

ЭКСПРЕССИЯ, ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СОЗРЕВАНИЕ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОЙ И ОПУХОЛЕВЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПОЧКИ

© 2023 А.С. Фролова^{1,2}, Н.К. Тихомирова³, И.И. Киреев³, Е.Ю. Зерний³, А. Пароди²,
К.И. Иванов², А.А. Замятнин мл.^{1,2,3,4*}

¹ Институт молекулярной медицины,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991 Москва, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Сочи, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: zamyat@belozersky.msu.ru

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.02.2023

После доработки 24.05.2023

Принята к публикации 24.05.2023

Цистеиновые катепсины играют важную роль при развитии опухолей и метастазировании, а их экспрессия повышена во многих опухолевых клетках. Помимо протеолиза белков внеклеточного матрикса и сигнальных молекул на поверхности клетки, цистеиновые катепсины участвуют в канцерогенезе посредством других механизмов, включающих деградацию транскрипционных факторов и нарушение функционирования сигнальных каскадов в клеточном ядре. На данный момент известна роль ряда катепсинов в определённых типах рака, однако нет исследований всех 11 цистеиновых катепсинов в одной опухоли или опухолевой модели. В настоящей работе мы оценивали и сравнивали экспрессию, локализацию и степень созревания всех 11 цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки НЕК293 и клеточных линиях рака почки 769-P и A-498. Нами было показано, что в опухолевых клетках экспрессия катепсинов V, B, Z, L и S повышена в 3–9 раз по сравнению с эмбриональными клетками. Также было установлено, что цистеиновые катепсины детектируются не только в цитоплазме, но и в клеточных ядрах как эмбриональных, так и опухолевых клеток. Так, например, более половины специфического флуоресцентного сигнала от катепсинов Z и K обнаруживалось в ядрах опухолевых клеток, а в случае катепсина F доля этого фермента в клеточном ядре превышала 88%. Более того, было обнаружено, что многие цистеиновые катепсины представлены в виде зрелого фермента именно в опухолевых клетках. В дальнейшем полученные результаты могут быть использованы для разработки новых диагностических систем, а также для дальнейшего изучения цистеиновых катепсинов в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цистеиновые катепсины, внутриклеточная локализация, экспрессия белков, созревание протеиназ, рак почки.

DOI: 10.31857/S032097252307014X, EDN: FYLWMO

ВВЕДЕНИЕ

Цистеиновые катепсины являются лизосомальными протеиназами и относятся к папаин-подобным ферментам. Группа цистеиновых катепсинов состоит из 11 ферментов: катепсины B, C, F, H, K, L, O, S, V, W и Z (X).

Принятые сокращения: GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

* Адресат для корреспонденции.

Они имеют общую доменную структуру, но различаются по молекулярной массе и функциям. Основная роль цистеиновых протеиназ заключается в деградации белков и регуляции клеточных процессов [1]. На основе аминокислотной последовательности продомена катепсины подразделяют на L-, B- и F-подобные катепсины [2].

Катепсины состоят из сигнального N-концевого пептида, продомена и каталитического домена [3]. Катепсины синтезируются в виде

неактивной проформы. В процессе многоступенчатого созревания от проформы отщепляется сигнальный пептид и продомен, и образуется зрелый фермент. В некоторых случаях в процессе созревания катепсины образуют одну или несколько промежуточных форм [4].

Цистеиновые катепсины экспрессируются практически всеми клетками организма. Некоторые из них имеют выраженную экспрессию в определённых органах человеческого тела. Например, в группе иммунных клеток катепсин S крайне распространён в антиген-презентирующих клетках [5], а катепсин W экспрессируется преимущественно NK-клетками и Т-лимфоцитами [6]. Повышенная экспрессия катепсинов наблюдается при опухолях мозга [7–9], раке груди [10–13], колоректальном раке [14, 15], меланоме [16], неходжкинской лимфоме [17], плоскоклеточной карциноме [18], раке лёгких [19], желудка [20], тимоме [21], раке почки [22, 23], щитовидной железы [24, 25], крупногранулярном лимфоцитарном лейкозе [26]. Из литературных данных известно, что у пациентов с почечно-клеточным раком в клетках наблюдается повышенная экспрессия катепсина В в сравнении с окружающими неопухолевыми клетками [27]. Катепсин К используется как диагностический маркер при TFE3/TFEB-реаранжированной почечно-клеточной карциноме и почечной эпителиоидной ангиомиолипоме [23]. Повышенную экспрессию цистеиновых катепсинов в опухолевых клетках часто связывают с плохим прогнозом [7, 28], общей низкой выживаемостью [29] и метастазированием [30].

Цистеиновые катепсины рассматриваются в качестве потенциальных маркеров и мишеней для диагностики и лечения определённых типов рака. К потенциальным маркерам можно отнести катепсин В [27], катепсин Н [14], а также катепсин К [23]. Ингибирование активности катепсина В в клетках гепатоцеллюлярной карциномы приводит к снижению клеточного роста опухоли [31, 32]. Пептиды, полученные на основе субстратов папаин-подобной цистеиновой протеиназы тритикаина-альфа, снижают миграцию опухолевых клеток почек, формирование сфероидов и колоний [22]. Нокаут катепсина Z и В при раке груди приводит к уменьшению метастазирования и размеров опухоли [33].

Несмотря на то что цистеиновые катепсины изначально были описаны как лизосомальные протеиназы, их обнаруживают в ядрах клеток, а также в некоторых других внутриклеточных компартментах [25, 34, 35].

В целом, функциональная роль «ядерных» цистеиновых катепсинов пока малоизучена. Однако показано, что наличие ядерного катепсина L коррелирует с негативным прогнозом выживаемости онкологических пациентов [36].

Многие исследования фокусируются на изучении одного определённого цистеинового катепсина. Несмотря на то что многие катепсины экспрессируются при определённом типе рака, в литературе практически отсутствуют работы, направленные на изучение экспрессии всех цистеиновых катепсинов одновременно. С целью заполнить этот пробел в настоящем исследовании мы изучили уровни экспрессии всех 11 цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки человека HEK293 и в опухолевых линиях почки 769-Р и А-498, а также определили локализацию и степень созревания цистеиновых катепсинов, присутствующих в этих клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточных линий. Клеточные линии карциномы почки человека 769-Р, А-498 и человеческие эмбриональные клетки почки HEK293 были получены из американской коллекции типовых культур. Клетки 769-Р и А-498 выращивали на флаконах в среде RPMI-1640, дополненной 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (v/v) и 1%-ной смесью антибиотиков пенициллин-стрептомицин (v/v) («Gibco», США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Клетки HEK293 выращивали на среде DMEM с теми же добавками и в тех же условиях.

Получение антител против катепсина L. Поликлональные антитела против катепсина L были получены и очищены в соответствии с обычной процедурой [37]. Вкратце, очищенный рекомбинантный катепсин L (1 мг/мл) смешивали в соотношении 1 : 1 с 1 мл вспомогательного адъюванта Фрейнда и подкожно вводили кролику. Через месяц иммунизацию усилили путём введения рекомбинантного катепсина L (1 мг/мл), смешанного с неполным адъювантом Фрейнда в том же соотношении. Через две недели после повторной иммунизации собрали кровь, и антитела очистили методом аффинной хроматографии. Для этого 1,2 мг рекомбинантного катепсина L смешали с 0,6 мл CNBr-активированной сефарозы («GE Lifesciences», США), следуя инструкциям производителя. Сыворотку разбавили в 2 раза раствором PBS и загрузили на иммуноаффинную

колонку. Антитела были удалены с колонки 0,2 М глицином (pH 2,5), элюат нейтрализовали 1 М Tris-HCl (pH 9,0). Антитела осадили сухим сульфатом аммония до насыщения 75%. Осадок антител центрифугировали, суспендировали в 50%-ном насыщенном растворе сульфата аммония и хранили при 4 °C.

