

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ СВЯЗИ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ Keap1/Nrf2/ARE И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА

© 2023 г. А. В. Чечушков¹, Е. Б. Меньщикова¹, *

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, 630117 Россия

*E-mail: lemen7383@mail.ru

Поступила в редакцию 17.03.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 08.04.2023 г.

Несмотря на ключевую роль редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в клеточном метаболизме, практически ничего не известно о ее связи с биогенезом лизосом. В настоящей работе выполнен теоретический и экспериментальный анализ возможности наличия такой связи. Путем формирования позиционной матрицы в генах транскрипционных факторов TFEB и TFE3 обнаружено наличие в некодирующих участках большого количества ARE-подобных последовательностей. Воздействие *in vitro* на клетки J774 активаторами системы Keap1/Nrf2/ARE (оригинального синтетического монофенола ТС-13 и препарата сравнения трет-бутилгидрохинона) приводит к дозозависимой индукции генов *Tfe3* и *Tfeb*, сопровождающейся постепенным увеличением количества лизосом и интенсивности аутофагосомно-лизосомного слияния. Таким образом, можно сделать предположение о том, что белки, контролирующие ARE-зависимые гены, способны влиять на лизосомный биогенез.

Ключевые слова: сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE, транскрипционные факторы TFEB и TFE3, лизосомы, аутофагия

DOI: 10.31857/S0041377123040041, **EDN:** ZFKNHA

Многие лекарственные препараты лизосомотропны (т.е. способные избирательно накапливаться в лизосомном аппарате клеток), и в лизосомах начинается первый этап их метаболизма. Наиболее часто он сводится к выбросу соединений из клеток с помощью системы белков ABC и MDR, что приводит к необходимости повышения терапевтических дозировок и приближения их к токсическим (Maniganda et al., 2014). Еще одна проблема лизосомотропных химиотерапевтических препаратов – вызываемое ими по-

вреждение лизосомных мембран, неизбежно ведущее к лизосомной дисфункции и гибели клеток (Mahapatra et al., 2021). Подобные эффекты проявляются при проведении химиотерапии и антибактериальной терапии (в частности при лечении инфекций, ассоциированных с персистирующими внутриклеточными патогенами).

Существует общая система регуляции генов, имеющих отношение к формированию и функционированию лизосом, ключевыми регуляторами их транскрипции являются белки семейства MITF/TFE, к которым относятся MITF, TFEB, TFE3 и TFE3. Они специфически распознают короткую палиндромную последовательность GTCACGTGAC (CLEAR), а содержащие ее гены условно объединены в одноименную генетическую сеть CLEAR (Sardiello et al., 2009). Индукция сигнальных систем, ассоциированных с лизосомной мембраной и контролируемых транскрипционными факторами TFEB и TFE3, непосредственно влияющих на активность генов CLEAR, а также фармакологическая активация последних – проблемная задача, являющаяся в настоящий момент мировым трендом в области экспериментальной терапии болезней накопления.

Все метаболические процессы в организме, в том числе с участием лизосом, сопровождаются генера-

Принятые сокращения: АКМ – активированные кислородные метаболиты; ТС-13 – 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксибензил)пропилтиосульфат натрия; ABC – АТФ-связывающие кассетные транспортеры; ARE – антиоксидант-репсонс(ив)ный элемент; CLEAR – скоординированное усиление и регулирование лизосом; LC3B – легкая цепь β 3-ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B; Nrf2 – фактор 2, родственник NF-E2 (NF-E2-related factor 2); Keap1 – ассоциированный с ECH Kelch-подобный белок 1; MDR – белки множественной лекарственной устойчивости; MITF – транскрипционный фактор, ассоциированный с микрофтальмией; p62/SQSTM – убиквитин-связывающий белок p62, он же секвестосом 1 (sequestosome 1), tBHQ – *трет*-бутилгидрохинон (*tert-butyl hydroquinone*); PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; TFE3 – транскрипционный фактор, связывающийся с энхансером 3 тяжелой μ -цепи иммуноглобулина; TFEB – транскрипционный фактор EB; TFE3 – транскрипционный фактор EC.

цией активированных кислородных метаболитов (АКМ), редокс-баланс поддерживается антиоксидантной системой, а главным регулятором их неразрывного единства выступает сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE (Зенков и др., 2017; Ngo, Duenwald, 2022; Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2021), регуляторные полномочия которой, тем не менее, более широки, и заключаются в поддержании внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. Так, Nrf2 контролирует метаболические процессы, прямо влияя на экспрессию генов, необходимых для тех или иных биохимических процессов, и регулируя ферменты, ключевые моменты метаболических реакций или точки разветвления таковых.

Интересно, что несмотря на тесные связи сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE с клеточным метаболизмом, практически ничего не известно о связях этой системы с биогенезом лизосом, имеющиеся сведения в основном касаются деградации ее компонентов (главным образом Keap1) посредством аутофагии (Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2021; Zhu et al., 2022) и их влияния на слияние аутофагосом и лизосом (Qiu et al., 2022). В то же время существует непосредственная зависимость между состоянием лизосомного аппарата и митохондрий (главного продуцента АКМ), и экспериментально вызванная дисфункция последних сопровождается клеточным фенотипом, напоминая таковой лизосомных болезней накопления. Более того, митохондриальная дисфункция сопровождается компенсаторной активацией мастер-регулятора лизосомного биогенеза TFEB и увеличением его транскрипционной активности (Baixauli et al., 2015).

