

УДК 576.52:577.112

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *gapdh* В ОРГАНАХ МЫШЕЙ, НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ *insrr*

© 2022 г. Е. А. Ганцова<sup>1,\*</sup>, А. А. Гавриленкова<sup>1,2</sup>, О. В. Серова<sup>1</sup>, И. Е. Деев<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН А.Г. Габитовым

Поступило 15.04.2022 г.

После доработки 10.05.2022 г.

Принято к публикации 10.05.2022 г.

Важнейшим свойством живого организма является поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия и ионного состава внутренней среды. Почка является одним из основных органов, регулирующих рН в организме. Рецепторная тирозинкиназа IRR (рецептор, подобный рецептору инсулина) является сенсором щелочного рН. У мышей (*Mus Musculus*) с нокаутом гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, в условиях щелочной нагрузки наблюдается нарушение секреции бикарбоната, что свидетельствует о роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. С целью поиска белков, функционально связанных с рецепторной тирозинкиназой IRR, нами было проведено широкомасштабное секвенирование транскриптомов почек мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, которых содержали в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. В результате мы обнаружили снижение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по гену *insrr*, в сравнении с мышами дикого типа. Данные РНК-секвенирования подтвердили методами TaqMan ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттинга. Используя метод TaqMan ПЦР в реальном времени, мы выявили снижение уровня экспрессии *gapdh* не только в почках, но и в печени и мозге мышей, нокаутных по гену *insrr*. Таким образом, изменение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи генов, и о возможной роли GAPDH в ранее не описанных молекулярных механизмах регуляции кислотно-основного баланса в организме.

**Ключевые слова:** *gapdh*, IRR, рецепторные тирозинкиназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

**DOI:** 10.31857/S2686738922040151

Одним из важнейших свойств живого организма является поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия и ионного состава внутренней среды, необходимого для жизнедеятельности клеток в условиях влияния внешних и внутренних факторов. Почка и легкие являются основными органами, регулируемыми рН в организме [1]. Почка регулирует кислотно-щелочное равновесие, увеличивая или снижая концентрацию ионов  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{H}^+$  в жидкостях организ-

ма. Ключевую роль в этих процессах играют вставочные клетки собирательных трубочек почки. Так,  $\alpha$ -вставочные клетки секретируют в мочу избыток кислоты и реабсорбируют бикарбонат в кровь,  $\beta$ -вставочные клетки секретируют бикарбонат и реабсорбируют кислоту.

Изучение регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме привело к открытию рН-чувствительных молекул, свойства и активность которых регулируется при изменении рН среды. Одним из сенсоров щелочного рН является рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), член семейства рецептора инсулина, которое также включает рецептор инсулина (IR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) [2]. В отличие от своих близких гомологов рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некото-

<sup>1</sup> ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОБУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия

\*e-mail: gantsova@mail.ru

рых органах, в определенных типах клеток. В почке IRR экспрессируется в  $\beta$ -вставочных клетках собирательных трубочек. У мышей с нокаутом по гену *insrr*, кодирующему рецептор IRR, в условиях щелочной нагрузки наблюдается нарушение секреции бикарбоната, а именно вывод его с мочой, что свидетельствует о роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме [3]. Также есть данные о том, что IRR экспрессируется в сердце и вместе с гомологами обеспечивает систему для стимуляции синтеза белка, обладает кардиопротекторными свойствами [4]. На данный момент молекулярные механизмы, лежащие в основе функционирования рецептора IRR, не известны. С целью поиска белков, функционально связанных с рецепторной тирозинкиназой IRR, нами было проведено широкомасштабное секвенирование транскриптома почек мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, которых содержали в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. Данные РНК-секвенирования подтверждали методами TaqMan ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттингом.