Фракционирование клеточных структур.

Фракционирование клеточных линий на цитоплазматическую и ядерную фракции проводили по основной методике [38] с некоторыми модификациями. Клетки отмывали от среды охлаждённым PBS. К клеткам добавляли сахарозный буфер (0,32 М сахароза, 3 мМ CaCl₂, 2 мМ ацетат магния, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ДТТ, 0,5%-ный NP-40 (v/v), коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», США)), собирали скребком с клеточного пластика и переносили в пробирку во льду. Через 30 мин инкубации во льду с периодическим пипетированием образцы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 g, +4 °C. После центрифугирования отбирали супернатант, содержащий цитоплазматическую фракцию, и ресуспендировали ядерный осадок в сахарозном буфере без добавления NP-40. После центрифугирования при 3000 g, +4 °C в течение 5 мин ядра ресуспендировали сначала в низкосолеовом буфере (20 мМ HEPES, pH 7,9, 20%-ный глицерин (v/v), 1,5 мМ MgCl₂, 0,02 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ, коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)), потом в высокосолеовом буфере (20 мМ HEPES, pH 7,9, 20%-ный глицерин (v/v), 1,5 мМ MgCl₂, 0,8 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, 1%-ный NP-40 (v/v), 0,5 мМ ДТТ, коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)). Ядра инкубировали в течение 30 мин во льду и центрифугировали на 16 000 g в течение 15 мин при +4 °C. Отобранный супернатант содержал ядерную фракцию. Цитоплазматическую и ядерную фракции хранили при -80 °C. Фракции смешивали с 2× буфером для нанесения образцов (125 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 20%-ный глицерин (v/v), 4%-ный SDS (w/v), 0,004%-ный бромфеноловый синий (w/v), 10%-ный 2-меркаптоэтанол (v/v)) и прогревали в течение 5 мин при 96 °C. На ПААГ наносили по 6 мкг цитоплазматической фракции и 60 мкг ядерной фракции.

Получение образцов клеточных лизатов.

Клетки аккуратно промывали охлаждённым PBS и лизировали в RIPA-буфере (150 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1%-ный NP-40 (v/v), 0,5%-ный дезоксихолат натрия (w/v), 0,1%-ный SDS (w/v)) с добавлением коктейля ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)

в течение 30 мин во льду. Клеточный лизат центрифугировали на 16 000 g при температуре +4 °C в течение 15 мин. Полученный клеточный лизат смешивали с 2× буфером для нанесения образцов (125 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 20%-ный глицерин (v/v), 4%-ный SDS (w/v), 0,004%-ный бромфеноловый синий (w/v), 10%-ный 2-меркаптоэтанол (v/v)) и прогревали в течение 5 мин при 96 °C. На ПААГ наносили по 30 мкг клеточного лизата.

Вестерн-блот. Готовые образцы разделяли в 14%-ном ПААГ и переносили на PVDF-мембрану («Merck Millipore», США). В работе использовали антитела к катепсинам V, C, B, K, W, Z, O, H, S («Abcam», Великобритания), катепсину L, катепсину F, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH), ламинам A/C («Thermo Fisher Scientific», США), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Thermo Fisher Scientific»). Мембраны проявляли набором Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad», США). Денситометрический анализ проводили в программе GelAnalyzer 19.1. Полученные данные нормировали к контролю нагрузки GAPDH и представляли в относительных единицах. Проверку чистоты цитоплазматической и ядерной фракций проводили по цитоплазматическому белку GAPDH и ядерным белкам ламинам A/C.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки отмывали в охлаждённом PBS, фиксировали в 4%-ном PFA (w/v)/PBS в течение 10 мин и пермеабелизовали в 0,25%-ном Triton X-100 (v/v) в течение 10 мин. Для блокировки неспецифических сайтов связывания клетки блокировали в 1%-ном BSA (w/v)/1× PBS-T/100 мМ глицерине в течение 30 мин. Далее клетки инкубировали с первичными антителами, описанными в разделе «Вестерн-блот», 1 ч при комнатной температуре. После этого к клеткам добавили меченные флуорофором вторичные антитела («Thermo Fisher Scientific») на 1 ч. Ядра клеток окрашивали ядерным красителем DAPI («Thermo Fisher Scientific») и заключали в монтирующую среду («Sigma-Aldrich»). Клетки визуализировали на конфокальном микроскопе C2 на платформе Eclipse Ti-E («Nikon», Япония). Анализ флуоресцентных изображений проводили в программе ImageJ 1.53c.

Анализ результатов. Статистический анализ результатов был выполнен с использованием программы GraphPad Prism 8.4.3. Результаты сравнительного анализа экспрессии представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспрессия цистеиновых катепсинов различается в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Для определения уровня экспрессии цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки был проведён вестерн-блоттинг клеточных лизатов (рис. 1). Результаты анализа показали, что все 11 цистеиновых катепсинов обнаруживаются как в эмбриональных клетках почки НЕК293, так и в двух опухолевых линиях клеток почки, 769-Р и А-498. Однако между эмбриональной и опухолевыми линиями были выявлены значимые различия в уровне экспрессии, а также в наличии различных форм цистеиновых катепсинов, отражающих степени созревания ферментов. Выяснилось, что опухолевые клетки почки продуцируют в среднем больше катепсина V (в 9,34 раз), катепсина Z (в 5,5), катепсина L (в 3,34), катепсина S (в 9,2) и катепсина B (в 3,34) в сравнении с эмбриональными клетками почки. Примечательно, что, помимо увеличенной экспрессии катепсинов L и B, в опухолевых клетках также детектировалось большее количество зрелых форм этих белков.

В опухолевых клетках уровень содержания проформы и промежуточной формы катепсина С был выше, чем в эмбриональных клетках, в то время как уровень содержания зрелой формы катепсина С снижался. Количество проформы и промежуточной формы катепсина О, наоборот, оказалось снижено в опухолевых клетках по сравнению с содержанием катепсина О в эмбриональных клетках, а зрелый катепсин О с молекулярной массой около 20 кДа детектировался исключительно в опухолевых клетках. В опухолевых клетках почки катепсин К присутствовал преимущественно в зрелой форме, а в эмбриональных клетках, наоборот, было больше проформы катепсина К. Количественное содержание проформы и промежуточной формы катепсина Н различалось во всех трёх клеточных линиях. Однако зрелая форма катепсина Н в опухолевых клетках была представлена в меньшем количестве, чем в эмбриональных клетках.

Экспрессия всех F-подобных катепсинов (катепсина F и W) оказалась выше в эмбриональных клетках почки по сравнению с экспрессией в опухолевых клетках. Помимо выявленных изменений в уровнях экспрессии катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках следует отдельно отметить, что в опухолевых клетках дополнительно детектировались промежуточные формы катепсинов V, K, C и H.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что все 11 цистеиновых катепсинов продуцируются как эмбриональными, так и опухолевыми клетками, однако уровень их экспрессии, а также набор форм, характерных для разных этапов созревания ферментов, могут существенно различаться. При этом опухолевые клетки почки содержат достоверно большее количество катепсинов V, B, Z, L и S по сравнению с эмбриональными клетками почки.