Поскольку активация транскрипционных факторов TFEB и TFE3 строго регулируема и происходит в ответ на нарушение лизосомного гомеостаза и повреждающие воздействия на клетки, которые сопровождаются изменением редокс-баланса и, вероятно, индукцией Keap1/Nrf2/ARE, возникает вопрос о наличии регуляторных связей между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR.

Цель исследования – теоретический и экспериментальный анализ регуляторной связи сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и транскрипционных регуляторов лизосомного биогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Поиск регуляторных последовательностей ARE в генах TFEB и TFE3. Для того, чтобы установить возможности обнаружения регуляторной связи между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR, мы проверили наличие элементов ARE в генах транскрипционных факторов TFEB и TFE3 человека и мыши. Для поиска последовательности ARE в интересующих генах на основании 52 различных последовательностей ARE

(Wang et al., 2007) была сформирована позиционная матрица (position frequency matrix). Обнаружение последовательности проводили с помощью программного пакета RSAT (Santana-Garcia et al., 2022). Для контроля качества собранной матрицы она была проверена на нуклеотидной последовательности гена *Mafg* мыши, в котором локализован мотив ARE с экспериментально подтвержденной функциональной значимостью (Зенков и др., 2017; Simov et al., 2021). Выявлена соответствующая описанной в литературе последовательность TCATGCTGACTCAGCGGATCG с уровнем значимости 1.4×10^{-6} . С помощью аналогичного подхода на предмет наличия ARE-подобных элементов проанализировали последовательности генов *TFEB* и *TFE3* человека и мыши, взятые из GenBank, с добавлением по 5000 пар нуклеотидов до и после окончания рамок считывания гена. Полученные ARE-подобные последовательности маркировали в геномном браузере UCSC для анализа эволюционной консервативности, ко-локализации с различными функциональными модификациями ДНК и хроматина, а также с другими регуляторными элементами.

Активаторы и клетки. В качестве индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE использовали синтезированный нами оригинальный гидрофильный монофенол 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), который получали из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по ранее описанной последовательности превращений (Олейник и др., 2007), а также прототипический индуктор *трет*-бутилгидрохинон (tBHQ; Sigma-Aldrich, США).

Клетки линии J774, полученные из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), культивировали в 250 мл культуральных флаконах в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% раствора пенициллина/стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере с 5%-ным насыщением CO₂. За ночь до начала экспериментов клетки снимали с пластика, трижды отмывали в предварительно прогретом растворе Версена, центрифугировали при ускорении 300 g в течение 5 мин, ресуспендировали в предварительно прогретой культуральной среде и рассаживали в лунки 24-луночного планшета по 10⁵ клеток на 1 лунку в 0.5 мл среды. Для микроскопического исследования клетки помещали на предварительно отмытые стерилизованные покровные стекла по 4 × 10⁴ клеток на 1 см² за ночь до начала эксперимента. Экспериментальное фармакологическое воздействие на клетки осуществляли через 4, 12 и 24 ч после рекультивирования, тестируемые соединения растворяли в культуральной среде (tBHQ сначала растворяли в ДМСО, конечная концентрация составляла 1%).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией. РНК выделяли с использованием TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) с использованием

Таблица 1. Подобранные пары прямых (F) и обратных (R) праймеров, TaqMan-зондов (Pr) с флуоресцентной меткой Fam-5'

Ген	Номер в GenBank	Последовательность праймера
<i>GAPDH</i>	NM_008084.3	F: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC-3' R: 5'-ACCAGTGGATGCAGGGATGATGTT-3' Pr: R6G-5'-ATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA-3'-Q
<i>TFEB</i>	NM_001161722.1 NM_001161723.1 NM_011549.3	F: 5'-CCCTGTCCACTTCCAGTC-3' R: 5'-GATACTCCCCGAACCTTCTGATG-3' Pr: Fam-5'-TCCTACCACCTGCAACAGTCCCA-3'-Q
<i>TFE3</i>	NM_172472.3 NM_001105196.1 NM_001105197.1 NM_001271489.1 NM_001271490.1 NM_001271491.1	F: 5'-CACACTGAGTCGTCCACCT-3' R: 5'-GACAAGTACTGTTTGACCTGCTG-3' Pr: Fam-5'-AACCTACACGCTACCACCTGCA-3'-Q

набора реагентов iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, США) согласно инструкции. Методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories) изучали изменение экспрессии мРНК генов *TFEB* и *TFE3*. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 20 мкл содержала буфер для ПЦР, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 1.5 е.а. Taq-полимеразы. Амплификацию выполняли согласно следующей программе: 3 мин при 95°C начальной денатурации, далее 40 циклов: 10 с при 95°C для денатурации, 20 с при 60°C для гибридизации праймеров, съём флуоресцентного сигнала, 20 с при 72°C для элонгации. Уровень экспрессии мРНК генов рассчитывали согласно методу 2^{-ΔΔCT} и нормировали относительно референсного гена *GAPDH*. Подобранные пары праймеров и TaqMan-зондов приведены в табл. 1.

Определение содержания лизосом. Индикатор Lysotracker Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific), свежеразведенный в растворе Хенкса, содержащем глюкозу в концентрации 1.8 г/л, добавляли к клеткам на покровных стеклах в финальной концентрации 1 мкМ и инкубировали 30 мин при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Затем клетки трижды отмывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и заключали в монтирующую среду Fluoroshield (Sigma-Aldrich), содержащую интеркалирующий краситель DAPI для окраски ядер (Abcam, США). Изображения получали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710/NLO (Zeiss AG, Германия) с объективом Plan-Apochromat 63×/1.4 и анализировали с помощью программного пакета ImageJ, количество лизосом определяли по интенсивности флуоресценции индикатора (усл. ед.).