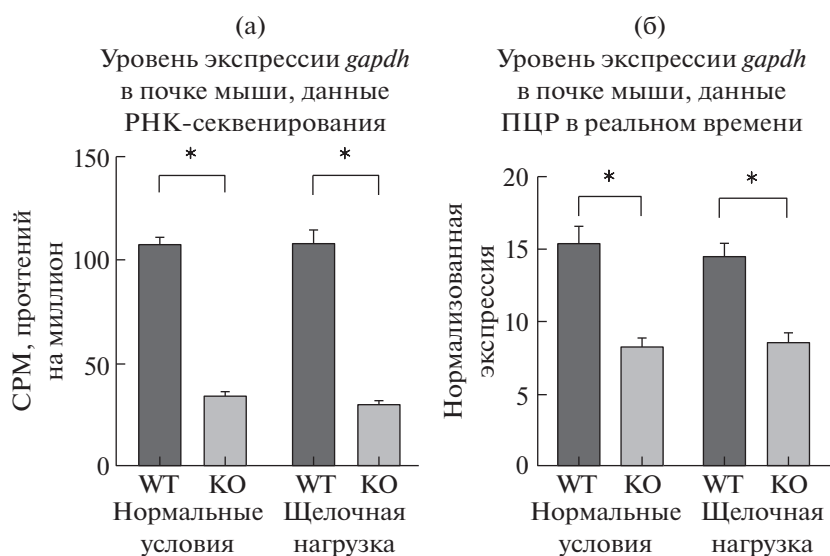
Мыши с нокаутом гена *insrr*<sup>-/-</sup> были получены ранее на основе линии мышей C57Bl/6J. Для минимизации эффекта накопления мутаций был использован метод разведения мышей литтермейтсов, потомков одного поколения гетерозигот. В экспериментах использовали самок мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*<sup>-/-</sup> одного возраста, 3–4 мес. Животных обоих генотипов (по 4 животных в каждой группе) содержали в двух условиях. При нормальных условиях мышей поили водой. В условиях щелочной нагрузки в течение 7 дней в воду для питья добавляли 280 мМ бикарбоната натрия. Показано, что при данных условиях у мышей или крыс развивается легкий метаболический алкалоз [5–7]. Для выравнивания метаболического статуса животных за 12 ч до извлечения органов у мышей забирали пищу, но оставляли питье. Перед выделением органов животных усыпляли с помощью анестезирующих препаратов, золетил 20 мг/кг массы тела, ксилазин 5 мг/кг массы тела в 0.9% растворе NaCl. Затем мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом комитета по уходу и использованию животных (IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee), утвержденным Комиссией по биоэтике Института биоорганической химии им. Шемякина–Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Был проведен сравнительный анализ транскриптомов почек однопометных мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена *insrr*, который кодирует рецепторную тирозинкиназу IRR, методом глубокого РНК-секвенирования. Для РНК-секвенирования вырезали сегмент почки толщи-

ной 3 мм из срединного отдела, помещали в буфер RNAlater и передавали для дальнейшего исследования в ЗАО “Геноаналитика” (Россия, Москва). Секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq 2500. Считывания RNA-Seq были сопоставлены с эталонным геномом мыши (mm10) с помощью STAR. Для количественной оценки уровней экспрессии всех аннотированных генов использовались считывания с уникальным картированием (Ensembl v.92). Количество общих генов было нормализовано до CPM (количество на миллион) с помощью EdgeR. Анализ дифференциальной экспрессии также выполняли с использованием EdgeR. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Software, USA). Данные, полученные для животных двух генотипов, соответствовали критерию нормальной выборки (критерий Шапиро–Уилка). Поэтому для расчета статистической значимости двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента, результаты считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

