

АКТИВНОСТЬ LINE-1 И СОДЕРЖАНИЕ АТФ В КУЛЬТУРАХ НЕКОТОРЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2025 г. Е.В. Канов*, О.М. Семёнов**, Ю.А. Гненная**,
Д.Н. Разгуляева***, В.В. Гурский****, ****, #

*Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

**Институт цитологии РАН, Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия

***Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Политехническая ул., 29, Санкт-Петербург, 195251, Россия

****Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе,
Политехническая ул., 26, Санкт-Петербург, 194021, Россия

#E-mail: gursky@math.ioffe.ru

Поступила в редакцию 07.12.2024 г.

После доработки 07.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Деметилирование ДНК делает доступной для транскрипции ранее закрытые участки генома и тем самым вызывает повышенную активность мобильных генетических элементов (транспозонов) в геноме. Изучение влияния аномальной активности транспозонов на энергетику клетки привлекает внимание в силу потенциальной возможности использовать это влияние для создания дефицита энергии с последующим запуском программ клеточной смерти, что может быть актуальным для создания антираковых стратегий. В работе представлены результаты экспериментальных измерений количества АТФ в клетках линии HEK-293, полученной из эмбриональных почечек человека, и линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 в нормальных условиях и в условиях деметилирования. Для линии HEK-293 проведена трансфекция плазмидой, содержащей генетический конструкт LINE-1-EGFP, и показана активная встройка транспозона LINE-1 в трансфицированных клетках. Экспрессия транспозонов в трансфицированных и «деметилированных» клетках MCF-7 показана с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Результаты измерения количества АТФ демонстрируют рост энергетических запасов в клетках как при деметилировании, так и при трансфекции LINE-1-EGFP. Выявленный эффект позволяет предположить, что энергетическая нагрузка, ожидаемая от активизации транспозонов, перекрывается высвобождением энергии от других клеточных процессов, проявляющихся при деметилировании ДНК и трансфекции.

Ключевые слова: мобильные элементы, транспозоны, LINE-1, HEK-293, MCF-7, АТФ.

DOI: 10.31857/S0006302925020116, EDN: KZAPII

Мобильные элементы (транспозоны) представляют собой повторяющиеся участки генома, обладающие способностью интегрироваться в новые места в геноме. В геноме человека наиболее распространены и являются активными на сегодняшний день ретротранспозоны LINE-1 и SINE, занимающие соответственно 17–20% и 11% генома [1, 2]. Транспозоны вовлечены в регуляцию экспрессии генов, участвующих во многих клеточных процессах, и считаются ответственными за разнообразие генома и адаптивную эволюцию [3]. В нормальных условиях негативные эффекты, связанные с активностью транспозонов, минимизируются механизмами сайленсинга, такими как метилирование ДНК [4]. В раковых

клетках мобильные элементы значительно активизируются, что связано с различными механизмами дерегуляции [5].

В недавней работе был предложен подход к созданию стратегии противораковой терапии, в котором активность ретротранспозонов в раковых клетках может быть инструментом влияния на энергетический баланс в клетке [6]. При достаточно высокой скорости встройки новых мобильных элементов в геном активные транспозоны могут конкурировать с основными клеточными процессами за внутриклеточную энергию, выраженную, например, в количестве доступных молекул АТФ. Заметное истощение АТФ внутри

раковых клеток может привести к запуску программ клеточной смерти [7–9], тем самым замедляя дальнейший рост злокачественной опухоли. В рамках такого подхода представляется важным получение новых экспериментальных данных об активности транспозонов в клетках человека совместно с оценкой энергетических запасов в клетке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трансфекция клеток НЕК-293 плазмидой pCER4-LINE1 (Addgene, США) проводилась с помощью липофектамина 3000 (ThermoFisher Scientific, США) на 24-луночном культуральном планшете (Nunc) в соответствии с инструкцией производителя. Спустя 48 ч после трансфекции целевым вектором клетки были пересажены на чашки Петри диаметром 60 мм (Jet Biofil, Китай). Селекцию клеток осуществляли на пуромицине (1 мкг/мл) в присутствии 0.5 мкмоль азациитидина (StemCells Technologies, Канада) в течение 5 суток, после чего была осуществлена смена среды на обычную культуральную. Клетки были пересажены на 2 чашки Петри диаметром 100 мм и после достижения конфлюэнтности 80–90% была проведена проточная флуоресцентная сортировка клеток на сортере S3e Cell Sorter (BioRad, США) по сигналу EGFP в зеленом канале. Полученные линии (НЕК-293-LINE-EGFP) были заморожены и сохранялись в криобанке.

