ИНГИБИТОР ДЕМЕТИЛАЗ СЕМЕЙСТВА KDM5 — KDOAM-25 — СНИЖАЕТ ПРОНИКНОВЕНИЕ ПСЕВДОТИПИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ SARS-CoV-2 В КЛЕТКИ

Е.Н.Князев[1,2], Р.С.Калинин[1], В.А.Абрикосова[1], Ю.А.Мокрушина[1], С.А.Тоневицкая[2]

[1]ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, РФ;
[2]Факультет биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ, Москва, РФ

Изучено влияние ингибиторов деметилаз семейства KDM5 (JIB-04, PBIT и KDOAM-25) на проникновение псевдотипированных вирусных частиц SARS-CoV-2 в дифференцированные клетки Caco-2 и клетки HEK293T с гиперэкспрессией *ACE2*. Указанные препараты не были цитотоксичными. Только KDOAM-25 значимо снижал проникновение вирусных частиц в клетки. При этом уровень экспрессии мРНК *ACE2* в Caco-2 значимо повышался, а экспрессия *TMPRSS2* значимо не изменялась. KDOAM-25 в дифференцированных клетках Caco-2 не влиял на экспрессию генов *BRCA1*, *CDH1*, *TP53*, *SNAI1*, *VIM* и *UGCG*, для которых ранее была показана связь с нокдауном или гиперэкспрессией деметилаз KDM5 или действием ингибиторов деметилаз, однако в недифференцированных клетках Caco-2 под действием KDOAM-25 значимо повышалась экспрессия *BRCA1*, *SNAI1*, *VIM* и *CDH1*.

Ключевые слова: *деметилаза; KDM5; COVID-19; SARS-CoV-2; коронавирус*

Одной из стратегий борьбы с коронавирусом SARS-CoV-2, вызывающим COVID-19, является предотвращение связывания вируса с клеточной мембраной и проникновения внутрь клетки, что может быть достигнуто за счёт выработки собственных антител, использования искусственных антител или применения препаратов, влияющих на различные этапы жизненного цикла вируса. Поиск потенциальных препаратов для борьбы с SARS-CoV-2 остаётся актуальным, поскольку появление новых штаммов вируса снижает эффективность вакцин и антител [1]. Одним из подходов при поиске потенциальной терапии является подбор молекул, направленных против ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), являющегося рецептором для входа SARS-CoV-2 в клетки, или клеточных протеаз, участвующих в разрезании спайкового белка (S-белка) SARS-CoV-2, например, трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 [2]. Вместе с тем было обнаружено, что SARS-CoV-2 может использовать иные молекулы для прикрепления к мембране и входа в клетки, например нейропилин 1 (NRP1), базигин (BSG/CD147) и дипептидилпептидазу 4 (DPP4) [3,4].

Ранее было показано, что лизинспецифичная деметилаза 5B (KDM5B, JARID1B или PLU1) может снижать экспрессию микроРНК семейств hsa-let-7e/hsa-miR-125a и hsa-miR-141/hsa-miR-200 за счёт удаления метильных меток H3K4me3 с гистонов H3 в области регуляторных регионов данных микроРНК. Поскольку мишенями этих микроРНК являются гены *ACE2* и *TMPRSS2*, было высказано предположение, что ингибиторы деметилазы KDM5B могут приводить к снижению экспрессии этих генов и препятствовать входу SARS-CoV-2 в клетки [5]. Одним из наиболее специфичных ингибиторов KDM5B, известных на данный момент, является KDOAM-25, который продемонстрировал низкую цитотоксичность и высокую стабильность и специфичность в отношении деметилаз семейства KDM5 с наибольшей специфичностью к деметилазе KDM5B: концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) 19 нМ в отношении деметилазы KDM5B *in vitro* и 50 мкМ в клеточной системе. При этом препарат не ингибировал другие деметилазы семейства JmjC [6]. Более высокое значение IC_{50} в клеточной системе по сравнению с условиями *in vitro* может объясняться частичной

Адрес для корреспонденции: eknyazev@hse.ru. Князев Е.Н.
DOI 10.47056/1814-3490-2023-1-40-46

конкуренцией с кофактором α-кетоглутаратом и относительно низкой проницаемостью клеточной мембраны для препарата, что было подтверждено на клетках Caco-2 [6]. Другие известные ингибиторы деметилазы KDM5B, в отличие от KDOAM-25, имеют меньшую специфичность. Так, IC_{50} ингибитора PBIT в отношении KDM5B составляла около 3 мкМ *in vitro* [7], в отношении аспартат/аспарагин-β-гидроксилазы — 0.14 мкМ *in vitro* [8] и триптофангидроксилазы 1 — 0.096 мкМ *in vitro* и 0.528 мкМ в клеточной системе [9], что ставит вопрос о его специфичности в отношении деметилаз семейства KDM5. Ещё одним потенциальным ингибитором деметилаз KDM5 является JIB-04 — пан-ингибитор гистоновых деметилаз семейства Jumonji. JIB-04 продемонстрировал IC_{50} около 5 мкМ *in vitro* в отношении фрагмента KDM5B [7], однако также ингибировал деметилазы семейств KDM4 и KDM6 [10].