Цистеиновые катепсины присутствуют в ядрах и в цитоплазме эмбриональных и опухолевых клеток почки, но в разных соотношениях. На следующем этапе исследования изучалась внутриклеточная локализация цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Цистеиновые катепсины, окрашенные с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем, визуализировали с помощью конфокальной микроскопии (рис. 2). Ядра клеток окрашивали ядерным красителем DAPI.

Результаты микроскопии показали, что все цистеиновые катепсины детектировались как в цитоплазме, так и в ядрах эмбриональных и опухолевых клеток почки. Тем не менее распределение конкретных белков между цитоплазмой и ядром существенно различалось. Например, около 90% сигнала катепсина F приходилось на ядра эмбриональных и опухолевых клеток. Исходя из распределения флуоресцентных сигналов в клетках, был сделан вывод о том, что большая часть катепсинов Z, B, O, K и H (более 50% от всего сигнала) содержится в ядрах клеток 769-Р, в то время как в ядрах клеток А-498 представлено больше катепсина Z и K.

Сигнал от некоторых цистеиновых катепсинов в цитоплазме и ядре различался между эмбриональными и опухолевыми клетками почки. В эмбриональных клетках 49% сигнала от катепсина V и 65,15% сигнала от катепсина W детектировалось в ядрах клеток, в то время как в опухолевых клетках происходило снижение сигнала до 22,94% и 24,76% для катепсина V и до 16% и 16,46% для катепсина W в ядрах клеток 769-Р и А-498 соответственно.

Проанализировав распределение катепсинов B, O и Z в эмбриональных и опухолевых клетках, мы обнаружили статистические различия только в одной из клеточных линий в сравнении с эмбриональными клетками. Так, в ядрах опухолевых клеток 769-Р уровень катепсина Z был снижен с 73,35% до 50,1%, а в опухолевых клетках А-487 достоверно снижалась ядерная локализация катепсина B с 55,68% до 21,65% и катепсина O с 66,92% до 39,88%.

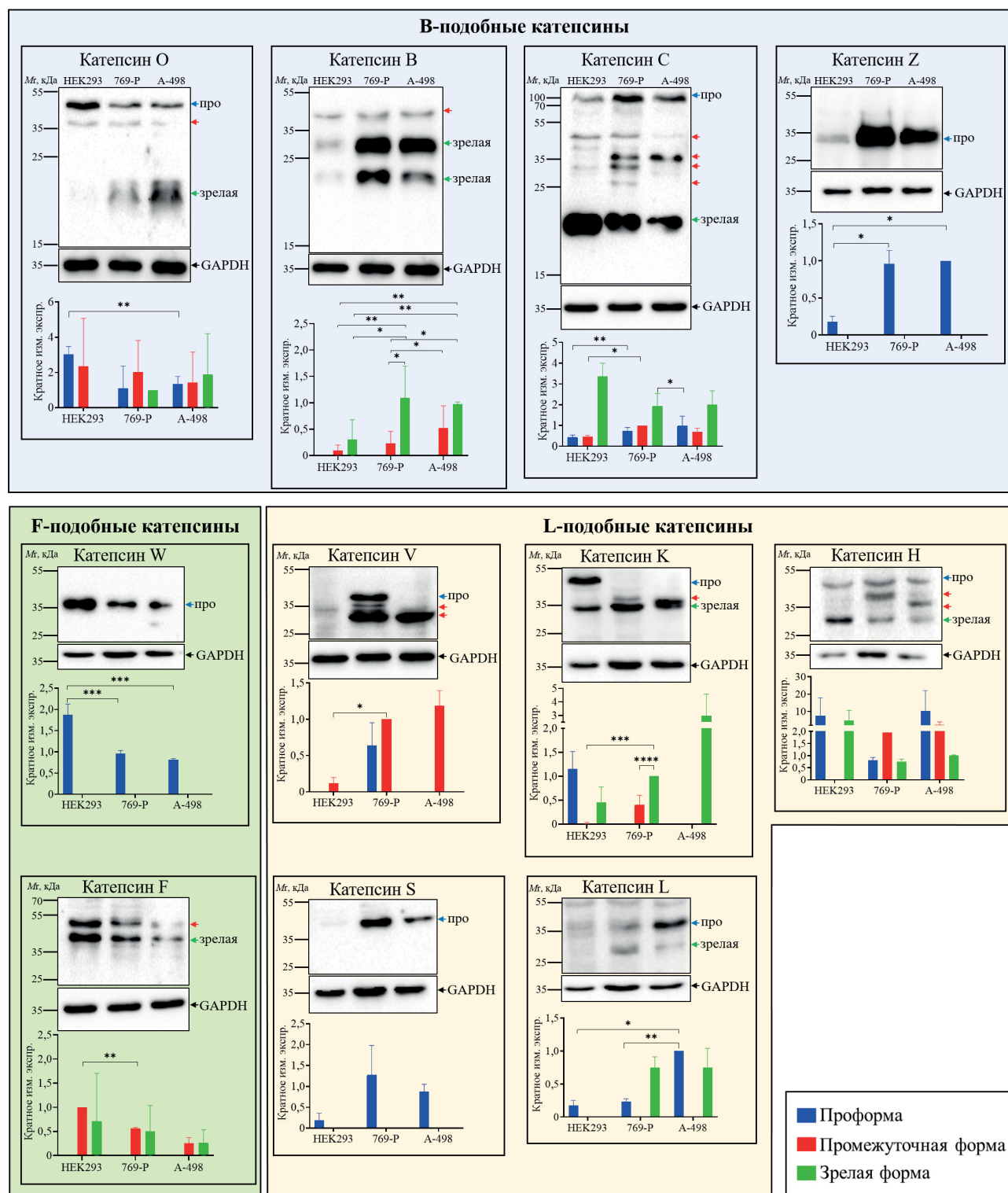


Рис. 1. Экспрессия В-, Ф- и Л-подобных цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-P и A-498. Анализ клеточных лизатов проводился с помощью вестерн-блоттинга. Мембраны окрашивались с помощью антител против 11 цистеиновых катепсинов, а также против GAPDH с целью количественного контроля нанесения образцов. Про – проформа катепсина, зрелая – зрелая форма катепсина, стрелки без подписей – промежуточные формы катепсинов. Гистограммы представляют результаты подсчёта вестерн-блотов (среднее значение и среднее квадратичное отклонение). Кратное изменение экспрессии вычислено как отношение значения интенсивности сигнала полосы белка к медианному значению интенсивности сигнала полосы белка. Медиана была выбрана среди значений интенсивностей сигналов полос белков, которые представлены на рисунке для определённого катепсина. Все значения интенсивностей сигналов полос белков были нормализованы по GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

