

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 57.042

ЭФФЕКТЫ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА GYY4137 НА ПУЛ ПРОТЕАСОМ КЛЕТОК РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ

© 2023 г. Е. В. Григорьева^{a, b}, Т. М. Астахова^c, А. В. Буров^a, В. Л. Карпов^a, А. В. Морозов^{a, b, *}

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

^bМосковский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук,
Москва, 119334 Россия

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Поступила в редакцию 29.04.2023 г.

После доработки 09.06.2023 г.

Принята к публикации 09.06.2023 г.

Опухолевые клетки характеризуются повышенным уровнем метаболизма. В регуляции метаболических процессов как в здоровых, так и в опухолевых клетках участвует сероводород (H_2S), который влияет на функцию ключевых клеточных систем, включая убиквитин-протеасомную систему, обеспечивающую протеостаз. Принципиальным компонентом убиквитин-протеасомной системы являются протеасомы — мультисубъединичные белковые комплексы, которые осуществляют протеолиз большей части внутриклеточных белков. На сегодняшний день данных о влиянии H_2S на общий пул протеасом и непосредственно на отдельные формы протеасом, в том числе в опухолевых клетках, недостаточно. Нами исследован эффект донора сероводорода GYY4137 (50, 100 и 200 мкМ) на пул протеасом в клетках аденокарциномы прямой кишки SW620B8-mCherry, экспрессирующих флуоресцентно меченные неконститутивные протеасомы. Клетки инкубировали с GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Показано, что воздействие GYY4137 в концентрации 200 мкМ в течение 24 ч приводит к снижению химотрипсинподобной и каспазаподобной активности протеасом. При этом наблюдается повышение экспрессии генов субъединиц протеасом. В лизатах клеток, инкубированных с 200 мкМ GYY4137, спустя 48 ч увеличивается содержание конститутивной субъединицы $\beta 5$, что, по-видимому, способствует выравниванию активности протеасом в клетках. Инкубация клеток с GYY4137 (200 мкМ, 72 ч) также приводила к повышению уровней экспрессии некоторых протеасомных генов, однако это не оказывало существенного влияния на активность и субъединичный состав протеасом. На протяжении эксперимента не выявлено изменений в содержании флуоресцентно меченных неконститутивных протеасом в клетках. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о модуляции активности протеасом донором сероводорода, а также о влиянии GYY4137 на уровни транскрипции и трансляции отдельных протеасомных генов.

Ключевые слова: H_2S , доноры сероводорода, протеасомы, аденокарцинома прямой кишки

DOI: 10.31857/S0026898423060083, **EDN:** RBEQZK

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, активные формы серы (АФС), к которым, в частности, относится сероводород (H_2S), играют важную роль в поддержании гомеостаза клеток и обладают цитопротекторными свойствами [1]. Поэтому изучение механизмов действия АФС, приводящих к адаптации клеток к неблагоприятным условиям, вызывает значительный интерес. На сегодняшний день активно исследуется влияние H_2S на жизненно важные системы, обеспечивающие регуляцию метаболизма клеток [2, 3].

Одной из таких систем является убиквитин-протеасомная система (УПС).

Роль УПС в метаболизме клеток связана с деградацией большинства внутриклеточных белков. Ключевым компонентом УПС, непосредственно осуществляющим разрушение белковых субстратов, являются протеасомы — крупные (мол. масса 20S протеасомы равна 700 кДа) мультисубъединичные белковые комплексы. 20S протеасомы представляют собой цилиндрические структуры, построенные из 28 субъединиц, организованных в четыре семичленных кольца [4].

Два внешних кольца содержат альфа-субъединицы ($\alpha 1-7$), которые участвуют в формировании структуры протеасом, а также барьера, ограничивающего доступ субстратов во внутренние камеры протеасом. Внутреннее пространство протеасомы сформировано двумя кольцами, состоящими из бета-субъединиц ($\beta 1-7$). Как и альфа-субъединицы, бета-субъединицы протеасом выполняют структурную функцию, однако три из них — $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ — являются каталитически активными гидролазами. N-концевые остатки треонина этих субъединиц осуществляют нуклеофильную атаку пептидных связей субстрата после кислых, основных и гидрофобных аминокислотных остатков соответственно. Таким образом, протеасомы проявляют каспазаподобную, трипсинподобную и химотрипсинподобную активности. Во время сборки протеасом конститутивные каталитические субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) могут заменяться так называемыми “иммунными” аналогами ($\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$), обладающими несколько иной структурой, что приводит к изменению активности протеасом и спектра производимых ими пептидов [5]. Протеасомы, содержащие все три иммунные субъединицы вместо конститутивных, принято называть иммунопротеасомами, в то время как протеасомы, содержащие как иммунные, так и конститутивные субъединицы, иногда называют промежуточными. И иммунные, и промежуточные (вместе “неконститутивные”) протеасомы активно участвуют в презентации антигенов, в воспалительных реакциях и ответе клеток на различные стрессовые воздействия [6, 7]. Поэтому экспрессия определенных форм протеасом рассматривается как прогностический фактор при онкологических и аутоиммунных заболеваниях. В этой связи при исследовании влияния определенных веществ на УПС особый интерес представляют изменения в пуле протеасом.

Накапливаются экспериментальные данные, указывающие на влияние АФС, в частности H_2S , на пул протеасом в клетке и функциональное состояние УПС [8, 9]. Недавно, используя технологию CRISPR-Cas9, нами была получена репортерная клеточная линия аденокарциномы прямой кишки, в состав протеасом которой входят иммунные субъединицы $\beta 5i$, слитые с флуоресцентным белком mCherry [10]. Принципиальной особенностью этой линии является то, что экспрессия гена, кодирующего химерную субъединицу $\beta 5i$ -mCherry, находится под контролем эндогенных регуляторных механизмов. Это позволяет количественно (с использованием проточной цитометрии) оценивать влияние различных препаратов на экспрессию компонентов иммунопротеасом в живых клетках, а также изучать локализацию неконститутивных форм протеасом. С использованием полученной линии в нашей работе изучено влияние молекулярного донора сероводорода — GYY4137,

обеспечивающего медленное высвобождение H_2S , на пул протеасом в клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. В работе использовали генетически модифицированную линию клеток аденокарциномы прямой кишки SW620B8-mCherry [10]. Клетки культивировали в среде DMEM (“Gibco”, Великобритания), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Hyclone”, США) и пенициллин/стрептомицин (500 Ед./500 мкг/мл), при 37°C и 5% CO_2 .