Анализ аутофагии. Для сравнения выраженности образования аутофагосом и скорости их лизосомной деградации каждую экспериментальную точку дублировали экспериментом с добавлением в культураль-

ную среду, помимо тестируемого соединения, хлорохина (C6628, Sigma-Aldrich) в концентрации 60 мкМ за 1 ч до выведения из эксперимента. Соотношение количества аутофагосом в группах с хлорохином и без него (коэффициент k_{CO}) отражает способность клеток удалять вновь формирующиеся аутофагосомы (Klionsky et al., 2021), будучи важным показателем защитных свойств аутофагии. Клетки фиксировали в 10%-ном формалине, пермеабилizировали в 0.15%-ном растворе Тритона X-100, после чего покрывали 200 мкл блокирующего раствора (PBS, содержащий 5% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% Тритона X-100) и инкубировали в шейкер-термостате (40 мин при 37°C). Далее блокирующий раствор меняли на аналогичный (но без сыворотки), содержащий антитела кролика против белка LC3В млекопитающих (L10382, Invitrogen, США), и проводили гибридизацию (60 мин, 37°C). После трехкратной пятиминутной отмывки бессывороточным блокирующим раствором выполняли гибридизацию с антителами против кроличьих антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Abcam, США) (30 мин, 37°C), затем PBS удаляли коротким промыванием деионизированной водой и заключали клетки в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую DAPI. Внутриклеточную локализацию LC3В исследовали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710/NLO и анализировали с помощью программного пакета ImageJ.

Обработка данных. Количественные данные на предварительном этапе статистического анализа оценивали на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка. Поскольку распределение отличалось от нормального, результаты представлены в виде медианы и межквартильных интервалов. Для оценки различий данных использовали критерии Манна–Уитни и Даннета. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0.05.

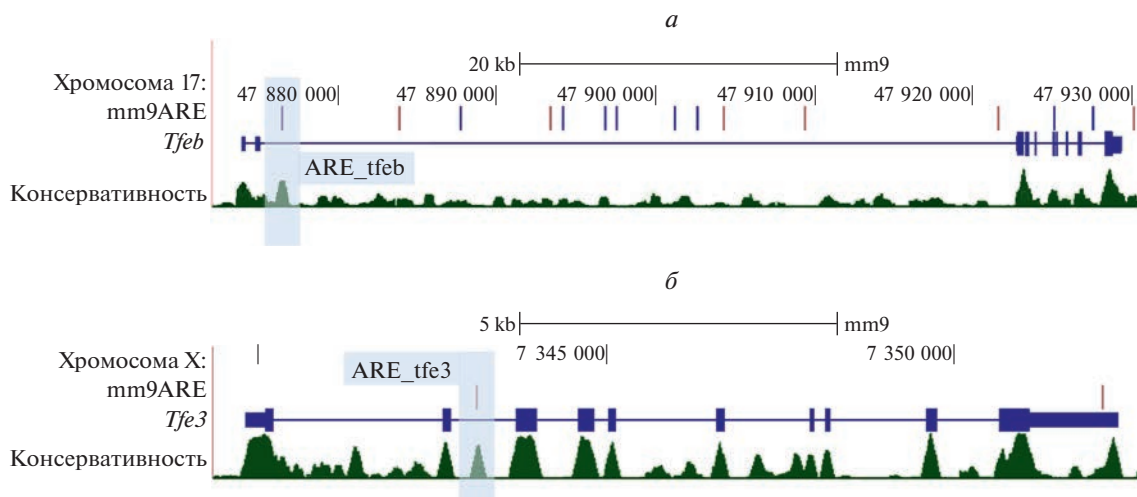


Рис. 1. Локализация последовательностей ARE в области генов *Tfeb* (а) и *Tfe3* мыши (б). Гистограмма характеризует уровень консервативности соответствующих последовательностей среди позвоночных животных (получены с помощью инструмента PhastCons).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наличие элемента ARE в генах *TFEB* и *TFE3*. Анализ сформированной позиционной матрицы показал присутствие в генах *TFEB* человека и *Tfeb* мыши по 15 ARE-подобных последовательностей (рис. 1а). Среди них консервативными для позвоночных оказались мотивы, находящиеся в первом интроне (человек, мышь; обозначены как ARE_tfeb) и в экзоне кодирующей области (мышь).

В генах человека и мыши, кодирующих транскрипционный фактор TFE3, также выявлены мотивы ARE, хотя и в меньшем количестве (рис. 1б), при этом, как и в гене TFEB, один из них расположен в некодирующем участке гена TFE3 обоих видов (во втором интроне, ARE_tfe3) и является высококонсервативным.

На основании анализа элементов хроматина, картированных международным исследовательским консорциумом ENCODE с помощью метода анализа ДНК-белковых взаимодействий ChIP-seq (Roopra, 2020), мы изучили ландшафт его модификаций в областях генома, в которые входят мотивы ARE_tfeb и ARE_tfe3. Для фрагмента хроматина, содержащего ARE_tfeb, установлена высокая частота H3K4me3, эпигенетической модификации гистона H3 (триметилирование по остатку лизина в положении 4), что свидетельствует о локализации данной последовательности в промоторной области гена (Sharifi-Zarchi et al., 2017). При этом сайтов связывания транскрипционных факторов подсемейства NFE2 (Nrf2, Nrf1, BACH1, р45) и MAF, вспомогательного белка для взаимодействия Nrf2 с ARE, не обнаружено.