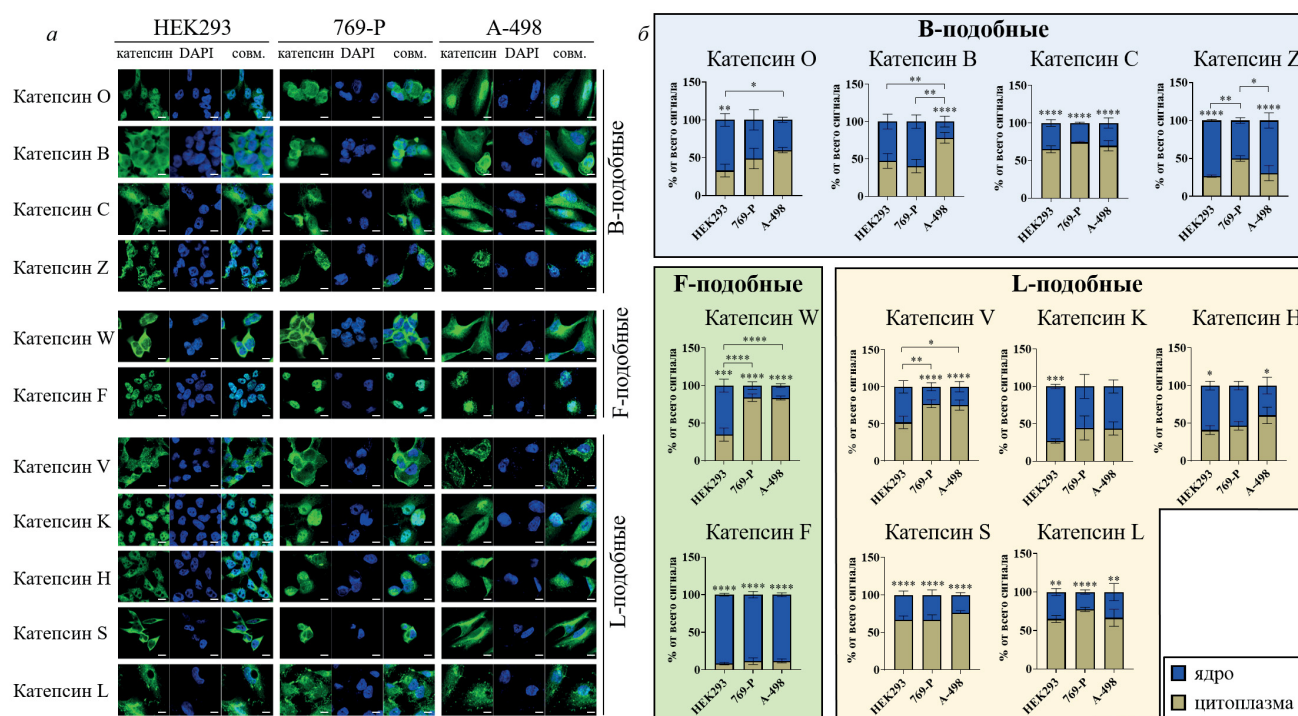


Рис. 2. Внутриклеточная локализация В-, F- и L-подобных цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-P и A-498. *а* — Микрофотографии, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Окрашивание проводилось с помощью антител к цистеиновым катепсинам и параллельно с помощью ядерного красителя DAPI. Размер масштабной шкалы — 10 мкм. Совм. — совмещённая фотография. *б* — Результаты подсчёта соотношений флуоресцентных сигналов от конъюгированных антител, детектируемых в цитоплазме или в ядре в клеточных линиях HEK293, 769-P и A-498 (среднее значение и среднее квадратичное отклонение). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

В то же время флуоресцентные сигналы от катепсинов S, H, K, L и C, детектируемые в цитоплазме и ядрах, в эмбриональных и опухолевых клетках не показали достоверных различий.

Полученные результаты позволяют заключить, что цистеиновые катепсины содержатся в ядрах и цитоплазме как в эмбриональных, так и в опухолевых клетках почки. Однако соотношения содержания отдельных ферментов в ядре и цитоплазме могут достоверно различаться в зависимости от типа клеток.

Цистеиновые катепсины созревают в опухолевых клетках почки эффективнее, чем в эмбриональных клетках почки. Следующий этап исследования заключался в определении различных форм катепсинов, образующихся при созревании ферментов и содержащихся в цитоплазме и ядрах эмбриональных и опухолевых клеток почки. Методом фракционирования клеточных компонентов были получены цитоплазматическая и ядерная фракции, которые анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител ко всем 11 катепсинам (рис. 3).

Анализ с помощью вестерн-блоттинга показал, что катепсины Z, W, V и L содержатся

в клетках в виде проформ: проформа белков определялась в цитоплазме и ядрах клеток (рис. 3). Проформы, а также зрелые формы катепсинов K, C, F и H определялись в ядерных фракциях, полученных из всех трёх клеточных линий. При анализе фракций на наличие катепсина S выявлялась только проформа в ядерной фракции эмбриональных клеток почки. Катепсин O в зрелой активной форме детектировался в ядерной фракции, полученной из опухолевых клеток, в то время как в ядерной фракции эмбриональных клеток определялась исключительно проформа и промежуточная форма. Катепсин В преимущественно определялся в цитоплазматической фракции в виде промежуточной и зрелой формы, в то время как в ядерной фракции содержалось лишь небольшое количество промежуточной формы катепсина В.

Исходя из результатов, представленных выше, можно сделать вывод, что в ядрах клеток цистеиновые катепсины представлены во всех возможных формах. Формы катепсина O и В различаются в ядерной фракции эмбриональных и опухолевых клеток почки. Кроме того, также можно сделать вывод о том, что процессы созревания катепсинов происходят

