

УДК 577.24

## БИОГЕНЕЗ микроРНК ПРИ КЛЕТОЧНОМ СТАРЕНИИ, ИНДУЦИРОВАННОМ ХРОНИЧЕСКИМ СТРЕССОМ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

© 2023 г. Д. М. Зайченко<sup>а</sup>, А. А. Микрюкова<sup>а</sup>, Я. Р. Астафьева<sup>а</sup>, С. Г. Малахо<sup>с</sup>,  
А. А. Кубатиев<sup>а, б</sup>, А. А. Московцев<sup>а, б, \*</sup>

<sup>а</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>б</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125993 Россия

<sup>с</sup>Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы,  
Москва, 125284 Россия

\*e-mail: bioinf@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

Малые некодирующие РНК (микроРНК) регулируют экспрессию генов, стабилизируют клеточный фенотип и играют важную роль в дифференцировке, развитии и апоптозе клеток. Канонический путь биогенеза микроРНК включает несколько этапов посттранскрипционного процессинга и транспорта и завершается цитоплазматическим расщеплением пре-микроРНК рибонуклеазой типа III DICER с формированием зрелого дуплекса, который встраивается в комплекс RISC. Биогенез микроРНК и их роль в таком важном процессе, как клеточный стресс, изучены недостаточно. В данной работе с использованием проточной цитофлуориметрии и высокопроизводительного анализа экспрессии генов показано, что хронический стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) — один из видов клеточного стресса, связанного с нарушением сворачивания белков в ЭПР — приводит к формированию фенотипа клеточного старения в фибробластоподобных клетках FRSN. Острый стресс ЭПР способен снижать биогенез микроРНК, тогда как хронический стресс не вызывает существенного падения глобальной экспрессии микроРНК и сопровождается лишь незначительным снижением экспрессии мРНК DICER1. Обнаружено также увеличение гетерогенности клеточной популяции по активности лизосомной бета-галактозидазы при хроническом стрессе ЭПР. Не исключена индуцируемая или исходная неоднородность клеточной популяции и по экспрессии компонентов пути биогенеза микроРНК.

**Ключевые слова:** стресс эндоплазматического ретикулума, стресс-индуцируемое старение, биогенез микроРНК

**DOI:** 10.31857/S0026898423040250, **EDN:** QMCHZK

### ВВЕДЕНИЕ

Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) — один из наиболее изученных видов клеточного стресса [1–4]. ЭПР играет важную роль в синтезе и созревании белков, а действие факторов стресса вызывает дисфункцию системы сворачивания белков в этом компартменте. В результате развивается протеотоксический клеточный стресс с накоплением в просвете ЭПР и цитоплазме токсичных и склонных к агрегации белков с дефектными конформациями. При стрессе ЭПР активируется система сигнальных каскадов, названная системой ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR) [5]. Си-

стема UPR играет двойную роль — запускает адаптивные реакции клетки или программируемую клеточную гибель в случае невозможности восстановления нормального гомеостаза [6].

Клеточный стресс в существенной степени меняет механизмы реализации генетической информации в клетке: модулируются процессы трансляции, транскрипции, а также сплайсинга, транспорта, деградации и стабилизации различных видов РНК, что приводит к значительным изменениям клеточного рибонуклеома [7]. МикроРНК, изящно названные Дэвидом Бартелом скульптурами транскриптома млекопитающих [8], играют важную роль в регуляции экспрессии большин-

ства генов, но их функции в клеточном стрессе и старении изучены недостаточно.

Класс микроРНК объединяет малые некодирующие РНК длиной 20–23 нуклеотида, впервые описанные в 1993 году [9]. МикроРНК регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном и транскрипционном уровнях [8, 10]. Локусы генов микроРНК обнаружены в экзонах (6%) и интронах (44%) кодирующих и некодирующих белки генов, а также в межгенных (50%) областях [11]. Гены микроРНК, в своем большинстве, транскрибируются РНК-полимеразой II, при этом транскрипт подвергается процессингу. Первичный транскрипт (при-микроРНК), достигающий в длину от сотен до нескольких тысяч нуклеотидов, содержит одну или несколько шпилечных структур (60–150 нуклеотидов), являющихся предшественниками (пре-микроРНК) зрелых микроРНК [12]. Эти структуры вырезаются эндорибонуклеазой III Droscha с участием кофактора DGCR8 и ряда других вспомогательных белков, формирующих микропроцессинговый комплекс. Если микроРНК расположена в интроне гена-хозяина и лишена своего собственного промотора, то процессинг ее предшественника, также осуществляемый микропроцессинговым комплексом, участвующим в созревании микроРНК, происходит параллельно со сплайсингом транскрипта гена-хозяина, но до стадии вырезания интронов. Отдельный класс микроРНК – митроны – процессируются без участия микропроцессингового комплекса. После процессинга в ядре предшественники микроРНК транспортируются с участием экспортина-5 (Exp5) в цитоплазму, где специфически расщепляются эндорибонуклеазой типа III DICER [12], что приводит к формированию короткого РНК-дуплекса с 3'-концевыми свесами, одна цепь которого “выбирается” белком семейства Argonaute (AGO1-AGO4) и помещается в макромолекулярный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), а оставшаяся цепь деградирует. Комплекс RISC с загруженной микроРНК (miRISC) связывается со специфической последовательностью мРНК-мишени, преимущественно располагающейся в 3'-нетранслируемой области мРНК и комплементарной (в разной степени) 5'-концевому фрагменту микроРНК, так называемому “seed region”. Данное взаимодействие в большинстве случаев приводит к деградации мРНК [13]. Описаны также случаи активации трансляции, но они редки [14].

Нокауты рибонуклеазы DICER – ключевого компонента биогенеза микроРНК – летальны, они приводят к митотическим катастрофам, нарушениям пролиферации стволовых клеток и дифференцировке [15–17]. микроРНК – один из продуктов ферментативной активности DICER – играют важную роль в дифференцировке, развитии, апоптозе [18]. Несмотря на сравнительно неболь-

шое (по амплитуде) регулирующее воздействие на мРНК-мишени (преимущественно снижение), микроРНК обеспечивают поддержание клеточного фенотипа. Такой контроль клеточного состояния не ограничивается переключениями транскриптома в процессе развития и дифференцировки, но включает формирование ответов на различные физиологические стимулы. Происходящие при клеточном стрессе изменения состояния клеток, обусловленные массивным репрограммированием транскриптома, представляют собой особый случай, требующий аккуратных оценок роли микроРНК.

Сдвиги в уровнях экспрессии компонентов биогенеза микроРНК имеют большое значение при широком спектре заболеваний, в том числе и возрастзависимых. Так, показано, что уровень DICER1 снижается в клетках пигментного эпителия сетчатки пациентов с географической атрофией при возрастной дегенерации желтого пятна [19]. Нокдаун DICER1, но не семи других ферментов, процессирующих микроРНК, вызывает дегенерацию пигментного эпителия сетчатки у мышей предположительно через накопление Alu-подобных РНК B1 и B2 и РНК Alu в клетках пигментного эпителия сетчатки человека. Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на Alu, предотвращают вызванную нокдауном DICER1 дегенерацию пигментного эпителия, несмотря на сохраняющееся глобальное подавление микроРНК в клетках. Рибонуклеаза DICER1 разрушает Alu-подобные РНК, предотвращая их цитотоксические эффекты и дегенерацию пигментного эпителия сетчатки у мышей.

Глобальное снижение уровня микроРНК считается ключевой чертой опухолевых клеток и важной причиной формирования злокачественного фенотипа [20]. Ранее в опухолевой линии Т-лимфоцитов Jurkat обнаружили падение экспрессии всего класса микроРНК при стрессе ЭПР, сопряженное со снижением их биогенеза и соответствующим падением уровня экспрессии DICER1 [7].

Показано также, что увеличение экспрессии miR-103/107 снижает уровень DICER, что приводит к глобальному падению экспрессии микроРНК с приобретением клетками мезенхимальных характеристик и метастазированию [17].