В результате транскриптом содержал 13 430 генов, из которых при нокауте гена *insrr* в нормальных условиях достоверно изменяют свою дифференциальную экспрессию 2316 генов, из них 1348 генов с увеличенной экспрессией, 968 – с уменьшенной экспрессией. В условиях щелочной нагрузки достоверно изменили дифференциальную экспрессию 2879 генов, из них 1504 генов с увеличенной экспрессией и 1375 генов с пониженной экспрессией у мышей, нокаутных по *insrr*. Полученные данные были проанализированы с помощью базы данных PANTHER (pantherdb.org) для получения сведений о биологических процессах и сигнальных путях, в которые вовлечены гены с измененной экспрессией при нокауте гена *insrr*. Выявлены гены, связанные с сигнальным путем рецептора гонадолиберина, рецептора холецистокинина, а также гены цитокинов и белков клеточной адгезии. Гонадолиберин стимулирует развитие преимплантационных эмбрионов мыши, что представляет большой интерес, так как ранее нами было показано влияние рецепторной тирозинкиназы IRR на развитие преимплантационных эмбрионов мыши [8]. Среди биологических процессов обнаружены изменения экспрессии генов, участвующих в организации клеточных компонентов, генов-регуляторов, которые кодируют ДНК- и РНК-связывающие белки, факторы транскрипции и др. Выделили 1138 генов, вовлеченных в метаболические процессы клетки, среди которых множество генов, участвующих в синтезе метаболитов и связанных с энергетическими процессами в клетке.

По данным, полученным в результате РНК-секвенирования, мы наблюдали значительное сни-



**Рис. 1.** а – Данные РНК-секвенирования почек мышей для гена *gapdh* (количество животных в каждой группе  $n = 4$ ); б – результаты ПЦР в реальном времени для образцов кДНК из почек мыши для гена *gapdh* ( $*p < 0.05$ ). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

жение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по гену *insrr* (рис. 1а).

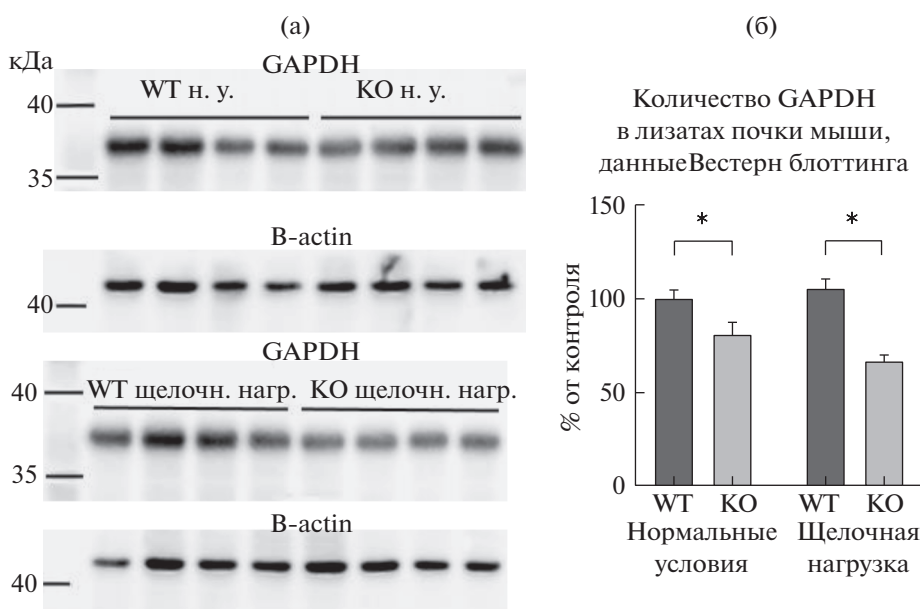
Ген *gapdh* часто используется в качестве референсного гена при проведении ПЦР в реальном времени. Однако достоверная разница экспрессии *gapdh* в двух генотипах при разных условиях не позволяет использовать этот ген в качестве референсного при проведении ПЦР в реальном времени в случае мышей, нокаутных по гену *insrr*. При поиске референсных генов для ПЦР в реальном времени, с помощью литературных данных [9], были подобраны два гена, экспрессия которых по данным РНК-секвенирования не изменялась у животных разного генотипа при различных условиях – *Ap3d1* и *Csnk2a2*. *Ap3d1* – ген, кодирующий субъединицу адаптерного белка, участвующего в транспорте везикул в аппарате Гольджи. *Csnk2a2* – ген, кодирующий каталитическую субъединицу конститутивно активной серин/треонин-протеинкиназы. В ходе экспериментов были получены образцы РНК из почек мышей, которую использовали для синтеза