При оценке влияния 5-азациитидина на выраженность свечения EGFP последний добавляли до 1 мкмоль в культуральную среду на 120, 96, 72, 48 и 24 ч. По истечении указанных сроков инкубации проводили проточную флуориметрию клеток (в трех технических повторах). В качестве контроля использовали клетки линии НЕК-293-LINE-EGFP без воздействия азациитидина и клетки НЕК-293, не подвергавшиеся трансфекции.

Трансфекцию клеток MCF-7 плазмидой pCER4-LINE1 проводили с помощью липофектамина 2000 в соответствии с инструкцией производителя в культуральных флаконах T-25 (Kirgen Inc., Китай). По окончании инкубации с трансфецирующей смесью среду во флаконах заменяли на обычную среду культивирования, содержащую 0.5 мкмоль 5-азациитидина. Контролем служили ложно-трансфецированные клетки, также культивируемые в присутствии 5-азациитидина. В качестве положительного контроля цитостатического эффекта использовали интактные клетки MCF-7, культивируемые 48 ч в присутствии 1.2 мкмоль доксорубина гидрохлорида (АО «Верофарм», Россия). Через 24 и 48 ч после трансфекции клетки снимали с поверхности культуральной посуды, подсчитывали и использовали: а) для количественного определения АТФ; б) для оценки флуоресценции EGFP в клет-

ках на визуализаторе Zoe (BioRad, США); в) для экстракции РНК с последующей обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени.

Количественное определение общего содержания АТФ осуществляли с помощью набора реагентов CellTiter Glo (Promega Corp., США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Калибровку проводили с использованием аденозин-трифосфата натрия (ООО «Эллара», Россия). Результаты выражали в мкмоль АТФ на 500 тыс. клеток для MCF7 и на 40 тыс. клеток для НЕК-293 соответственно.

Клеточную РНК экстрагировали и очищали с помощью набора реагентов RNAsolo (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Обратную транскрипцию проводили посредством готовых смесей и обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (ЗАО «Евроген», Россия). ПЦР в реальном времени проводили с использованием готовой смеси qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), содержащей интеркалирующий флуоресцентный краситель SYBR Green, и праймеров для LINE1F1и LINE1F2 (ЗАО «Евроген», Россия). Результаты выражали как $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе измерена активность LINE-1 в клетках НЕК-293, использованных в качестве модельного объекта (иммortalизованная, но не опухолеродная линия) путем трансфекции с помощью плазмиды, содержащей генный конструкт LINE-1-EGFP, с последующим измерением экспрессии EGFP в трансфицированных клетках с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессия EGFP свидетельствует о прохождении транспозиции и возможной встройке LINE-1 в геном трансфицированной клетки. В связи с низкой эффективностью трансфекции была проведена процедура селекции трансфицированных клеток НЕК-293 на пуромицине с последующей проточной сортировкой по сигналу EGFP в зеленом канале. Высокий уровень экспрессии EGFP сохранялся в стабильно трансфецированных клетках (рис. 1).

Для проверки влияния деметилирования на активность LINE-1 стабильно трансфицированные клетки НЕК-293 обрабатывались известным индуктором деметилирования ДНК 5-азациитидином, и затем вновь проводилась проточная цитофлуориметрия по сигналу EGFP. После 24 ч воздействия азациитидином сигнал в обработанных 5-азациитидином клетках повысился, и доля флуоресцирующих клеток увеличилась (рис. 2). Этот результат подтверждает, что изменение метилирования действительно облегчает транспозицию в НЕК-293.