Следствием клеточного стресса может быть не только апоптоз и адаптация, но и клеточное старение [21]. Согласно одному из предположений, клеточное старение – это программа остановки клеточного цикла в ответ на действие различных факторов стресса [22], в результате которой клетки становятся нечувствительными к митогенным стимулам [23]. Клеточное старение является чрезвычайно важным механизмом старения организма и возрастзависимых заболеваний [22]. Пред-

ложенная исходно Л. Хейфликом, концепция клеточного старения (названного впоследствии репликативным, или теломерным), как необратимого ареста клеточного цикла с исчерпанием репликативного потенциала [24], пересматривается в последнее время в сторону большей динамической природы старения [25]. Хотя в репликативно старых фибробластах обнаружены признаки, позволяющие считать их терминально дифференцированными [26], ряд работ указывает на обратимость полноценного фенотипа старения. Другими словами, клетки на стадии, как минимум непосредственно предвещающей старение, или в ранней фазе старения способны вернуться в клеточный цикл [25, 27].

Первоначальное предположение о противоположной направленности клеточного старения также не выглядит столь однозначным. Так, недавно было показано, что индуцированное химиотерапией старение (терапевтически индуцируемое) приводит к повышенной экспрессии сигнатуры стволовости клеток В-клеточной лимфомы [28]. В результате выхода из состояния старения и возвращения в цикл, Wnt-зависимый клоногенный потенциал роста этих клеток был значительно выше, чем у клеток, не претерпевавших старение. По-видимому, в переключение на стволовость также может быть вовлечена микроРНК-опосредованная регуляция.

Клеточное старение и роль некодирующих РНК в этом процессе вызывают значительный интерес, однако многочисленные данные о роли микроРНК весьма противоречивы, а их регуляторный потенциал при стресс-индуцированном старении недостаточно изучен.

В работе [29] обсуждается возможная связь между активацией UPR и клеточным старением, при этом рассматриваются разные варианты причинно-следственной связи: UPR инициирует клеточное старение или клеточное старение приводит к активации UPR. В нашем исследовании предложена модель хронического стресса ЭПР, индуцируемого в течение 4 сут, в ходе которого развивается клеточный фенотип, близкий к наблюдаемому при репликативном старении. Проведено сравнение маркеров старения при остром и хроническом стрессе ЭПР и репликативном старении. С целью обнаружения различий в метаболизме микроРНК нами проанализированы транскриптомы клеток при хроническом и остром стрессе, охарактеризован биогенез микроРНК при старении.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клеточные культуры.** В работе использовали первичную культуру фибробластоподобных клеток FRSN из крайней плоти ребенка 3 лет, полу-

ченную из Российской коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Эти клетки имеют фибробластоподобную морфологию, экспрессируют поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и не экспрессируют CD34 и HLA-DR. Клетки имеют нормальный кариотип человека (46, XY), количество полиплоидов составляет 13%, модальное число хромосом 46 ( $98.5 \pm 1.2\%$ ).

Клетки культивировали в ростовой среде DMEM с глюкозой (4.5 г/л) с добавлением 10% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего.

**Индукция острого и хронического стресса ЭПР.** Хронический стресс ЭПР в клетках FRSN индуцировали дитиотреитолом (ДТТ), восстанавливающим дисульфидные связи в белках. ДТТ использовали в субтоксической концентрации (0.75 мМ), которая была подобрана в предварительных экспериментах. Субтоксической считали концентрацию ДТТ, достаточную для остановки клеточной пролиферации, но не вызывающую гибель существенной части клеток. Индуктор, предварительно растворенный в полном объеме среды, добавляли 1 раз в сут в течение 4 сут. Затем следовала постстрессовая фаза, в которой проводилась полная замена среды ежедневно без добавления индуктора стресса, минимальная длительность этой фазы составляла 1 сут, максимальная — 4 сут. В постстрессовой фазе среду заменяли 1 раз в сутки на полную среду. Также использовали схему однократной индукции стресса ЭПР в течение 6 ч сравнительно высокой концентрацией ДТТ (2.5 мМ).

**Выделение суммарной РНК, синтез первой цепи комплементарной ДНК, полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).** Изменения экспрессии мРНК оценивали методом ПЦР-РВ с использованием набора реактивов Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США), включающего интеркалирующий краситель SYBRGreen, на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США). Суммарную РНК выделяли с использованием набора реагентов RNeasy® Mini Kit (“Qiagen GmbH”, Германия) или тризольным методом (с повторной доочисткой хлороформом) с последующей обработкой ДНКазой I и оценкой качества. Лизис клеток проводили непосредственно в культуральной посуде (чашки Петри, 6-луночные планшеты) после удаления ростовой среды. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific Inc.”). Реакцию синтеза первой цепи кДНК проводили на суммарной РНК, нормированной по

количеству, на флуориметре (Qubit, “Invitrogen”, США), после обработки ДНКазой I с использованием случайных праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV (набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, “Thermo Fisher Scientific Inc.”) в соответствии с протоколом производителя. Уровни транскриптов нормировали по уровню мРНК GAPDH, нормированные данные использовали для определения относительных изменений экспрессии генов методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Для статистической обработки результатов количественной оценки экспрессии генов использовали критерий Манна–Уитни.

**Высокопроизводительный анализ экспрессии микроРНК и мРНК.** микроРНК выделяли из клеток с использованием набора *mirVana® miRNA Isolation Kit* (“Ambion”, США). Библиотеки малых РНК получены с использованием *Illumina TruSeq small RNA library preparation kit* (“Illumina”, США). Процедура подготовки состояла из нескольких последовательных этапов: лигирования фракции малых РНК (0.3–0.5 мкг) на 3'- и 5'-концах с синтетическими РНК-адапторами, обратной транскрипции и амплификации (обогащения) с использованием праймеров для секвенирования Illumina с баркодами для мультиплексирования образцов. Перед проведением ПЦР все библиотеки подвергали процедуре нормирования с использованием дополнительной количественной ПЦР в формате SYBR Green с праймерами, идентичными Illumina TruSeq PCR primer, но без концевых модификаций. Амплифицированные библиотеки очищали при помощи электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Для валидации библиотек и количественной их оценки проводили дополнительную количественную ПЦР в соответствии с протоколом Illumina qPCR Library quantification protocol (“Illumina”). Нормированные библиотеки малых РНК секвенировали (36 циклов) с использованием генетического анализатора MiSeq Illumina.

Для обработки файлов, полученных в результате секвенирования и прошедших препроцессинг с “обрезанием” индексных последовательностей, использовали локально установленное программное обеспечение MiSeq Reporter v.2.6.3. Прочитанные последовательности малых РНК с обрезанными 3'-адапторами (5'-TGGAATTCTC-GGGTGCCAAGG) подвергали фильтрации по качеству ридов ( $\geq 30$  Phred Score): фильтрацию прошли 96.9%. Затем прочитанные последовательности картировали с использованием приложения Bowtie с установленным требованием полного совпадения с версией hg19 сборки генома человека и последовательностями из базы данных микроРНК miRBase.

Суммарную РНК для высокопроизводительного анализа с использованием платформы Affy-

metrix (США) выделяли тризольным методом с дополнительным этапом очистки хлороформом. Пробоподготовку проводили с использованием набора реагентов GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (“Ambion”), гибридизацию, мечение и отмывку – с помощью наборов GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit (“Affymetrix”, США), микрочипов Affymetrix 1.0 ST и станции Fluidics Station (“Affymetrix”). Сканирование осуществляли на системе Gene Scan 7G (“Affymetrix”). Коррекцию фона, квантильную нормализацию и суммирование данных микрочипового анализа на уровне генов осуществляли с помощью алгоритма Robust Multi-chip Analysis (RMA) в программе Transcriptome Analysis Console (ТАС) версии 4.0.2, там же с помощью алгоритма limma differential expression (элемент Bioconductor) анализировали дифференциальную экспрессию генов. Представленность генных листов в транскриптомных микрочиповых данных оценивали с использованием Gene Set Enrichment Analysis [30] на платформе GenePattern <https://cloud.genepattern.org> [31].

**Анализ активности  $\beta$ -галактозидазы, проточная цитометрия.** Активность бета-галактозидазы определяли с использованием в качестве субстрата  $C_{12}$ FDG (5-додеканоиламинофлуоресцеин ди- $\beta$ -D-галактопиранозида). В этой реакции образуется флуоресцентный продукт, позволяющий проводить его количественную оценку (микроскопию, проточную цитофлуориметрию). Субстрат добавляли в конечной концентрации 20 мкМ в ростовую среду клеток и инкубировали в течение 2 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После этого клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и анализировали. Сбор данных проточной цитометрии проводили с использованием проточного цитометра FACS Calibur, программного обеспечения CellQuest версии 6.0 (“Becton-Dickinson Biosciences”, США). Цитометрические данные анализировали с использованием программного обеспечения FCS Express (De Novo Software).

