

УДК 577.218

IGFBP6 МОДУЛИРУЕТ ПРОТЕОСТАЗ, АКТИВИРУЯ МИШЕНИ ATF4 И СНИЖАЯ ЭКСПРЕССИЮ РЕТРОТРАНСЛОКОНА ЭПР

© 2024 г. О. Е. Колодеева, О. Е. Колодеева, И. Д. Антипенко,
А. А. Фаткулин, М. Р. Яхина, Ю. А. Макарова*

Представлено академиком РАН В. Г. Дебабовым

Поступило 27.07.2024 г.

После доработки 17.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Сниженная экспрессия белка IGFBP6 приводит к росту метастатического потенциала клеток рака молочной железы (РМЖ). В опухолевых клетках повышен уровень синтеза белка, что приводит к компенсаторной перенастройке протеостаза. Одним из инструментов изучения протеостаза служат белковые токсины семейства РИБ-П, необратимо инактивирующие рибосомы, в частности, вискумин. В данной работе исследовано воздействие нокдауна гена IGFBP6 на протеостаз клеток линии РМЖ MDA-MB-231. Обнаружено, что рибосомы клеток MDA-MB-231^{IGFBP6} с нокдауном IGFBP6 менее эффективно модифицируются токсином. По-видимому, это связано со снижением транспорта каталитической субъединицы вискумина из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в цитоплазму. В клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} снижена экспрессия субъединиц ретротранслокона HRD1/Derlin, входящего в состав ассоциированной с ЭПР системы деградации белков (ERAD). Кроме того, обнаружен рост экспрессии мишеней фактора транскрипции ATF4, который является компонентом пути ответа ЭПР на несвернутые белки (UPR).

Ключевые слова: вискумин, ЭПР, MDA-MB-231, IGFBP6, UPR, ERAD

DOI: 10.31857/S2686738924060126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭПР — эндоплазматический ретикулум; UPR — unfolded protein response; ERAD — ER-associated degradation; РИБ-П — рибосом-инактивирующие белки П типа; РМЖ — рак молочной железы; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени; ФТ — фактор транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Для поддержания протеостаза важное значение имеет эффективный ответ клетки на накопление несвернутых белков. Его осуществляет система ответа на несвернутые белки (unfolded protein response, UPR) и связанная с ней система деградации белков, ассоциированная с ЭПР (ERAD — ER-associated degradation). В мембране

ЭПР локализованы три сенсора UPR: PERK, ATF6 и IRE1 α . Каждый из них направляет регуляторные каскады, причем ERAD активируют только ATF6 и IRE1 α [1].

Одним из инструментов изучения UPR и ERAD служат цитотоксические белки семейства РИБ-П, одним из которых является рицин. Эти белки проникают в цитоплазму с поверхности клетки, с помощью ретроградного транспорта попадая сначала в ЭПР, а затем в цитоплазму. В ЭПР происходит восстановление дисульфидной связи между двумя субъединицами токсина, после чего одна из них (А-субъединица) с помощью системы ERAD транспортируется в цитоплазму [2, 3]. С использованием рицина получен ряд важных данных о функционировании ERAD, однако его высокая токсичность служит препятствием для более детальных исследований. Хорошей альтернативой может служить родственный, но менее токсичный белок вискумин (*Mistletoe lectin I, ML-I*), содержащийся в омеле белой (*Viscum album*) и способный ингибировать синтез белка в клетке [4]. В больших дозах это приводит к гибели, однако малые дозы могут оказывать

Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

*e-mail: jmakarova@hse.ru

терапевтическое воздействие, поэтому вискумин рассматривается как антиопухолевый препарат. Основным механизмом действия, как и у ризицина, заключается в гидролизе гликозидной связи A-4324 28S рРНК, что приводит к остановке синтеза белка [5].