Аналогичный анализ участка хроматина, содержащего последовательность ARE_tfe3, показал отсутствие характерного для энхансерных областей преобладания эпигенетических модификаций H3-

гистона H3K27Ac (ацетилирование по остатку лизина в положении 27) и H3K4Me1 (метилирование по остатку лизина в положении 4) (Maurya, 2021; Sharifi-Zarchi et al., 2017) (рис. 2). Напротив, в отличие от мотива ARE_tfeb, обнаружено связывание с ARE_tfe3 транскрипционных факторов BACH1 и NFE2, сателлитных белков MAF и Jun, белков семейства AP-1 (часть ARE включает в себя сайт связывания фактора AP-1 TRE, 5'-TGACTCA-3'), в непосредственной близости находятся консервативные участки связывания таких регуляторов транскрипции, как SEBPB, MAZ, CTCF.

Экспериментальная проверка возможности регуляции лизосомного биогенеза со стороны сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. С целью исследовать регуляторное влияние сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE на экспрессию генов *Tfeb* и *Tfe3* выполнен ПЦР-анализ продуктов их транскрипции в клетках J774. Для гена *Tfe3* отмечено увеличение экспрессии при добавлении в культуральную среду оригинального синтетического индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE TC-13, с максимальной выраженностью в концентрации 10 мкМ и падением эффекта при увеличении концентрации до 100 мкМ. Интересно, что подобную зависимость мы наблюдали при исследовании влияния TC-13 на транслокацию Nrf2 в ядро клеток J774, ключевой момент активации системы Keap1/Nrf2/ARE: вплоть до концентрации TC-13 50 мкМ она возрастала и уменьшалась почти до контрольных значений при концентрации TC-13 100 мкМ (Меньщикова и др., 2020), что можно трактовать как косвенное доказательство прямой позитивной связи между системой Keap1/Nrf2/ARE и регуляцией лизосомного биогенеза. Для гена *Tfeb* характерен менее выраженный, но устойчивый дозозависимый ответ (рис. 3).

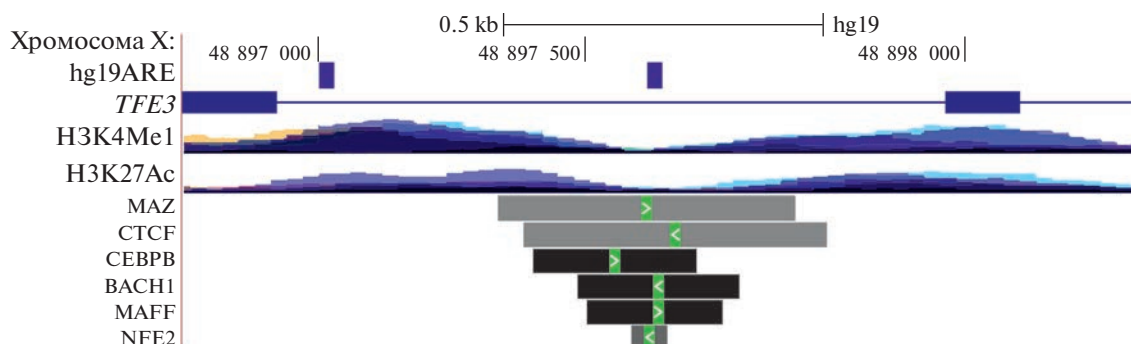


Рис. 2. Гистоновые модификации (H3K4Me1 и H3K27Ac) и мотивы связывания различных транскрипционных факторов в области ARE_tfe3.

ТС-13 оказывал аналогичное воздействие на количество лизосом в цитоплазме клеток J774, дозозависимо увеличивая его в используемом диапазоне концентраций, что показано с помощью лизосомного индикатора LysoTracker DND-99. Прототипический индуктор Keap1/Nrf2/ARE tBHQ, схожий по структуре с ТС-13, но жирорастворимый, вызывал аналогичный, но более выраженный эффект (рис. 4). Следует заметить, что в отличие от ТС-13, tBHQ токсичен для клеток J774 в концентрациях более 10 мкМ, что и ограничило диапазон использованных концентраций.

Влияние индукторов Keap1/Nrf2/ARE на аутофагию. Поскольку TFE3 и TFEВ позитивно регулируют экспрессию генов, ассоциированных с аутофагией, мы исследовали, в какой степени индуктор Nrf2 ТС-13 влияет на этот механизм. Четырехчасовая экспозиция ТС-13 практически не влияла на количество

клеток, восприимчивых к индукции аутофагии. При этом отмечалось небольшое, но статистически значимое снижение величины этого показателя при воздействии ТС-13 в концентрации 100 мкМ в условиях блокирования слияния аутофагосом с лизосомами, что может указывать на снижение способности клеток индуцировать аутофагию (рис. 5а). Двадцатичетырехчасовая экспозиция клеток с ТС-13 характеризуется дозозависимым снижением доли LC3В-позитивных клеток в экспериментах без блокатора аутофагосомно-лизосомного слияния и стабильным количеством таких клеток в экспериментах с добавлением блокатора с результирующим уменьшением активности аутофагии k_{CO} (рис. 5а, б). Интересно, что при низких дозах ТС-13 (от 0.01 до