Для изучения живых вирусов SARS-CoV-2 требуются лаборатории с 3-м уровнем биобезопасности, поэтому многие исследования проводятся на псевдотипированных вирусных частицах. Для исследования SARS-CoV-2 могут использоваться системы упаковки на основе лентивирусов, вируса мышиной лейкемии, вируса везикулярного стоматита и других вирусов, в которые включается S-белок SARS-CoV-2 и плазмиды, позволяющие детектировать заражение клеток псевдотипированными частицами, например, по активности гена люциферазы или флюоресцентных белков [11]. Для изучения вирионов дикого типа и псевдотипированных вирусов могут использоваться различные клеточные системы, включая иммортализованные клеточные линии (Caco-2, Vero E6, Huh-7, A549 и др.) и первичные клетки с экспрессией *ACE2*, а также клеточные линии с искусственной гиперэкспрессией *ACE2* [12].

Целью данной работы являлось изучение влияния ингибиторов деметилаз семейства KDM5 на проникновение псевдотипированных вирусных частиц SARS-CoV-2 в клетки Caco-2 и модифицированные клетки HEK293T с гиперэкспрессией *ACE2*. Для оценки влияния ингибиторов деметилаз мы выбрали две клеточные линии с принципиально разной регуляцией активности гена *ACE2*: Caco-2, в которой *ACE2* находится под регуляцией естественных клеточных механизмов, и HEK293T, которая трансфицирована *ACE2*, находящимся под контролем промотора цитомегаловируса.

Методика исследования

Псевдотипированные вирусные частицы SARS-CoV-2 были получены на основе лентивируса ВИЧ-1. Клетки HEK293T трансфицировали плазмидой, несущей ген S-белка SARS-CoV-2 под управлением CAG-промотора, плазмидой, несущей ген *gag-pol* ВИЧ-1, и плазмидой, кодирующей рекомбинантный РНК-геном с геном люциферазы светлячка в составе.

Клетки Caco-2 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде Gibco MEM с 20% Gibco FBS OneShot, 1% Gibco GlutaMAX Supplement, 1% Gibco PenStrep (100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) (все компоненты — Thermo Fisher Scientific). Для получения монослоя дифференцированных клеток Caco-2 культивирование продолжали после достижения конфлюэнтного монослоя в течение 21 сут. Контроль дифференцировки осуществляли с помощью импедансной спектроскопии клеток Caco-2 на культуральных вставках Transwell (Corning) [13].

Клетки HEK293T трансфицировали генетической конструкцией на основе лентивирусной плазмиды pCDH-CMV-MCS, содержащей последовательность кДНК гена *ACE2*, под управлением промотора цитомегаловируса (HEK293T-ACE2). Клетки культивировали в среде Gibco DMEM с высоким содержанием глюкозы (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10% Gibco FBS OneShot, 1% Gibco GlutaMAX Supplement, 1% Gibco PenStrep (100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) (все компоненты — Thermo Fisher Scientific).

Клетки HEK293T-ACE2 и дифференцированные клетки Caco-2 высевали в 96-луночные планшеты и добавляли 25 или 50 мкМ KDOAM-25, 5 или 10 мкМ PBIT, 2 или 0.6 мкМ JIB-04 или контрольную среду с 0.1% ДМСО. Через 72 ч культуральную среду меняли на новую порцию с вирусными частицами и инкубировали ещё 72 ч. После этого клетки лизировали по протоколу Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent (Promega) и переносили 20 мкл лизата в белые 96-луночные планшеты, добавляли 100 мкл реагента с люциферином и производили считывание люминесценции. Состав реагента с люциферином: 100 мМ трис, 60 мМ $MgSO_4$, 5 мМ DTT, 4 мМ ЭДТА, 4 мМ АТФ, 0.6 мМ люциферина, 0.1 мМ $Na_4P_2O_7$, 10 об.% глицерола и деионизированная вода до конечного объёма.

Цитотоксичность препаратов оценивали в 96-луночных планшетах с помощью MTT Assay Kit (Abcam) через 24 и 72 ч после инкубации с ингибиторами деметилазы.

Для проведения ПЦР клетки HEK293T-ACE2, дифференцированные и недифференцированные клетки Caco-2 инкубировали в течение 72 ч в

6-луночных планшетах с 50 мкМ KDOAM-25 или в контрольных условиях с 0.1% ДМСО и лизировали в 700 мкл QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN). РНК из лизатов выделяли с помощью набора реагентов miRNeasy Mini Kit по протоколу производителя (QIAGEN) со стадией обработки ДНКазой на колонках и элюцией в 30 мкл воды. Концентрацию тотальной РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000, качество РНК оценивали с помощью набора реагентов RNA StdSens Analysis Kit на приборе Experion (Bio-Rad) [14].

Проводили обратную транскрипцию с 750 нг тотальной РНК в объёме 20 мкл с помощью набора реагентов MMLV RT kit ("Евроген") по протоколу производителя. ПЦР проводили в 384-луночных планшетах в объёме 12.5 мкл с помощью набора реагентов qPCRmix-HS SYBR ("Евроген") по протоколу производителя. В качестве референсного гена использовали *ACTB*. Праймеры для ПЦР приведены в таблице.