Ранее было показано, что клетки линии рака молочной железы MDA-MB-231 с нокдауном IGFBP6 MDA-MB-231^{IGFBP6} имеют повышенный уровень пролиферации и более высокий метастатический потенциал по сравнению с контролем [6, 7]. IGFBP6 связывает факторы роста IGF1 и IGF2. Механизм его антионкогенного действия остается малоизученным. Известно, что в связи с активной пролиферацией раковые клетки, как правило, имеют высокий уровень синтеза белка и поэтому нуждаются в корректировке протеостаза. Часто это достигается за счет повышения интенсивности UPR.

В данной работе изучено воздействие вискумина на клетки линии рака молочной железы MDA-MB-231 с нокдауном гена IGFBP6. Показана более высокая устойчивость их рибосом к токсину, причиной которой может быть сниженная экспрессия компонентов ERAD. Обнаружена активация экспрессии мишеней фактора транскрипции (ФТ) ATF4, который является частью пути UPR PERK-eIF2 α -ATF4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Клетки MDA-MB-231 были трансфицированы лентивирусными векторами pLVX-shRNA1 (Clontech Laboratories, USA) с shРНК к гену IGFBP6 (линия MDA-MB-231^{IGFBP6}) и контрольной shРНК к гену люциферазы светлячка *Photinus pyralis* (линия MDA-MB-231^{luc}) [8]. Клетки MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} культивировали в культуральных флаконах 25см² (Corning, США) при 37°C с 5% CO₂ в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия) до конечной концентрации соответственно 100 ед/мл и 100 мкг/мл (ПанЭко, Россия), 10% FBS (HyClone, США) и 1% GlutaMAXTM (Gibco, США).

Оценка доли рибосом, модифицированных вискумином

Долю модифицированных рибосом определяли методом ПЦР-РВ. Использовали праймеры к 28S рРНК, соответствующие: 1) участку с немодифицированным нуклеотидом (RIP11_nmod), 2) участку с модифицированным нуклеотидом (RIP11_mod), 3) участку, отдаленному от депуринизированного сайта, для детекции всех

транскриптов 28S рРНК (RIP11_ctrl) (табл. 1). Vilo-ревертаза, доходя до депуринизированного сайта, встраивает в кДНК dATP, тогда как для интактного сайта – dTTP. На основе этой особенности детектировали модифицированные и немодифицированные участки 28S рРНК. Значения пороговых циклов ПЦР (Ct) для RIP11_ctrl использовали для нормировки значений, полученных для RIP11_mod и RIP11_nmod в каждом образце РНК.

Экстракция РНК

Клетки MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} лизировали с использованием QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Германия). Экстракцию РНК проводили с помощью набора miRNeasy Micro Kit (50) (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту препаратов РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Обратная транскрипция и количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США); в реакцию брали 200 нг РНК. Использовали амплификатор DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BioRad, США). Для проведения количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ) использовали набор 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Последовательности используемых праймеров приведены в табл. 1. Отбор праймеров проводили с использованием программного обеспечения Primer-BLAST. Возможность образования праймерами вторичных структур (шпильки), гомо- и гетеродимеров оценивали с помощью программного обеспечения OligoAnalyzer 3.1. Температура плавления праймеров составляет 64 \pm 2°C. Конечная концентрация праймеров – 5 μ M. В реакцию добавляли кДНК, разбавленную в 15 раз свободной от нуклеаз водой для измерения экспрессии целевых генов или разбавленную в 50 000 раз для оценки доли инактивированных рибосом. Амплификацию проводили с помощью амплификатора DTprime detecting amplifier (ДНК-Технология, Россия). Проводили 35 циклов кПЦР-РВ (94°C – 20 сек, 64°C – 10 сек, 72°C – 15 сек).