Обработка клеток донором сероводорода. Донор сероводорода GYY4137 (“Sigma-Aldrich”, США) разводили в DMSO до концентрации 50, 100 и 200 мМ, затем добавляли в культуральную жидкость до конечной концентрации 50, 100 и 200 мкМ. К контрольным клеткам добавляли такое же количество DMSO (по объему). Клетки инкубировали в течение 6, 24, 48 и 72 ч, после чего промывали фосфатным буфером (ФБ), снимали с подложки с помощью резинового скребка, суспендировали в ФБ и переносили в пробирки объемом 1.5 мл. Клетки осаждали центрифугированием (200 g, 4 мин), отбирали надосадочную жидкость, а осадки клеток замораживали при $-80^\circ C$.

Выделение РНК и получение кДНК. Суммарную РНК выделяли из клеток с помощью набора RNA Solo (“Евроген”, Россия) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли спектрофотометрически, используя прибор NanoDrop (“Thermo Scientific”, США). Далее проводили реакцию обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу Magnus (“Евроген”) и праймер oligo(dT)₂₀ для получения кДНК.

Оценка уровня экспрессии протеасомных генов. Проводили количественную ПЦР в реальном времени и сравнительный анализ уровней экспрессии генов, кодирующих каталитические субъединицы протеасом: *PSMB5* (субъединица $\beta 5$), *PSMB6* (субъединица $\beta 1$), *PSMB8* (субъединица $\beta 5i$) и *PSMB9* (субъединица $\beta 1i$). Использовали разработанную нами ранее ПЦР-систему [11], олигонуклеотиды (табл. 1), образцы кДНК, полученные из клеток, и набор Luminaris Color Hi-Green qPCR Master Mix (“Thermo Scientific”, США). В качестве референсного гена использовали ген *Actb*.

Лизирование клеток. Для определения активности протеасом клетки гомогенизировали в буфере (50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 100 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 10% глицерина, 10 мМ $Na_2S_2O_5$ и 2 мМ АТФ) из расчета 1 мкл буфера на 10000 клеток. Гомогенаты осветляли центрифугированием в центрифуге 5418R (“Eppendorf”, Германия) при максимальных оборотах в

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер*	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
PSMB5 for (субъединица β5)	CTCCAAACTGCTTGCCAAC
PSMB5 rev (субъединица β5)	GTTCCCTTCACTGTCCACG
PSMB6 for (субъединица β1)	AAGCCGAGAAGTTTCCACT
PSMB6 rev (субъединица β1)	GCGATGTAGGACCCAGT
PSMB8 for (субъединица β5i)	GGTGAACAAGGTGATTGAG
PSMB8 rev (субъединица β5i)	GTTCTCCATTTTCGCAGATAG
PSMB9 for (субъединица β1i)	GCTGCTGATGCCCAAGC
PSMB9 rev (субъединица β1i)	GCTGATATTTCTCACCACATTTGC

* Последовательности праймеров опубликованы ранее [11].

Таблица 2. Антитела, использованные в работе

Антитела	Производитель
Моноклональные антитела мыши к субъединице β2	“Enzo”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице β5	“GeneTex”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице β1i	“Abcam”, Великобритания
Поликлональные антитела кролика к субъединице β5i	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к β-актину	“Abcam”, Великобритания
Антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Enzo”, США
Поликлональные антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Abcam”, Великобритания

течение 30 мин. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Лоури. Для изучения содержания белков субъединиц протеасом методом иммуноблоттинга клетки лизировали в буфере (50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% NP-40), инкубировали в течение 10 мин на льду, после чего осветляли центрифугированием (10000 g, 10 мин). Затем надосадочную жидкость отбирали и замораживали при –80°C.

Иммуноблоттинг. Содержание целевых белков в гомогенатах анализировали методом иммуноблоттинга. Белки разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) после чего переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США). Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембраны 0.1%-ным раствором Ponceau Rouge (“Sigma-Aldrich”). Для выявления субъединиц протеасом мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в течение 2 ч, затем отмывали ФБ, содержащим 0.1% Tween 20 (“Thermo

Fisher Scientific”), и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена. Блоты проявляли с помощью набора ECL Prime (“GE Healthcare”, Великобритания) и рентгеновской пленки (“FujiFilm”, Япония). Для нормирования сигнала мембраны отмывали от антител сначала буфером для снятия антител (ФБ, 2%-ный додецилсульфат Na, 100 мМ β-меркаптоэтанол), а затем дополнительно ФБ. Мембраны инкубировали с первичными антителами к β-актину (табл. 2) в течение 1 ч, после чего отмывали и инкубировали с соответствующими вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена (табл. 2), и проявляли, как описано выше. Относительную оптическую плотность сигналов оценивали с помощью программы ImageJ.

Определение активности протеасом. Химотрипсиноподобную и каспазаподобную активности протеасом в осветленных гомогенатах оценивали по уровню гидролиза флуорогенных субстратов

Suc-LLVY-AMC (“Sigma-Aldrich”) и Z-LLE-AMC (“Sigma-Aldrich”) с использованием VersaFluor Fluorometer (“Bio-Rad”), как описано в [12]. Активность измеряли как минимум в трех повторностях в 100 мкл буфера для определения активности (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ и 30 мкМ субстрата), содержащего 6 мкл осветленного гомогената; концентрации АТФ и $MgCl_2$ выбирали, учитывая данные [13]. Специфическую активность протеасом контролировали, добавляя в отдельные пробы по 10 мкМ ингибитора протеасом MG132 (“Sigma-Aldrich”). Полученные значения умножали на уравнивающий коэффициент (определяемый после оценки концентрации белка в пробах), вычисляли среднее значение и стандартное отклонение, после чего пересчитывали относительно уровня активности в контрольных клетках (в процентах).