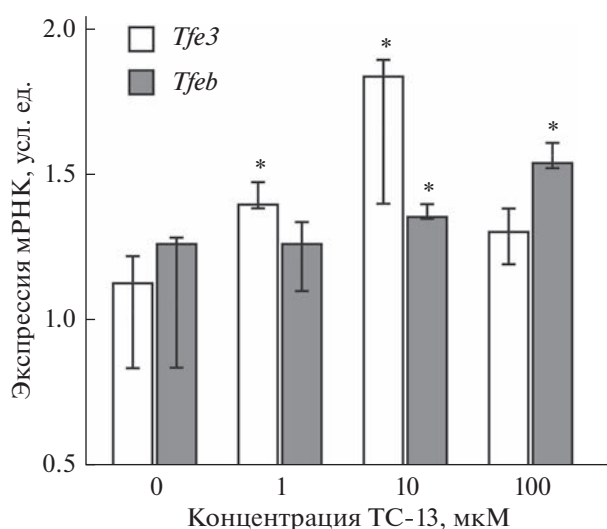


Рис. 3. Экспрессия генов, кодирующих TFE3 и TFEВ, при культивировании клеток J774 в течение 12 ч с индуктором Nrf2 ТС-13 в различных концентрациях; * – отличие от величины соответствующего показателя контроля статистически значимо при $p < 0.05$.

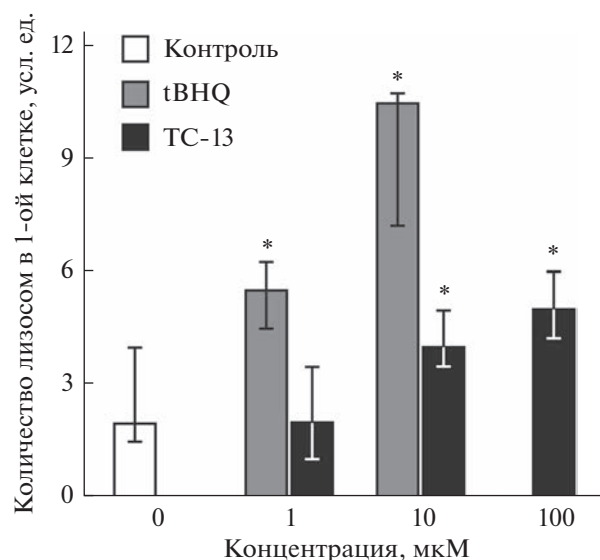


Рис. 4. Изменение содержания лизосом в клетках J774 при их культивировании в присутствии ТС-13 и tBHQ в течение 24 ч, оцениваемого по накоплению флуоресцентного лизосомотропного индикатора LysoTracker DND-99 (усл. ед.). * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0.05$.