Биоинформационный анализ экспрессии мРНК и белков

Для анализа транскриптомов клеток MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} использованы исходные данные секвенирования, полученные нами ранее (GSE247735) [8]. Первичные прочтения были

Таблица 1. Последовательности и эффективности праймеров

Ген	Праймер	Эффективность	Длина ПЦР продукта, п.н
HERPUD1	f-5'-ACCCCAACAATAACTTACAGGAAGG r-5'-ATAAAGGAGGGGCTGGTCTGC	1.99 ± 0.07	109
HERPUD2	f-5'-GGTCATCAGCAGGCTCCCAA r-5'-CCATCATCCATAAGACGCTCCATTT	2.06 ± 0.07	101
SEL1L	f-5'-ACCAGCTTTGACCGCCATTG r-5'-GCAGCCTCTTCTTCAGTTTCACAA	2.07 ± 0.08	189
EDEM2	f-5'-TATCGGGCTGGTCGGCAA r-5'-CCAGTCATCGAAGCGGGTGT	1.89 ± 0.08	196
AUP1	f-5'-TCAGTCCCTACCCACAGCCT r-5'-CGTCTCTCTGTGAATCTCCTTCTTG	2.13 ± 0.12	168
SYVN1	f-5'-GAGGACCGTGTGGACTTTATGGA r-5'-GGATGCTGTGATAGGCGTGG	1.97 ± 0.09	130
DERL1	f-5'-CCACACCTCAGTTTTTGTACCGC r-5'-AGTTGTGTCTCCCGCTCC	1.99 ± 0.06	123
DERL2	f-5'-AGGCAGGCAGTTACAGGGTT r-5'-CTGTCAAGCAACACAGGGCT	2.15 ± 0.08	178
DERL3	f-5'-TTACACCGCAGCCTGTGTCC r-5'-CGGCAGTAGCGGAACACGA	1.93 ± 0.19	192
SEC61A1	f-5'-GTGGTCATCTATTTCCAGGGCTTC r-5'-TGCAGGATGATGGGGATGTTGG	2.17 ± 0.04	122
SEC61A2	f-5'-AAGGGTTACGGCTTGGGGTC r-5'-CCCTCAAACCTCAGTACCTCTGCC	1.93 ± 0.09	122
SEC61B	f-5'-CACCTCATCTCCAATATGCCTG r-5'-GCACTCCTTGTCACACAGC	2.02 ± 0.08	147
SEC61G	f-5'-AAGGACTCCATTGGGCTGGTT r-5'-CACCTCACATCTGTTACCAAT	2.05 ± 0.04	218
RIP1I_nmod	f-5'-TGCCATGGTAATCCTGCTCAGTA r-5'-TCTGAACCTGCGGTTCCCTCT	1.87 ± 0.15	45
RIP1I_mod	f-5'-TGCCATGGTAATCCTGCTCAGTA r-5'-TCTGAACCTGCGGTTCCACA	2.0 ± 0.2	45
RIP1I_ctrl	f-5'-GATGTCGGCTCTTCCTATCATTGT r-5'-CCAGCTCACGTTCCCTATTAGTG	2.05 ± 0.2	81

предобработаны с использованием fastp 0.23.2, после чего картированы на референсный геном человека (GRCh38) с помощью STAR 2.7.10b. Анализ дифференциальной экспрессии генов был проведен при помощи R пакета DESeq2. Поправка на множественную проверку гипотез была выполнена методом Бенджамини – Хохберга. При анализе рассматривались гены со скорректированным p-value (FDR) < 0.05. К исходной матрице независимо была применена нормализация median of ratios из R пакета DESeq2, полученные значения были нормированы на длины генов (т.п.н.), что сделало возможным сравнение уровня экспрессии как между образцами, так и между генами в пределах одного образца. Для анализа протеомов клеток MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} использовали нормированные log2 значения iBAQ [6].

Для анализа представленности активированных мишеней транскрипционных факторов в линии MDA-MB-231^{IGFBP6} использовали базу данных TRRUST v2 (<https://www.grnpedia.org/trrust>).