Проточная цитометрия. Клетки SW620B8-mCherry обрабатывали GYY4137 (50, 100 или 200 мкМ) в течение 6, 24, 48 или 72 ч, после чего снимали с подложки и оценивали флуоресценцию mCherry с помощью проточного цитометра LSRFortessa (“BD Biosciences”, США). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием FlowJo версии 10.0.7 (“FlowJo LLC”, США) и Microsoft Excel (“Microsoft Corp.”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

GYY4137 снижает активность протеасом при инкубации в течение суток

На первом этапе работы оценили влияние GYY4137 в различных концентрациях на активность протеасом в клетках SW620B8-mCherry. Исходя из данных, приведенных в [14–16], были выбраны и использованы следующие концентрации донора сероводорода – 50, 100 и 200 мкМ, а также время инкубации клеток – 6, 24, 48 и 72 ч. Наблюдали статистически значимое снижение активности протеасом в клетках, инкубированных с 200 мкМ GYY4137 в течение 24 ч. При этом выявили снижение химотрипсинподобной (на 25%, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) и каспазаподобной (на 20% $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) активности протеасом (рис. 1). Следует отметить снижение химотрипсинподобной активности протеасом также спустя 48 ч после начала инкубации, однако статистически значимым снижение активности было в присутствии 100 мкМ GYY4137. При концентрации донора сероводорода 200 мкМ снижение химотрипсинподобной активности спустя 48 ч было близким к значимому. Через 72 ч различия в активности внутриклеточных протеасом отсутствовали.

GYY4137 вызывает динамические изменения экспрессии протеасомных генов

Связан ли эффект модуляции активности протеасом с изменением содержания протеасом? Чтобы понять это, мы в первую очередь исследовали уровни экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом с химотрипсинподобной ($\beta 5$, $\beta 5i$, $\beta 1i$) и каспазаподобной активностью ($\beta 1$). Так, в клетках SW620B8-mCherry, инкубированных с GYY4137, методом ПЦР в реальном времени проведен анализ экспрессии генов *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB8* и *PSMB9*, кодирующих каталитические субъединицы $\beta 5$, $\beta 1$, $\beta 5i$ и $\beta 1i$ соответственно. Показано, что воздействие GYY4137 вызывает динамические изменения уровней экспрессии протеасомных генов (рис. 2). Следует отметить, что амплитуда выявленных изменений превосходила амплитуду в контрольных клетках не более, чем в 2.3 раза. Наиболее заметно изменились уровни экспрессии генов *PSMB6* (2.3 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), *PSMB8* (2.2 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) и *PSMB5* (2 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) в образцах клеток, инкубированных с 50 мкМ GYY4137 в течение 24 ч. Также в образцах клеток, инкубированных со 100 и 200 мкМ GYY4137 в течение 24 ч, выявлено повышение экспрессии генов *PSMB6* (1.88 и 1.76 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) и *PSMB8* (1.85 и 1.39 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). Кроме того, обнаружено повышение уровней экспрессии генов *PSMB5* (1.37 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), *PSMB6* (1.56 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), *PSMB8* (1.27 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) при инкубации клеток с 200 мкМ GYY4137 в течение 6 ч. Экспрессия генов *PSMB5* и *PSMB6* возрастала и после инкубации со 100 и 200 мкМ GYY4137 (1.44 и 1.76 раза и 1.32 и 1.4 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) спустя 72 ч после добавления донора сероводорода (рис. 2). Более сложная динамика экспрессии генов *PSMB8* и *PSMB9*, кодирующих иммунные субъединицы $\beta 5i$ и $\beta 1i$ протеасом, наблюдалась при инкубации клеток с GYY4137 в течение 72 ч. Экспрессия гена *PSMB8* увеличивалась при инкубации с 50 и 100 мкМ (1.36 и 1.22 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), но имела тенденцию к снижению после инкубации с 200 мкМ GYY4137 (0.84 раза). Экспрессия *PSMB9* также увеличивалась после инкубации со 100 мкМ, но снижалась после инкубации с 200 мкМ GYY4137 (1.45 и 0.88 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) (рис. 2).