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Statistica, версия 10.0 (“StatSoft Inc.”, США), а также Microsoft Excel. Использовали *t*-критерий, однофакторный дисперсионный анализ и критерий Крускала–Уоллиса. Статистическую обработку результатов количественной оценки экспрессии генов проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Коррекцию множественных сравнений в транскриптомных данных проводили с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга (метод контроля ожидаемой доли ложных отклонений), встроенной в Transcriptome Analysis

Console, и реализации алгоритма GSEA [30] платформы GenePattern [31].

В транскриптомном анализе представленности генов листов GSEA [30] использовали порог отсечения  $FDR < 0.25$  (см. ссылку [https://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/FAQ#Why\\_does\\_GSEA\\_use\\_a\\_false\\_discovery\\_rate\\_.28FDR.29\\_of\\_0.25\\_rather\\_than\\_the\\_more\\_classic\\_0.05.3F](https://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/FAQ#Why_does_GSEA_use_a_false_discovery_rate_.28FDR.29_of_0.25_rather_than_the_more_classic_0.05.3F)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Бета-галактозидазная активность клеток FRSN при хроническом стрессе ЭПР*

Динамику бета-галактозидазной активности в клетках FRSN анализировали с использованием в качестве субстрата  $C_{12}FDG$ , который превращается во флуоресцирующий продукт, и проточной цитофлуориметрии. Этот метод позволяет описывать изменения активности бета-галактозидазы на уровне единичных клеток.

Как видно из рис. 1, интенсивность флуоресценции клеток слабо изменялась в течение хронического стресса ЭПР (рис. 1а): отличия от значений в контроле составляли менее 5% после 4-х сут воздействия. Следует заметить, что на третьи сутки воздействия стала заметна бимодальность распределения интенсивностей флуоресценции клеток, что может указывать на рост гетерогенности клеточной популяции, подвергнутой стрессу. На 5-й день стресса после удаления ДТТ из среды отмечен значительный рост флуоресценции клеток.

### *ПЦР-РВ-анализ экспрессии генов-маркеров стресса ЭПР и DICER1 при хроническом стрессе ЭПР в фибробластах FRSN*

Для подтверждения того, что четырехдневное воздействие ДТТ в концентрации 0.75 мМ на фибробласты приводит к развитию ответа на стресс ЭПР, была изучена экспрессия ключевого маркера стресса – шаперона BiP. Отмечено значимое повышение уровня мРНК BiP (рис. 2).

При этом наблюдалось также повышение экспрессии генов стресс-активируемой эндорибонуклеазы ангиогенина (*ANG*) и падение уровня ее ингибитора (*RNHI*) – сходное соотношение уровней экспрессии этих генов отмечено ранее при остром стрессе ЭПР в линии клеток Jurkat [7]. Кроме того, отмечена тенденция к снижению уровня экспрессии гена *DICER1*.

### *Транскриптомный анализ фибробластов при хроническом стрессе ЭПР*

Изменения в процессах метаболизма нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в фибробластах

FRSN, подвергнутых 4-дневному хроническому стрессу ЭПР, определяли, анализируя их транскриптомные профили (табл. 1).

Из табл. 1. видно, что в клетках, подвергнутых хроническому стрессу, изменена активность большого числа процессов, связанных с синтезом ДНК и регуляцией клеточного цикла. Синтез ДНК при стрессе приводит к репликативному стрессу, ответу на повреждение ДНК и влечет за собой, по-видимому, митотические катастрофы и анеуплоидию – эти процессы вполне характерны и для репликативно старых клеток. Кроме того, в клетках, подвергнутых хроническому стрессу, усилены процессы деградации РНК, сплайсинга и процессинга мРНК. В них обнаружено сравнительно небольшое число процессов РНК-метаболизма, активность которых снизилась – один процесс “Reactome cytosolic tRNA aminoacylation” в пределах  $FDR < 25\%$  – порога отсечения, рекомендованного разработчиками метода GSEA. Биогенез микроРНК среди этих процессов не обнаружен.

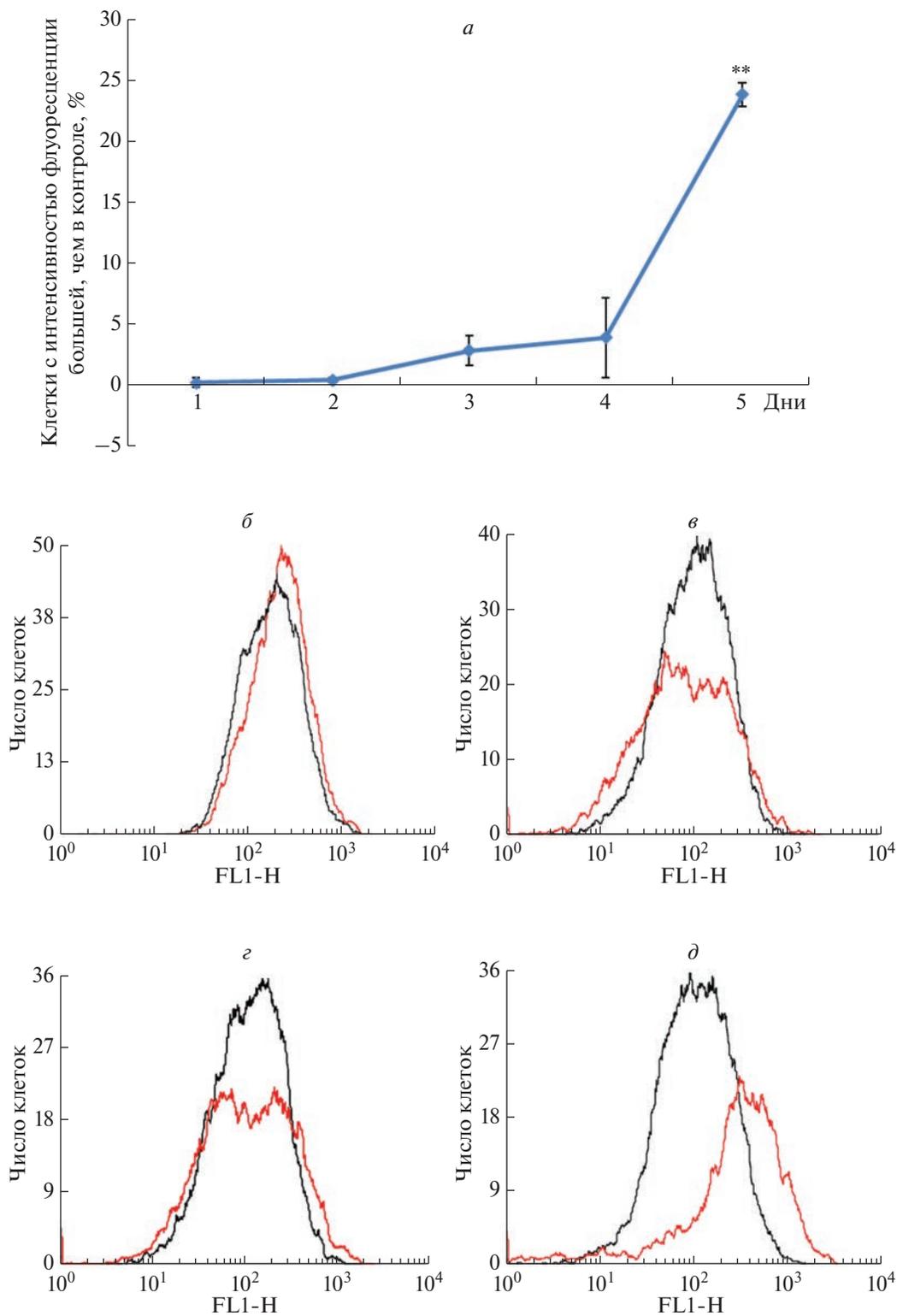
### *Изменения во фракции микроРНК при хроническом стрессе ЭПР*

Анализ фракции малых РНК также показал, что при 4-дневном стрессе ЭПР в клетках возрастает содержание предшественников микроРНК, а также (в небольшой степени) зрелых форм микроРНК, т.е. не наблюдается глобальное снижение представленности микроРНК (рис. 3).

