогенеза огромного ряда заболеваний, затрагивающих ион-транспортирующие системы, в том числе сердечно-сосудистые, онкологические, нейропатологические. Эта

диссертационная работа может послужить в качестве основы для будущих исследований в малоизученной области Na^+/K^+ -зависимой регуляции экспрессии генов и для разработки новых подходов к терапии заболеваний, связанных с нарушениями ионного транспорта.

Выводы

1. Изменение объема клеток HUVEC приводит к увеличению экспрессии *FOS* в этих клетках только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
2. Увеличение внеклеточной концентрации Na^+ от 125 до 140 мМ приводит к увеличению активности Na,K-АТФазы и не влияет на экспрессию *FOS* в клетках HUVEC.
3. Убаин индуцирует экспрессию *FOS* в клетках HeLa только при увеличении внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
4. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa сопровождается фосфорилированием ERK1/2, JNK и p38. Ингибирование этих протеинкиназ не подавляет активацию транскрипции *FOS* в ответ на увеличение внутриклеточного Na^+/K^+ -соотношения.
5. Увеличение Na^+/K^+ -соотношения в клетках HeLa не приводит к генерации активных форм кислорода в цитоплазме и сопровождается временным повышением внутриклеточного pH.
6. Три последовательности из промоторного региона *FOS* человека формируют G-квадруплексы *in vitro*, которые изменяют свою структуру в зависимости от Na^+/K^+ -соотношения или в присутствии ионов Li^+ .

Список публикаций по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science (WoS), РИНЦ:

1. A. A. Shiyan, S. V. Sidorenko, **D. A. Fedorov**, E. A. Klimanova, L. V. Smolyaninova, L. V. Kapilevich, R. Grygorczyk, and S. N. Orlov. Elevation of intracellular Na^+ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2019. – Vol. 53. – №. 4. – P. 638–647. – EDN: IGHFSQ. Импакт-фактор 2,0 (JIF) (1,155/0,2)*
2. **D. A. Fedorov**, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, E. Y. Parshina, A. M. Tverskoi, P. A. Abramicheva, G. V. Maksimov, S. N. Orlov, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova. $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl // *Heliyon*. – 2021. – Vol. 7. – №. 9. – P. e08088. – EDN: BYCCLW. Импакт-фактор 3,6 (JIF) (1,155/0,3)*
3. Лопина О.Д., **Федоров Д.А.**, Сидоренко С.В., Букач О.В., Климанова Е.А. Ионы натрия как регуляторы транскрипции в клетках млекопитающих // *Биохимия*. – 2022. – Т. 87. – №. 8. – С. 1132-1144. – EDN: AYZLMK. Импакт-фактор 0,856 (РИНЦ) (1,5/0,35)*
- О. D. Lopina, **D. A. Fedorov**, S. V. Sidorenko, O. V. Bukach, and E. A. Klimanova. Sodium ions as regulators of transcription in mammalian cells // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – Vol. 87. – №. 8. – P. 789-799. – EDN: UXVNDM. Импакт-фактор 2,2 (JIF) (1,155/0,3)*
4. O. D. Lopina, S. V. Sidorenko, **D. A. Fedorov**, and E. A. Klimanova. G -quadruplexes as sensors of intracellular Na^+/K^+ ratio: Potential role in regulation of transcription and translation // *Biochemistry (Moscow)* – 2024. – Vol. 89. – №. (Suppl. 1) – P. S262–S277. – EDN: MYHYRO. Импакт-фактор 2,2 (JIF) (1,85/0,4)*

*-объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ANOVA – дисперсионный анализ

AP-1 – активирующий белок 1 (транскрипционный фактор)

DMEM – модифицированная среда Дульбеко

E_m – потенциал на плазматической мембране

ENaC – амилорид-чувствительные эпителиальные Na-каналы

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

FOS – гомолог онкогена вируса остеосаркомы мыши FBJ

G4 – G-квадруплекс

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

HUVEC – клетки эндотелия пупочной вены человека

MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы

PQS – последовательность, потенциально формирующая G-квадруплекс

RIPA – буфер для радиоиммунопреципитации

RPLP0 – субединица бокового стебля рибосомального белка P0

SRE – элемент ответа на сыворотку

АФК – активные формы кислорода

кДНК – комплементарная ДНК

ЭГТА – этиленгликольдиаминтетрауксусная кислота