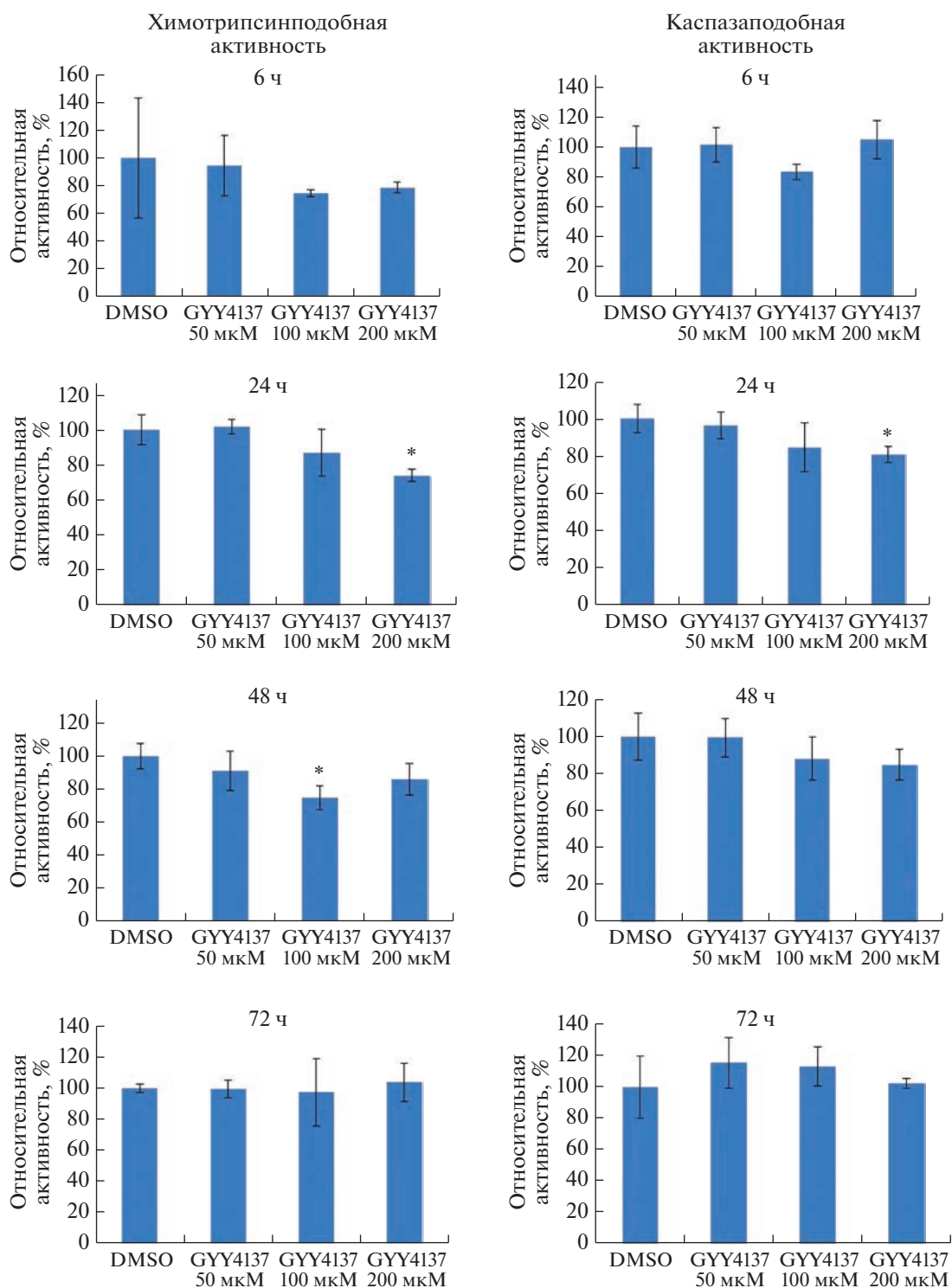


Рис. 1. Сравнительный анализ химотрипсинподобной и каспазаподобной активности в гомогенатах клеток SW620B8-mCherry после инкубации с различными концентрациями GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Уровни активности нормированы по уровню в контрольных клетках. Статистическая значимость различий в уровнях активности в образцах по сравнению с контролем оценена с помощью критерия Манна–Уитни, * $p < 0.05$.