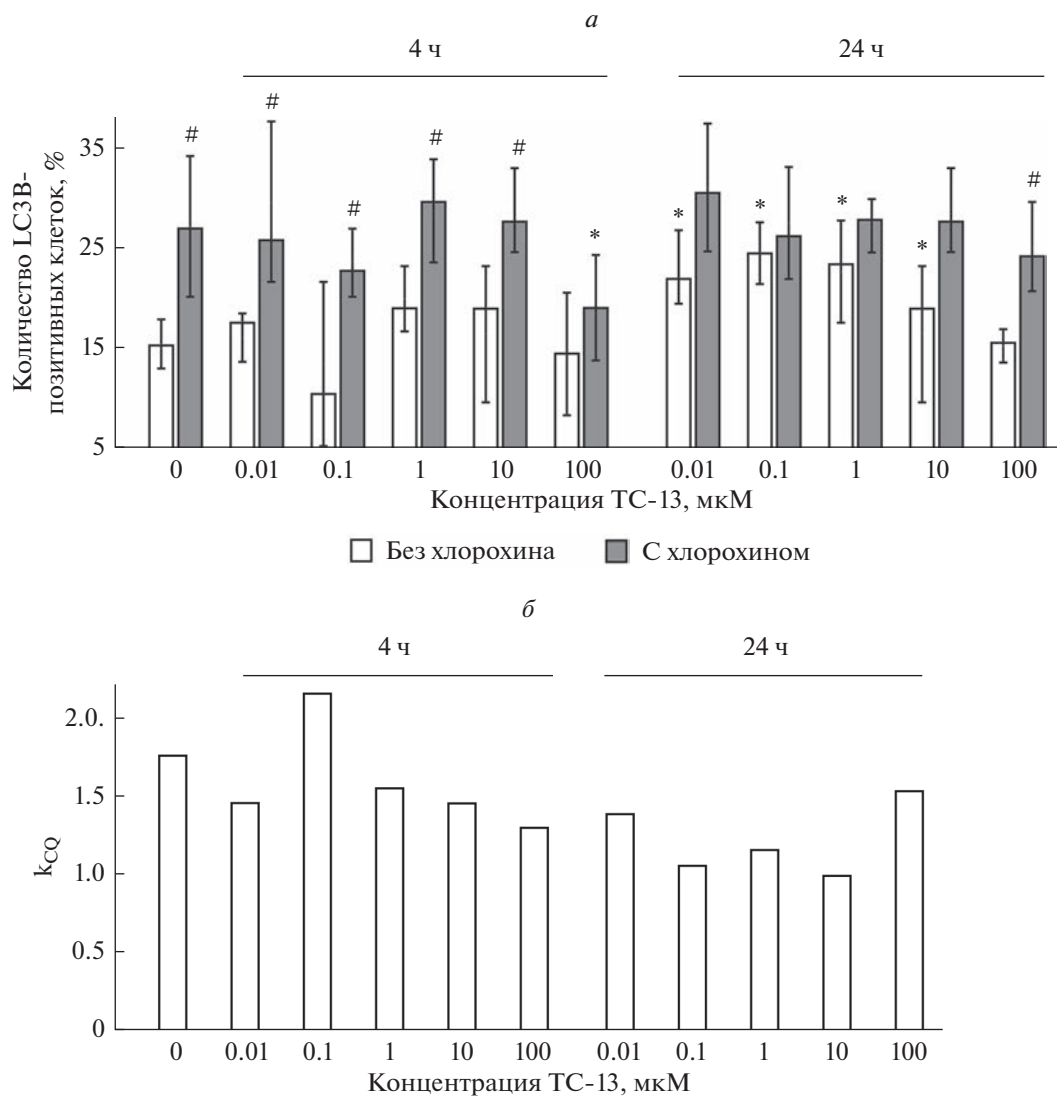


Рис. 5. Влияние ТС-13 на процессы аутофагии в клетках J774. *а* – Количество LC3B-позитивных клеток; отличия от соответствующего показателя статистически значимы при $p < 0.05$: от группы контроля (*), от клеток, культивированных в аналогичных условиях без хлорохина (#). *б* – Величина коэффициента k_{SQ} .

10 мкМ) количество позитивных клеток больше, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательности ARE, с которыми специфично связывается Nrf2, помимо генов эффекторных белков, непосредственно участвующих в биохимических процессах, локализируются в регуляторных областях генов различных транскрипционных факторов и сигнальных белков (Зенков и др., 2017; Egbujor et al., 2022), что характеризует ARE как высокоуровневые транскрипционные регуляторы. Неизвестно, насколько широко распространяется такая сеть, поскольку ежегодно открываются новые функциональные ARE-подобные мотивы в генах, казалось бы, не имеющих непосредственного отноше-

ния к антиоксидантной защите клеток. В контексте данного исследования следует отметить наличие двусторонних регуляторных связей между Nrf2 и аутофагией, которые были обнаружены относительно недавно, и роль которых мало понятна. Индукция Keap1/Nrf2/ARE может осуществляться с помощью белка p62/SQSTM1, который связывает белок Keap1 с образованием агрегатов Keap1/p62, что в свою очередь увеличивает активность Nrf2 (Zhang et al., 2021). Одновременно Nrf2 стимулирует экспрессию гена p62/SQSTM1, что может дополнительно повышать интенсивность связывания Keap1 и активность Nrf2, образуя таким образом петлю положительной обратной связи в механизме собственной активации. В дополнение к этому, Nrf2 положительно контролирует экспрессию генов рецепторов аутофагии NDP52 и Parkin1.

Аутофагия в этом механизме выполняет лимитирующую функцию (петлю негативной обратной связи), удаляя агрегаты Keap1/p62. При этом влияние Nrf2 на данную сторону процесса не исследовано. В то же время, принимая во внимание стимуляцию аутофагии АКМ, окисляющими цистеиновые остатки белков-эффекторов аутофагии, а также существенное влияние активности аутофагии на генерацию АКМ клетками, мы предположили наличие такой регуляторной связи.

С точки зрения анализа возможной связи двух сигнальных систем – регулирующей активность генетической сети CLEAR (лизосомного аппарата) и системы Keap1/Nrf2/ARE (редокс-гомеостаза) – наибольшее значение может иметь последовательность ARE_tfeb в силу своего расположения в интроне (некодирующей области, находящейся под сильным эволюционным давлением) и высокой консервативности; ее наличие впервые установлено в настоящем исследовании.

Расположение последовательности ARE_tfeb в промоторных участках и в то же время отсутствие признаков локализации характерных для ARE транскрипционных факторов и белков позволяет предположить, что данный мотив не выполняет свойственную ARE функцию, при этом участвуя в регуляции экспрессии гена *TFE3* посредством взаимодействия с транскрипционными факторами других сигнальных систем, о чем также свидетельствует его высокая консервативность. Локализация сайтов связывания с мотивом ARE_tfe3 транскрипционных факторов подсемейства NFE2, вспомогательных белков и регуляторов транскрипции и их консервативность дают основание заключить, что регуляция активности гена *TFE3* осуществляется с участием белков как системы Keap1/Nrf2/ARE, так и других сигнальных систем, в том числе взаимодействующих с первой.

Геном человека содержит тысячи некодирующих последовательностей, которые для позвоночных зачастую более консервативны, чем экзоны, кодирующие белки. Как правило, они входят в состав регуляторных участков, и изменение их структуры грозит нарушением структуры и функции белков, кодируемых соответствующими генами, что, в частности, и объясняет необходимость консервативности таких мотивов (Pearson, 2016).

В результате выполнения экспериментального раздела исследования установлено, что воздействие на клетки активаторами системы Keap1/Nrf2/ARE действительно приводит к дозозависимой индукции генов *Tfe3* и *Tfeb*, сопровождающейся увеличением количества лизосом и интенсивности аутофагосомно-лизосомного слияния.