Рассматривали только активирующие взаимодействия между ФТ и мишенями. Чтобы проанализировать значимость количества активированных мишеней каждого ФТ, использовали односторонний точный тест Фишера (fisher_exact, библиотека SciPy 1.13.1). Мишень считали активированной, если наблюдалось изменение экспрессии в линии с нокдауном более чем в 1.5 раза (FDR < 0.05) по сравнению с контрольной. Считали, что обогащение активированными мишенями ФТ наблюдается, если значение FDR точного теста Фишера было менее 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нокдаун IGFBP6 снижает эффективность модификации рибосом вискумином

В клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} после обработки вискумином число поврежденных рибосом было ниже, чем в контрольных клетках MDA-MB-231^{luc},

Таблица 2. Доля модифицированных рибосом в клетках MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} при обработке клеток вискумином (100 нМ) в течение 6 ч, а также в течение 6 ч с последующей 24 ч инкубацией (три повтора)

Время инкубации, ч	MDA-MB-231 ^{luc} , %	MDA-MB-231 ^{IGFBP6} , %
0 (Контроль)	0 ± 0	0 ± 0
6	20.1 ± 2.8	16.8 ± 1.1
6 + 24	41.5 ± 5.8	25.2 ± 1

причем дополнительная инкубация в течение суток в среде без вискумина увеличивала эту разницу (табл. 2). Возможные причины могут состоять в менее эффективном транспорте в цитоплазму и/или более эффективной деградации вискумина клетками MDA-MB-231^{IGFBP6}.

Вискумин, как и другие токсины семейства РИБ-II, попадает из ЭПР в цитоплазму с помощью системы ERAD. Транспорт белков люмена ЭПР в цитоплазму осуществляется с помощью ретротранслокона, состоящего из Е3-убиквитинлигазы HRD1, одного из трех белков семейства дерлинов – DERL1-3, одного из белков HERPUD1 и HERPUD2, а также адапторного белка SEL1L [1]. Этот ретротранслокон вовлечен и в транспорт рицина [3]. В транспорте рицина участвует также транслокон ЭПР Sec61 [9], который тоже вовлечен в ERAD [10].

Нокдаун IGFBP6 изменяет экспрессию ряда генов, осуществляющих транспорт и деградацию субстратов ERAD

Анализ транскриптомов клеток MDA-MB-231^{luc} и MDA-MB-231^{IGFBP6} показал, что в клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} по сравнению с контролем снижена экспрессия компонентов ретротранслокона HERPUD1 и HERPUD2. Снижение экспрессии HERPUD1 показано также с помощью кПЦР-РВ, а тенденция к снижению экспрессии HERPUD2 обнаружена в протеомах (табл. 3). Оба белка необходимы для правильной организации и функционирования ретротранслокона [1]. Также снижена экспрессия SEL1L и, кроме того, резидентного лектина ЭПР EDEM2, который инициирует ERAD белков люмена, осуществляя первую стадию удаления углеводных остатков с растворимых субстратов

Таблица 3. Экспрессия компонентов ретротранслокона HRD1/Derlin, транслокона Sec61 и некоторых вспомогательных элементов, осуществляющих транспорт растворимых белков между люменом ЭПР и цитоплазмой. Приведены данные анализа транскриптомов и протеомов MDA-MB-231^{luc}/IGFBP6, а также данные ПЦР-РВ. Кратность изменения (fold change) дана в линейной шкале. “-” – кратность изменения менее 1.1. Nd – белок не обнаружен в протеоме. Для всех значений изменений экспрессии в транскриптоме FDR < 0.001. Жирным выделены названия генов, для экспрессии которых обнаружены согласованные значимые изменения по данным анализа транскриптомов и ПЦР-РВ, и относительная экспрессия которых в транскриптомах выше 1.0