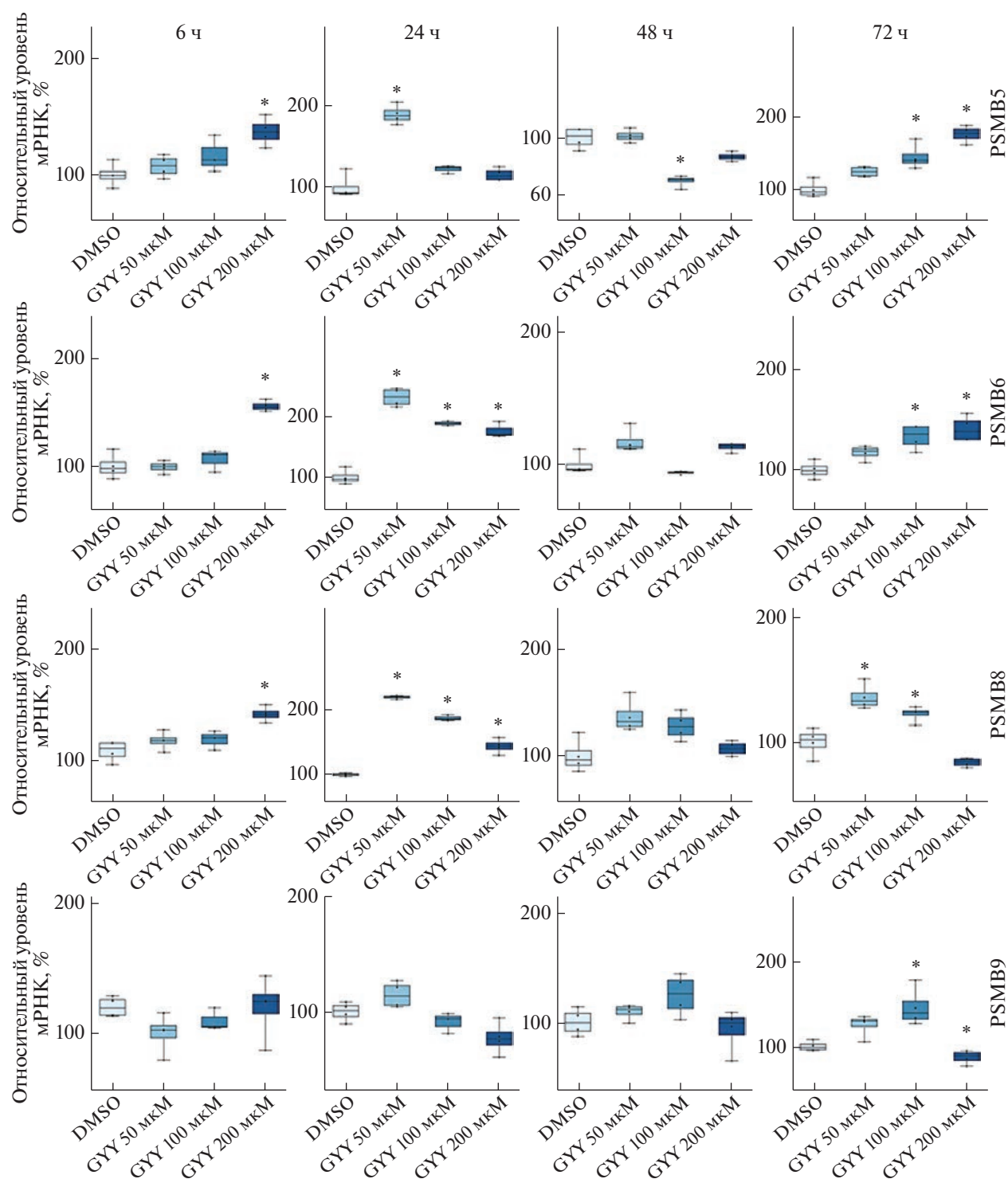


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии генов конститутивных (*PSMB5*, *PSMB6*) и иммунных субъединиц протеасом (*PSMB8*, *PSMB9*) в клетках SW620B8-mCherry после инкубации с различными концентрациями GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Уровень экспрессии гена нормирован по уровню экспрессии в контрольных клетках, инкубированных в указанные промежутки времени. Указаны медианные значения и стандартное отклонение. Статистическая значимость различий в уровне экспрессии генов в образцах по сравнению с контролем оценена с помощью критерия Манна–Уитни, * $p < 0.05$.

ГYY4137 вызывает изменения содержания субъединиц протеасом в гомогенатах клеток

С целью более детальной характеристики изменений в пуле протеасом под действием GYY4137 оценили содержание субъединиц $\beta 5$, $\beta 1i$ и $\beta 5i$ протеасом в гомогенатах клеток, инкубированных с донором сероводорода в течение разных промежутков времени, методом иммуноблоттинга (рис. 3).

В клетках, инкубированных с GYY4137 в течение 48 ч, выявлено некоторое снижение количества субъединицы $\beta 1i$, однако, учитывая низкий уровень экспрессии данной субъединицы, можно предположить, что небольшие изменения ее содержания не оказывают существенного влияния на общую активность протеасом. Кроме того, после 48 ч инкубации с донором сероводорода наблюдали дозозависимое увеличение содержания субъединицы $\beta 5$ (рис. 3), тогда как экспрессия субъединицы $\beta 5i$ существенно не изменилась. Содержание этой субъединицы мы оценили, используя также другой подход. Особенность линии SW620B8-mCherry заключается в том, что в клетках этой линии экспрессируется $\beta 5i$, слитая с флуоресцентным белком mCherry, поэтому оценить содержание этой субъединицы в клетках можно также по интенсивности флуоресценции. Используя проточную цитометрию, определили флуоресценцию mCherry в клетках через разные промежутки времени после инкубации с GYY4137 в разных концентрациях. Оказалось, что инкубация клеток с донором сероводорода не влияет на уровень флуоресценции mCherry в клетках SW620B8-mCherry (рис. 4). Эти результаты подтверждают данные, полученные при анализе содержания субъединиц протеасом в лизатах клеток, и указывают на отсутствие значительных изменений в содержании неконститутивных протеасом, содержащих эту субъединицу, несмотря на повышение экспрессии гена *PSMB8*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клетках человека H_2S синтезируется из аминокислоты цистеина с помощью ферментативной реакции, катализируемой цистатионин- γ -лиазой (CSE) и цистатионин- β -синтазой (CBS), а также 3-меркапто-сульфидтрансферазой (3-MST) [17]. Как правило, уровни сероводорода в клетках достаточно низкие, однако H_2S признан физиологическим медиатором, выполняющим множество важных функций и влияющим на ключевые клеточные системы. Так, сероводород играет цитопротекторную роль при ишемической болезни, участвует в защите клеток от окислительного стресса, в синаптической передаче, поддержании тонуса сосудов, в процессах ангиогенеза, в воспалительных реакциях, регуляции транскрипции и

заживлении ран [1]. Таким образом, изучение роли сероводорода в клетке представляется крайне актуальным, поэтому необходимы специальные соединения, которые могут служить донорами H_2S , т.е. обеспечивать его высвобождение. На сегодняшний день известны соединения, обеспечивающие разную скорость высвобождения H_2S [17]. К классическим молекулам относятся такие соли, как NaSH, Na_2S . При растворении этих солей происходит быстрое высвобождение сероводорода, что может плохо воспроизводить физиологические процессы в клетке. Более медленное высвобождение сероводорода обеспечивает GYY4137 – сравнительно недавно полученное производное замещенного дитиофосфетана (Реагент Лавессона) [15]. В настоящее время GYY4137 относится к наиболее часто применяемым в исследованиях донорам сероводорода [17]. Нами изучены динамические эффекты разных концентраций GYY4137 на пул протеасом в линии клеток SW620B8-mCherry аденокарциномы прямой кишки.

В клетках SW620B8-mCherry под действием GYY4137 снижается активность протеасом. Так, инкубация клеток в течение 24 ч с GYY4137 приводит к статистически значимому снижению как химотрипсинподобной, так и калпаинаподобной активности комплексов, не связанному с изменением содержания субъединиц протеасом, обладающих этими активностями. Важным механизмом регуляции активности протеасом является модификация субъединиц посредством посттрансляционных модификаций [18]. Так, фосфорилирование и нитрозилирование субъединиц протеасом может приводить как к повышению, так и к понижению активности протеасом [18]. Нам не удалось найти публикаций, в которых выявлено сульфгидрирование субъединиц протеасом, однако известно, что в клетках от 10 до 25% белков подвергаются сульфгидрированию [19]. Нельзя исключить и сульфгидрирование субъединиц протеасом, что, в конечном итоге, скажется на активности комплексов. С другой стороны, сульфгидрирование белков может влиять на эффективность их фосфорилирования и нитрозилирования [20]. Таким образом, можно предположить, что на начальном этапе снижение активности протеасом может быть связано с модификацией их субъединиц H_2S . При этом со снижением активности протеасом в промежутке между 6 и 24 ч совпадает умеренная активация экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом. По всей видимости, данный эффект зависит от концентрации GYY4137. Так, при использовании GYY4137 в концентрации 200 мкМ повышение экспрессии протеасомных генов заметно уже через 6 ч. Спустя 24 ч повышение экспрессии протеасомных генов под действием 200 мкМ GYY4137 становится минимальным, а в присутствии 50 мкМ, наоборот,