Вероятно, индукция Keap1/Nrf2/ARE при повышении концентрации соединений положительно влияет на экспрессию генов *TFE3* и *TFEB*, тем самым способствуя нормализации количества лизосом в клетках и увеличению активности аутофагии.

При этом влияние TC-13 и tBHQ на лизосомный аппарат клеток может не зависеть от Nrf2 и быть опосредованным их непосредственным взаимодействием с митохондриальной мембраной. Так, известно, что TC-13 способен снижать митохондриальный потенциал и вызывать генерацию АКМ, что, вероятно, связано с влиянием на активность цепи переноса электронов (Мартинovich и др., 2015). То же характерно и для tBHQ (Li et al., 2014). Нарушение функционирования цепи переноса электронов негативно влияет на функцию и количество лизосом, при этом ведет к снижению соотношения $NAD^+/NADH$, к которому чувствителен транскрипционный фактор TFEB (его уменьшение активирует TFEB и стимулирует лизосомный биогенез) (Baixauli et al., 2015). Таким образом, эффект индукции экспрессии генов *TFE3* и *TFEB*, а также увеличения количества лизосом может быть опосредован одновременно несколькими факторами, и проблема требует более детального исследования.

Полученные результаты, с одной стороны, не демонстрируют непосредственного влияния индукторов Keap1/Nrf2/ARE на аутофагию. С другой стороны, они свидетельствуют о возможности влияния на этап слияния аутофагосом с лизосомами, критически важный для реализации всего процесса аутофагии в целом. Принимая во внимание обнаруженные эволюционно консервативные регуляторные элементы, характерные для транскрипционного контроля элементом ARE, можно сделать предположение о том, что белки, контролирующие ARE-зависимые гены (Nrf2, Nrf1, BACH1 и BACH2, а также белки-сателлиты и другие представители семейства NFE), способны влиять на лизосомный биогенез. Учитывая антагонистичный характер взаимоотношений Nrf2 и BACH1, можно предположить разнонаправленность такого влияния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для генов транскрипционных факторов TFEB и TFE3 характерно наличие в некодирующих участках большого количества ARE-подобных последовательностей. Воздействие на клетки J774 активаторами системы Keap1/Nrf2/ARE приводит к дозозависимой индукции генов *Tfe3* и *Tfeb*, сопровождающейся постепенным увеличением количества лизосом и интенсивности аутофагосомно-лизосомного слияния. Таким образом, можно сделать предположение о том, что белки, контролирующие ARE-зависимые гены, способны влиять на лизосомный биогенез.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Современные оптические системы” и “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Черенкевич С.Н.* 2015. Индуктор экспрессии ARE-регулируемых генов фенольный антиоксидант ТС-13 вызывает гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь. *Биофизика*. Т. 60. С. 120. (*Martinovich G.G., Martinovich I.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalinцева N.V., Cherenkevich S.N.* 2015. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway. *Biophysics*. V. 60. P. 94.) <https://doi.org/10.1134/S0006350915010194>
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Павлов В.С., Ромах Л.П., Храпова Н.В., Серых А.Е., Кандалинцева Н.В.* 2020. Влияние новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность Nrf2-подконтрольных ферментов, систему глутатиона и транслокацию Nrf2 в ядро. *Сибирский научный медицинский журнал*. Т. 40. № 6. С. 58. (*Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Pavlov V.S., Romakh L.P., Khrapova M.V., Serykh A.E., Gritsyk O.B., Kandalinцева N.V.* 2020. Effect of new water-soluble phenolic antioxidants on the activity of Nrf2-driven enzymes, glutathione system, and Nrf2 translocation into the nucleus. *Sibirskij nauchnyj meditsinskij zhurnal*. V. 40. № 6. P. 58.) <https://doi.org/10.15372/SSMJ20200606>
- Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б.* 2017. Лабиринты регуляции Nrf2. *Биохимия*. Т. 82. С. 757. (*Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kandalinцева N.V., Menshchikova E.B.* 2017. Mazes of Nrf2 regulation. *Biochemistry (Moscow)*. V. 82. P. 556.) <https://doi.org/10.1134/s0006297917050030>
- Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А.* 2007. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия. *Изв. АН. Серия химическая*. № 6. С. 1094. (*Oleynik A.S., Kuprina T.S., Pevneva N.Yu., Markov A.F., Kandalinцева N.V., Prosenko A.E., Grigorev I.A.* 2007. Synthesis and antioxidant properties of sodium S-[3-(hydroxyaryl)propyl] thiosulfates and [3-(hydroxyaryl)propane]-1-sulfonates. *Russian Chemical Bulletin*. V. 56. P. 1135.)
- Baixauli F., Acin-Perez R., Villarroya-Beltri C., Mazzeo C., Nunez-Andrade N., Gabande-Rodriguez E., Ledesma M.D., Blazquez A., Martin M.A., Falcon-Perez J.M., Redondo J.M., Enriquez J.A., Mittelbrunn M.* 2015. Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory T cell responses. *Cell Metab*. V. 22. P. 485. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.020>
- Egbujor M.C., Petrosino M., Zuhra K., Saso L.* 2022. The role of organosulfur compounds as Nrf2 activators and their antioxidant effects. *Antioxidants (Basel)*. V. 11. P. 1255. <https://doi.org/10.3390/antiox11071255>
- Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S., Abdellatif M., Abdoli A., Abel S., Abeliovich H., Abildgaard M.H., Abudu Y.P., Acevedo-Arozena A., Adamopoulos I.E., Adeli K., Adolph T.E., Adornetto A., Aflaki E. et al.* 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*. V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Li S., Li J., Shen C., Zhang X., Sun S., Cho M., Sun C., Song Z.* 2014. Tert-Butylhydroquinone (tBHQ) protects hepatocytes against lipotoxicity via inducing autophagy independently of Nrf2 activation. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1841. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.09.004>
- Mahapatra K.K., Mishra S.R., Behera B.P., Patil S., Gewirtz D.A., Bhutia S.K.* 2021. The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death. *Cell. Mol. Life Sci*. V. 78. P. 7435. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03988-3>
- Maniganda S., Sankar V., Nair J.B., Raghu K.G., Maiti K.K.* 2014. A lysosome-targeted drug delivery system based on sorbitol backbone towards efficient cancer therapy. *Org. Biomol. Chem*. V. 12. P. 6564–9. <https://doi.org/10.1039/c4ob01153h>
- Maurya S.S.* 2021. Role of enhancers in development and diseases. *Epigenomes*. V. 5. P. 21. <https://doi.org/10.3390/epigenomes5040021>
- Ngo V., Duennwald M.L.* 2022. Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease. *Antioxidants (Basel)*. V. 11. P. 2345. <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>
- Pearson R.G.* 2016. Reasons to conserve Nature. *Trends Ecol. Evol*. V. 31. P. 366. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.005>
- Qiu S., Liang Z., Wu Q., Wang M., Yang M., Chen C., Zheng H., Zhu Z., Li L., Yang G.* 2022. Hepatic lipid accumulation induced by a high-fat diet is regulated by Nrf2 through multiple pathways. *FASEB J*. V. 36. P. e22280. <https://doi.org/10.1096/fj.202101456R>
- Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A.* 2021. Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res*. V. 1868. P. 119041. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119041>
- Roopra A.* 2020. MAGIC: A tool for predicting transcription factors and cofactors driving gene sets using ENCODE data. *PLoS Comput. Biol*. V. 16. P. e1007800. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007800>
- Santana-Garcia W., Castro-Mondragon J.A., Padilla-Galvez M., Nguyen N.T.T., Elizondo-Salas A., Ksouri N., Gerbes F., Thieffry D., Vincens P., Contreras-Moreira B., Van Helden J., Thomas-Chollier M., Medina-Rivera A.* 2022. RSAT 2022: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*. V. 50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac312>