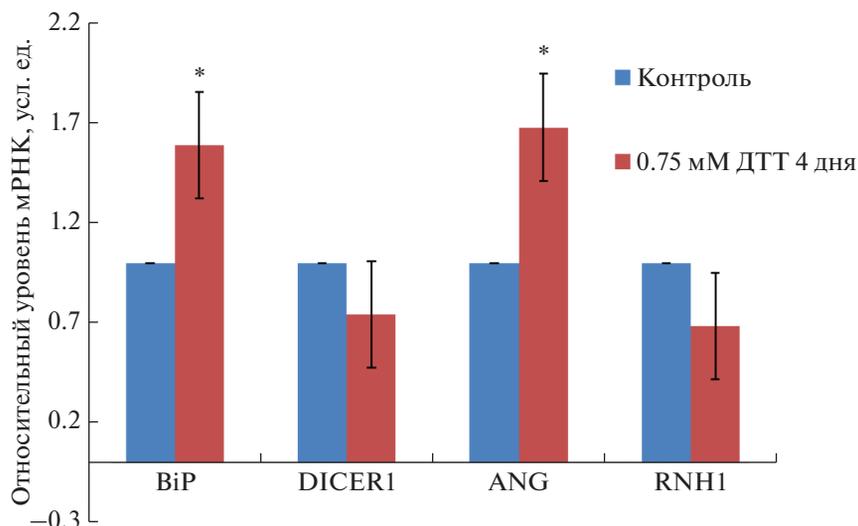
### *Выборочное сравнение уровней отдельных транскриптов фибробластов при репликативном старении, остром и хроническом стрессе ЭПР*

Выборочное рассмотрение отдельных генов в транскриптомах позволило выявить увеличение экспрессии ключевого маркера – шаперона BiP (*HSPA5*) – при остром стрессе ЭПР в 3.45 раза ( $FDR = 1.00E-05$ ), при хроническом стрессе ЭПР в 1.19 ( $FDR = 0.1587$ ). Также были проанализированы транскриптомы репликативно старых клеток FRSN, изменение экспрессии в которых составило 1.11 ( $FDR = 0.3138$ ). Таким образом, уровень мРНК шаперона BiP при остром стрессе ЭПР был заметно выше уровней при хроническом стрессе и старении, которые оказались сходными в этих двух состояниях.

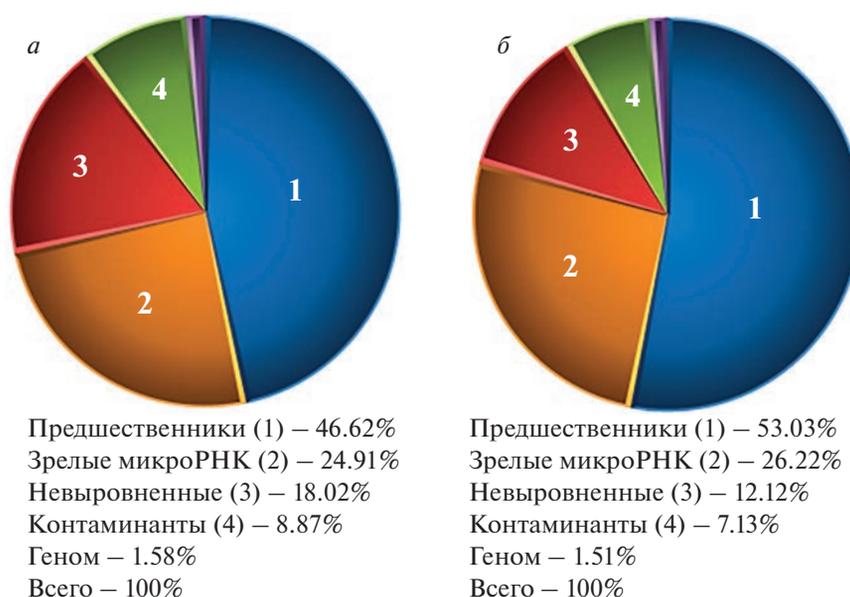
В случае мРНК *DICER1* наблюдали следующее соотношение: снижение  $-1.74$  ( $FDR = 0.0005$ ) при остром стрессе,  $-1.14$  ( $FDR = 0.2536$ ) при хроническом,  $-1.05$  ( $FDR = 0.6444$ ) при репликативном старении. Таким образом, при хроническом стрессе ЭПР и старении имело место незначимое изменение уровня *DICER1* и его снижение при остром стрессе ЭПР.



**Рис. 1.** Динамика изменений бета-галактозидазной активности в клетках FRSN при индуцированном ДТТ субтоксическом многократном стрессе ЭПР (0.75 мМ ДТТ, 4 дня стресс, 5-й день без индуктора). *а* – Содержание подвергнутых стрессу клеток (%), интенсивность флуоресценции которых выше, чем в контроле; *б–д* – гистограммы по каналу FL1. Дни стресса: *б* – 1, *в* – 3, *з* – 4, *д* – 5-й день. \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 3$ .



**Рис. 2.** Уровни мРНК BiP (HSPA5), DICER1, ANG и ингибитора ANG (RNH1) в клетках FRSN при ДТТ-индуцированном субтоксическом стрессе ЭПР (0.75 мМ ДТТ, 4 дня), \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .



**Рис. 3.** МикроРНОм при многократном стрессе ЭПР. Примеры распределения прочтений: *а* – контроль; *б* – 4-дневный стресс ЭПР.

Выборочный анализ генов ингибиторов циклинзависимых киназ выявил следующие соотношения кратности изменения их экспрессии:

*CDKN1A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21): 1.79 (FDR = 0.0002) – острый стресс, 1.43 (FDR = 0.0057) – хронический, 1.86 (FDR = 9.63E–05) – репликативное старение.

*CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16): 1.21 (FDR = 0.0778) – острый стресс, 1.13 (FDR = 0.3028) – хронический, 1.53 (FDR = 0.0022) – репликативное старение.

Кратность изменения экспрессии гена маркера пролиферации *MKI67* (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67): –1.84 (FDR = 0.0007) – острый стресс, –4.19 (FDR = 2.74E–05) – хронический, –14.65 (FDR = 2.28E–07) – репликативное старение;

*DNMT1* – маркер клеточного старения ДНК-метилтрансферазы DNMT1 (DNA (cytosine-5-) – methyltransferase 1): 1.25 (FDR = 0.0190) – острый стресс, –1.18 (FDR = 0.1010) – хронический, –1.89 (FDR = 5.96E–05) – репликативное старение.