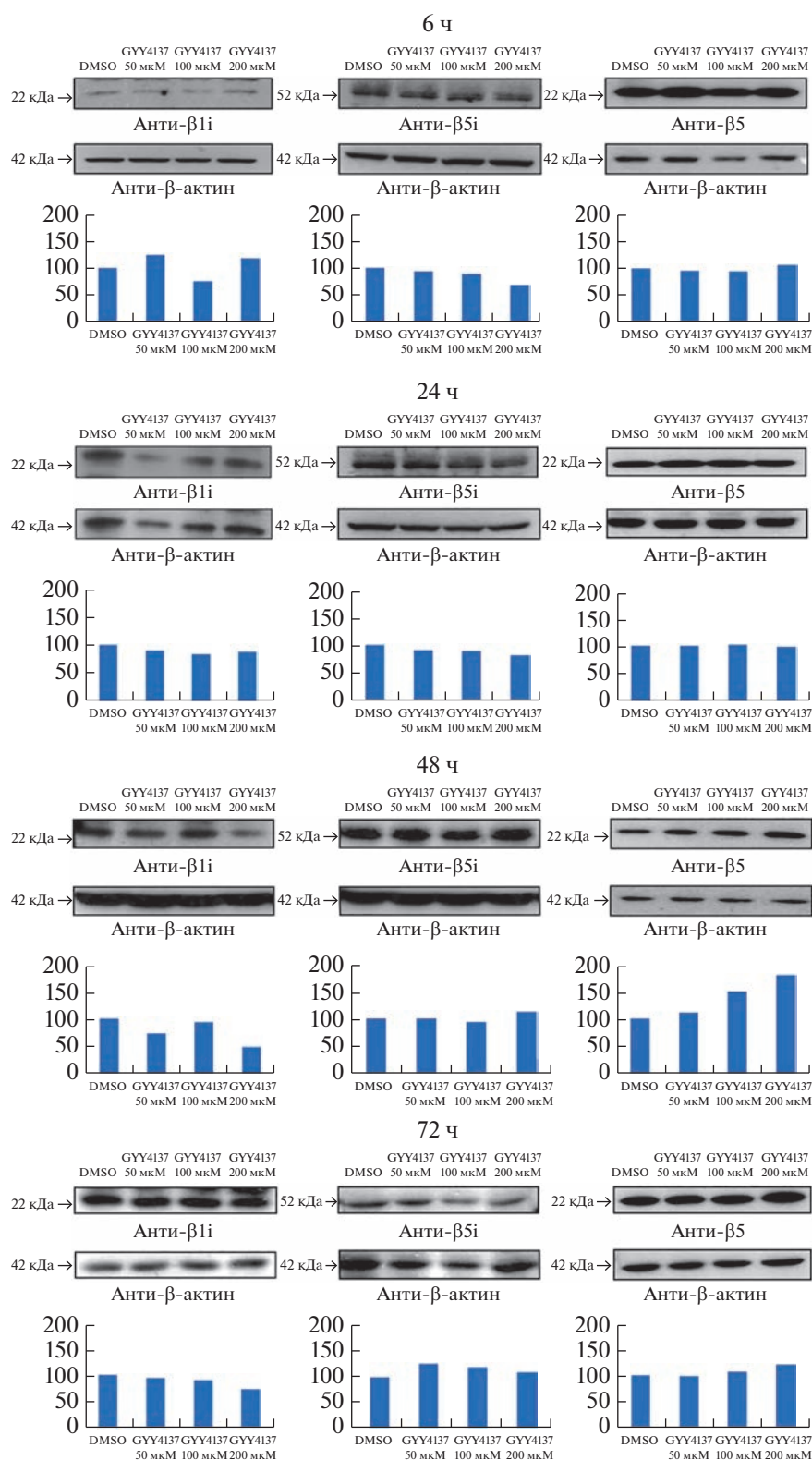


Рис. 3. Иммуноблоттинг лизатов клеток SW620B8-mCherry, инкубированных с различными концентрациями донора сероводорода GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Под изображениями блотов приведены диаграммы, отражающие нормированные (по уровню сигнала β-актина) значения оптической плотности (в % от контроля (DMSO)). Результаты иммуноблоттинга анализировали с помощью программы ImageJ.

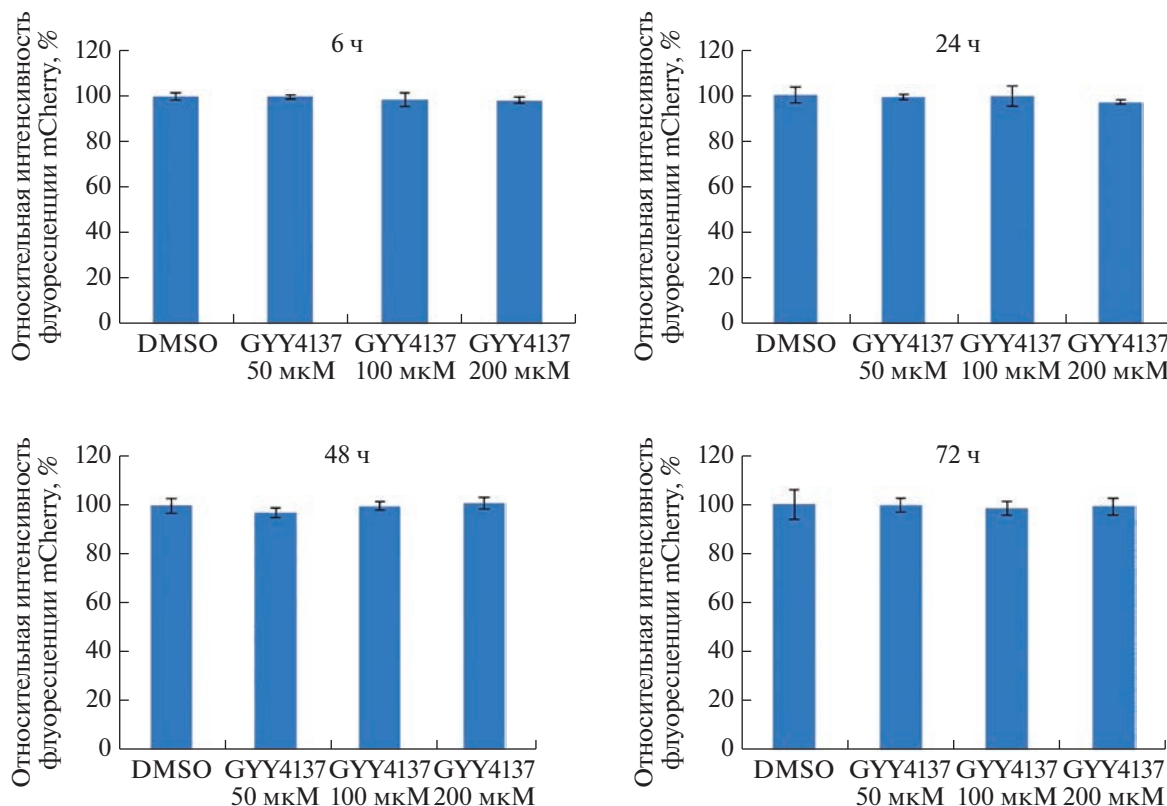


Рис. 4. Сравнительный анализ средней интенсивности флуоресценции mCherry в клетках SW620B8-mCherry после инкубации с различными концентрациями GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч.

максимальным. Таким образом, вероятно, имеет место отложенный эффект, связанный с высвобождением сероводорода. Этот эффект подтверждается дозозависимым увеличением содержания конститутивной каталитической субъединицы $\beta 5$ в лизатах клеток через 48 ч после добавления донора сероводорода. В результате чего, возможно, происходит восстановление общей активности протеасом. Можно предположить несколько механизмов, обеспечивающих такие изменения. Так, сульфгидрирование белка Keap1 приводит к высвобождению и ядерной транслокации транскрипционного фактора Nrf2 [8], мишенями которого являются промоторы протеасомных генов [7, 21]. На мышах, моделирующих развитие сердечной недостаточности, показано, что H_2S -терапия по Nrf2-зависимому механизму способствует повышению активности протеасом и замедляет развитие патологии [9]. Кроме того, АФС активируют эндотелиальную синтазу оксида азота и, как следствие, выработку NO [22]. В то же время, под действием NO происходит повышение уровня экспрессии генов, кодирующих иммунные субъединицы протеасом, что способствует увеличению протеолитической активности комплексов [23]. Кроме того, сульфгидрирование субъединицы p65 NF- κ B способ-

ствует связыванию транскрипционного фактора с коактиватором RPS3, после чего этот комплекс стимулирует транскрипцию целевых генов [24], среди которых есть и гены иммунных субъединиц протеасом [6]. Еще один возможный механизм воздействия АФС на компоненты УПС – стимуляция выработки cAMP и участие в активации cAMP-зависимой протеинкиназы [25], которая фосфорилирует и активирует транскрипционный фактор CREB [26], усиливающий транскрипцию генов иммунных субъединиц протеасом [6]. Важно отметить, что несмотря на изменения уровня экспрессии гена *PSMB8*, мы не наблюдали существенного изменения содержания неконститутивных протеасом, содержащих субъединицу $\beta 5i$, в клетках SW620B8-mCherry. Таким образом, полученные данные указывают на то, что в клетках рака прямой кишки действие GYY4137 в большей степени сказывается на содержании и активности конститутивных протеасом.

В целом, экспериментальные и опубликованные данные указывают на вероятную роль сероводорода в регуляции активности и субъединичного состава протеасом, что напрямую влияет на поддержание редокс-статуса и гомеостаза клеток в целом. Дальнейшие эксперименты позволят точнее установить молекулярные механизмы, обеспечива-

