

УДК 576.32/.36

Ингибитор ASIC1a мамбалгин-2 тормозит рост клеток лейкемии, вызывая арест клеточного цикла

М. Л. Бычков¹, М. А. Шулепко¹, В. Ю. Васильева², А. В. Сударикова², М. П. Кирпичников^{1,3}, Е. Н. Люкманова^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119992 Россия

*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступило в редакцию 02.04.2020

Принято к печати 27.05.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10949

РЕФЕРАТ Применение ингибиторов тирозинкиназ позволило добиться существенного успеха в терапии хронической миелогенной лейкемии, однако поиск новых мишеней для терапии этого заболевания по-прежнему остается актуальной задачей. Известно, что в линии клеток K562 хронической миелогенной лейкемии человека экспрессируются протон-управляемые ионные каналы ASIC1, которые являются молекулярной мишенью трехпетельных токсинов из яда черной мамбы (*Dendroaspis polylepis*) – мамбалгинов. Мамбалгины эффективно ингибируют гомо- и гетеромерные рецепторы, содержащие субъединицу ASIC1a, однако возможность их использования в качестве противоопухолевых агентов ранее не исследовалась. С помощью метода патч-кламп нами впервые обнаружена активация протон-управляемых ионных каналов ASIC1a в клетках K562 в ответ на снижение внеклеточного pH. Показано, что рекомбинантный мамбалгин-2 ингибирует активность ASIC1a и тормозит пролиферацию клеток K562 с полумаксимальной эффективной концентрацией EC₅₀ ~ 0.2 мкМ. Максимальный ингибирующий эффект мамбалгина-2 достигается после 72-часовой инкубации с клетками и при достижении pH клеточной среды ~ 6.6. В клетках K562 мамбалгин-2 вызывает арест клеточного цикла в фазе G1 и снижает фосфорилирование регуляторов фазы G1 клеточного цикла – циклина D1 и циклинзависимой киназы CDK4, не влияя на активацию киназы CDK6. Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания на основе мамбалгина-2 новых противолейкозных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА хроническая миелогенная лейкемия, лейкоз, протон-управляемые ионные каналы, трехпетельные белки, клеточный цикл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМСО – диметилсульфоксид; ASIC – протон-управляемые ионные каналы; CDK – циклинзависимая киназа; CML – хроническая миелогенная лейкемия; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид; РсТх – псалмотоксин; ТBS – трис-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая миелогенная лейкемия (СМЛ) – наиболее частый вид лейкоза у взрослых. Несмотря на прогресс в терапии СМЛ, обусловленный разработкой ингибиторов тирозинкиназ, клетки СМЛ часто проявляют устойчивость к терапии, а при прогрессии формируется пул быстрорастущих и устойчивых к терапии стволовых опухолевых клеток [1]. По этой причине поиск новых молекулярных мишеней для терапии СМЛ представляет собой актуальную задачу онкологии.

Известно, что в клетках лейкемии человека экспрессируются амилорид-чувствительные протон-управляемые Na⁺-каналы ASIC [2]. Каналы ASIC являются одними из наиболее чувствительных молекулярных сенсоров изменения внеклеточного pH у млекопитающих. В настоящее время известно шесть изоформ этих каналов, широко представленных в мембранах нейрональных и ненейрональных клеток, где ASIC участвуют в таких важных регуляторных функциях, как синаптическая пластичность, обучение, память, восприятие боли, а также в разви-

тии различных патологических состояний [3]. Однако функциональную активность каналов ASIC в клетках рака крови до настоящего времени не изучали. Ингибирование этих каналов в клетках лейкемии может стать перспективной стратегией для борьбы с CML.