Сравнение жизнеспособности клеток в различных условиях проводили с помощью двустороннего *t* критерия Стьюдента, достоверными считались изменения при $p<0.05$. Визуализацию и статистическое сравнение относительной люминесценции при заражении псевдотипированными вирусными частицами проводили в программе R.Studio на основе языка программирования R с использованием пакета ggpubr и критерия Вилкоксона для оценки статистической значимости ($p<0.05$). Различия в экспрессии генов считали достоверными при кратности изменения экспрессии не менее 1.5 по модулю и $p<0.05$ при использовании двустороннего *t* критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Оценка цитотоксичности ингибиторов деметилаз KDOAM-25, PBIT и JIB-04 с помощью MTT-теста не выявила значимых изменений жизнеспособности клеток HEK293T-ACE2 и дифференцированных Caco-2 в течение 24 и 72 ч. На рисунке 1 показана относительная жизнеспособность клеток при воздействии ингибитора KDOAM-25, поскольку в дальнейшем было установлено, что только этот препарат влияет на проникновение псевдотипированных вирусных частиц в клетки. Полученные результаты согласуются с данными о низкой цитотоксичности KDOAM-25 [7]. Ингибитор PBIT в концентрации 10 мкМ приводил к гибели опухолевой линии UACC-812 с высокой экспрессией *KDM5B*, но практически не влиял на клетки MCF7 и MCF10A, у которых экспрессия этого гена была ниже [15]. При исследовании линий колоректального рака ингибитор JIB-04 дозозависимо снижал жизнеспособность клеток HCT-116, но практически не влиял на линии HT-29 и DLD-1 [16]. Полулетальная концентрация PBIT и JIB-04 для разных клеточных линий значительно различалась [17]. По-видимому, эффекты ингибиторов деметилаз на клетки могут в значительной мере зависеть от уровня экспрессии деметилаз и особенностей активности внутриклеточных сигнальных систем. В нашем эксперименте KDOAM-25, PBIT и JIB-04 не были токсичны для HEK293T-ACE2 и дифференцированных клеток Caco-2 в исследуемых концентрациях.

Также оценивалось влияние ингибиторов деметилаз KDOAM-25, PBIT и JIB-04 на проникновение псевдотипированных вирусных частиц

Последовательность праймеров, использованных при проведении ПЦР

Ген	Последовательность праймера
ACTB	F: CTGAACGGTGAAGGTGACA R: AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA
ACE2	F: AGAGAAGTGGAGGTGGATGGTCTTT R: GCGGGGTCACAGTATGTTTCATCA
TMPRSS2	F: AACGAGAACTACGGGCGGGC R: CGCTGTCATCCACTATTCCTTGGC
BRCA1	F: GCGGGAGGAAAATGGGTAGTTAG R: AACAGATTTCTAGCCCCCTGAAGA
CDH1	F: CGACACCCGATTCAAAGTGG R: TCCCAGGCGTAGACCAAGAA
TP53	F: TGTGGTGGTGCCCTATGAGCC R: ATGTAGTTGTAGTGGATGGTGGT
SNAI1	F: CTAGCGAGTGGTTCTTCTG R: CTGCTGGAAGGTAAACTCTG
VIM	F: GCAGGAGGAGATGCTTCAGAGA R: AAGGTCAAGACGTGCCAGAGAC
UGCG	F: GAGCGTTGTCCGTGTTGG R: TCAGTTGCCTTCTTGTTGAGG
HNF4A	F: CACGGGCAAACACTACGGT R: TTGACCTTCGAGTGCTGATCC
SOX2	F: CGCAGACCTACATGAACG R: GGACTTGACCACCGAACC
DDIT4	F: GTTTGACCGCTCCACGAGCC R: CGAAGTCGGGCAACGACACC
PROM1	F: CCAGTGCTTCCTGCTCCTCTT R: AACTTGGTGCCTCCTGCCT
PTEN	F: CTCAGCCGTTACCTGTGTGTGG R: TGAGGTTTCCTCTGGTCCTGGTATG
MALAT1	F: AGCAGTTCGTGGTGAAGATAG R: CATATTGCCGACCTCACG
EGR1	F: AACGAGAAGGTGCTGGTGGAGA R: AGATGGTGCTGAGGACGAGGAG
CDKN1B	F: AGGAGAGCCAGGATGTCAGC R: ACCAAATGCGTGTCCTCAGA
BSG	F: GCAGGTTCTTCGTGAGTTCC R: GGCGTCGTCATCATCCA
DPP4	F: TTTCTTTGCAGTGGCTCAGGAGG R: GCCTAAATCTTCCAACCCAGCC