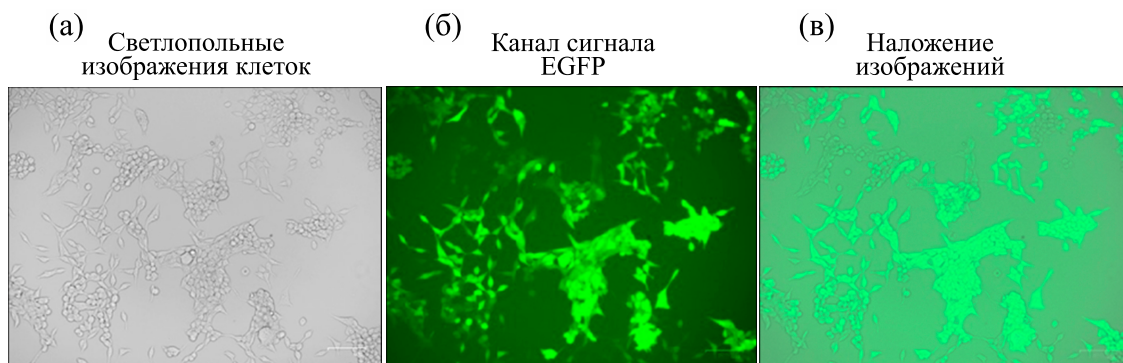


Рис. 1. Результаты трансфекции HEK-293 (48 ч после трансфекции) с помощью плазмиды, кодирующей LINE-1-EGFP. Показаны светлопольные изображения клеток (а), канал сигнала EGFP (б) и наложение одного изображения на другое (в).

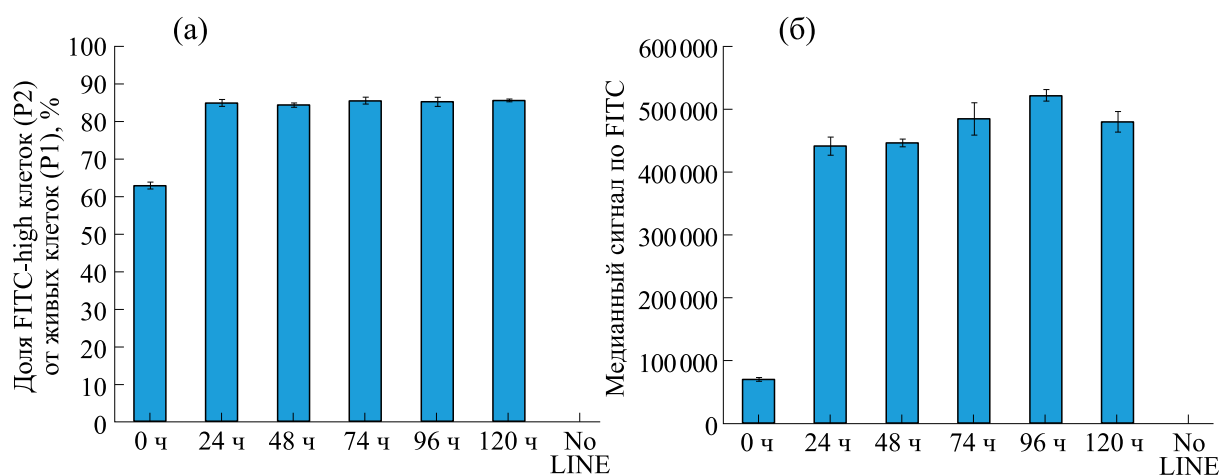


Рис. 2. Увеличение сигнала EGFP при обработке 5-азациитидином в трансфицированных клетках HEK-293 по сравнению с трансфицированными клетками HEK-293 без обработки (точка 0 ч) и с интактными клетками HEK-293 (точка “No LINE”).

Для оценки влияния активности транспозонов на энергетику клеток HEK-293 было измерено количество АТФ в интактных и трансфицированных клетках, а также до и после обработки 5-азациитидином (рис. 3). Результаты показали, что обработка 5-азациитидином ведет к росту количества АТФ, причем как в интактных, так и в трансфицированных клетках. При этом трансфицированные клетки HEK-293 устойчиво демонстрируют более высокий уровень АТФ по сравнению с интактными для идентичных условий и времен измерения.

Похожий эффект наблюдался в измерениях с клетками линии злокачественной аденокарциномы молочной железы MCF-7. Уровень АТФ в клетках данной линии после обработки 5-азациитидином немного превысил количество АТФ в клетках без обработки (рис. 4). В предположении, что повышение числа молекул АТФ может быть связано с возможным цитостатическим эффек-

том на популяцию со стороны 5-азациитидина, дополнительно был измерен уровень энергии в клетках после обработки мощным и широко используемым цитостатиком доксорубицином. В клетках, обработанных этим цитостатиком, содержание АТФ значительно превышало таковое в интактных клетках (рис. 4).