Из яда черной мамбы (*Dendroaspis polylepis*) выделены селективные ингибиторы протон-управляемых ионных каналов ASIC1 – мамбалгины [4]. Мамбалгины обладают сильным анальгезирующим эффектом и эффективно ингибируют каналы ASIC1a [4, 5]. В работе исследовано влияние рекомбинантного мамбалгина-2 на клетки модельной линии CML K562. Впервые в клетках K562 зарегистрированы токи, опосредованные протон-управляемыми ионными каналами ASIC1a, показано, что мамбалгин-2 ингибирует активность этих каналов и тормозит пролиферацию клеток K562, вызывая арест клеточного цикла в фазе G1 и ингибируя активацию циклина D1 и циклинзависимой киназы CDK4. Таким образом, рекомбинантный мамбалгин-2 может рассматриваться в качестве прототипа таргетных препаратов нового класса для терапии хронической миелогенной лейкемии человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки хронической миелогенной лейкемии человека K562 (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН) культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Nucleon, Великобритания) при 37°C и 5% CO₂. Для электрофизиологических экспериментов клетки высевали на покровные стекла (4 × 4 мм), предварительно покрытые поли-DL-лизинном (Sigma Aldrich, США).

Уровень экспрессии мРНК ASIC в клетках K562 определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Из клеток K562 выделяли суммарную РНК с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), обрабатывали ДНКазой I (Sigma Aldrich) и очищали

с помощью набора CleanRNA Stanadart («Евроген»). кДНК синтезировали с помощью Mint-ревертазы («Евроген») и проводили ПЦР с готовой смесью SYBRGreen HS («Евроген») и праймерами (таблица) на амплификаторе Roche LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Уровень экспрессии целевых генов нормировали по уровню экспрессии генов домашнего хозяйства β -ACTIN, GPDH и RPL13a на ПО LightCycler SW (Roche).

Трансмембранные ионные токи регистрировали с помощью метода патч-кламп при отведении сигнала от плазматической мембраны всей клетки (whole-cell). Использовали высокоточный усилитель Axopatch 200B, аналогово-цифровой преобразователь Digidata 1550A (Molecular Devices Corp., США). Пипетки с сопротивлением 3–6 МОм изготавливали на пуллере P-97 (Sutter Instrument, США) из стандартных заготовок BF 150-110-10. Наружный раствор (в камере) содержал 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES/TrisOH (pH 7.4), а внутриклеточный раствор в пипетке – 140 mM К-аспартата, 5 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES/TrisOH, и 0.176 mM CaCl₂ для создания свободной концентрации ионов кальция на уровне 0.01 мкМ (pCa = 8). Внеклеточный раствор с pH 5.0 содержал MES. Токи регистрировали при поддерживаемом потенциале на мембране -50 мВ. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием ПО pCLAMP 10.6 (Molecular Devices Corp.).

Мамбалгин-2 и его мутантный вариант L32A получали в *Escherichia coli* по разработанной ранее методике [6]. Для определения времени удвоения клетки K562 высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5 × 10⁵ клеток/мл) и растили с заменой среды на свежую каждые 24 ч. Количество клеток после разных временных интервалов культивирования определяли подсчетом в камере Горяева («МиниМед», Россия) после окрашивания трипановым синим («ПанЭко»). Для изучения влияния мамбалгина-2 на пролиферацию клетки K562 высевали в 96-луночные культуральные планшеты

Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер		Ампликон, п.н.
	Прямой	Обратный	
<i>β-actin</i>	САТGТАСGТТGСТАТССАGGC	СТССТТААТGТCАCGCАCГАТ	88
<i>GPDH</i>	АСААСТТТGГТАТCГТGGAAGG	GCCАТCАCGCСCАCАGТТТC	73
<i>RPL13a</i>	ТСАААGССТТCГСТАGТСТСС	GGСТСТТТТТGССCGТАТGC	104
<i>ASIC1a</i>	CGAAGCAGGCATCAAAGTGC	ТТТGGАТGАТАGGGAGCCACG	642
<i>ASIC2</i>	САССАGАCТТCАССCАGТGТТТ	TGТАGCGGGТСТCАCАGТCА	409
<i>ASIC3</i>	ТАСААGААСТGТGСССACCC	GGТСТТCГGAACAGAGCAGA	502
<i>ASIC4</i>	GAGGAGAGAGACAAGCGGCA	GTCCAGCATGATCTCCAGGC	930