ющие изменения в пуле протеасом, вызванные действием доноров сероводорода, в частности GYY4137. Также предстоит понять, подвергаются ли субъединицы протеасом сульфидированию и какой эффект это оказывает на протеолитическую активность комплексов.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 17-74-30030).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kimura H. (2014) Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules*. **19**, 16146–16157.
- Sen N. (2017) Functional and molecular insights of hydrogen sulfide signaling and protein sulfhydration. *J. Mol. Biol.* **429**, 543–561.
- Paul B.D., Snyder S.H., Kashfi K. (2021) Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. *Redox Biol.* **38**, 101772.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. **386**, 463–471.
- Abi Habib J., Lesenfans J., Vigneron N., Van den Eynde B.J. (2022) Functional differences between proteasome subtypes. *Cells*. **11**, 421.
- Ferrington D.A., Gregerson D.S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Progr. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 75–112.
- Pickering A.M., Linder R.A., Zhang H., Forman H.J., Davies K.J. (2012) Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 10021–10031.
- Koike S., Ogasawara Y., Shibuya N., Kimura H., Ishii K. (2013) Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by *t*-buthylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **587**, 3548–3555.
- Shimizu Y., Nicholson C.K., Lambert J.P., Barr L.A., Kuek N., Herszenhaut D., Tan L., Murohara T., Hansen J.M., Husain A., Naqvi N., Calvert J.W. (2016) Sodium sulfide attenuates ischemic-induced heart failure by enhancing proteasomal function in an Nrf2-dependent manner. *Circ. Heart Fail.* **9**, e002368.
- Burov A., Funikov S., Vagapova E., Dalina A., Rezvykh A., Shyroкова E., Lebedev T., Grigorieva E., Popenko V., Leonova O., Spasskaya D., Spirin P., Prasolov V., Karpov V., Morozov A. (2021) A cell-based platform for the investigation of immunoproteasome subunit $\beta 5i$ expression and biology of $\beta 5i$ -containing proteasomes. *Cells*. **10**, 3049.
- Морозов А.В., Буров А.В., Астахова Т.М., Спаская Д.С., Маргулис Б.А., Карпов В.Л. (2019) Динамика функциональной активности и экспрессии субъединиц протеасом в условиях адаптации клетки к тепловому шоку. *Молекуляр. биология*. **53**, 638–647.
- Морозов А.В., Буров А.В., Фуников С.Ю., Тетерина Е.В., Астахова Т.М., Ерохов П. А., Устюгов А.А., Карпов В.Л. (2023) Изменения активности и содержания отдельных форм протеасом в образцах коры головного мозга при развитии патологии у мышей линии 5xFAD. *Молекуляр. биология*. **57**(5), 873–885.
- Morozov A., Astakhova T., Erokhov P., Karpov V. (2022) The ATP/Mg²⁺ balance affects the degradation of short fluorogenic substrates by the 20S proteasome. *Methods Protocols*. **5**, 15.
- Li L., Fox B., Keeble J., Salto-Tellez M., Winyard P.G., Wood M.E., Moore P.K., Whiteman M. (2013) The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J. Cell. Mol. Med.* **17**(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12016>
- Li L., Whiteman M., Guan Y.Y., Neo K.L., Cheng Y., Lee S.W., Zhao Y., Baskar R., Tan C.H., Moore P.K. (2008) Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. **117**(18), 2351–2360. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467>
- Wu Z., Peng H., Du Q., Lin W., Liu Y. (2015) GYY4137, a hydrogen sulfide-releasing molecule, inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases in Coxsackie virus B3-infected rat cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* **11**(3), 1837–1844. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2901>
- Powell C.R., Dillon K.M., Matson J.B. (2018) A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* **149**, 110–123.
- Kors S., Geijtenbeek K., Reits E., Schipper-Krom S. (2019) Regulation of proteasome activity by (post-) transcriptional mechanisms. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 48.
- Westermann B. (2009) Nitric oxide links mitochondrial fission to Alzheimer's disease. *Sci. Signaling*. **2**, pe29–pe29.
- Zhang D., Du J., Tang C., Huang Y., Jin H. (2017) H₂S-induced sulfhydration: biological function and detection methodology. *Front. Pharmacol.* **8**, 608.
- Kaya H.E.K., Radhakrishnan S.K. (2021) Trash talk: mammalian proteasome regulation at the transcriptional level. *Trends Genet.* **37**, 160–173.
- King A.L., Polhemus D.J., Bhushan S., Otsuka H., Kondo K., Nicholson C.K., Bradley J.M., Islam K.N., Calvert J.W., Tao Y.X., Dugas T.R., Kelley E.E., Elrod J.W., Huang P.L., Wang R., Lefer D. (2014) Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 3182–3187.
- Kotamraju S., Matalon S., Matsunaga T., Shang T., Hickman-Davis J.M., Kalyanaraman B. (2006) Upreg-

- ulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* **40**, 1034–1044.
24. Sen N., Paul B.D., Gadalla M.M., Mustafa A.K., Sen T., Xu R., Kim S., Snyder S.H. (2012) Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell.* **45**, 13–24.
25. Kimura H. (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 129–133.
26. Huang H., Wang H., Figueiredo-Pereira M.E. (2013) Regulating the ubiquitin/proteasome pathway via cAMP-signaling: neuroprotective potential. *Cell Biochem. Biophys.* **67**, 55–66.

Effects of Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 on the Proteasome Pool of Colon Cancer Cells

E. V. Grigorieva^{1, 2}, T. M. Astakhova³, A. V. Burov¹, V. L. Karpov¹, and A. V. Morozov^{1, 2, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

³Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Cancer cells are characterized by an increased level of metabolism and are highly dependent on the correct functioning of the processes that ensure homeostasis. Reactive sulfur species (RSS) are important molecular modulators of metabolic processes in both healthy and tumor cells. The effect of RSS and, in particular, H₂S, on key cellular systems, including the ubiquitin-proteasome system (UPS), which ensures the destruction of most intracellular proteins, has been shown. The main components of the UPS are proteasomes – multisubunit protein complexes, within which protein proteolysis occurs. At the same time, data on the effect of H₂S directly on the pool of proteasomes in tumor cells are insufficient. Here, we studied the effect of incubation of SW620B8-mCherry colon adenocarcinoma cells expressing a fluorescently labeled proteasome subunit with 50, 100, and 200 μ M of hydrogen sulfide donor GYY4137. The effect of the substance on the proteasome pool was assessed 6, 24, 48, and 72 h after administration. It was shown that the chymotrypsin-like and caspase-like proteasome activity decreases in cells incubated with 200 μ M of the GYY4137 for 24 h. This coincided with an increase in the expression of proteasome subunit genes. In lysates of cells incubated with 200 μ M GYY4137 for 48 h an increase in the content of the constitutive β 5 subunit was observed. Against this background, the activity of proteasomes in cells levels off. Following prolonged incubation with GYY4137 (72h), an increase in the expression levels of some proteasome genes was also observed, though this did not have a significant effect on the activity and subunit composition of proteasomes. Thus, the data obtained indicate the modulation of proteasome activity by the hydrogen sulfide donor, as well as the effect of GYY4137 on the levels of transcription and translation of proteasome genes.

Keywords: H₂S, hydrogen sulfide donor, proteasome, rectal adenocarcinoma