

Интеркалированные мотивы как рН-чувствительные регуляторы транскрипции протоонкогенов и генов нейропластичности

Научный руководитель – Варижук Анна Михайловна

Книжник Екатерина Константиновна

Студент (магистр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: knizhnik.ek@gmail.com

Интеркалированные мотивы (iM) – элементы вторичной структуры цитозин-богатых фрагментов ДНК [1]. Протонирование половины остатков цитозинов в слабокислой среде является условием формирования iM. Недавно было показано, что синтетические iM могут играть роль рН-сенсоров *in vitro* [2]. Мы предположили, что в клетке геномные iM также выполняют функцию рН-сенсоров, обеспечивая регуляцию транскрипции при изменении уровня кислотности среды.

Примером подобных изменений служит накопительный эффект от скачков рН при многократном возбуждении нейронов; он может являться стартовой точкой активации генов синаптогенеза и нейропластичности [3]. Изменения транскрипции в раковых клетках также отчасти обусловлены ацидозом, хотя механизм изучен слабо [3]. Целью нашей работы было прояснение механизма рН-зависимой регуляции транскрипции протоонкогенов и генов нейропластичности, а именно проверка роли в этих процессах iM из промоторных и 5'-нетранслируемых областей (UTR).

Отбор потенциально значимых iM из регуляторных участков генома проводился на основании их картирования в клетках HEK293 методом Cut&Tag [3] и вероятности iM-фолдинга по данным DNA Analyser. Отобранные iM были синтезированы в виде коротких олигонуклеотидов (ОДН) для проверки фолдинга *in tube*, а также встроены в плазмиду с репортерным геном – люциферазой Firefly (FLuc) для проверки влияния на транскрипцию.

Подтверждение iM-фолдинга *in tube* проводилось методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) в псевдофизиологическом буфере с ранжированием рН или с добавлением дестабилизатора iM SOP1812 [4].

Для оценки влияния iM на транскрипцию клетки HEK293 были трансфицированы референсной плазмидой, кодирующей люциферазу Renilla (Rluc), и целевой плазмидой, кодирующей Fluc с iM в промоторе/UTR, без iM или с мутантным iM. Соотношение Fluc:Rluc после 6-8 часов инкубации трансфицированных клеток в среде с рН 7.4/6.0 с/без SOP1812 оценивалось с помощью двойного люциферазного теста.

По данным биоинформатического анализа были отобраны потенциально значимые и устойчивые iM из промоторов/UTR протоонкогенов EGR1, JUN, PIM1, а также ассоциированного с синаптопластичностью гена RHEB1.

Анализ iM-ОДН EGR1, JUN, PIM1, RHEB1 методом КД-спектроскопии подтвердил их стабильность в слабокислой среде (рН 6) и дестабилизацию в присутствии SOP1812.

Двойной люциферазный тест показал, что в iM-вставка в промоторе или, в меньшей степени, в UTR модельной конструкции приводит к незначительному снижению экспрессии репортерного гена. В модели острого ацидоза (рН 6) данный эффект проявлялся более

отчетливо – предположительно, за счет стабилизации iM. В присутствии SOP1812, напротив, наблюдалось ослабление эффекта или его обращение – предположительно, за счет дестабилизации iM и стабилизации противолежащих им G-квадруплексных структур. Мутации в iM практически нивелировали эффект. В совокупности эти данные подтверждают роль iM как геномных pH-сенсоров и репрессоров транскрипции.

На примере четырех картированных в геноме iM с подтвержденной pH-чувствительностью было показано pH-зависимое подавление экспрессии репортерного гена в модельной конструкции. Результаты указывают на возможное участие iM в регуляции транскрипции при ацидозе.

Работа выполнена в рамках госзадания «Шаперон» (№ госрегистрации 124031200005-4)

Источники и литература

- 1 – Hala Abou Assi, Miguel Garavís, Carlos González, Masad J Damha, i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue 16, 19 September 2018, Pages 8038–8056, <https://doi.org/10.1093/nar/gky735>.
- 2 – Anton V. Turaev, Ekaterina A. Isaakova, Vjacheslav V. Severov, Alexandra N. Bogomazova, Timofei S. Zatsepin, Makar V. Sardushkin, Andrey V. Aralov, Maria A. Lagarkova, Galina E. Pozmogova, Anna M. Varizhuk, Genomic DNA i-motifs as fast sensors responsive to near-physiological pH microchanges, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 175, 2021, 112864, ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112864>.
- 3 – Zanin I, Ruggiero E, Nicoletto G, Lago S, Maurizio I, Gallina I, Richter SN. Genome-wide mapping of i-motifs reveals their association with transcription regulation in live human cells. *Nucleic Acids Res.* 2023 Sep 8;51(16):8309-8321. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad626>.
- 4 – Iachettini, S.; Biroccio, A.; Zizza, P. Therapeutic Use of G4-Ligands in Cancer: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Pharmaceuticals* 2024, 17, 771. <https://doi.org/10.3390/ph17060771>.