- Sardiello M., Palmieri M., Di Ronza A., Medina D.L., Valenza M., Gennarino V.A., Di Malta C., Donaudy F., Embrione V., Polishchuk R.S., Banfi S., Parenti G., Cattaneo E., Ballabio A. 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. V. 325. P. 473.
<https://doi.org/10.1126/science.1174447>
- Sharifi-Zarchi A., Gerovska D., Adachi K., Totonchi M., Pezeshk H., Taft R.J., Scholer H.R., Chitsaz H., Sadeghi M., Baharvand H., Arauzo-Bravo M.J. 2017. DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics*. V. 18. P. 964.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4353-7>
- Simov V., Altman M.D., Bianchi E., Delrizzo S., Dinunzio E.N., Feng G., Goldenblatt P., Ingenito R., Johnson S.A., Mansueto M.S., Mayhood T., Mortison J.D., Serebrov V., Sondy C., Sriraman V. et al. 2021. Discovery and characterization of novel peptide inhibitors of the NRF2/MAFG/DNA ternary complex for the treatment of cancer. *Eur. J. Med. Chem.* V. 224. P. 113686.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113686>
- Wang X., Tomso D.J., Chorley B.N., Cho H.Y., Cheung V.G., Kleeberger S.R., Bell D.A. 2007. Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum. Mol. Genet.* V. 16. P. 1188.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm066>
- Zhang W., Feng C., Jiang H. 2021. Novel target for treating Alzheimer's diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. *Ageing Res. Rev.* V. 65. P. 101207.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101207>
- Zhu L., He S., Huang L., Ren D., Nie T., Tao K., Xia L., Lu F., Mao Z., Yang Q. 2022. Chaperone-mediated autophagy degrades Keap1 and promotes Nrf2-mediated antioxidative response. *Aging Cell.* V. 21. P. e13616.
<https://doi.org/10.1111/acel.13616>

Regulatory Relationship between the Keap1/Nrf2/ARE Signaling System and Transcriptional Regulators of Lysosomal Biogenesis

A. V. Chechushkov^a and E. B. Menshchikova^{a, *}

^aFederal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia

*e-mail: lemen7383@mail.ru

Despite the key role of the Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system in cellular metabolism, little is known about its relationship to lysosome biogenesis. In this paper, a theoretical and experimental analysis of the possibility of such a link has been carried out. By forming a position frequency matrix in the transcription factor genes TFEB and TFE3, the presence of a large number of ARE-like sequences was found in the non-coding regions. In vitro exposure to J774 cells by Keap1/Nrf2/ARE activators (original synthetic monophenol TS-13 and *tert*-butylhydroquinone as comparison compound) results in dose-dependent induction of *Tfe3* and *Tfeb* genes, accompanied by a gradual increase in the lysosome number and autosomal-lysosomal fusion intensity. Thus, it can be assumed that the proteins controlling the ARE-dependent genes are able to influence lysosome biogenesis.

Keywords: Keap1/Nrf2/ARE signaling system, transcription factors TFEB and TFE3, lysosomes, autophagy