кДНК с помощью обратной транскриптазы. Полученную кДНК использовали как матрицу для ПЦР в реальном времени. Для каждого гена были подобраны специфичные праймеры и зонд с флуоресцентной меткой (см. табл. 1), синтезированные компаниями Lumiprobe и ЕвроГен (Москва, Россия), содержащие флуорофор FAM и тушитель VHQ1. Для дизайна праймеров использовали программы GeneRunner, OligoExplorer, OligoAnalyzer. Ген *Ap3d1* показал более высокий и стабильный уровень экспрессии и был выбран основным референсным геном для подсчета данных ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили на приборе DTrime фирмы ДНК-технология (Россия, Москва), для каждого образца кДНК в трех повторах. Нормализованную относительно референсного гена экспрессию рассчитывали по протоколу, описанному в [10].

По данным ПЦР в реальном времени экспрессия гена *gapdh* в почке мыши снижается на 54% ( $p < 0.05$ ) при нокауте гена *insrr* (рис. 1б). В условиях щелочной нагрузки у нокаутных по *insrr* мы-

**Таблица 1.** Праймеры и зонды TaqMan для ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер от 5' к 3'	TaqMan зонд от 5' к 3'	Обратный праймер от 5' к 3'	Размер продукта, п.н.
<i>Ap3d1</i>	tcagtgcctctgaaagtcc	ctggaggagcagcgcgaca	agagagctgtggcgcc	139
<i>Csnk2a2</i>	cagagctccttgtggactatca	ctgcatgttagcgagcatgatattccgaa	acaagctggcatagtgtcc	129
<i>Gapdh</i>	ttgtcagcaatgcatcct	tggccaaggtcatccatgaca	ctgtgtgcatgagccct	115



**Рис. 2.** а – Вестерн-блот анализ тотальных лизатов почек мышей. Слева указано положение белковых маркеров в геле, кДа, сверху указаны антитела, которыми производили окраску; б – количественный анализ экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (количество животных в каждой группе  $n = 4$ ,  $*p < 0.05$ ). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

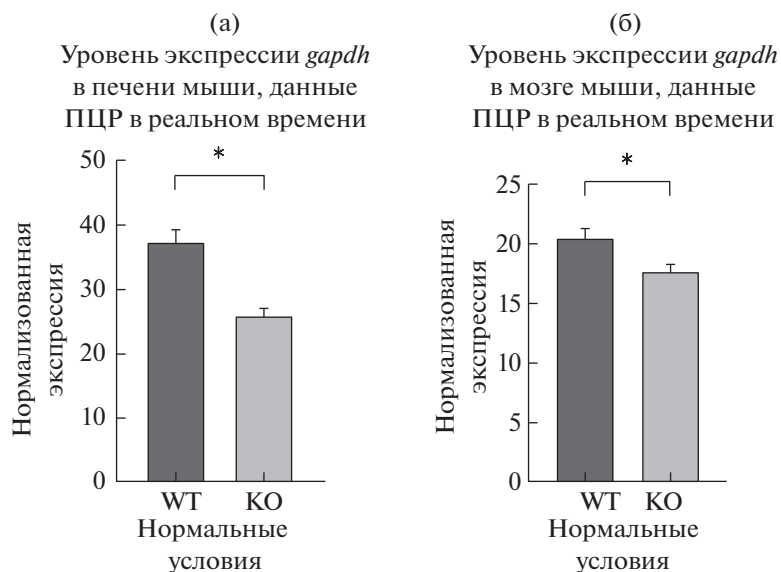
шей также наблюдалось снижение на 59% уровня экспрессии *gapdh* по сравнению с мышами дикого типа ( $p < 0.05$ ). При этом в двух условиях уровни экспрессии гена *gapdh* оставались примерно одинаковыми и для животных дикого типа, и для нокаутных по *insrr*. Таким образом, можно предположить, что изменение экспрессии гена *gapdh* не связано с условиями экспериментального алкалоза.