(5×10^5 клеток/мл или 5×10^5 клеток/лунка), мамбалгин-2 (из 2 мМ стока в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО)) растворяли в культуральной среде и добавляли к клеткам в различных концентрациях. После этого клетки инкубировали в течение 72 ч с заменой среды на свежую каждые 24 ч (перед заменой среды клетки осаждали в течение 5 мин при 200 G). Максимальная концентрация ДМСО не превышала 0.5%, добавленный ДМСО не влиял на рост клеток. Пролиферацию клеток оценивали при помощи МТТ-теста. К клеткам добавляли МТТ (конечная концентрация 0.1 мг/мл), инкубировали в течение 4 ч и образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в изопропанолe с 75 мМ HCl, после чего определяли поглощение в лунках планшета при 540 нм с выравниванием на фон при 655 нм на планшетном ридере Bio-Rad 680. Оптическую плотность лунок планшета нормировали на оптическую плотность лунок с необработанными клетками и анализировали с помощью ПО Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, США).

Для анализа клеточного цикла клетки K562 высеивали в 6-луночные культуральные планшеты (25×10^4 клеток/лунка) и инкубировали с 1 мкМ мамбалгина-2 в течение 72 ч с заменой среды на свежую каждые 24 ч. Затем клетки фиксировали в 70% этаноле в течение 12 ч (-20°C), дважды промывали раствором Эрла и инкубировали в буфере для экстракции ДНК (200 мМ Na_2HPO_4 с 0.004% Triton X-100, pH 7.8) в течение 5 мин. Затем клетки промывали и ресуспендировали в растворе Эрла с 50 мг/мл йодида пропидия и 0.2 мг/мл РНКазы А, после чего анализировали на цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Процентное содержание клеток в фазах клеточного цикла определяли посредством ПО ModFit LT (Verity Software, США).

Влияние мамбалгина-2 на фосфорилирование регуляторов клеточного цикла анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Клетки лизировали в буфере RIPA с ингибиторами протеаз SIGMAFAST (Sigma Aldrich), лизаты разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Santa Cruz, США). Мембраны блокировали в 5% обезжиренном молоке («Диа-М», Россия) в течение 2 ч, а затем инкубировали в течение 16 ч (4°C) с первичными антителами кролика к циклину D1 (pSer90, Antibodies online, Германия, ABIN6271254), циклинзависимой киназе CDK4 (pThr172, Antibodies online, ABIN6271182) и циклинзависимой киназе CDK6 (pTyr24, Antibodies online, ABIN319289), а также с первичными антителами мыши к β -актину (R&D Systems, США, MAB8929). Затем мембраны промывали 3 раза в TBS + 0.1% Tween-20 и инкубировали в течение 1 ч с HRP-конъюгированными антикроличьими

(Jackson Immunoresearch, Великобритания, 111-035-003) или антимишными (Jackson Immunoresearch, 715-035-150) вторичными антителами. После этого мембраны промывали 4 раза TBS + 0.1% Tween-20 и детектировали белки с помощью субстрата ECL (Bio-Rad, США) на документирующей системе LAS500 (GE Healthcare, США). Интенсивность полос оценивали с помощью ПО ImageJ (NIH, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что в линии клеток лейкемии человека K562 экспрессируются ионные каналы ASIC1 [2]. В настоящей работе с помощью ПЦР в реальном времени мы подтвердили экспрессию ASIC1a в клетках K562, в то время как экспрессия ASIC2, ASIC3 и ASIC4 не была выявлена (рис. 1A). Известно, что снижение pH в среде, окружающей клетку, приводит к активации протон-управляемых ионных каналов, опосредующих пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [7]. Чтобы определить, вызывает ли снижение внеклеточного pH активацию входящих токов через мембрану клеток K562, мы провели электрофизиологические эксперименты методом патч-кламп в конфигурации whole-cell. Мы обнаружили, что быстрое изменение pH внеклеточного раствора с 7.4 до 5.0 приводит к активации H^+ -чувствительных натриевых токов (рис. 1B). Снижение pH приводило к быстрому нарастанию амплитуды тока до максимальной и более медленному спаду в ходе десенситизации до стационарного уровня, что характерно для протон-управляемых катионных каналов ASIC1a [8]. Амплитуды ответов при pH 5.0 составляли 7–16 пА ($n = 6$). Блокирование входящих токов, наблюдаемых при низких значениях pH (5.0), производным амилорида – бензамиллом (1 мкМ), подтвердило принадлежность протон-управляемых ионных каналов к семейству ASIC1a (рис. 1B). Таким образом, для клеток K562 характерны вызываемые закислением внешней среды транзистентные токи, обуславливаемые ASIC1a. Добавление 1 мкМ мамбалгина-2 во внеклеточный раствор с pH 5.0 полностью ингибировало активацию протон-управляемых натриевых токов в клетках K562 (рис. 1Г). Последующая замена внеклеточного раствора на аналогичный без мамбалгина-2 (с pH 7.4 и 5.0) приводила к повторной активации протон-управляемых ионных каналов (рис. 1Г), указывая на обратимое действие мамбалгина-2.

Время удвоения клеток K562, определенное подсчетом после окрашивания трипановым синим, составило ~ 35 ч (рис. 2A). Мы протестировали pH клеточной среды в процессе роста клеток K562 и обнаружили, что при ежедневной замене среды на свежую клетки K562 через 72 ч закисляют среду, сни-