Название гена	Транскриптом, относительная экспрессия		Кратность изменения	ПЦР		Протеом		Сниженная экспрессия защищает от рицина
	MDA-MB-231 ^{luc}	MDA-MB-231 ^{IGFBP6}		Кратность изменения	FDR	Кратность изменения	FDR	
Ретротранслокон <i>HRD1/Derlin</i> и ассоциированные белки								
<i>HERPUD1</i>	93.6	66.0	−1.4	−1.6	3e-3	Nd		+ [13]
<i>HERPUD2</i>	70.3	54.2	−1.3	−1.2	0.20	−2.0	0.59	+ [13]
<i>SEL1L</i>	134.1	1069	−1.3	1.2	0.19	−1.1	0.90	+ [13]
<i>HRD1 (SYVN1)</i>	125.6	125.4	−	−1.3	0.09	Nd		−
<i>DERL1</i>	79.3	72.5	−1.1	−1.1	0.59	−1.8	0.38	+ [13]
<i>DERL2</i>	71.7	67.7	−1.1	1.1	0.85	1.9	0.34	+ [13]
<i>DERL3</i>	0.7	0.4	−1.6	−5.5	9e-7	Nd		+ [13]
<i>EDEM2</i>	84.2	50.0	−1.7	−1.5	0.01	Nd		+ [3]
<i>AUP1</i>	317.0	621.6	2.0	1.5	0.01	2.4	0.02	−
Транслокон <i>Sec61</i>								
<i>SEC61A1</i>	391.2	402.7	−	−	0.86	1.3	0.25	−
<i>SEC61A2</i>	35.3	43.8	1.2	−2.2	3e-3	Nd		−
<i>SEC61B</i>	255.1	188.7	−1.4	−1.8	0.04	1.1	0.13	−
<i>SEC61G</i>	84.7	109.5	1.3	−	0.87	1.1	0.25	−

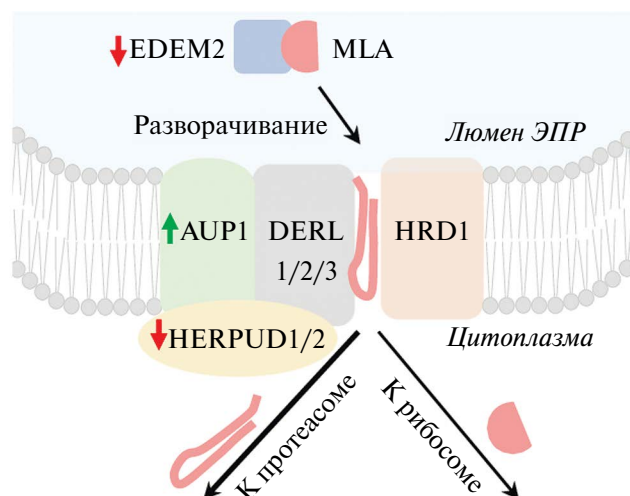


Рис. 1. Снижение экспрессии EDEM2 и компонента ретротранслокона HERPUD1/2 может уменьшать транспорт вискумина из ЭПР в цитоплазму, а рост экспрессии AUP1 — приводит к росту убиквитинирования и деградации вискумина. MLA — А-субъединица вискумина.

ERAD [11]. EDEM2 направляет растворимые субстраты ERAD, а также рибин [12], к транслокону. Описанные изменения могут способствовать снижению транспортировки субстратов ERAD, включая, вероятно, родственную рибину вискумин, из ЭПР в цитоплазму (рис. 1). Сниженная экспрессия DERL3, вероятно, не оказывает влияние на интенсивность транспорта, поскольку ген почти не экспрессируется в обеих линиях (табл. 3). Следует отметить, что для всех белков ретротранслокона HRD1/Derlin показано их участие в транспорте рибина при полногеномном скрининге с помощью shRNA [13] либо в отдельных экспериментах [3], табл. 3.

Помимо этого, и на основе анализа транскриптомов, и с помощью кПЦР-РВ обнаружено снижение экспрессии субъединицы SEC61B транслокона Sec61 (табл. 3). Снижение экспрессии SEC61B может вносить вклад в сниженную доступность рибосом MDA-MB-231^{IGFBP6} для вискумина.

В то же время, с помощью всех трех методов анализа обнаружен рост экспрессии гена *AUP1* (табл. 3), задействованного в убиквитинировании

транслоцированных в цитоплазму через транслокон HRD1/Derlin субстратов ERAD [1]. Это, вероятно, может способствовать более интенсивной деградации субстратов ERAD, включая вискумин, клетками MDA-MB-231^{IGFBP6} (Рис.1). Описанные изменения свидетельствуют об изменениях в системе ERAD и могут вносить вклад в меньшую доступность рибосом для вискумина в клетках MDA-MB-231^{IGFBP6}.