**Таблица 1.** Процессы ДНК- и РНК-метаболизма, активность которых изменилась при 4-дневном стрессе ЭПР\*

Процесс	Число генов	ES	NES	NOM <i>p</i> -val.	FDR <i>q</i> -val.
Reactome M G1 transition	70	-0.57119	-2.0412	0	0.015571239
Reactome activation of the pre replicative complex	23	-0.70386	-2.01857	0	0.015304196
Reactome processing of capped intron containing pre mRNA	118	-0.50592	-1.98361	0	0.015815465
KEGG cytosolic DNA sensing pathway	44	-0.59669	-1.95188	0.002347418	0.018572371
Reactome assembly of the pre replicative complex	56	-0.55779	-1.92291	0	0.02145724
Reactome vif mediated degradation of APOBEC3G	47	-0.5544	-1.85614	0	0.033851728
Reactome mRNA splicing	91	-0.49049	-1.83755	0	0.03826567
Reactome mRNA processing	135	-0.45359	-1.82997	0	0.040611435
Reactome transport of mature transcript to cytoplasm	42	-0.56155	-1.80992	0.002304148	0.0455481
Reactome mRNA 3 end processing	25	-0.59268	-1.76488	0.004830918	0.053662024
Reactome p53 dependent G1 DNA damage response	51	-0.50441	-1.73786	0	0.064953834
Reactome activation of ATR in response to replication stress	25	-0.5934	-1.72793	0.023017902	0.06917527
Reactome metabolism of non coding RNA	42	-0.52777	-1.71281	0.002487562	0.07342382
Reactome activation of chaperone genes by XBP1S	41	-0.52384	-1.68704	0.014634146	0.08357151
Reactome synthesis of DNA	81	-0.45024	-1.66991	0	0.09007551
Reactome destabilization of mRNA by AUF1/hnRNP D0	48	-0.49912	-1.66699	0.004975124	0.090713635
Reactome transport of mature mRNA derived from an intronless transcript	31	-0.54141	-1.64859	0.01438849	0.09772833
Reactome transport of ribonucleoproteins into the host nucleus	25	-0.53486	-1.57752	0.037406486	0.12973335
KEGG RNA degradation	52	-0.45107	-1.54381	0.011848342	0.14593673
Reactome G1/S transition	95	-0.4025	-1.5027	0.015831135	0.16722047
Reactome mRNA splicing minor pathway	36	-0.46363	-1.48038	0.043589745	0.17420946
KEGG DNA replication	34	-0.46562	-1.44514	0.078947365	0.19072776
Reactome SMAD2 SMAD3 SMAD4 heterotrimer regulates transcription	25	-0.49914	-1.44286	0.06590909	0.18828596
Reactome DNA strand elongation	28	-0.47466	-1.43111	0.08	0.19533893
KEGG mismatch repair	20	-0.50254	-1.39918	0.09859155	0.21652995
Reactome RNA pol II pre transcription events	52	-0.40576	-1.38314	0.07537688	0.22260873
Reactome cytosolic tRNA aminoacylation	22	0.623262	1.702985	0.008532	0.147578

\*FDR &lt; 25%.

Примечание. ES – Enrichment Score, NES – Normalized Enrichment Score, NOM *p*-val. – Nominal *P* Value, FDR *q*-val. – False Discovery Rate. Отрицательные значения NES – повышение активности генов, входящих в генный лист процесса, положительные – снижение.

Стресс ЭПР сопровождается временным блоком трансляции, что влечет за собой сборку стрессорных гранул [3, 32]. Изменения экспрессии генов некоторых предполагаемых участников сборки стрессорных гранул составили:

*G3BP1* (GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1):  $-1.3$  (FDR = 0.0189) – острый стресс,  $-1.1$  (FDR = 0.4045) – хронический,  $-1.16$  (FDR = 0.1381) – репликативное старение.

*G3BP2* (GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2):  $-1.53$  (FDR = 0.0022) – острый стресс,  $1.01$  (FDR = 0.9417) – хронический,  $1.01$  (FDR = 0.9126) – репликативное старение.

*TIA1* (cytotoxic granule-associated RNA binding protein):  $1.53$  (FDR = 0.0012) – острый стресс,  $1.26$  (FDR = 0.0472) – хронический,  $-1.09$  (FDR = 0.3723) – репликативное старение.

Видны разнонаправленные небольшие изменения экспрессии потенциальных элементов стрессорных гранул; для характеристики гранул при хроническом стрессе ЭПР требуется проведение дополнительных исследований.

Результаты транскриптомного анализа согласуются с приведенными результатами определения экспрессии методом ПЦР.

#### *Сопоставление транскриптомных профилей фибробластов при остром и хроническом стрессах ЭПР*

С целью выявления отличий в процессах метаболизма мРНК и микроРНК сравнили транскриптомные профили фибробластов, подвергнутых 4-дневному хроническому стрессу ЭПР и острому стрессу ЭПР (табл. 2).

Показана активность ряда процессов метаболизма ДНК и РНК при остром стрессе. Подобную активацию наблюдали ранее в клетках, подвергнутых хроническому стрессу ЭПР. Значительное число этих процессов связано с поддержанием целостности генома и репарацией ДНК. Обнаружено повышение активности элементов системного контроля клеточного цикла и поддержания теломера, а также процессов синтеза ДНК и репликативного стресса. Усилены процессы деградации РНК, включая механизмы ее дестабилизации: BRF1-опосредованные и зависимые от деаденирования. Выявлено отличие острого стресса от хронического: острый стресс сопровождался снижением экспрессии генов, вовлеченных в биогенез микроРНК.

Согласно полученным данным, при остром стрессе ЭПР наблюдается снижение биогенеза микроРНК, практически не выраженное при хроническом стрессе ЭПР и старении. Снижение уровня мРНК DICER1 при остром стрессе ЭПР было более существенным, чем при хроническом и репликативном старении. Таким образом, на-

копление стрессового воздействия при многократном применении его индуктора в субтоксической концентрации приводит к развитию старения и не сопровождается заметным снижением биогенеза микроРНК.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования установлено, что хронический стресс ЭПР, индуцируемый в течение 4 суток, вызывает рост бета-галактозидазной активности в клетках FRSN. Уровень бета-галактозидазной активности, ассоциированной со старением (SA- $\beta$ -Gal), широко используется в качестве одного из ключевых маркеров старения клеток. Показано [33], что активность бета-галактозидазы увеличивается при старении фибробластов кожи человека вплоть до конца их жизни. В нашем исследовании в качестве субстрата бета-галактозидазы использовали  $C_{12}$ FDG. В ходе этой реакции образуется флуоресцентный продукт, что позволяет подсчитать с помощью проточной цитометрии число клеток с измененной активностью бета-галактозидазы. На вторые сутки стресса обнаруживается бимодальность распределения клеточной популяции по активности бета-галактозидазы, что свидетельствует о росте гетерогенности популяции при стрессе и возможном появлении субпопуляций с повышенной и пониженной активностями этого фермента.

Транскриптомный анализ фибробластов, подвергнутых острому и хроническому стрессу ЭПР, а также репликативно старых, выявил ряд совпадений по маркерам клеточного старения. Stein и соавт. [33] показали рост уровня белка ингибитора циклинзависимых киназ p21 на ранних стадиях старения фибробластов кожи человека, однако на поздних стадиях этот уровень значительно снижается. Уровень другого ингибитора – p16 – при этом стабильно возрастал и поддерживался на высоком уровне не менее 2 месяцев. Предполагается, что на ранних этапах клеточное старение имеет более динамический характер, чем и объясняется вариабельность уровней p16 и p21 в клеточных культурах в раннем периоде старения [33].

В нашем исследовании повышенный уровень мРНК p21 (CDKN1A) наблюдали при всех условиях – при остром и хроническом стрессе ЭПР, и репликативном старении. Отмечено небольшое увеличение уровня мРНК p16 (CDKN2A) при остром стрессе ЭПР и наиболее существенное его повышение при репликативном старении. Снижение уровня MKI67 – маркера клеточной пролиферации – было наиболее заметным при хроническом стрессе ЭПР и репликативном старении. Уровень еще одного маркера клеточного старения – ДНК-метилтрансферазы DNMT1 [34], снижался при хроническом стрессе ЭПР и репликативном старении, и повышался при остром

**Таблица 2.** Процессы ДНК- и РНК-метаболизма, активность которых изменилась при остром стрессе ЭПР относительно хронического\*