Помимо анализа экспрессии мРНК, мы провели анализ экспрессии GAPDH на белковом уровне методом Вестерн блоттинга на образцах тотальных лизатов почек мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, содержащихся в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. В каждой группе было по 4 животных. Для получения белковых лизатов из животных извлекали почки, гомогенизировали в бездетергентном буфере на керамических шариках Lysing matrix D (MP Biomedicals) с использованием классической настольной системы для лизиса FastPrep-24 (MP Biomedicals), содержащем Tris-HCl 100 мМ, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma Aldrich), PMSF 1 мМ. Затем добавляли додецилсульфат натрия (SDS) до конечной концентрации 2%. Концентрацию белка определяли реагентом Coomassie Protein Assay kit (Sigma Aldrich) согласно протоколу производителя.

Белковые лизаты анализировали методом вестерн блоттинга с антителами anti-GAPDH 1:1000 (SC #25778), anti- $\beta$ -actin 1:5000 (Cell Signaling

#3700). Для количественного анализа вестерн блоттинга использовали программу Fusion Solo (Vilber Lourmat). Сигналы на блотах анализировали денситометрией. В качестве контрольного белка использовали  $\beta$ -актин, экспрессия которого не меняется в почках мышей обоих генотипов в двух условиях по данным РНК-секвенирования. Определено отношение сигнала GAPDH к актину в каждом из образцов белковых лизатов почки. Отношение плотности сигнала пересчитали в процентах, где за 100% приняли среднее значение сигнала в лизатах почки животных дикого типа в нормальных условиях. По данным вестерн блоттинга (см. рис. 2) было выявлено снижение количества белка GAPDH в почках животных, нокаутных по гену *insrr* как при нормальных условиях (на 19%), так и в условиях щелочной нагрузки (на 39%,  $p < 0.05$ ).

Ген *gapdh*, который относится к генам “домашнего хозяйства”, кодирует фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Эти гены являются конститутивными генами, которые необходимы для поддержания основных клеточных функций и стабильно экспрессируются во всех клетках организма при любых условиях и на всех стадиях развития [11]. Однако ранее были показаны различия в уровнях экспрессии мРНК *gapdh* между разными тканями. Ген *gapdh* экспрессируется во всех органах, наибольшее количество мРНК обнаруживается в тканях с активным энергопотреблением, в скелетных и сердеч-



**Рис. 3.** а – Результаты ПЦР в реальном времени для образцов кДНК из печени мыши для гена *gapdh*, б – результаты ПЦР в реальном времени для образцов кДНК из печени мыши для гена *gapdh* (количество животных в каждой группе  $n = 4$ ,  $*p < 0.05$ ). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

ной мышцах [12]. Уровень экспрессии мРНК GAPDH может меняться с возрастом и статусом питания, что было показано на модели цыплят на ранних сроках после вылупления [13]. Так же есть сведения, что уровень мРНК гена *gapdh* примерно одинаков для тканей почки, печени и мозга [14]. Далее мы провели исследования образцов кДНК из печени и мозга мыши методом TaqMan ПЦР в реальном времени, чтобы понять, характерно ли снижение экспрессии гена *gapdh*, наблюдаемое в почках, для других органов. Результаты показаны на рис. 3, где видно, что снижение экспрессии гена *gapdh* у нокаутных по *insrr* животных характерно также для печени (рис. 3а) и мозга (рис. 3б), все изменения достоверны ( $p < 0.01$ ). Для печени и мозга показано снижение экспрессии гена *gapdh* на 30.5 и 13.7% соответственно.

GAPDH хорошо известен как один из ключевых ферментов, участвующих в гликолизе. Помимо своей роли в гликолизе GAPDH участвует во множестве внутриклеточных процессов, таких как апоптоз, транспорт железа, слияние мембран, регуляция транскрипции, транспорт везикул от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи, а также клеточная реакция на воздействия окружающей среды, например, при окислительном стрессе или гипоксии [15]. В почке млекопитающих показано, что GAPDH связан с хлоридно-бикарбонатным обменником AE1 (*slc4a1*), который отвечает за реабсорбцию бикарбоната в  $\alpha$ -вставочных клетках собирательной трубочки.  $\alpha$ -вставочные клетки почек отвечают

за выведение избытка кислот из организма и реабсорбцию бикарбоната в кровь, участвуя таким образом в поддержании кислотно-основного гомеостаза. Для C-конца белка AE1 в почке характерно связывание с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, которое обеспечивает его локализацию на мембране [16]. Исходя из этого, можно предположить участие GAPDH в регуляции кислотно-основного баланса в почке.