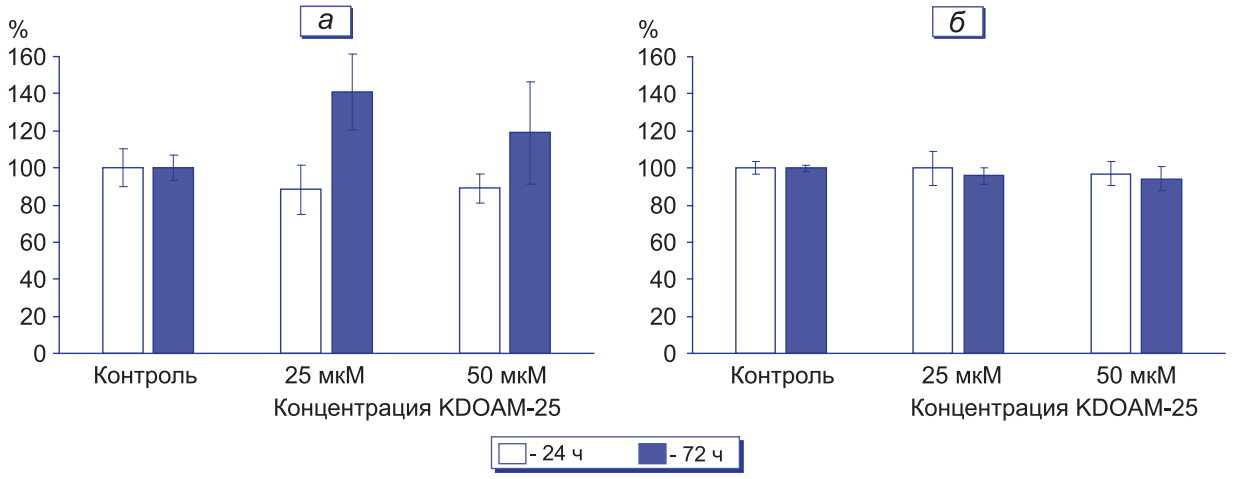

Рис. 1. Относительная цитотоксичность ингибитора деметилазы KDOAM-25 в концентрациях 25 и 50 мкМ в отношении дифференцированных клеток Caco-2 (*а*) и клеток HEK293T-ACE2 (*б*) через 24 и 72 ч культивирования.

SARS-CoV-2 в дифференцированные клетки Caco-2 и клетки HEK293T-ACE2. Количество вирусных частиц, проникающих в клетки в различных условиях, определялось по люминесценции, выраженной в процентах относительно контрольных условий. KDOAM-25, селективный ингибитор деметилаз семейства KDM5, приводил к уменьшению заражения дифференцированных клеток Caco-2 в 2.9 раза в концентрации 25 мкМ и в 7.6 раза в концентрации 50 мкМ (рис. 2, *а*), а заражение клеток HEK293T-ACE2 снижалось на фоне применения обеих концентраций примерно в 1.7 раза (рис. 2, *б*). В то же время ингибитор деметилаз PBIT в концентрациях 5 и 10 мкМ и ингибитор JIB-04 в концентрациях 2 и 0.6 мкМ не приводил к значимому изменению заражения клеток.

Одна из гипотез предполагает наличие регуляторных связей между деметилазами семейства KDM5, в частности KDM5B, и экспрессией *ACE2* и *TMPRSS2* [18]. По изменению экспрессии генов *ACE2* и *TMPRSS2* оценивали влияние ингибитора KDOAM-25 в течение 72 ч на клетки HEK293T-ACE2 и дифференцированные и недифференцированные клетки Caco-2. В клетках HEK293T-ACE2, в которых стабильная экспрессия *ACE2* поддерживается благодаря трансфекции плазмидой с геном *ACE2* под управлением промотора цитомегаловируса, значимого изменения экспрессии *ACE2* не наблюдалось, а экспрессия гена *TMPRSS2* не детектировалась на достаточном уровне для анализа её изменения. В то же время при воздействии KDOAM-25 на дифференцированные Caco-2 происходило