Процесс	Число генов	ES	NES	NOM <i>p</i> -val.	FDR <i>q</i> -val.
Reactome meiotic recombination	65	0.8735447	3.0217183	0.0	0.0
Reactome meiosis	90	0.82234603	2.96751	0.0	0.0
Reactome RNA pol I promoter opening	45	0.9244056	2.9474995	0.0	0.0
Reactome RNA pol I transcription	66	0.8583928	2.9423776	0.0	0.0
Reactome deposition of new CENPA containing nucleosomes at the centromere	48	0.9169156	2.942151	0.0	0.0
Reactome chromosome maintenance	100	0.7930599	2.90852	0.0	0.0
Reactome RNA pol I RNA pol III and mitochondrial transcription	95	0.78643805	2.8621817	0.0	0.0
Reactome meiotic synapsis	59	0.8478427	2.8409016	0.0	0.0
Reactome telomere maintenance	65	0.82788223	2.8384316	0.0	0.0
Reactome packaging of telomere ends	39	0.89991754	2.7889936	0.0	0.0
Reactome mitotic prometaphase	78	0.71624535	2.5278203	0.0	0.0
Reactome generic transcription pathway	314	0.61757505	2.5247838	0.0	0.0
Reactome DNA replication	170	0.63824695	2.4992688	0.0	0.0
Reactome mitotic M M G1 phases	151	0.6272604	2.4370246	0.0	0.0
Reactome cell cycle mitotic	278	0.5840766	2.3945434	0.0	0.0
Reactome DNA repair	91	0.5916363	2.1514232	0.0	7.006776E-5
Reactome G2-M checkpoints	29	0.7238688	2.125362	0.0	1.0110341E-4
Reactome DNA strand elongation	28	0.73273474	2.11058	0.0	2.2830068E-4
KEGG DNA replication	34	0.6707805	2.0365164	0.0	6.039853E-4
Reactome activation of ATR in response to replication stress	25	0.71596396	2.0221338	0.0	7.4789627E-4
Reactome activation of the pre replicative complex	23	0.7113308	2.0045867	0.0	9.3203026E-4
Reactome E2F mediated regulation of DNA replication	23	0.69756645	1.9457265	0.0	0.0020754456
Reactome tRNA aminoacylation	38	0.6286507	1.9356256	0.001506024	0.0023312168
Reactome cytosolic tRNA aminoacylation	22	0.68875885	1.9215747	0.0	0.0028764098
KEGG mismatch repair	20	0.6977293	1.9181719	0.0016501651	0.002935597
Reactome extension of telomeres	26	0.66418475	1.8678123	0.0015772871	0.006243486
Biocarta ATM pathway	19	0.6773608	1.8271466	0.005033557	0.0105374735
Reactome synthesis of DNA	81	0.50922495	1.8051174	0.0	0.0134009
Reactome mitotic G2 G2-M phases	68	0.52067155	1.8027968	0.0	0.013513143
KEGG RNA degradation	52	0.5344431	1.7615125	0.0044444446	0.019558316
Reactome homologous recombination repair of replication independent double strand breaks	15	0.69050735	1.7571673	0.0033057851	0.020094687
Reactome cell cycle checkpoints	96	0.47384042	1.7323368	0.0	0.026984116

Таблица 2. Окончание

Процесс	Число генов	ES	NES	NOM <i>p</i> -val.	FDR <i>q</i> -val.
Reactome G0 and early G1	20	0.626771	1.7156974	0.008064516	0.031962775
Reactome mitotic G1 G1/S phases	118	0.45982128	1.7137032	0.0	0.031992786
Biocarta G2 pathway	20	0.63347596	1.7037532	0.00792393	0.035362072
Reactome RNA pol I transcription initiation	20	0.62224483	1.692696	0.008431703	0.038403533
KEGG p53 signaling pathway	65	0.4859263	1.6910647	0.006954103	0.03845253
Reactome unfolded protein response	71	0.49807125	1.6886604	0.0028328612	0.038820274
Reactome S phase	97	0.4626438	1.6864203	0.0013003901	0.039107393
Reactome nucleotide excision repair	42	0.52816725	1.6751274	0.009036144	0.043052983
Reactome perk regulated gene expression	25	0.5864574	1.6702857	0.0062305294	0.043940376
Reactome double strand break repair	21	0.60828984	1.657773	0.006472492	0.04618458
Reactome deadenylation dependent mRNA decay	41	0.50045973	1.6009737	0.01490313	0.07402219
Reactome activation of genes by ATF4	22	0.5698372	1.5749847	0.02601626	0.08751855
Reactome transport of ribonucleoproteins into the host nucleus	25	0.5460245	1.5581003	0.021909233	0.09215212
Reactome RNA pol I transcription termination	18	0.5971615	1.5489627	0.040584415	0.094890304
Reactome M/G1 transition	70	0.44184095	1.5154264	0.015006822	0.11944161
Biocarta stress pathway	24	0.53664243	1.5047216	0.04347826	0.125504
Reactome mitochondrial tRNA aminoacylation	19	0.5240794	1.4389845	0.06539075	0.18136242
Reactome destabilization of mRNA by BRF1	15	0.566649	1.4311684	0.07509158	0.18765597
Reactome RNA pol III transcription initiation from type 3 promoter	23	0.5010268	1.4196658	0.08279221	0.1929102
Reactome intrinsic pathway for apoptosis	28	0.4842015	1.4041576	0.07119741	0.20652774
KEGG base excision repair	31	0.4659267	1.3808284	0.08229814	0.23449185
Reactome destabilization of mRNA by tristetraprolin TTP	15	0.54531926	1.378124	0.11355932	0.23645765
Reactome metabolism of non coding RNA	42	0.43581405	1.3656077	0.06994048	0.24292718
Reactome destabilization of mRNA by KSRP	15	0.54964983	1.3626724	0.11584327	0.24208733
Biocarta bad pathway	24	-0.50187	-1.57884	0.020566	0.10174
Reactome microRNA miRNA biogenesis	20	-0.51226	-1.52795	0.032	0.123316
Reactome regulatory RNA pathways	22	-0.46209	-1.40196	0.072776	0.188577

\*FDR < 25%.

Примечание. ES – Enrichment Score, NES – Normalized Enrichment Score, NOM *p*-val. – Nominal *P* value, FDR *q*-val. – False Discovery Rate. Положительные значения NES – повышение активности генов, входящих в генный лист процесса, отрицательные – снижение.

стрессе. Анализ экспрессионных маркеров, а также рост активности бета-галактозидазы свидетельствуют о приобретении фенотипа стресс-индуцированного старения фибробластами, подвергнутыми 4-суточному воздействию субтоксических концентраций ДТТ, причем этот фенотип сходен с фенотипом репликативного старения.

Хронический стресс ЭПР индуцировали ДТТ в концентрации, которая не вызвала значительной гибели контрольных клеток, но замедляла их пролиферацию. Вообще, воздействие высоких доз соединений, вызывающих стресс, например токсинов, приводит к развитию апоптоза. Предполагается, что при меньшей интенсивности стрессового воздействия доминирующим механизмом будет старение [35].

Следует отметить невысокий уровень p16 (CDKN2A) при хроническом стрессе ЭПР по сравнению с репликативным старением. В то же время, при хроническом стрессе наблюдается бимодальность распределения клеток по активности бета-галактозидазы, что позволяет предположить разделение исходно гомогенной популяции как минимум на две с более и менее выраженными признаками стресс-индуцированного старения. Это может быть одним из объяснений сравнительно низкого среднего уровня экспрессии p16 (CDKN2A) во всей популяции. Путь p16<sup>Ink4a</sup>/RB обычно активируется при репликативном старении, а также при старении, индуцированном активными формами кислорода и активацией онкогенов, но не при старении, вызванном повреждением ДНК. Считается, что этот путь необходим именно для поддержания в клетках состояния старения [36].

ДТТ — сильный восстанавливающий агент, который блокирует образование дисульфидных связей в ЭПР [37], быстро (в течение нескольких минут) вызывает развитие стресса ЭПР в клеточных культурах [38]. В клетках эукариот в условиях окисленной среды в ЭПР происходит образование большинства дисульфидных связей [39], что важно для конформационного созревания белков в секреторном пути. Известно, что окислительно-восстановительный баланс цитозоля сильно сдвинут в сторону восстановления (соотношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона составляет ~100 : 1), что препятствует образованию дисульфидных связей, в ЭПР же соотношение GSH : GSSG составляет примерно 3 : 1 [40]. Несмотря на то, что ДТТ может действовать на белки с дисульфидными связями в разных локализациях, например, на внеклеточные домены, ДТТ сильно влияет на белки *en masse* и их сворачивание в ЭПР, запуская сигнальные ветви UPR, как показано здесь и ранее [7].

В обзоре Pluquet и соавт. [29] высказано предположение, что механизмом, индуцированного

стрессом ЭПР старения, может быть окислительный стресс, вызванный нарушением окислительного фолдинга, опосредуемого оксидоредуктазой ERO1 и протеиндисульфидизомеразами (PDI). Показано, что ДТТ в концентрации свыше 1.25 мМ вызывает снижение уровня активных форм кислорода в клетках Jurkat, индуцируя в них восстановительный стресс, однако более низкие концентрации ДТТ увеличивают уровень активных форм кислорода [41]. Предполагалось, что в результате окисления в присутствии металлов (преимущественно меди) ДТТ индуцирует образование пероксида водорода и вызывает окислительный стресс [42]. Окислительный фолдинг, как известно, вносит существенный, но не основной вклад в генерацию пероксида водорода в клетках [43, 44]. Кроме того, в просвете ЭПР пероксиредоксин 4 (фермент, обладающий антиоксидантной активностью, которым богаты секретирующие клетки) восстанавливает пероксид водорода с образованием дисульфидных связей [44–46]. Однако мы не наблюдали значимого роста уровней пероксиредоксинов, включая пероксиредоксин 4, во всех использованных условиях, отмечено только небольшое увеличение экспрессии гена оксидоредуктазы *ERO1B*. Вместе с тем, Pluquet и соавт. указывают на возможную роль ветви UPR, опосредуемую сенсором ЭПР, белком ATF6α, в старении фибробластов [47].