Трансфекция плазмидой, кодирующей LINE-1 и EGFP, оказалась неэффективной для линии MCF-7 и не привела к значительной флуоресценции в популяции, что говорит об отсутствии встройки в геном LINE-1 из конструкта. Аналогичные эксперименты по трансфекции на других раковых линиях (Hs578T и A549) также дали отрицательный результат. При этом высокая экспрессия транспозонов, измеренная с помощью обратнo-транскриптазной ПЦР в реальном времени в трансфицированных клетках MCF-7, обработанных 5-азациитидином, показывает повышенную активность транспозонов по сравнению с

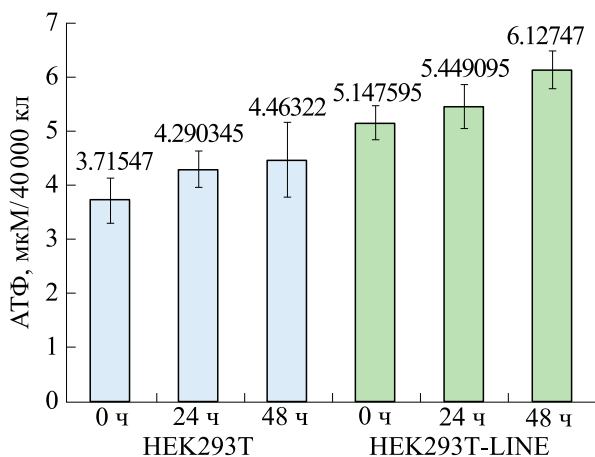


Рис. 3. Количество АТФ в интактных (HEK293T) и трансфицированных (HEK293T-LINE) клетках HEK-293 до обработки 5-азациитидином (0 ч) и после обработки (24 ч и 48 ч).

интактными клетками, обработанными 5-азациитидином (табл. 1). Этот результат согласуется с влиянием трансфекции LINE-1 на энергетику HEK-293 (рис. 3), несмотря на отсутствие значимого флуоресцентного сигнала в эксперименте с MCF-7.

Полученные данные предоставляют новую информацию о связи энергетики клетки с деметилированием генома и активностью транспозонов. Можно предположить, что рост содержания АТФ при обработке азациитидином определяется тем, что азациитидин проявляет некоторое цитостатическое действие. Это подтверждается тем, что скорость роста популяции MCF-7 снижалась при обработке азациитидином. Замедленный рост может ассоциироваться с более медленными клеточными процессами и, как следствие, сниженным потреблением энергии. Еще более выраженный рост энергии при обработке доксорубицином, являющимся мощным цитостатиком,

Таблица 1. Данные ПЦР в реальном времени по экспрессии транспозонов в трансфицированных LINE-1 клетках MCF-7, обработанных 5-азациитидином

Ген	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
	24 часа	48 часов
LINE1F1	18.30 ± 0.14	11.65 ± 0.080
LINE1F2	337.68 ± 13.27	258.44 ± 3.14

Примечание. Приведены данные экспрессии относительно интактных клеток, обработанных 5-азациитидином, нормализованные к экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH, кодирующего глицеральдегид3-фосфат дегидрогеназу.

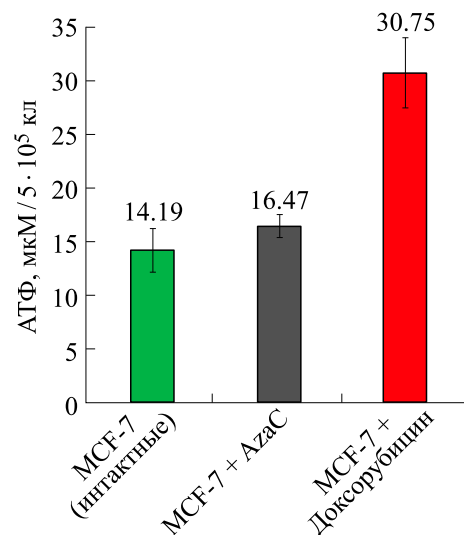


Рис. 4. Количество АТФ в интактных клетках MCF-7, а также после обработки 5-азациитидином (AzaC) и после обработки доксорубицином.