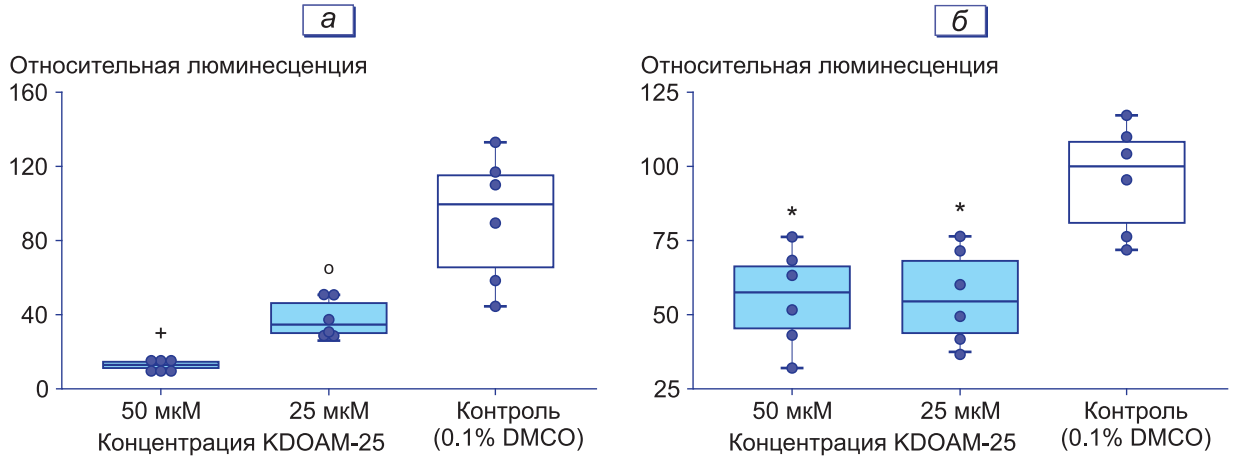

Рис. 2. Относительная люминесценция при инкубации дифференцированных клеток Caco-2 (*а*) и клеток HEK293T-ACE2 (*б*) с псевдотипированными частицами SARS-CoV-2 после воздействия ингибитора KDOAM-25 в концентрации 25 и 50 мкМ.

^{+}p=0.005, ^{o}p=0.0087, $^{*}p$=0.0043 по сравнению с контролем.

повышение экспрессии ACE2 в 1.7 раза (p=0.041), а экспрессия *TMPRSS2* значимо не изменялась (кратность изменения 0.7, p=0.499). В недифференцированных клетках Caco-2 экспрессия *ACE2* повышалась в 2.1 раза (p=0.015), а экспрессия *TMPRSS2* также значимо не изменялась (кратность изменения 1.4, p=0.377).

Ранее показано, что PBIT очень слабо влияет на активность нуклеазного комплекса nsp14—nsp10 SARS-CoV-2, в то время как его аналог эбселен, в котором атом серы замещён на селен, выраженно подавляет активность данного комплекса [19]. Влияние KDOAM-25 и PBIT на проникновение коронавируса SARS-CoV-2 в клетки не исследовалось, однако было показано, что ингибитор JIB-04 снижает заражение клеток Vero E6, при этом исследователи сделали вывод о связи такого эффекта не со стадией входа в клетки, а с нарушением стабильности или транскрипции вирусной РНК на ранней стадии после входа в клетки. При этом нокдаун деметилаз KDM4B, KDM4C, KDM5A или KDM5B также имитировал эффекты JIB-04 на заражение клеток вирусами [20]. В нашем эксперименте использовались псевдотипированные вирусные частицы SARS-CoV-2, которые не экспрессируют вирусную РНК, возможно, поэтому JIB-04 не оказал влияния на заражение клеток HEK293T и Caco-2. В то же время KDOAM-25 значимо снижал проникновение вирусных частиц в клетку, но экспрессия *ACE2* при этом не снижалась, а, наоборот, увеличивалась. Поскольку увеличение экспрессии на уровне мРНК не означает аналогичного изменения на уровне белка, то нельзя исключать регуляцию ACE2 через деметилазы KDM5, однако в основе наблюдаемого эффекта могут быть и другие, пока невыясненные причины. Исследование промоторной области гена *ACE2* выявило большое количество метильных меток H3K4me3 в почках, сердце и тонкой кишке и небольшое — в лёгких и эндотелиальных клетках HUVEC, что соотносится с уровнем экспрессии *ACE2* в этих тканях [21]. По-видимому, KDOAM-25 как ингибитор деметилазы KDM5B может непосредственно повышать активность гена *ACE2* в клетках Caco-2, схожих с клетками эпителия тонкой кишки, а в клетках HEK293T, полученных из почки, данный эффект не наблюдался, поскольку клетки уже экспрессируют *ACE2* на повышенном уровне за счёт промотора цитомегаловируса, который не подвержен естественной регуляции клеточными системами. Вместе с тем снижение проникновения вирусных частиц в клетки объяснялось не регуляцией генов *ACE2* и *TMPRSS2*, а другими механизмами.

SARS-CoV-2 может использовать для прикрепления к мембране и входа в астроциты базигин (BSG/CD147) и дипептидилпептидазу 4 (DPP4) [3]. По данным проведённого нами ранее секвенирования клеток Caco-2 [22], уровень экспрессии генов *BSG* и *DPP4* на несколько порядков выше, чем уровень экспрессии *ACE2*. Мы не выявили статистически значимых изменений экспрессии данных генов при воздействии KDOAM-25. По-видимому, в снижении проникновения вирусных частиц в клетки при воздействии KDOAM-25 задействованы и другие механизмы, кроме регуляции рецепторов на поверхности клеток. Так, было показано, что деметилаза KDM5B может регулировать экспрессию гена *CAV1*, кодирующего белок кавеолин, вовлечённый в один из видов эндоцитоза [23], что также может быть потенциальным механизмом регуляции входа SARS-CoV-2 в клетки.