Ряд авторов считают, что снижение экспрессии DICER, наблюдаемое при действии таких стрессоров, как активные формы кислорода, форболовый эфир, активация онкогена *RAS* [48], снижает клеточную устойчивость к стрессу [49]. Проверено предположение, согласно которому причиной снижения уровня белка DICER может быть апоптоз, вызванный действием стрессоров, однако это предположение не нашло подтверждения [48]. Увеличение экспрессии DICER, наоборот, способствует устойчивости к стрессу, как минимум, у беспозвоночных [49].

Интересной представляется связь уровней экспрессии DICER и генов иммунного ответа. Интерфероны типа I и двухцепочечная РНК (Poly IC) снижают экспрессию DICER на уровне белка, в то время как интерферон-гамма повышает ее [48]. Анализ экспрессии DICER в нескольких клеточных линиях с варьирующими паттернами экспрессии иммунных генов выявил высокий уровень экспрессии белка DICER в клетках трофобласта JAR и JEG-3, в которых подавлена активность генов МНС класса II и костимулирующих генов [48]. В клетках рака шейки матки, в которых иммунные гены конститутивно репрессированы, но индуцируются интерфероном-гамма, выявлен умеренный уровень DICER. В клетках же Raji и Daudi, в которых, как и в нормальных В-клетках, на высоком уровне конститутивно экспрессируются гены МНС класса II

и другие иммунные гены, белок DICER не определялся [48]. При этом уровни мРНК DICER не всегда полностью коррелируют с уровнем белка DICER. МикроРНК проявляют в том числе и антивирусную направленность, и нокдаун DICER увеличивает чувствительность мышей к вирусным инфекциям [50]. Учитывая это, подавление DICER ключевыми противовирусными молекулами — интерферонами-альфа — трудно объяснить с позиции оптимальной защиты клетки [48]. Необходимо также учитывать, что мишенью вирусных ответов может быть DICER [51].

В клеточном ответе на стресс можно выделить как минимум две фазы — раннюю и позднюю. Ранняя неспецифическая фаза характеризуется блоком кепзависимой трансляции и началом активной экспрессии генов стрессового ответа, таких как шапероны. В поздней фазе (специфической адаптации) происходит ослабление экспрессии шаперонов, и клетка “пытается” возвратиться к нормальному функционированию при условии снижения воздействия стресса или адаптации к нему. По нашему мнению, роль DICER на этих двух этапах может быть разной. На первом этапе снижение экспрессии DICER будет способствовать более эффективной и высокоамплитудной экспрессии генов стрессового ответа и стохастическому фенотипу клеток, что направлено на выживание. На втором же этапе, вероятно, DICER необходим для восстановления дифференцированного фенотипа. Так как подавление DICER часто влечет за собой падение экспрессии микроРНК, предположили, что это приводит к дерепрессии генов, способствующих клеточному выживанию — это может иметь место при действии интерферонов-альфа [48]. Не удивительно, что опухолевые клетки характеризуются снижением уровня DICER — они как бы “застревают” в первой фазе ответа на стресс, что подтверждается частым повышением экспрессии в них генов стрессового ответа, например, шаперонов. Участие микроРНК в специфической фазе стрессового ответа подтверждают недавние работы. Так, например, в постстрессовой стадии после теплового шока показано возвращение к нормальному уровню шаперона hsp-70 посредством связывания микроРНК miR-85 со специфическими сайтами в 3'-нетранслируемой области его мРНК [52].

Наше предположение о роли DICER может помочь объяснить данные, наблюдаемые при клеточном старении. При старении клеток, индуцированном стрессом ЭПР, не происходит существенного снижения биогенеза микроРНК, наблюдается лишь небольшое падение уровня DICER, что сочетается с умеренным ростом экспрессии генов стрессового ответа, например, BiP. Несмотря на накопительный эффект хронического стресса, биогенез микроРНК при этом почти не изменяется, однако речь идет о среднем

по клеточной популяции уровне. Сообщалось о глобальном снижении экспрессии микроРНК и падении уровня DICER в жировой ткани мышей при старении, причем снижение калорийности корма предотвращало этот эффект [53]. Однако в этой работе при определении уровня белка DICER методом вестерн-блоттинга не использовали нормирование при сравнении с уровнем контрольного белка бета-тубулина, что затрудняет интерпретацию данных. Кроме того, уровни экспрессии в ПЦР-анализе нормировали по гену *36B4*, кодирующему кислый рибосомный фосфобелок RPLP0. Хотя *36B4* может использоваться для оценки относительного уровня экспрессии генов при анализе процессов в жировой ткани, не сопровождаемых массивными изменениями транскриптома, при старении наблюдается масштабная дизрегуляция экспрессии рибосомных генов: показано повышение биогенеза рибосом с сопутствующим укрупнением ядрышка [54]. Это может повлечь за собой систематическое изменение уровня референсного рибосомного белка и погрешность в оценке экспрессии генов.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показано, что хронический стресс ЭПР (4 сут), индуцированный ДТТ (0.75 мМ) в фибробластах FRSN, приводит к формированию фенотипа клеточного старения, сходного с фенотипом репликативного старения. Сопоставление хронического и острого стресса ЭПР выявило их важное отличие — при хроническом стрессе не происходит снижения биогенеза микроРНК.

Авторы выражают благодарность коллективу нашего института.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820/>).

Статья не содержит результатов исследований, полученных на животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozutsumi Y., Segal M., Normington K., Gething M.J., Sambrook J. (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. **332**, 462–464. <https://doi.org/10.1038/332462A0>
2. Schröder M., Kaufman R.J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 739–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
3. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатеев А.А. (2013) Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система UPR (Unfolded Protein Response). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*.

- 57(4), 97–108.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24640782/>
4. Acosta-Alvear D., Karagöz G.E., Fröhlich F., Li H., Walther T.C., Walter P. (2018) The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1. *Elife*. **7**, e43036.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.43036>
  5. Korennykh A., Walter P. (2012) Structural basis of the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* **28**, 251–277.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155826>
  6. Московцев А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. (2018) Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. **62**, 21–27.  
<https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.21-27>
  7. Mesitov M.V., Soldatov R.A., Zaichenko D.M., Malakho S.G., Klementyeva T.S., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A., Mironov A.A., Moskovtsev A.A. (2017) Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **7**, 46080.  
<https://doi.org/10.1038/srep46080>
  8. Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. **136**, 215–233.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
  9. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**, 843–854.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
  10. Kim D.H., Sætrom P., Snøve O., Rossi J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 16230–16235.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0808830105>
  11. Kozomara A., Griffiths-Jones S. (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl. Acids Res.* **42**, 68–73.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
  12. Kim V.N., Han J., Siomi M.C. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2632>
  13. Bartel D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell*. **173**, 20–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
  14. Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060308-103103>
  15. Wienholds E., Koudijs M.J., van Eeden F.J., Cuppen E., Plasterk R.H. (2003) The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat. Genet.* **35**, 217–218.  
<https://doi.org/10.1038/NG1251>
  16. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* **35**, 215–217.  
<https://doi.org/10.1038/NG1253>
  17. Martello G., Rosato A., Ferrari F., Manfrin A., Cordenonsi M., Dupont S., Enzo E., Guzzardo V., Rondina M., Spruce T., Parenti A.R., Daidone M.G., Biciato S., Piccolo S. (2010) A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. **141**, 1195–1207.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.05.017>
  18. Pampalakis G., Diamandis E.P., Katsaros D., Sotiropoulou G. (2010) Down-regulation of dicer expression in ovarian cancer tissues. *Clin. Biochemistry*. **43**, 324–327.  
<https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2009.09.014>
  19. Kaneko H., Dridi S., Tarallo V., Gelfand B.D., Fowler B.J., Cho W.G., Kleinman M.E., Ponicsan S.L., Hauswirth W.W., Chiodo V.A., Karikó K., Yoo J.W., Lee D.K., Hadziahmetovic M., Song Y., Misra S., Chaudhuri G., Buas F.W., Braun R.E., Hinton D.R., Zhang Q., Grossniklaus H.E., Provis J.M., Madigan M.C., Milam A.H., Justice N.L., Albuquerque R.J.C., Blandford A.D., Bogdanovich S., Hirano Y., Witta J., Fuchs E., Littman D.R., Ambati B.K., Rudin C.M., Chong M.M., Provost P., Kugel J.F., Goodrich J.A., Dunaief J.L., Baffi J.Z., Ambati J. (2011) DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*. **471**, 325–332.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE09830>
  20. Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R., Jacks T. (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* **39**, 673–677.  
<https://doi.org/10.1038/ng2003>
  21. Toussaint O., Medrano E.E., von Zglinicki T. (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontology*. **35**, 927–945.  
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00180-7)
  22. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., Van Deursen J.M. (2015) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Medicine*. **21**(12), 1424–1435.  
<https://doi.org/10.1038/nm.4000>
  23. Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G. J., Lowe S.W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. **113**, 703–716.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
  24. Hayflick L. (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
  25. Lee S., Schmitt C.A. (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell. Biol.* **21**, 94–101.  
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>
  26. Seshadri T., Campisi J. (1990) Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science*. **247**, 205–209.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2104680>