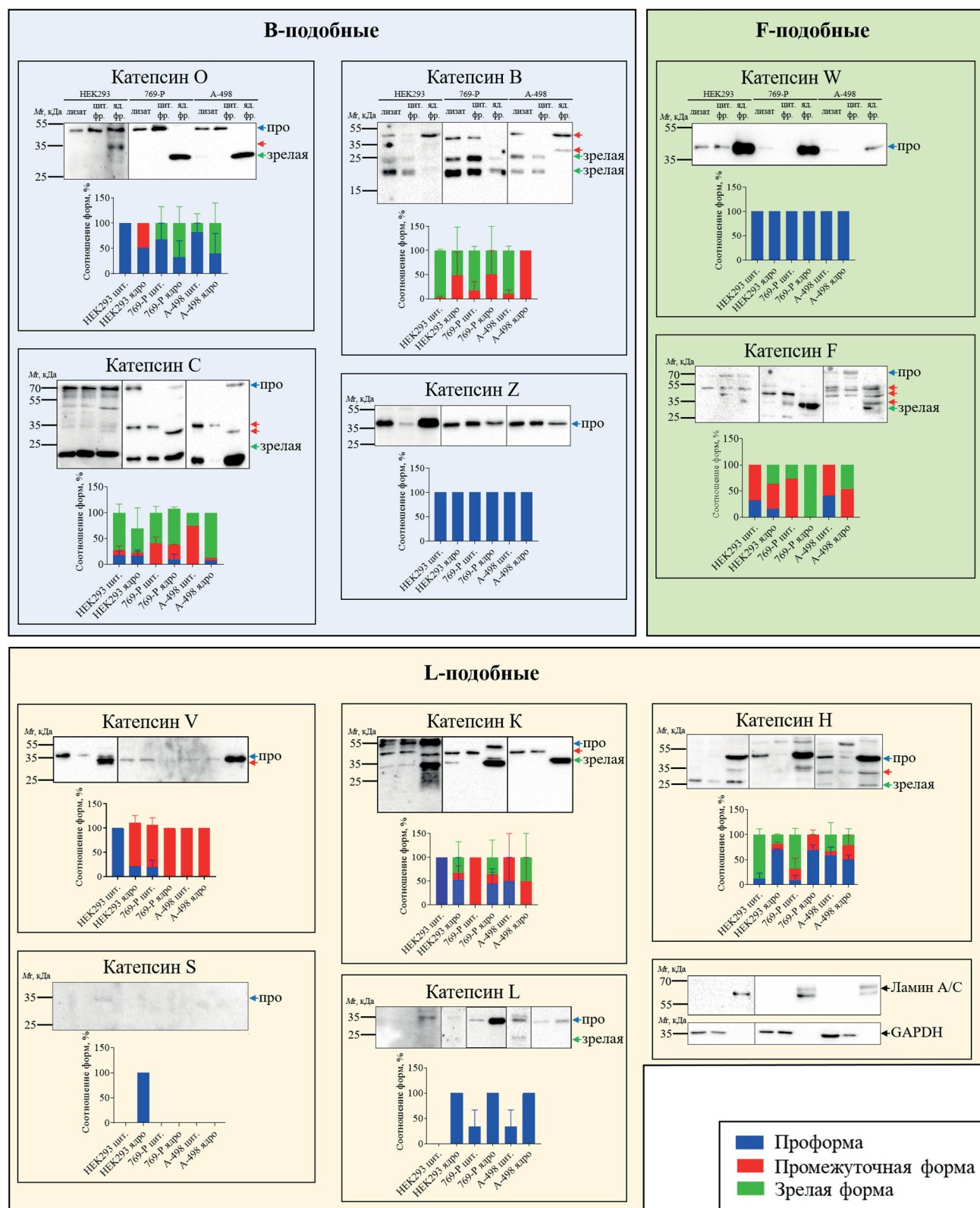


Рис. 3. Определение различных форм В-, F- и L-подобных цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-Р и А-498. Анализ клеточных лизатов и фракций проводился с помощью вестерн-блоттинга. Мембраны окрашивались с помощью антител против 11 цистеиновых катепсинов. Антитела к GAPDH и ламинам А/С использовали для проверки чистоты цитоплазматической и ядерной фракций. Про – проформа катепсина, зрелая – зрелая форма катепсина, стрелки без подписей – промежуточные формы катепсина, цит. фр. – цитоплазматическая фракция, яд. фр. – ядерная фракция. Гистограммы представляют результаты обсчёта вестерн-блотов (среднее значение и стандартная ошибка среднего)

эффективнее в ядрах и цитоплазме опухолевых клеток, чем в ядрах и цитоплазме эмбриональных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают и дополняют имеющиеся в литературе данные о том, что экспрессия практически всех цистеиновых катепсинов повышена в опухолевых клетках [7–26]. На молекулярном уровне повышенная экспрессия и секреция цистеиновых катепсинов ведёт к протеолизу белков внеклеточного матрикса и поверхностных мембранных белков, что, в свою очередь, приводит к разрушению межклеточных контактов, миграции раковых клеток и метастазированию опухоли [39].

В настоящей работе мы обнаружили повышенную экспрессию катепсинов В и L в клетках рака почки. В других опухолевых клетках, таких как клетки рака поджелудочной железы, также наблюдается повышенный уровень катепсинов В и L [40, 41]. На мышинной модели канцерогенеза клеток островков поджелудочной железы RIP1-Tag2 было показано участие катепсинов В и L в протеолизе супрессора опухолей Е-кадгерина [42], что ведёт к активации эпителиально-мезенхимального перехода. Это, в свою очередь, приводит к усилению метастазирования и химиорезистентности опухолевых клеток [43]. Мы предполагаем, что в опухолевых клетках почки может происходить аналогичное расщепление Е-кадгерина при помощи катепсинов В и L. Мы также увидели повышенную экспрессию катепсинов Н, К и Z, для которых были определены молекулярные механизмы участия этих ферментов в развитии рака простаты [44, 45] и печени [46]. Более того, результаты, полученные в настоящей работе, согласуются с литературными данными о том, что повышенный уровень катепсинов наблюдается при раке мозга [7–9, 47], груди [10–13], лёгких [19], кишечника [14, 15], кожи [16] и простаты [44, 45, 48, 49].

Интересно, что в опухолевых клетках почки происходит изменение соотношения форм катепсинов К и О в сторону зрелых форм этих ферментов. Зрелая форма катепсина К является каталитически активной и обычно образуется внутри лизосом [1]. Соответственно, преобладание зрелой формы катепсинов К и О в раковых клетках может свидетельствовать о более полном процессинге этих ферментов в лизосомах, ведущему к их полной активации.

Логично предположить, что онкогенная роль катепсинов К и О в развитии рака почки может быть обусловлена их более полной активацией. Гипотеза о том, что эффективное созревание катепсинов К и О обуславливает их активное вовлечение в процесс канцерогенеза, согласуется с недавно опубликованными данными о роли этих катепсинов в развитии рака предстательной железы [45] и груди [11].

Наличие множественных промежуточных форм катепсинов в опухолевых клетках почки можно объяснить каталитической активностью цистеиновых протеиназ. Известно, что катепсины К и V могут расщеплять катепсин С с образованием нескольких промежуточных форм [50]. Молекулярный вес этих промежуточных форм соответствует размерам фрагментов катепсина С, найденных нами в опухолевых клетках почки.

При анализе экспрессии цистеиновых катепсинов мы обнаружили, что экспрессия и формы катепсинов О, С, V, Н и L различаются в опухолевых клетках 769-Р и А-498. Используемые в данной работе опухолевые клеточные линии 769-Р и А-498 принадлежат к группе карцином почки. Некоторые исследователи относят линию А-498 к папиллярной клеточной карциноме почки, в то время как линия 769-Р принадлежит к группе светлоклеточного рака почки. Эти группы имеют разные молекулярные и гистологические характеристики [51, 52]. Так, например, в клеточных линиях 769-Р и А-498 наблюдался разный уровень роста клеток при добавлении растительных экстрактов [53], а также отличалась чувствительность клеток в ответ на TRAIL-индуцированный апоптоз [54]. Исходя из вышеуказанных молекулярных, морфологических и биохимических различий между клеточными линиями 769-Р и А-498, в них можно ожидать разного уровня экспрессии цистеиновых катепсинов и разного соотношения их процессированных форм.

В настоящей работе мы показали, что все 11 цистеиновых катепсинов присутствуют в ядрах как эмбриональных, так и опухолевых клеток почки. Эти результаты подтверждаются литературными данными о ядерной локализации ряда катепсинов в раковых клетках [15, 23, 25, 36, 49–58]. Вместе с тем мы впервые показали, что катепсины О, W, Z и К присутствуют не только в цитоплазме, но и в клеточном ядре.

Обнаруженная в настоящей работе ядерная локализация цистеиновых катепсинов в клетках рака почки подтверждается литературными данными об их канцерогенной роли

в клеточном ядре. Так, например, активная, зрелая форма катепсина L обнаруживается в ядре клеток колоректальной карциномы HCT116, где она участвует в нарушении клеточного цикла [57]. Более того, в этих клетках отсутствует физиологический ингибитор катепсина L — стефин В. Молекулярный механизм канцерогенного действия катепсина L в клеточном ядре связан с протеолизом транскрипционного фактора CDP/Cux, который участвует в регуляции клеточного цикла [59] и может выступать в роли онкогена [60]. Другой пример включает в себя катепсины В, К, L и S, ассоциированные с ядерной мембраной и регулирующие ядерный транспорт белков SMAD, которые являются важными компонентами сигнального пути TGF- β . Этот сигнальный путь играет важную роль как в развитии рака [61], так и в противораковом иммунитете [62]. Ещё один представитель семейства цистеиновых катепсинов, катепсин V, также обнаруживается в ядрах клеток карциномы щитовидной железы. Его укороченная N-терминальная ядерная форма, вероятно, участвует в нарушении клеточного цикла и вызывает гиперпролиферацию [24].