Нами проведён поиск генов, экспрессия которых потенциально может изменяться при воздействии KDOAM-25. В доступной литературе практически отсутствуют данные о влиянии KDOAM-25 на экспрессию различных генов в клетках. По предварительным данным, KDOAM-25 при инкубации с модифицированными клетками РМЖ MCF7 повышает экспрессию гена *UGCG* примерно в 2 раза в концентрации 30 мкМ и примерно в 1.5 раза в концентрации 50 мкМ [24]. Также проведён поиск генов, экспрессия которых изменяется при нокдауне или гиперэкспрессии генов деметилаз семейства KDM5 или при воздействии ингибиторов PBIT и JIB-04, для оценки изменения этих генов под воздействием KDOAM-25. Нокдаун гена *KDM5B* приводил к изменению экспрессии генов *BRCA1*, *PTEN* и *TP53* в клетках MCF7 [23]. Также нокдаун гена *KDM5B* в клетках MCF10A был связан со снижением уровня экспрессии *SNAI1* и *VIM* на уровне белка по данным вестерн-блоттинга, а гиперэкспрессия *KDM5B* приводила к повышению экспрессии *SNAI1* и *VIM* по данным ПЦР, что по предположению исследователей происходило опосредованно через регуляцию экспрессии гена *MALAT1* [25]. Гиперэкспрессия *KDM5B* снижала экспрессию генов *EGR1* и *CDKN1B* в мышиных стволовых клетках [26]. Ингибитор JIB-04 приводил к повышению экспрессии генов *CDH1* и *PROM1* в клетках колоректального рака и фибробластах [16], *SOX2* в фибробластах [27], *DDIT4* в линиях Tcam-2, 2102EP и JAR [17], а PBIT изменял экспрессию *VIM*, *CDH1* и *SOX2* в клетках линии немелкоклеточного рака лёгких [28] и экспрессию гена *HNF4A* в мышиных гепатоцитах [29].

В проведённом нами эксперименте в дифференцированных клетках Caco-2 после воздей-

ствия KDOAM-25 не было выявлено значимого изменения экспрессии генов *BRCA1*, *CDH1*, *TP53*, *SNAI1*, *VIM* и *UGCG*. Дифференцированные клетки Caco-2 более устойчивы к различным воздействиям, вероятно, из-за глубокой морфофункциональной дифференцировки и отсутствия активного деления [30], поэтому мы также оценивали влияние KDOAM-25 на экспрессию генов в недифференцированных клетках Caco-2. Наблюдалось значимое повышение экспрессии генов *BRCA1* (в 2.7 раза, p=0.049), *SNAI1* (в 2.3 раза, p=0.039), *VIM* (в 1.7 раза, p=0.014) и *CDH1* (в 1.7 раза, p=0.020). Однако в недифференцированных Caco-2 не происходило значимого изменения экспрессии генов *TP53*, *UGCG*, *HNF4A*, *SOX2*, *DDIT4*, *PROM1*, *PTEN*, *MALAT1*, *EGR1* и *CDKN1B*, для которых была выявлена связь с экспрессией деметилаз семейства KDM5 и действием их ингибиторов.

Таким образом, исследованные ингибиторы деметилаз семейства KDM5 — JIB-04, PBIT и KDOAM-25 — не оказывали цитотоксического действия на дифференцированные клетки Caco-2 и клетки HEK293T с повышенной экспрессией *ACE2*. При этом только KDOAM-25 достоверно снижал проникновение псевдотипированных вирусных частиц SARS-CoV-2 в эти клетки. KDOAM-25 значимо повышал экспрессию ACE2 на уровне мРНК в дифференцированных и недифференцированных Caco-2, что может указывать на отсутствие связи между экспрессией ACE2 на уровне мРНК и белка или на наличие другого механизма регуляции проникновения SARS-CoV-2 в клетки при действии KDOAM-25. В дифференцированных Caco-2 не было выявлено значимого изменения экспрессии генов, которые связаны с нокдауном или гиперэкспрессией гена *KDM5B* или действием других ингибиторов деметилаз, однако в недифференцированных Caco-2 происходило значимое увеличение экспрессии генов *BRCA1*, *SNAI1*, *VIM* и *CDH1*. Механизм влияния KDOAM-25 на проникновение SARS-CoV-2 в клетки требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1049).