27. Beauséjour C.M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S.W., Yaswen P., Campisi J. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG417>
28. Milanovic M., Fan D.N.Y., Belenki D., Däbritz J.H.M., Zhao Z., Yu Y., Dörr J.R., Dimitrova L., Lenze D., Monteiro Barbosa I.A., Mendoza-Parra M.A., Kanashova T., Metzner M., Pardon K., Reimann M., Trumpp A., Dörken B., Zuber J., Gronemeyer H., Hummel M., Dittmar G., Lee S., Schmitt C.A. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature.* **553**, 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>
29. Pluquet O., Pourtier A., Abbadie C. (2015) The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **308**, 415–425. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2014>
30. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomero S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
31. Reich M., Liefeld T., Gould J., Lerner J., Tamayo P., Mesirov J.P. (2006) GenePattern 2.0. *Nat. Genet.* **38**, 500–501. <https://doi.org/10.1038/ng0506-500>
32. Кухарский М.С., Эверетт М.У., Лыткина О.А., Распопова М.А., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Антохин А.И., Московцев А.А. (2022) Нарушение белкового гомеостаза в клетке как основа патогенеза нейродегенеративных заболеваний. *Молекуляр. биология.* **56**(6), 1044–1056.
33. Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., Dulić V. (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2109–2117. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.2109>
34. Wang A.S., Dreesen O. (2018) Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Front. Genet.* **9**, 247. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00247>
35. Childs B.G., Baker D.J., Kirkland J.L., Campisi J., Van Deursen J.M. (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
36. González-Gualda E., Baker A.G., Fruk L., Muñoz-Espín D. (2021) A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*. *FEBS J.* **288**, 56–80. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15570>
37. Braakman I., Helenius J., Helenius A. (1992) Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **11**, 1717–1722. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05223.X>
38. Osowski C.M., Urano F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* **490**, 71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0>
39. Tu B.P., Weissman J.S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell. Biol.* **164**, 341–346. <https://doi.org/10.1083/JCB.200311055>
40. Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* **257**, 1496–1502. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1523409>
41. Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мещерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А., Кубатиев А.А. (2012) Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфоцитарной лейкемии человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия,* **56**(3), 87–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23072118/>.
42. Held K.D., Sylvester F.C., Hopcia K.L., Biaglow J.E. (1996) Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiation Res.* **145**, 542–553. <https://doi.org/10.2307/3579272>
43. Masciarelli S., Sitia R. (2008) Building and operating an antibody factory: redox control during B to plasma cell terminal differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**(4), 578–588. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.01.003>
44. Anelli T., Bergamelli L., Margittai E., Rimessi A., Fagioli C., Malgaroli A., Pinton P., Ripamonti M., Rizzuto R., Sitia R. (2012) Ero1 $\alpha$  regulates Ca<sup>2+</sup> fluxes at the endoplasmic reticulum–mitochondria interface (MAM). *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1077–1087. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4004>
45. Tavender T.J., Bulleid N.J. (2010) Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced during disulphide formation. *J. Cell Sci.* **123**, 2672–2679. <https://doi.org/10.1242/JCS.067843>
46. Zito E., Melo E.P., Yang Y., Wahlander Å., Neubert T.A., Ron D. (2010) Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol. Cell.* **40**, 787. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.11.010>
47. Cormenier J., Martin N., Deslé J., Salazar-Cardozo C., Pourtier A., Abbadie C., Pluquet O. (2018) The ATF6 $\alpha$  arm of the unfolded protein response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E2 intracrine pathway. *Mech. Ageing Dev.* **170**, 82–91. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.08.003>
48. Wiesen J.L., Tomasi T.B. (2009) Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol. Immunol.* **46**, 1222. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2008.11.012>
49. Emde A., Hornstein E. (2014) miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *EMBO J.* **33**, 1428–1437. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201488142>

50. Otsuka M., Jing Q., Georgel P., New L., Chen J., Mols J., Kang Y.J., Jiang Z., Du X., Cook R., Das S.C., Pattnaik A.K., Beutler B., Han J. (2007) Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*. **27**, 123–134. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.05.014>
51. Müller S., Imler J.L. (2007) Dicing with viruses: microRNAs as antiviral factors. *Immunity*. **27**, 1–3. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.07.003>
52. Pagliuso D.C., Bodas D.M., Pasquinelli A.E. (2021) Recovery from heat shock requires the microRNA pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. **17**, e1009734. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009734>
53. Mori M.A., Raghavan P., Thomou T., Boucher J., Robida-Stubbs S., MacOtela Y., Russell S.J., Kirkland J.L., Blackwell T.K., Kahn C.R. (2012) Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metabolism*. **16**, 336–347. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.07.017>
54. Turi Z., Lacey M., Mistrik M., Moudry P. (2019) Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging. *Ageing (Albany NY)*. **11**, 2512. <https://doi.org/10.18632/AGING.101922>

## microRNA Biogenesis during Cellular Senescence Induced by Chronic Stress of the Endoplasmic Reticulum

D. M. Zaichenko<sup>1</sup>, A. A. Mikryukova<sup>1</sup>, I. R. Astafeva<sup>1</sup>, S. G. Malakho<sup>3</sup>,  
A. A. Kubatiev<sup>1,2</sup>, and A. A. Moskovtsev<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

<sup>2</sup>*Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMANPO), Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125993 Russia*

<sup>3</sup>*Botkin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, 125284 Russia*

\*e-mail: bioinf@mail.ru

MicroRNAs are small non-coding regulatory RNAs about 22 nt long, post-transcriptional and transcriptional regulators of gene expression that stabilize the cellular phenotype and play an important role in differentiation, development, and apoptosis. MicroRNA biogenesis includes several precisely controlled post-transcriptional stages of processing and transport, including cytoplasmic cleavage of pre-miRNA by type III ribonuclease DICER with the formation of a mature duplex included in the RISC complex. The role of miRNA and its biogenesis are not well understood in such an important process as cellular stress. Cellular stress is a non-specific cellular response to non-physiological stimuli that can switch a cell to death or cellular senescence. The global decrease in microRNA levels is a key feature of cancer cells and an important reason for the formation of a malignant phenotype. In this work, using flow cytometry and high-throughput analysis of gene expression, we showed that chronic endoplasmic reticulum (ER) stress, one of the types of cellular stress associated with impaired protein folding in the ER, leads to the formation of a cellular aging phenotype in fibroblast-like FRSN cells. Despite the fact that acute ER stress can reduce miRNA biogenesis, chronic stress does not lead to a significant drop in global miRNA expression and is accompanied by only a slight decrease in DICER1 mRNA expression. Under chronic ER stress, we found an increase in cell population heterogeneity in terms of lysosomal beta-galactosidase activity, which does not exclude induced or initial cell heterogeneity and in terms of expression of microRNA biogenesis pathway components.

**Keywords:** ER stress, stress-induced aging, miRNA biogenesis