Нокдаун IGFBP6 активирует мишени ATF4 — ФТ, опосредующего UPR

Для всех ФТ проанализировали изменение экспрессии их генов-мишеней с помощью гипергеометрического теста. В табл. 4 представлены ФТ, активированные мишени которых в линии MDA-MB-231^{IGFBP6} значимо перепредставлены (экспрессия гена-мишени увеличивается более чем в 1.5 раза, FDR < 0.05). Наибольшую долю таких мишеней имеет ATF4 — ФТ, активируемый резидентным сенсором ЭПР PERK, который запускает UPR при стрессе ЭПР.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что нокдаун IGFBP6 усиливает пролиферацию, а также метастатический потенциал клеток MDA-MB-231 [6]. Раковые клетки в связи с усиленной пролиферацией имеют высокий уровень синтеза белка, что создает нагрузку на механизмы фолдинга. Поэтому во многих типах рака, включая РМЖ, происходит компенсаторная активация UPR, что позволяет перенастроить протеостаз под нужды раковой клетки [14, 15]. Активация ATF4 в клетках MDA-MB-231^{IGFBP6} может вносить вклад в такую активацию UPR.

Три других ФТ (табл. 4) — активаторы транскрипции, усиливающие клеточную пролиферацию. Их активация при сниженной экспрессии IGFBP6 может вносить вклад в усиление онкогенного фенотипа клеток MDA-MB-231^{IGFBP6}.

Кроме того, и Jun, и Мус вовлечены в комплексную регуляцию UPR. Jun активируется в ответ на UPR и, в свою очередь, активирует UPR, связываясь с промоторами участвующих в нем генов, в том числе с промотором ATF4 [16]. Мус также активирует гены UPR, связываясь, в частности, с промотором ATF4, а ATF4 стабилизирует Мус, препятствуя его протеасомной деградации [17]. Rela является субъединицей NFκB,

Таблица 4. ФТ с наиболее высокой долей активированных мишеней

ФТ	Отношение шансов	Число активированных мишеней/число всех мишеней	p-value	FDR
ATF4	6.10	8/21	3e-4	0.04
JUN	4.20	19/64	3e-6	1e-3
MYC	3.82	15/54	7e-5	0.01
RELA	2.43	31/158	4e-5	0.01

который активируется при UPR, в том числе через путь PERK-ATF4 [18].

Интересно, что несмотря на увеличение активности UPR, не обнаружен рост ERAD. Возможно, это связано с тем, что ERAD активируется не PERK-ATF4, а сенсорами IRE1 α и ATF6, экспрессия которых не изменилась.

Таким образом, в результате обработки вискумином в клетках РМЖ MDA-MB-231^{IGFBP6} инактивируется меньшее число рибосом по сравнению с контролем. Это может быть связано со сниженным транспортом токсина из ЭПР в цитоплазму, обусловленным снижением экспрессии элементов системы ERAD, а также с его более эффективной протеасомной деградацией. Рост экспрессии мишеней ФТ ATF4 свидетельствует об активации UPR. Изменения экспрессии компонентов ERAD и UPR свидетельствуют об изменении протеостаза в результате снижения экспрессии IGFBP6. Отрицательная корреляция активности UPR с уровнем экспрессии IGFBP6 может вносить вклад в антионкогенный эффект этого гена.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проводилось в рамках проекта “Создание экспериментальных научно-исследовательских лабораторий по естественно-научным направлениям” и программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Работа выполнена на клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231. В исследовании отсутствовало изучение человека и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christianson J.C., Jarosch E., Sommer T. Mechanisms of substrate processing during ER-associated protein degradation // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023. Т. 24. № 11. С. 777–796.
2. Agapov I.I. u др. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm // *FEBS Letters.* 1999. Т. 452. № 3. С. 211–214.
3. Sowa-Rogozńska N. u др. Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin // *Toxins.* 2019. Т. 11. № 6. С. 350.
4. Niwa H. u др. Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose // *European Journal of Biochemistry.* 2003. Т. 270. № 13. С. 2739–2749.
5. Tonevitsky A.G. u др. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain // *FEBS Letters.* 1996. Т. 392. № 2. С. 166–168.
6. Nikulin S. u др. Effect of the Expression of ELOVL5 and IGFBP6 Genes on the Metastatic Potential of Breast Cancer Cells // *Front. Genet.* 2021. Т. 12. С. 662843.
7. Samatov T.R. u др. Novel biomarkers in cancer: The whole is greater than the sum of its parts // *Seminars in Cancer Biology.* 2017. Т. 45. С. 50–57.
8. Shkurnikov M. u др. IGFBP6 regulates extracellular vesicles formation via cholesterol abundance in MDA-MB-231 cells // *Biochimie.* 2024.
9. Wesche J., Rapak A., Olsnes S. Dependence of Ricin Toxicity on Translocation of the Toxin A-chain from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol // *Journal of Biological Chemistry.* 1999. Т. 274. № 48. С. 34443–34449.
10. Schäfer A., Wolf D.H. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery // *EMBO J.* 2009. Т. 28. № 19. С. 2874–2884.
11. Ninagawa S. u др. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step // *Journal of Cell Biology.* 2014. Т. 206. № 3. С. 347–356.
12. Słomińska-Wojewódzka M. u др. The role of EDEM2 compared with EDEM1 in ricin transport from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *Biochemical Journal.* 2014. Т. 457. № 3. С. 485–496.
13. Bassik M.C. u др. A Systematic Mammalian Genetic Interaction Map Reveals Pathways Underlying Ricin Susceptibility // *Cell.* 2013. Т. 152. № 4. С. 909–922.
14. Galatenko V.V. u др. Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression // *Sci Rep.* 2015. Т. 5. № 1. С. 14967.
15. Patra A., Adhikary A., Ghosh S. The unfolded protein response (UPR) pathway: the unsung hero in breast cancer management // *Apoptosis.* 2023. Т. 28. № 3–4. С. 263–276.
16. Zhou C. u др. JUN is a key transcriptional regulator of the unfolded protein response in acute myeloid leukemia // *Leukemia.* 2017. Т. 31. № 5. С. 1196–1205.
17. Zhang T. u др. MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? // *EMBO Mol Med.* 2020. Т. 12. № 5. С. e11845.
18. Tam A.B. u др. ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK // *PLoS ONE.* 2012. Т. 7. № 10. С. e45078.

IGFBP6 MODULATES PROTEOSTASIS BY ACTIVATING ATF4 TARGETS AND REDUCING ER RETROTRANSLOCON EXPRESSION

**O. E. Kolodeeva, O. E. Kolodeeva, I. D. Antipenko, A. A. Fatkulin,
M. R. Yakhina, J. A. Makarova***

Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation

**e-mail: jmakarova@hse.ru*

Presented by Academician of the RAS V.G. Debabov

Reduced expression of the IGFBP6 protein leads to an increase in the metastatic potential of breast cancer (BC) cells. The level of protein synthesis in tumour cells is increased, leading to a compensatory adjustment of proteostasis. One of the tools used to study proteostasis is protein toxins of the RIP-II family, which irreversibly inactivate ribosomes (particularly, viscumin). We investigated the effect of IGFBP6 gene knockdown on the proteostasis in the BC cell line MDA-MB-231. Ribosomes from MDA-MB-231^{IGFBP6} cells are less efficiently modified by the toxin. This is probably due to the reduced transport of the viscumin catalytic subunit from the ER to the cytoplasm. MDA-MB-231^{IGFBP6} cells showed reduced expression of the retrotranslocon HRD1/Derlin subunit, which is a component of the ER-associated protein degradation system (ERAD). For ATF4 transcription factor, which is a part of the ER unfolded protein response pathway (UPR), an increased expression of its targets was found.

Keywords: viscumin, ER, MDA-MB-231, IGFBP6, UPR, ERAD