Литература

1. *Laurie M.T., Liu J., Sunshine S., Peng J., Black D., Mitchell A.M., Mann S.A., Pilarowski G., Zorn K.C., Rubio L., Bravo S., Marquez C., Sabatino J.J., Mittl K., Petersen M., Havlir D., DeRisi J.* SARS-CoV-2 variant exposures elicit antibody responses with differential cross-neutralization of established and emerging strains including Delta and Omicron // J. Infect. Dis. 2022. Vol. 225, N 11. P. 1909-1914. doi: 10.1093/infdis/jiab635
2. *Ashour N.A., Abo Elmaaty A., Sarhan A.A., Elkaeed E.B., Moussa A.M., Erfan I.A., Al-Karmalawy A.A.* A systematic review of the global intervention for SARS-CoV-2 combating: from drugs repurposing to Molnupiravir approval // Drug Des. Devel. Ther. 2022. Vol. 16. P. 685-715. doi: 10.2147/DDDT.S354841
3. *Huang S., Fishell G.* In SARS-CoV-2, astrocytes are in it for the long haul // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2022. Vol. 119, N 30. ID e2209130119. doi: 10.1073/pnas.2209130119
4. *Knyazev E., Nersisyan S., Tonevitsky A.* Endocytosis and transcytosis of SARS-CoV-2 across the intestinal epithelium and other tissue barriers // Front. Immunol. 2021. Vol. 12. ID 636966. doi: 10.3389/fimmu.2021.636966
5. *Nersisyan S., Shkurnikov M., Turchinovich A., Knyazev E., Tonevitsky A.* Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2 // PLoS One. 2020. Vol. 15, N 7. ID e0235987. doi: 10.1371/journal.pone.0235987
6. *Tumber A., Nuzzi A., Hookway E.S., Hatch S.B., Velupillai S., Johansson C., Kawamura A., Savitsky P., Yapp C., Szykowska A., Wu N., Bountra C., Strain-Damerell C., Burgess-Brown N.A., Ruda G.F., Fedorov O., Munro S., England K.S., Nowak R.P., Schofield C.J., La Thangue N.B., Pawlyn C., Davies F., Morgan G., Athanasou N., Müller S., Oppermann U., Brennan P.E.* Potent and selective KDM5 inhibitor stops cellular demethylation of H3K4me3 at transcription start sites and proliferation of MM1S myeloma cells // Cell Chem. Biol. 2017. Vol. 24, N 3. P. 371-380. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.02.006
7. *Zheng Y.C., Chang J., Wang L.C., Ren H.M., Pang J.R., Liu H.M.* Lysine demethylase 5B (KDM5B): A potential anti-cancer drug target // Eur. J. Med. Chem. 2019. Vol. 161. P. 131-140. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.040
8. *Brewitz L., Tumber A., Pfeffer I., McDonough M.A., Schofield C.J.* Aspartate/asparagine-β-hydroxylase: a high-throughput mass spectrometric assay for discovery of small molecule inhibitors // Sci. Rep. 2020. Vol. 10, N 1. ID 8650. doi: 10.1038/s41598-020-65123-9
9. *Betari N., Sahlholm K., Ishizuka Y., Teigen K., Haavik J.* Discovery and biological characterization of a novel scaffold for potent inhibitors of peripheral serotonin synthesis // Future Med. Chem. 2020. Vol. 12, N 16. P. 1461-1474. doi: 10.4155/fmc-2020-0127
10. *Wang L., Chang J., Varghese D., Dellinger M., Kumar S., Best A.M., Ruiz J., Bruick R., Peña-Llopis S., Xu J., Babinski D.J., Frantz D.E., Brekken R.A., Quinn A.M., Simeonov A., Easmon J., Martinez E.D.* A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth // Nat. Commun. 2013. Vol. 4. ID 2035. doi: 10.1038/ncomms3035
11. *Chen M., Zhang X.E.* Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review // Int. J. Biol. Sci. 2021. Vol. 17, N 6. P. 1574-1580. doi: 10.7150/ijbs.59184
12. *Rosa R.B., Dantas W.M., do Nascimento J.C.F., da Silva M.V., de Oliveira R.N., Pena L.J.* In vitro and in vivo models for studying SARS-CoV-2, the etiological agent responsible for COVID-19 pandemic // Viruses. 2021. Vol. 13, N 3. ID 379. doi: 10.3390/v13030379
13. *Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., Shilin S.A., Gazizov I.N., Zakharova G.S., Poloznikov A.A., Sakharov D.A.* Impedance spectroscopy and transcriptome analysis

of choriocarcinoma BeWo b30 as a model of human placenta // Mol. Biol. (Mosk). 2019. Vol. 53, N 3. P. 467-475. doi: 10.1134/S0026898419030133