подтверждает эту гипотезу. С другой стороны, такой рост противоречит полученным ранее результатам обработки доксорубицином клеток нескольких линий рака молочной железы, включая MCF-7, в которых содержание АТФ наоборот падало после обработки [10]. Уменьшение содержания АТФ под действием доксорубицина в работе [10] может, по нашему мнению, объясняться использованием авторами гораздо больших доз препарата, приводящих к гибели клеток, а не просто торможению пролиферации, что в итоге выражается в падении количества АТФ.

Активизация транспозонов в результате деметилизации ДНК должна приводить к дополнительным энергетическим расходам, связанным с этой активностью [6]. Однако рост количества АТФ в трансфицированных клетках по сравнению с интактными позволяет сделать предположение о непрямом влиянии активизировавшихся транспозонов на энергетику, в результате которого проявляется обратный эффект сохранения энергетических ресурсов. Полученные результаты позволяют предположить, что достичь энергетического истощения в раковых клетках нельзя просто за счет увеличения числа активных транспозонов, и требуются дополнительные модификации транспозон-ассоциированных параметров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00153, <https://rscf.ru/project/23-24-00153/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cordaux R. and Batzer M. A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev. Genet.*, **10**, 691–703 (2009). DOI: 10.1038/nrg2640
2. Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860–921 (2001). DOI: 10.1038/35057062
3. Schrader L. and Schmitz J. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol. Ecol.*, **28**, 1537–1549 (2019). DOI: 10.1111/mec.14794
4. Yu C.-W., Tai R., Wang S.-C., Yang P., Luo M., Yang S., Cheng K., Wang W.-C., Cheng Y.-S., and Wu K. HISTONE DEACETYLASE6 acts in concert with histone methyltransferases SUVH4, SUVH5, and SUVH6 to regulate transposon silencing. *Plant Cell*, **29**, 1970–1983 (2017). DOI: 10.1105/tpc.16.00570
5. Pradhan R. K. and Ramakrishna W. Transposons: unexpected players in cancer. *Gene*, **808**, 145975 (2022). DOI: 10.1016/j.gene.2021.145975
6. Павлов С. Р., Гурский В. В., Самсонова М. Г., Канапин А. А. и Самсонова А. А. Управление активностью мобильных элементов в раковых клетках как стратегия для противораковой терапии. *Биофизика*, **69** (6), 1231–1234 (2025). DOI: 10.31857/S0006302924050102.
7. Eguchi Y., Shimizu S., and Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, **57**, 1835–1840 (1997).
8. Lieberthal W., Menza S. A., and Levine J. S. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. – Renal Physiol.*, **274**, F315–F327 (1998). DOI: 10.1152/ajprenal.1998.274.2.f315
9. Skulachev V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, **11**, 473–485 (2006). DOI: 10.1007/s10495-006-5881-9
10. Wigner P., Zielinski K., Labieniec-Watala M., Marczak A., and Szwed M. Doxorubicin–transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells. *Sci. Reports*, **11**, 4544 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-84146-4
11. Livak K. J. and Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, **25** (4), 402–408 (2001). DOI: 10.1006/meth.2001.1262

Measuring LINE-1 Activity and ATP Amount in Human Cell Cultures

E.V. Kanov*, O.M. Semenov, Yu.A. Gnennaya**,
D.N. Razgulyaeva***, and V.V. Gursky****, ******

*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7–9, St. Petersburg, 199034 Russia

**Institute of Cytology, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

***Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg, 195251 Russia

****Ioffe Institute, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia

DNA demethylation makes closed regions of the genome available for transcription and thus causes increased activity of mobile genetic elements (transposons) in the genome. The study of the influence of abnormal activity of transposons on cell energy attracts attention due to the potential possibility of using this effect to create an energy deficit with subsequent launch of cell death programs, which may be relevant for the development of anti-cancer strategies. The paper presents the results of experimental measurements of the ATP amount in HEK-293 cells obtained from human embryonic kidneys and the MCF-7 breast cancer cell line under normal and demethylation conditions. The HEK-293 line was transfected with a plasmid containing the LINE-1-EGFP genetic construct, and active insertion of the LINE-1 transposon in the transfected cells was shown. Transposon expression in demethylated MCF-7 cells was shown using real-time PCR. The results of ATP measurements demonstrate an increase in energy stores in cells upon both demethylation and transfection with LINE-1-EGFP. The observed effect suggests that the energy load expected from transposon activation is overwhelmed by the energy release from other cellular processes that occur during demethylation and transfection.

Keywords: *transposons, LINE-1, HEK-293, MCF-7, ATP*