Результаты нашего исследования показывают, что в опухолевых клетках почки зрелые цистеиновые катепсины частично локализуются в ядрах клеток. Из литературных данных известно, что катепсины активируются при кислых значениях pH [63] или при помощи других протеиназ [50]. С другой стороны, повышение pH обычно приводит к потере катепсинами своей активности [64]. Мы предполагаем, что в pH-нейтральной среде клеточного ядра катепсины могут либо частично терять свою активность, либо менять свою субстратную специфичность, что позволяет предотвратить неспецифическую деградацию ядерных белков. Помимо этого, каталитическая активность катепсинов в ядре клетки может регулироваться их селективными ингибиторами стефинами, ядерная локализация которых подтверждается литературными данными [65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было проведено сравнение уровней экспрессии цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Мы определили, что экспрессия цистеиновых катепсинов V, B, Z, F и H повышена в опухолевых клетках. По наличию зрелых форм ферментов можно сделать вывод о том, что процессы созревания происходят более активно в опухолевых клетках по сравнению с эмбриональными. Также была описана локализация для всех 11 цистеиновых катепсинов в одной клеточной модели и обнаружено, что все эти ферменты в разной степени присутствуют в клеточном ядре. Важно, что часть катепсинов была обнаружена в ядре в активной форме, что позволяет предположить, что цистеиновые катепсины являются функционально активными не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток. Функции некоторых катепсинов с ядерной локализацией активно изучают, но молекулярные механизмы их действия и субстраты ещё только предстоит выявить. Мы надеемся, что результаты настоящей работы по изучению экспрессии и локализации цистеиновых катепсинов найдут своё применение в будущем, в том числе при поиске опухолевых маркеров в тканях пациентов с раком почки.

Вклад авторов. А.С.Ф., А.А.З. — концепция и руководство работой; А.С.Ф., Н.К.Т., И.И.К. — проведение экспериментов; А.С.Ф., Е.Ю.З., А.П., К.И.И., А.А.З. — обсуждение результатов исследования; А.С.Ф., А.А.З. — написание текста; А.С.Ф., К.И.И., А.А.З. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 21-75-30020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., and Shiri-Sverdlov, R. (2020) The ins and outs of cathepsins: physiological function and role in disease management, *Cells*, **9**, 1679, doi: 10.3390/cells9071679.
2. Manchanda, M., Fatima, N., Chauhan, S.S. (2017) Physiological and Pathological Functions of Cysteine Cathepsins. In: *Proteases in Physiology and Pathology*, Springer, Singapore, doi: 10.1007/978-981-10-2513-6_11.
3. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new

- frontiers, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1824**, 68–88, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002.
4. Bestvater, F., Dallner, C., and Spiess, E. (2005) The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability, *BMC Cell Biol.*, **6**, 16, doi: 10.1186/1471-2121-6-16.
 5. Hsing, L. C., and Rudensky, A. Y. (2005) The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation, *Immunol. Rev.*, **207**, 229–241, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x.
 6. Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., and Tolosa, E. (2009) Cathepsin W expressed exclusively in CD8⁺ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs, *Exp. Hematol.*, **37**, 266–275, doi: 10.1016/J.EXPHEM.2008.10.011.
 7. Cheng, X., Ren, Z., Liu, Z., Sun, X., Qian, R., Cao, C., Liu, B., Wang, J., Wang, H., Guo, Y., et al. (2022) Cysteine cathepsin C: a novel potential biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma, *Cancer Cell Int.*, **22**, 53, doi: 10.1186/S12935-021-02417-6.
 8. Majc, B., Habič, A., Novak, M., Rotter, A., Porčnik, A., Mlakar, J., Župunski, V., Fonović, U. P., Knez, D., Zidar, N., et al. (2022) Upregulation of cathepsin X in glioblastoma: interplay with γ -enolase and the effects of selective cathepsin X inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1784, doi: 10.3390/ijms23031784.
 9. Verbovšek, U., Motaln, H., Rotter, A., Atai, N. A., Gruden, K., Van Noorden, C. J. F., and Lah, T. T. (2014) Expression analysis of all protease genes reveals cathepsin K to be overexpressed in glioblastoma, *PLoS One*, **9**, e0142116, doi: 10.1371/journal.pone.0111819.
 10. Xiao, Y., Cong, M., Li, J., He, D., Wu, Q., Tian, P., Wang, Y., Yang, S., Liang, C., Liang, Y., et al. (2021) Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular Trap formation, *Cancer Cell*, **39**, 423–437, doi: 10.1016/J.CCELL.2020.12.012.
 11. Cairns, J., Ingle, J. N., Wickerham, L. D., Weinshilboum, R., Liu, M., and Wang, L. (2017) SNPs near the cysteine proteinase cathepsin O gene (CTSO) determine tamoxifen sensitivity in ER α -positive breast cancer through regulation of BRCA1, *PLoS Genet.*, **13**, e1007031, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1007031.
 12. Santamaría, I., Velasco, G., Cazorla, M., Fueyo, A., Campo, E., and López-Otín, C. (1998) Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas, *Cancer Res.*, **58**, 1624–1630.
 13. Sereesongsang, N., McDowell, S. H., Burrows, J. F., Scott, C. J., and Burden, R. E. (2020) Cathepsin V suppresses GATA3 protein expression in luminal A breast cancer, *Breast Cancer Res.*, **22**, 139, doi: 10.1186/S13058-020-01376-6.
 14. Schweiger, A., Christensen, I. J., Nielsen, H. J., Sørensen, S., Brünner, N., and Kos, J. (2018) Serum cathepsin H as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer, *Int. J. Biol. Markers*, **19**, 289–294, doi: 10.1177/172460080401900406.
 15. Tamhane, T., Njenga, R. W., Burden, R. E., Büth, H., Maeldansmo, G. M., Haugen, M. H., Scott, C. J., and Brix, K. (2021) Trafficking of full-length and N-terminally truncated cathepsin B in human colorectal carcinoma cells, *Appl. Sci.*, **11**, 11936, doi: 10.3390/app112411936.
 16. Kos, J., Stabuc, B., Schweiger, A., Krasovec, M., Cimerman, N., Kopitar-Jerala, N., and Vrhovec, I. (1997) Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients, *Clin Cancer Res.*, **3**, 1815–1822.
 17. Dheilly, E., Battistello, E., Katanayeva, N., Sungalee, S., Michaux, J., Duns, G., Wehrle, S., Sordet-Dessimoz, J., Mina, M., Racle, J., et al. (2020) Cathepsin S regulates antigen processing and T cell activity in non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Cell*, **37**, 674–689, doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.016.
 18. Haider, A. S., Peters, S. B., Kaporis, H., Cardinale, I., Fei, J., Ott, J., Blumenberg, M., Bowcock, A. M., Krueger, J. G., and Carucci, J. A. (2006) Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 869–881, doi: 10.1038/sj.jid.5700157.
 19. Yang, L., Zeng, Q., Deng, Y., Qiu, Y., Yao, W., and Liao, Y. (2022) Glycosylated cathepsin V serves as a prognostic marker in lung cancer, *Front. Oncol.*, **12**, 876245, doi: 10.3389/fonc.2022.876245.
 20. Teller, A., Jechorek, D., Hartig, R., Adolf, D., Reißig, K., Roessner, A., and Franke, S. (2015) Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer, *Pathol. Res. Pract.*, **211**, 62–70, doi: 10.1016/j.prp.2014.09.005.
 21. Kiuchi, S., Tomaru, U., Ishizu, A., Imagawa, M., Kiuchi, T., Iwasaki, S., Suzuki, A., Otsuka, N., Deguchi, T., Shimizu, T., et al. (2017) Expression of cathepsins V and S in thymic epithelial tumors, *Hum. Pathol.*, **60**, 66–74, doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.027.
 22. Rudzińska, M., Parodi, A., Maslova, V. D., Efremov, Y. M., Gorokhovets, N. V., Makarov, V. A., Popkov, V. A., Golovin, A. V., Zernii, E. Y., and Zamyatnin, A. A. (2020) Cysteine cathepsins inhibition affects their expression and human renal cancer cell phenotype, *Cancers (Basel)*, **12**, 1310, doi: 10.3390/cancers12051310.
 23. Caliò, A., Brunelli, M., Gobbo, S., Argani, P., Munari, E., Netto, G., and Martignoni, G. (2021) Cathepsin K: a novel diagnostic and predictive biomarker for renal tumors, *Cancers (Basel)*, **13**, 2441, doi: 10.3390/cancers13102441.