Показано, что GAPDH участвует во многих событиях, которые связаны с общим процессом передачи сигналов инсулина, включая сигнальные пути белков PI3K, Akt, Rab [14]. Интересно, что взаимодействие между GAPDH (т.е. фосфорилированной формой фермента) и фосфорилированным Akt в сердечной мышце крыс возникает при повышении глюкозы в крови [17]. Рецепторы инсулинового семейства, в том числе IIR, так же задействуют сигнальные пути, связанные с PI3K и Akt белками. Снижение уровня экспрессии белка GAPDH может приводить к изменению уровня метаболизма у мышей, нокаутных по гену *insrr*, о чем свидетельствуют и наши предыдущие исследования [18]. Ранее мы показали, что у мышей, несущих нокаут *insrr*  $-/-$ , наблюдаются поведенческие особенности в виде снижения агрессивно-оборонительного поведения [19], что может быть связано с изменением экспрессии ряда генов, в том числе *gapdh* в мозге нокаутных мышей.

Ген *gapdh* используется в качестве гена сравнения для ПЦР в реальном времени в большинстве

современных исследований. Полученные в ходе наших экспериментов данные не позволяют использовать этот ген как референсный для анализа экспрессии генов мышей, нокаутных по *insrr*. Для животной модели, используемой в эксперименте, нами был выбран ген *Ap3d1* в качестве референсного. В данной работе мы показали снижение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, методами РНК-секвенирования, ТаqМан ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттинга, как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Методом ТаqМан ПЦР в реальном времени мы выявили также снижение уровня экспрессии *gapdh* не только в почках, но и в печени и мозге мышей, нокаутных по *insrr*. Ранее нами было показано, что у мышей, нокаутных по гену *insrr*, при щелочной нагрузке на организм наблюдается пониженная секреция бикарбоната в моче [20]. При этом нокаут гена *insrr* приводит к снижению экспрессии  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменника SLC26A4, который локализуется в  $\beta$ -вставочных клетках почечных канальцев, участвующих в секреции ионов бикарбоната почками. Таким образом, изменение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи генов, и о возможной роли GAPDH в ранее не описанных молекулярных механизмах регуляции кислотно-основного баланса в организме.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 19-34-90177, 20-04-00880.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clayton-smith M. Renal physiology: acid e base balance // Anaesth Intensive Care Med. 2021. V. 22. P. 415–421.
2. Deyev I.E., Popova N.V., Serova O.V., et al. Alkaline pH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line // Biochimie. 2017. V. 138. P. 62–69.
3. Serova O.V., Gantsova E.A., Deyev I.E., et al. The Value of pH Sensors in Maintaining Homeostasis of the Nervous System // Russ J Bioorganic Chem. 2020. V. 46. P. 369–384.
4. Meijles D.N., Fuller S.J., Cull J.J., et al. The insulin receptor family and protein kinase B (Akt) are activated in the heart by alkaline pH and  $\alpha$ 1-adrenergic receptors // Biochem J. 2021. V. 478. P. 2059–2079.
5. Eladari D., Leviel F., Pezy F., et al. Rat proximal NHE3 adapts to chronic acid-base disorders but not to chronic changes in dietary NaCl intake // Am J Physiol – Ren Physiol. 2002. V. 282. P. 835–843.
6. Sabolić I., Brown D., Gluck S.L., et al. Regulation of AE1 anion exchanger and  $\text{H}^+$ -ATPase in rat cortex by acute metabolic acidosis and alkalosis // Kidney Int. 1997. V. 51. P. 125–137.
7. Wagner C.A., Finberg K.E., Stehberger P.A., et al. Regulation of the expression of the  $\text{Cl}^-$ /anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status // Kidney Int. 2002. V. 62. P. 2109–2117.
8. Ганцова Е.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. и др. Анализ развития преимплантационных эмбрионов мыши, нокаутных по гену *insrr* // ОНТОГЕНЕЗ. 2022. Т. 53. С. 196–202.
9. Hildyard J.C.W., Finch A.M., Wells D.J. Identification of qPCR reference genes suitable for normalizing gene expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy // PLoS One. 2019. V. 14.
10. Серова О.В., Ганцова Е.А., Деев И.Е. и др. Тканеспецифическая экспрессия изоформ нейрексина-1 $\alpha$  в органах крысы // Биоорганическая химия. 2022. Т. 48. С. 217–222.
11. Wei K., Ma L. Concept development of housekeeping genes in the high-throughput sequencing era // Yi Chuan = Hered. 2017. V. 39. P. 127–134.
12. Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues // Physiol Genomics. 2005. V. 21. P. 389–395.
13. Mozdziak P.E., Dibner J.J., McCoy D.W. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Expression Varies With Age and Nutrition Status // Nutrition. 2003. V. 19. P. 438–440.
14. Seidler N.W. Basic biology of GAPDH // Adv Exp Med Biol. 2013. V. 985. P. 1–36.
15. Singh N., Bhalla N. Moonlighting Proteins // Annu. Rev. Genet. 2020. V. 54. P. 265–85.
16. Su Y., Blake-Palmer K.G., Fry A.C., et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is required for band 3 (anion exchanger 1) membrane residency in the mammalian kidney // Am J Physiol Renal Physiol. 2011. V. 300. P. F157–F166.
17. Baba T., Kobayashi H., Kawasaki H., et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with phosphorylated Akt resulting from increased blood glucose in rat cardiac muscle // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 2796–2800.
18. Деев И.Е., Ржевский Д.И., Берчатова А.А. и др. Декомпенсированный метаболический алкалоз у мышей с нокаутом гена *insrr* // Acta naturae. 2011. V. 4. P. 119–122.
19. Zubkov E.A., Morozova A.Y., Chachina N.A., et al. Behavioral Characteristics of Mice with Knockout of the IRR Alkali Sensor Gene // Neurosci Behav Physiol. 2018. V. 48. P. 483–487.
20. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // Cell Metab. 2011. V. 13. P. 679–689.