14. *Knyazev E.N., Nyushko K.M., Alekseev B.Y., Samatov T.R., Shkurnikov M.Y.* Suppression of ITGB4 gene expression in PC-3 cells with short interfering RNA induces changes in the expression of β-integrins associated with RGD-receptors // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. Vol. 159, N 4. P. 541-545. doi: 10.1007/s10517-015-3011-9
15. *Sayegh J., Cao J., Zou M.R., Morales A., Blair L.P., Norcia M., Hoyer D., Tackett A.J., Merkel J.S., Yan Q.* Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, N 13. P. 9408-9417. doi: 10.1074/jbc.M112.419861
16. *Kim M.S., Cho H.I., Yoon H.J., Ahn Y.H., Park E.J., Jin Y.H., Jang Y.K.* JIB-04, a small molecule histone demethylase inhibitor, selectively targets colorectal cancer stem cells by inhibiting the Wnt/β-catenin signaling pathway // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, N 1. ID 6611. doi: 10.1038/s41598-018-24903-0
17. *Müller M.R., Burmeister A., Skowron M.A., Stephan A., Bremmer F., Wakileh G.A., Petzsch P., Köhrer K., Albers P., Nettersheim D.* Therapeutical interference with the epigenetic landscape of germ cell tumors: a comparative drug study and new mechanistical insights // Clin. Epigenetics. 2022. Vol. 14, N 1. P. 5. doi: 10.1186/s13148-021-01223-1
18. *Nersisyan S.A., Shkurnikov M.Y., Osipyants A.I., Vechorko V.I.* Role of ACE2/TMPRSS2 genes regulation by intestinal microRNA isoforms in the COVID-19 pathogenesis // Bulletin of RSMU. 2020. N 2. P. 16-18. doi: 10.24075/brsmu.2020.024
19. *Baddock H.T., Brolih S., Yosaatmadja Y., Ratnaweera M., Bielinski M., Swift L.P., Cruz-Migoni A., Fan H., Keown J.R., Walker A.P., Morris G.M., Grimes J.M., Fodor E., Schofield C.J., Gileadi O., McHugh P.J.* Characterization of the SARS-CoV-2 ExoN (nsp14ExoN-nsp10) complex: implications for its role in viral genome stability and inhibitor identification // Nucleic Acids Res. 2022. Vol. 50, N 3. P. 1484-1500. doi: 10.1093/nar/gkab1303
20. *Son J., Huang S., Zeng Q., Bricker T.L., Case J.B., Zhou J., Zang R., Liu Z., Chang X., Darling T.L., Xu J., Harastani H.H., Chen L., Gomez Castro M.F., Zhao Y., Kohio H.P., Hou G., Fan B., Niu B., Guo R., Rothlauf P.W., Bailey A.L., Wang X., Shi P.Y., Martinez E.D., Brody S.L., Whelan S.P.J., Diamond M.S., Boon A.C.M., Li B., Ding S.* JIB-04 has broad-spectrum antiviral activity and inhibits SARS-CoV-2 replication and coronavirus pathogenesis // mBio. 2022. Vol. 13, N 1. ID e0337721. doi: 10.1128/mbio.03377-21
21. *Beacon T.H., Delcuve G.P., Davie J.R.* Epigenetic regulation of ACE2, the receptor of the SARS-CoV-2 virus[1] // Genome. 2021. Vol. 64, N 4. P. 386-399. doi: 10.1139/gen-2020-0124
22. *Knyazev E., Maltseva D., Raygorodskaya M., Shkurnikov M.* HIF-dependent NFATC1 activation upregulates ITGA5 and PLAUR in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease // Front. Genet. 2021. Vol. 12. ID 791640. doi: 10.3389/fgene.2021.791640
23. *Yamane K., Tateishi K., Klose R.J., Fang J., Fabrizio L.A., Erdjument-Bromage H., Taylor-Papadimitriou J., Tempst P., Zhang Y.* PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation // Mol. Cell. 2007. Vol. 25, N 6. P. 801-812. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.001
24. *Rajput K., Ansari M.N., Jha S.K., Medatwal N., Sharma P., Datta S., Kar A., Pani T., Cholke K., Rana K., Khan A., Mukherjee G., Deo S.V.S., Prabhu J.S., Mukhopadhyay A., Bajaj A., Dasgupta U.* RICTOR drives ZFX-mediated ganglioside biosynthesis to promote breast cancer progression // bioRxiv. 2022.01.10.475595. doi: 10.1101/2022.01.10.475595
25. *Bamodu O.A., Huang W.C., Lee W.H., Wu A., Wang L.S., Hsiao M., Yeh C.T., Chao T.Y.* Aberrant KDM5B expression promotes aggressive breast cancer through MALAT1 overexpression and downregulation of hsa-miR-448 // BMC Cancer. 2016. Vol. 16. ID 160. doi: 10.1186/s12885-016-2108-5
26. *Dey B.K., Stalker L., Schnerch A., Bhatia M., Taylor-Papidimitriou J., Wynder C.* The histone demethylase KDM5b/JARID1b plays a role in cell fate decisions by blocking terminal differentiation // Mol. Cell. Biol. 2008. Vol. 28, N 17. P. 5312-5327. doi: 10.1128/MCB.00128-08
27. *Dabiri Y., Gama-Brambila R.A., Taškova K., Herold K., Reuter S., Adjaye J., Utikal J., Mrowka R., Wang J., Andrade-Navarro M.A., Cheng X.* Imidazopyridines as potent KDM5 demethylase inhibitors promoting reprogramming efficiency of human iPSCs // iScience. 2019. Vol. 12. P. 168-181. doi: 10.1016/j.isci.2019.01.012
28. *Kuo K.T., Huang W.C., Bamodu O.A., Lee W.H., Wang C.H., Hsiao M., Wang L.S., Yeh C.T.* Histone demethylase JARID1B/KDM5B promotes aggressiveness of non-small cell lung cancer and serves as a good prognostic predictor // Clin. Epigenetics. 2018. Vol. 10, N 1. P. 107. doi: 10.1186/s13148-018-0533-9
29. *Schonfeld M., Averilla J., Gunewardena S., Weinman S.A., Tikhanovich I.* Male-specific activation of lysine demethylases 5B and 5C mediates alcohol-induced liver injury and hepatocyte dedifferentiation // Hepatol. Commun. 2022. Vol. 6, N 6. P. 1373-1391. doi: 10.1002/hep4.1895
30. *Nikulin S.V., Mnafki (Krainova) N.A., Shilin S.A., Gazizov I.N., Maltseva D.V.* Ribosome inactivation and the integrity of the intestinal epithelial barrier // Mol. Biol. (Mosk). 2018. Vol. 52, N 4. P. 675-682. doi: 10.1134/S0026898418040146

Получено 03.11.22