24. Al-Hashimi, A., Venugopalan, V., Sereesongsang, N., Tedelind, S., Pinzaru, A. M., Hein, Z., Springer, S., Weber, E., Führer, D., Scott, C. J., et al. (2020) Significance of nuclear cathepsin V in normal thyroid epithelial and carcinoma cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1867**, 118846, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118846.
25. Tedelind, S., Poliakova, K., Valeta, A., Hunegnaw, R., Yemanaberhan, E. L., Heldin, N. E., Kurebayashi, J., Weber, E., Kopitar-Jerala, N., Turk, B., Bogoyo, M., and Brix, K. (2010) Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells, *Biol. Chem.*, **391**, 923-935, doi: 10.1515/BC.2010.109.
26. Kothapalli, R., Bailey, R. D., Kusmartseva, I., Mane, S., Epling-Burnette, P. K., and Loughran, T. P. (2003) Constitutive expression of cytotoxic proteases and down-regulation of protease inhibitors in LGL leukemia, *Int. J. Oncol.*, **22**, 33-39, doi: 10.3892/ijo.22.1.33.
27. Rudzinska-Radecka, M., Frolova, A. S., Balakireva, A. V., Gorokhovets, N. V., Pokrovsky, V. S., Sokolova, D. V., Korolev, D. O., Potoldykova, N. V., Vinarov, A. Z., Parodi, A., et al. (2022) *In silico, in vitro*, and clinical investigations of cathepsin B and stefin A mRNA expression and a correlation analysis in kidney cancer, *Cells*, **11**, 1455, doi: 10.3390/CELLS11091455.
28. El-Nadi, M., Hassan, H., Amer, M., Mohamed, M. M., El-Shinawi, M., and Ibrahim, S. A. (2019) Cathepsin L is a potential marker for triple-negative breast cancer, *Egypt. Acad. J. Biol. Sci. C Physiol. Mol. Biol.*, **11**, 29-36, doi: 10.21608/EAJBSC.2019.26817.
29. Vizin, T., Christensen, I., Nielsen, H., and Kos, J. (2012) Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis, *Radiol. Oncol.*, **46**, 207, doi: 10.2478/V10019-012-0040-0.
30. Tan, G.-J., Peng, Z.-K., Lu, J.-P., and Tang, F.-Q. (2013) Cathepsins mediate tumor metastasis, *World J. Biol. Chem.*, **4**, 91, doi: 10.4331/WJBC.V4.I4.91.
31. Chen, C. H., Bhasin, S., Khanna, P., Joshi, M., Joslin, P. M., Saxena, R., Amin, S., Liu, S., Sindhu, S., Walker, S. R., et al. (2019) Study of cathepsin B inhibition in VEGFR TKI treated human renal cell carcinoma xenografts, *Oncogenesis*, **8**, 15, doi: 10.1038/S41389-019-0121-7.
32. Gondi, C. S., and Rao, J. S. (2013) Cathepsin B as a cancer target, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**, 281, doi: 10.1517/14728222.2013.740461.
33. Sevenich, L., Schurigt, U., Sachse, K., Gajda, M., Werner, F., Müller, S., Vasiljeva, O., Schwinde, A., Klemm, N., Deussing, J., et al. (2010) Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2497, doi: 10.1073/PNAS.0907240107.
34. Soond, S. M., Kozhevnikova, M. V., Frolova, A. S., Savvateeva, L. V., Plotnikov, E. Y., Townsend, P. A., Han, Y. P., and Zamyatnin, A. A. (2019) Lost or forgotten: the nuclear cathepsin protein isoforms in cancer, *Cancer Lett.*, **462**, 43-50, doi: 10.1016/j.canlet.2019.07.020.
35. Hiwasa, T., and Sakiyama, S. (1996) Nuclear localization of procathepsin L/MEP in *ras*-transformed mouse fibroblasts, *Cancer Lett.*, **99**, 87-91, doi: 10.1016/0304-3835(95)04041-2.
36. Sullivan, S., Tosetto, M., Kevans, D., Coss, A., Wang, L., O'Donoghue, D., Hyland, J., Sheahan, K., Mulcahy, H., and O'Sullivan, J. (2009) Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer, *Int. J. Cancer*, **125**, 54-61, doi: 10.1002/ijc.24275.
37. Senin, I. I., Tikhomirova, N. K., Churumova, V. A., Grigoriev, I. I., Kolpakova, T. A., Zinchenko, D. V., Philippov, P. P., and Zernii, E. Y. (2011) Amino acid sequences of two immune-dominant epitopes of recoverin are involved in Ca²⁺/recoverin-dependent inhibition of phosphorylation of rhodopsin, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 332-338, doi: 10.1134/S0006297911030060.
38. Dyer, R. B., and Herzog, N. K. (1995) Isolation of intact nuclei for nuclear extract preparation from a fragile B-lymphocyte cell line, *Biotechniques*, **19**, 192-195.
39. Olson, O. C., and Joyce, J. A. (2015) Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 712-729, doi: 10.1038/nrc4027.
40. Fujimoto, T., Tsunedomi, R., Matsukuma, S., Yoshimura, K., Oga, A., Fujiwara, N., Fujiwara, Y., Matsui, H., Shindo, Y., Tokumitsu, Y., et al. (2021) Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells and is associated with patients' surgical outcomes, *Oncol. Lett.*, **21**, 30, doi: 10.3892/OL.2020.12291.
41. Singh, N., Das, P., Gupta, S., Sachdev, V., Srivasatava, S., Datta Gupta, S., Pandey, R. M., Sahni, P., Chauhan, S. S., and Saraya, A. (2014) Plasma cathepsin L: a prognostic marker for pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 17532, doi: 10.3748/WJG.V20.I46.17532.
42. Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J. A. (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis, *Genes Dev.*, **20**, 543-556, doi: 10.1101/gad.1407406.
43. Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., and Looi, C. Y. (2019) The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges, *Cells*, **8**, 1118, doi: 10.3390/CELLS8101118.
44. Jevnikar, Z., Rojnik, M., Jamnik, P., Doljak, B., Fonović, U. P., and Kos, J. (2013) Cathepsin H

- mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 2201-2209, doi: 10.1074/JBC.M112.436394.
45. Wu, N., Wang, Y. Z., Wang, K. K., Zhong, B. Q., Liao, Y. H., Liang, J. M., and Jiang, N. (2022) Cathepsin K regulates the tumor growth and metastasis by IL-17/CTSK/EMT axis and mediates M2 macrophage polarization in castration-resistant prostate cancer, *Cell Death Dis.*, **13**, 813, doi: 10.1038/s41419-022-05215-8.
 46. Wang, J., Chen, L., Li, Y., and Guan, X. Y. (2011) Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma, *PLoS One*, **6**, 24967, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0024967.
 47. Sivaparthi, M., Sawaya, R., Gokaslan, Z. L., Chintala, K. S., and Rao, J. S. (1996) Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion, *Cancer Lett.*, **104**, 121-126, doi: 10.1016/0304-3835(96)04242-5.
 48. Rojnik, M., Jevnikar, Z., Mirkovic, B., Janes, D., Zidar, N., Kikelj, D., and Kos, J. (2011) Cathepsin H indirectly regulates morphogenetic protein-4 (BMP-4) in various human cell lines, *Radiol. Oncol.*, **45**, 259, doi: 10.2478/V10019-011-0034-3.
 49. Burton, L. J., Dougan, J., Jones, J., Smith, B. N., Randle, D., Henderson, V., and Otero-Marah, V. A. (2017) Targeting the nuclear cathepsin L CCAAT displacement protein/cut homeobox transcription factor-epithelial mesenchymal transition pathway in prostate and breast cancer cells with the Z-FY-CHO inhibitor, *Mol. Cell. Biol.*, **37**, e00297-16, doi: 10.1128/MCB.00297-16.
 50. Lamort, A. S., Hamon, Y., Czaplewski, C., Gielon, A., Seren, S., Coquet, L., Lecaille, F., Lesner, A., Lalmanach, G., Gauthier, F., et al. (2019) Processing and maturation of cathepsin C zymogen: a biochemical and molecular modeling analysis, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4747, doi: 10.3390/IJMS20194747.
 51. Brodaczevska, K. K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., and Czarnecka, A. M. (2016) Choosing the right cell line for renal cell cancer research, *Mol. Cancer*, **15**, 83, doi: 10.1186/S12943-016-0565-8.
 52. Sinha, R., Winer, A. G., Chevinsky, M., Jakubowski, C., Chen, Y. B., Dong, Y., Tickoo, S. K., Reuter, V. E., Russo, P., Coleman, J. A., et al. (2017) Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection, *Nat. Commun.*, **8**, 15165, doi: 10.1038/ncomms15165.
 53. Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., and Silva, B. M. (2010) Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L., *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 441-447, doi: 10.1016/j.fct.2009.10.043.
 54. Griffith, T. S., Fialkov, J. M., Williams, R. D., Scott, D. L., Azuhata, T., Sandler, A. D., Wall, N. R., and Altieri, D. C. (2002) Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma, *Cancer Res.*, **62**, 3093-3099.
 55. Yang, Z., Liu, Y., Qin, L., Wu, P., Xia, Z., Luo, M., Zeng, Y., Tsukamoto, H., Ju, Z., Su, D., et al. (2017) Cathepsin H-mediated degradation of HDAC4 for matrix metalloproteinase expression in hepatic stellate cells, *Am. J. Pathol.*, **187**, 781-797, doi: 10.1016/J.AJP.2016.12.001.
 56. Goulet, B., Sansregret, L., Leduy, L., Bogoyo, M., Weber, E., Chauhan, S. S., and Nepveu, A. (2007) Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation, *Mol. Cancer Res.*, **5**, 899-907, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0160.
 57. Tamhane, T., Llukumbura, R., Lu, S., Maeldandsmo, G. M., Haugen, M. H., and Brix, K. (2016) Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells, *Biochimie*, **122**, 208-218, doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.003.
 58. Maubach, G., Lim, M. C., and Zhuo, L. (2008) Nuclear cathepsin F regulates activation markers in rat hepatic stellate cells, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4238-4248, doi: 10.1091/mbc.e08-03-0291.
 59. Goulet, B., Truscott, M., and Nepveu, A. A. (2006) Novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L, *Biol. Chem.*, **387**, 1285-1293, doi: 10.1515/BC.2006.159.
 60. Feng, F., Zhao, Z., Zhou, Y., Cheng, Y., Wu, X., and Heng, X. (2021) CUX1 facilitates the development of oncogenic properties via activating Wnt/ β -catenin signaling pathway in glioma, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 705008, doi: 10.3389/FMOLB.2021.705008.
 61. Zhao, M., Mishra, L., and Deng, C. X. (2018) The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer, *Int. J. Biol. Sci.*, **14**, 111, doi: 10.7150/IJBS.23230.
 62. MaruYama, T., Chen, W. J., and Shibata, H. (2022) TGF- β and cancer immunotherapy, *Biol. Pharm. Bull.*, **45**, 155-161, doi: 10.1248/BPB.B21-00966.
 63. Turk, B., Dolenc, I., Lenarcic, B., Krizaj, I., Turk, V., Bieth, J. G., and Björk, I. (1999) Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity, *Eur. J. Biochem.*, **259**, 926-932, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00145.x.
 64. Turk, B., Dolenc, I., Zerovnik, E., Turk, D., Gubensek, F., and Turk, V. (1994) Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site, *Biochemistry*, **33**, 14800-14806, doi: 10.1021/bi00253a019.
 65. Paraoan, L., Ratnayaka, A., Spiller, D. G., Hiscott, P., White, M. R. H., and Grierson, I. (2004) Unexpected intracellular localization of the AMD-associated cystatin C variant, *Traffic*, **5**, 884-895, doi: 10.1111/J.1600-0854.2004.00230.X.

EXPRESSION, INTRACELLULAR LOCALIZATION AND MATURATION OF CYSTEINE CATHEPSINS IN RENAL EMBRYONIC AND CANCER CELL LINES

A. S. Frolova^{1,2}, N. K. Tikhomirova³, I. I. Kireev³, E. Yu. Zernii³, A. Parodi²,
K. I. Ivanov², and A. A. Zamyatnin, Jr.^{1,2,3,4*}

¹ *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

² *Scientific Center for Translation Medicine, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

³ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru*

⁴ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

Cysteine cathepsins play an important role in tumor development and metastasis. The expression of these enzymes is often increased in many types of tumor cells. Cysteine cathepsins contribute to carcinogenesis through a number of mechanisms, including proteolysis of extracellular matrix and signaling molecules on the cell surface, as well as degradation of transcription factors and disruption of signaling cascades in the cell nucleus. Distinct oncogenic functions have been reported for several members of the cysteine cathepsin family in various types of cancer, but a comparative study of all eleven cysteine cathepsins in one experimental model is still missing. In this work, we assessed and compared the expression, localization, and maturation of all eleven cysteine cathepsins in embryonic kidney cells HEK293 and kidney cancer cell lines 769-P and A-498. We found that the expression of cathepsins V, B, Z, L, and S was 3- to 9-fold higher in kidney tumor cells than in embryonic cells. We also showed that all cysteine cathepsins were present in varying amounts in the nucleus of both embryonic and tumor cells. Notably, more than half of the cathepsin Z or K and over 88% of cathepsin F were localized in tumor cell nuclei. Moreover, mature forms of cysteine cathepsins were more prevalent in tumor cells than in embryonic cells. These results can be further used to develop novel diagnostic tools and may assist in the investigation of cysteine cathepsins as potential therapeutic targets.

Keywords: cysteine cathepsins, subcellular localization, protein expression, protease maturation, renal cancer