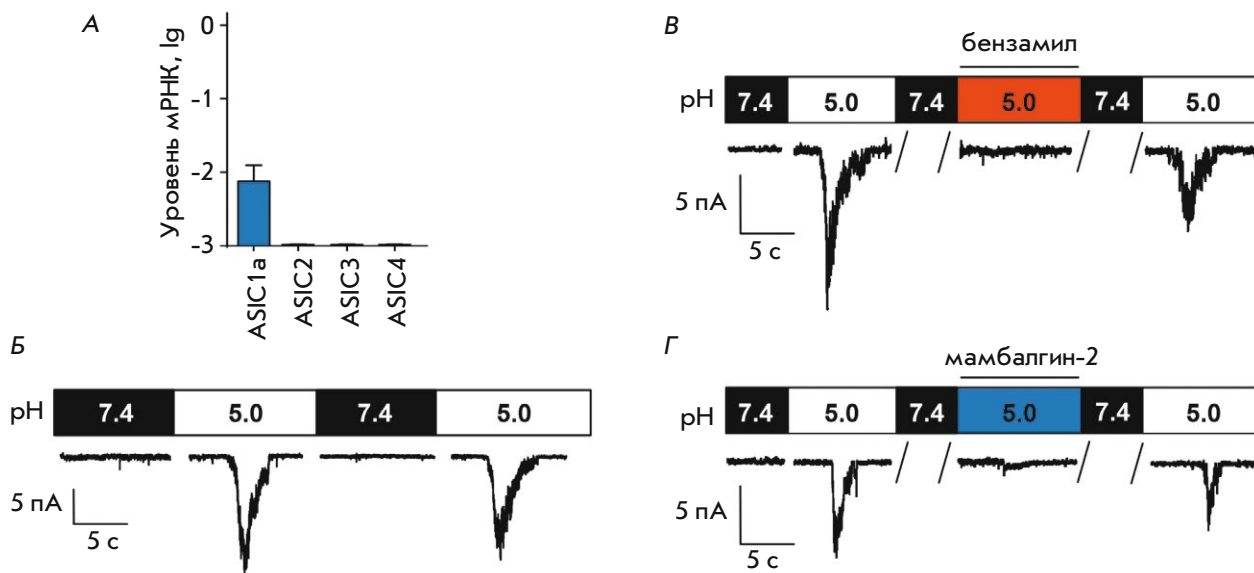


Рис. 1. Действие мамбалгина-2 на протон-управляемые натриевые каналы в клетках K562. А – анализ экспрессии мРНК различных типов ASIC с помощью ПЦР в реальном времени ($n = 3$). Б – активация каналов, вызванная быстрой сменой внеклеточного раствора с pH 7.4 до 5.0, поддерживаемый потенциал на мембране -50 мВ. В – токи, активированные pH 5.0, до, во время и после подачи 1 мкМ бензамилла. Г – токи, активированные pH 5.0, до, во время и после подачи 1 мкМ мамбалгина-2

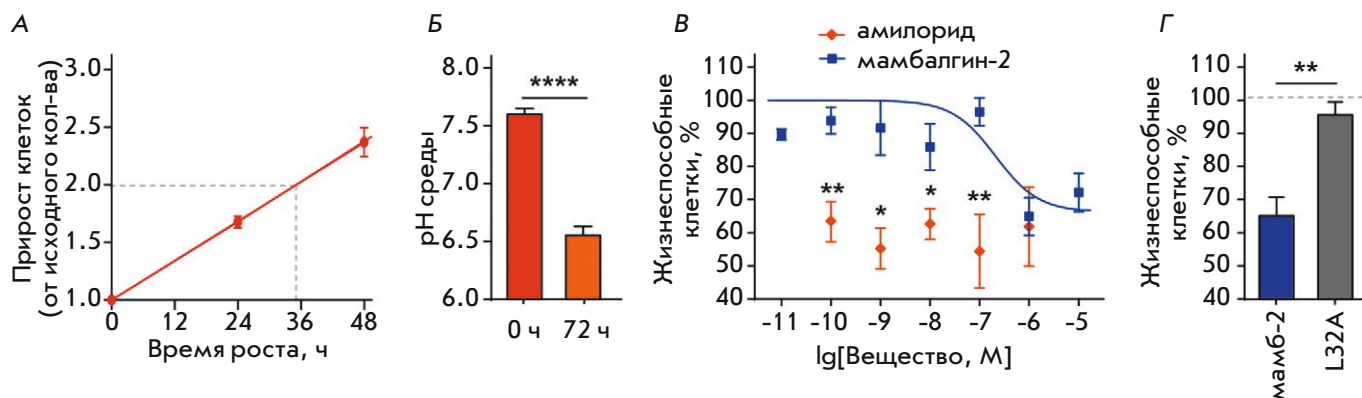


Рис. 2. Влияние мамбалгина-2 на рост клеток K562. А – зависимость роста клеток K562 от времени культивирования. Время удвоения клеток вычисляли с помощью линейной регрессии. Б – изменение pH среды при инкубации клеток в течение 72 ч. Данные приведены как значения pH \pm SEM ($n = 3$); **** ($p < 0.0001$) указывает на разницу между группами данных согласно двустороннему t -тесту. В – влияние различных концентраций мамбалгина-2 на пролиферацию клеток. Данные приведены как % от контроля (необработанные клетки) \pm SEM ($n = 3-6$). * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$) означает различие между группами данных согласно двустороннему t -тесту. Г – антипролиферативная активность мамбалгина-2 и его мутантного варианта L32A. Данные приведены как % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm SEM ($n = 3$); ** ($p < 0.01$) означает различие между группами данных согласно двустороннему t -тесту

жая значение pH с 7.6 ± 0.06 до 6.6 ± 0.07 (рис. 2Б), что достаточно для активации ASIC1a [3]. Таким образом, по-видимому, быстро пролиферирующие клетки K562 в высокой плотности из-за активного метаболизма закисляют клеточную среду, активируя тем самым протон-управляемые ионные каналы.

Ранее было показано, что ингибирование ASIC1a при помощи псалмотоксина (PsTx1) из яда тарантула

Psalmopoeus cambridgei и бензамилла тормозит рост опухолевых клеток [9], поэтому нами было оценено влияние мамбалгина-2 на рост клеток K562. МТТ-тест показал, что инкубация клеток K562 с мамбалгином-2 в течение 72 ч приводит к сокращению числа жизнеспособных клеток до $68.2 \pm 5.8\%$ по сравнению с необработанными клетками (контроль) с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50})

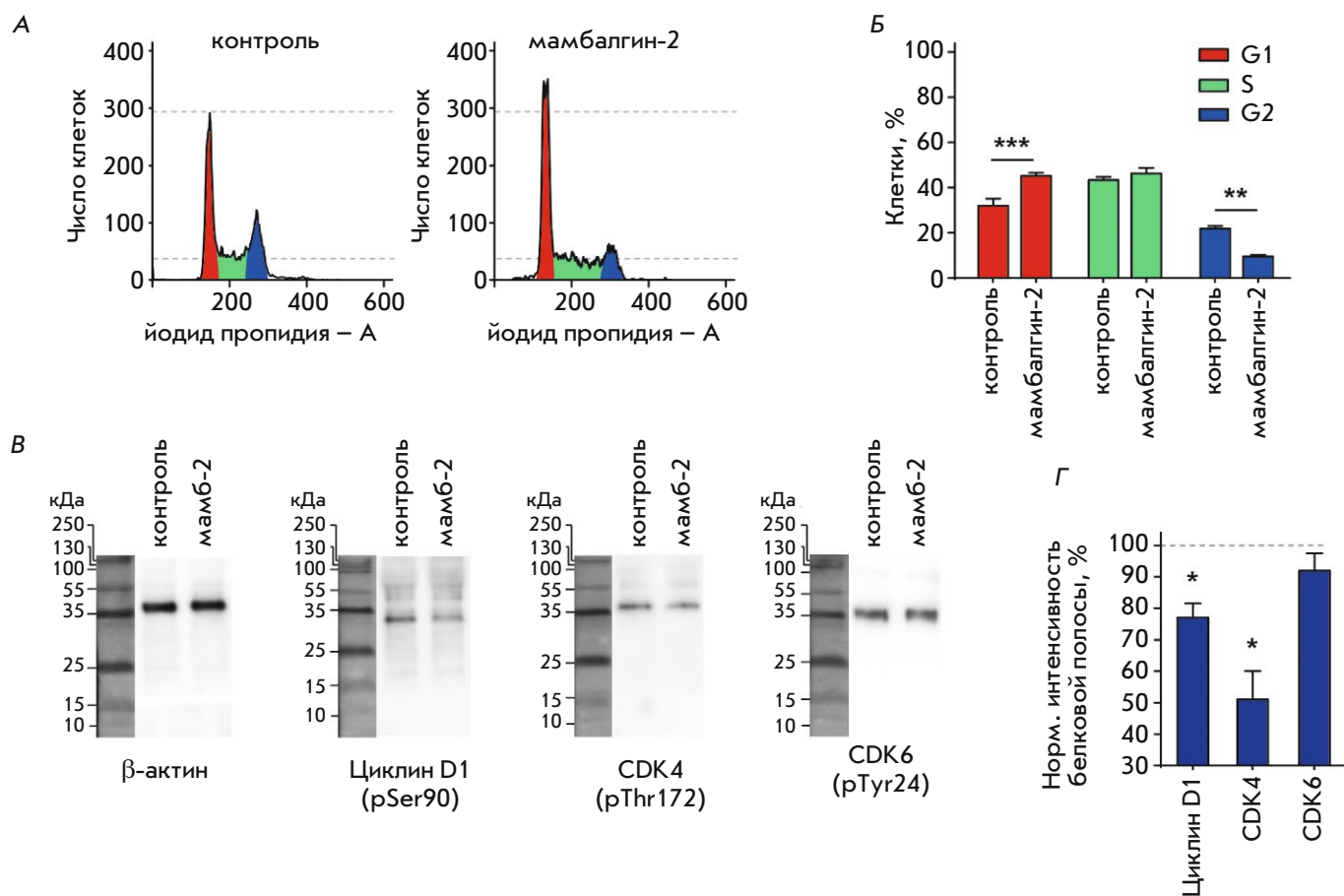


Рис. 3. Влияние мамбалгина-2 на клеточный цикл в линии клеток K562. А – распределение ядер клеток до и после инкубации в течение 72 ч с мамбалгином-2. Б – содержание клеток в различных фазах клеточного цикла. Данные представлены в виде % клеток в каждой фазе клеточного цикла \pm SEM ($n = 4$); ** ($p < 0.01$) и *** ($p < 0.001$) указывают на разницу между контролем (необработанные клетки) и клетками, обработанными мамбалгином-2, согласно двустороннему *t*-тесту. В – репрезентативный вестерн-блот, демонстрирующий влияние мамбалгина-2 на фосфорилирование регуляторов клеточного цикла. Г – количественная оценка интенсивностей полос регуляторов клеточного цикла после инкубации клеток с мамбалгином-2. Данные приведены как нормализованная интенсивность полос \pm SEM ($n = 4$); * ($p < 0.05$) указывает на разницу между контролем (необработанные клетки) и клетками, обработанными мамбалгином-2, согласно двустороннему *t*-тесту

179.9 \pm 20.8 нМ. При этом антипролиферативный эффект мамбалгина-2 в диапазоне концентраций от 10^{-10} до 10^{-7} М был выражен значительно слабее, чем у блокатора ASIC1a амилорида (рис. 2B). Для подтверждения связи антипролиферативной активности мамбалгина-2 с его взаимодействием с ASIC1a мы использовали мутантный вариант токсина с заменой L32A, который обладает пониженной аффинностью к ASIC1a и поэтому не способен ингибировать токи через ASIC1a [10]. Действительно, в отличие от рекомбинантного мамбалгина-2, мутант L32A не влиял на рост клеток K562 (рис. 2Г). Таким образом, основной молекулярной мишенью мамбалгина-2 в клетках K562 является именно ASIC1a. По-видимому, при пролиферации клеток K562 происходит закисление среды, что приводит к активации и последую-

щей десенситизации канала ASIC1a, а мамбалгин-2 снижает рост клеток K562, стабилизируя канал в десенситизированном состоянии. Это согласуется с ранее полученными данными о взаимодействии мамбалгина-2 с каналом ASIC1a в десенситизированном состоянии [4, 11].

Ранее было обнаружено, что PcTx1 и бензамил вызывают остановку клеточного цикла в фазе G0/G1 и ингибируют циклинзависимые киназы [9]. Инкубация клеток K562 с мамбалгином-2 также приводила к увеличению количества клеток в фазе G1 клеточного цикла на 33% при уменьшении количества клеток в фазе G2 на 54%, что свидетельствует об аресте клеточного цикла в фазе G1 (рис. 3А,Б). Методом вестерн-блоттинга показано, что инкубация клеток K562 с мамбалгином-2 приводит к падению

фосфорилирования циклина D1 и циклинзависимой киназы CDK4, но не циклинзависимой киназы CDK6 (рис. 3В,Г). Формирование комплекса между циклином D1 и циклинзависимой киназой CDK4 необходимо для активации CDK4 и перехода клетки в фазу синтеза ДНК, поэтому ингибирование активности циклина D1 и CDK4 приводит к аресту клеточного цикла. Повышенная экспрессия циклина D1 в фазе акселерации CML считается негативным прогностическим фактором, поэтому ингибирование циклина D1 может стать новой стратегией для лечения больных хронической миелогенной лейкемией [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые в клетках лейкемии K562 обнаружены функционально-активные протон-управляемые ионные каналы ASIC1a. Показано, что мамбалгин-2 подавляет их активность и тормозит

пролиферацию клеток лейкемии, вызывая арест клеточного цикла в фазе G1 и снижая активность регуляторов клеточного цикла – циклина D1 и циклинзависимой киназы CDK4. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования ASIC1a в качестве молекулярной терапевтической мишени при CML, а рекомбинантного мамбалгина-2 – в качестве прототипа новых таргетных противоопухолевых препаратов. ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 18-34-00497, М.Л.Б., исследование антипролиферативной активности мамбалгина-2 и № 19-015-00211, А.В.С., изучение токов в клетках K562), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Совета по грантам Президента РФ (стипендия № СП-4316.2018.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Flis S., Chojnacki T. // Drug Design, Development Therapy. 2019. V. 13. P. 825–843.
2. Föller M., Kasinathan R.S., Durantion C., Wieder T., Huber S.M., Lang F. // Cell. Physiol. Biochem. 2006. V. 17. № 5–6. P. 201–210.
3. Boscardin E., Alijevic O., Hummler E., Frateschi S., Kellenberger S. // Br. J. Pharmacol. 2016. V. 173. № 18. P. 2671–2701.
4. Diochot S., Baron A., Salinas M., Douguet D., Scarzello S., Dabert-Gay A.-S., Debayle D., Friend V., Alloui A., Lazdunski M., et al. // Nature. 2012. V. 490. № 7421. P. 552–555.
5. Osmakov D.I., Koshelev S.G., Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Andreev Y.A., Illes P., Kozlov S.A. // Biomolecules. 2019. V. 9. № 8. pii: E336.
6. Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Dubovskii P.V., Astapova M.V., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. // Protein Expr. Purif. 2017. V. 130. P. 13–20.
7. Xu S., Liu C., Ma Y., Ji H.-L., Li X. // Biomed. Res. Int. 2016. V. 2016. P. 2190216.
8. Gründer S., Pusch M. // Neuropharmacology. 2015. V. 94. P. 9–18.
9. Rooj A.K., McNicholas C.M., Bartoszewski R., Bebok Z., Benos D.J., Fuller C.M. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 6. P. 4053–4065.
10. Mourier G., Salinas M., Kessler P., Stura E.A., Leblanc M., Tepshi L., Besson T., Diochot S., Baron A., Douguet D., et al. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. № 6. P. 2616–2629.
11. Sun D., Yu Y., Xue X., Pan M., Wen M., Li S., Qu Q., Li X., Zhang L., Li X., et al. // Cell Discovery. 2018. V. 4. № 1. P. 1–11.
12. Liu J.-H., Yen C.-C., Lin Y.-C., Gau J.-P., Yang M.-H., Chao T.-C., Hsiao L.-T., Wang W.-S., Tsai Y.-C., Chen P.-M. // Leuk. Lymphoma. 2004. V. 45. № 12. P. 2419–2425.

ERRATUM

В статье А.А. Кудряевой, А.В. Соколова, А.А. Белогурова «Стохастика разрушения: аутофаголизосомная система клетки», опубликованной в журнале *Acta Naturae*, 2020, т. 12, № 1 (44), с. 18–32, на стр. 30 вместо

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-14-00585-П «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии»

следует читать:

Работа выполнена при поддержке тематически связанных грантов под руководством А.А. Белогурова РФФИ № 14-14-00585-П «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии» и РФФИ № 19-14-00262 «Исследование особенностей функционирования убиквитин-протеасомной системы с применением методов геномного редактирования».