## CHANGES IN THE EXPRESSION OF THE *gapdh* GENE IN THE ORGANS OF *insrr* KNOCKOUT MICE

E. A. Gantsova<sup>a,#</sup>, A. A. Gavrilenkova<sup>a,b</sup>, O. V. Serova<sup>a</sup>, and I. E. Deyev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> The Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: gantsova@mail.ru

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

The most important property of a living organism is the maintenance of optimal acid-base balance and the ionic composition of the internal environment. The kidneys are one of the main pH-regulating organs in the body. Receptor tyrosine kinase IRR (an insulin receptor-like receptor) is an alkaline pH-sensor. In mice (*Mus Musculus*) with a knockout of the *insrr* gene encoding the IRR receptor, under conditions of alkaline loading, a violation of bicarbonate secretion is observed, which indicates the role of the receptor tyrosine kinase IRR in the regulation of acid-base balance in the body. In order to search for proteins functionally associated with the receptor tyrosine kinase IRR, we performed a large-scale sequencing of the kidney transcriptome of wild-type and *insrr* knockout mice, which were kept under normal conditions and under alkaline conditions. As a result, we found a decrease in *gapdh* gene expression in the kidneys of *insrr* knockout mice compared to wild-type mice. RNA sequencing data were confirmed by TaqMan real-time PCR and Western blotting. Using the TaqMan real-time PCR method, we revealed a decrease in the level of *gapdh* expression not only in the kidneys, but also in the liver and brain of *insrr* knockout mice. Thus, changes in *gapdh* gene expression in the kidneys of *insrr* knockout mice may indicate a functional relationship between genes and a possible role of GAPDH in previously undescribed molecular mechanisms of regulation of acid-base balance in the body.

**Keywords:** *gapdh*, IRR, receptor tyrosine kinases, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase