

РОЛЬ КАСПАЗЫ-2 В РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Саидова К.М.^{1,2}, Мамедова А.Р.^{1,2}, Смольянинова Л.В.^{1,2}, Замараев А.В.^{1,2}, Аверина О.А.², Попов В.С.², Филипович Е.С.^{1,2}, Попов Д.В.³, Животовский Б.Д.^{1,2,4} Копейна Г.С.^{1,2}

¹ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; k.saidova25@gmail.com

³Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

⁴Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Каспаза-2, одна из самых эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, принимает участие в регуляции различных типов программируемой клеточной гибели (ПКГ): в процессе апоптоза может выступать в качестве инициаторной и эффекторной каспазы, служит негативным регулятором некроптоза, ферроптоза и аутофагии. Участие каспазы-2 в процессах, не связанных с ПКГ, представляет бóльший интерес: фермент участвует в регуляции клеточного цикла, поддержании геномной стабильности, защите клеток от окислительного стресса и т.д. Все эти функции определяют онкосупрессорную роль фермента. Для изучения функций каспазы-2 был проведен конститутивный нокаут этого гена у мышей с помощью технологии CRISPR/Cas9, по результатам которого обнаружилось, что самки с гомозиготным нокаутом бесплодны. Чтобы изучить наблюдаемый эффект и определить роль каспазы-2 в функционировании женской репродуктивной системы, были проведены полнотранскриптомное РНК-секвенирование (RNA-seq) и РНК-секвенирование единичных клеток (sc-RNA-seq). Так, у самок с нокаутом каспазы-2 наблюдалось: 1) снижение уровня экспрессии генов *Dnah5*, *FoxJ1*, *Tekt4*, *Dnaaf1*, *Dnaaf3* и *p73* по данным RNA-seq; 2) снижение *p21* по результатам sc-RNA-seq. Полученные данные были верифицированы с помощью количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР). Снижение экспрессии генов, участвующих в функционировании ресничек (*Dnah5*, *FoxJ1*, *Tekt4*, *Dnaaf1*, *Dnaaf3*, *p73*), может быть связано с развитием первичной цилиарной дискинезии и являться одной из причин инфертильности нокаутных самок. Снижение экспрессии *p73*, гомолога *p53*, также связано со снижением экспрессии *p21*, ингибитора циклин-зависимых киназ. Вероятно, при падении уровня *p21* в гранулёзных клетках нокаутных самок цикл не останавливается и, следовательно, нарушен процесс дифференциации в большие лютеальные клетки. Эти клетки синтезируют 80% всего прогестерона. Их количество снижается, что критично для поддержания беременности.

Таким образом, в данной работе мы показали участие каспазы-2 в работе цилиарного аппарата и в процессах клеточной дифференцировки, нарушения которых могут приводить к инфертильности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-74-30006.

THE ROLE OF CASPASE-2 IN MAMMALIAN REPRODUCTIVE FUNCTION

Saidova Camila M.^{1,2}, Mamedova Aygun R.^{1,2}, Smolyaninova Larisa V.^{1,2}, Zamaraev Alexey V.^{1,2}, Averina Olga A.², Filipovich Ekaterina S.^{1,2}, Popov Vladimir S.², Popov Daniil V.³, Zhivotovsky Boris D.^{1,2,4}, Kopeina Gelina S.^{1,2}

¹The Engelhardt Institute of Molecular Biology (EIMB) of the RAS, Moscow, Russia

²Faculty of Basic Medicine, MV Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;
k.saidova25@gmail.com

³The Institute of Biomedical Problems of the RAS, Moscow, Russia

⁴Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Caspase-2, one of the most conserved cysteine proteases, participates in the regulation of various types of programmed cell death (PCD): it can act as an initiator and effector caspase in the process of apoptosis, serves as a negative regulator of necroptosis, ferroptosis and autophagy. The participation of caspase-2 in non-PCD processes is of greater interest: the enzyme is involved in cell cycle regulation, maintenance of genomic stability, protection of cells from oxidative stress, etc. All these functions of caspase-2 determine its oncosuppressor role.

To study the functions of caspase-2, constitutive knockout of this gene in mice was performed using CRISPR/Cas9 technology, which revealed that females with homozygous knockout were infertile. To study the observed effect, we performed total RNA sequencing (RNA-seq) and single-cell RNA sequencing (sc-RNA-seq). Thus, females with caspase-2 knockout exhibited: 1) decreased gene expression of *Dnah5*, *FoxJ1*, *Tekt4*, *Dnaaf1*, *Dnaaf3* and *p73* according to RNA-seq; 2) decreased expression of *p21* according to sc-RNA-seq. The data obtained were verified by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Decreased expression of genes involved in cilia function (*Dnah5*, *FoxJ1*, *Tekt4*, *Dnaaf1*, *Dnaaf3*, *p73*) may be associated with the development of primary ciliary dyskinesia. This perturbation may be one of the causes of infertility in knockout females. The decreased expression of *p73*, a homolog of *p53*, is also associated with decreased expression of *p21*, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. It is likely that when *p21* levels fall in the granulosa cells of knockout females, the cycle does not stop. Therefore, they don't differentiate into the large luteal cells that synthesize 80% of all progesterone. The number of these cells decreases that is critical for the maintenance of pregnancy.

Thus, we have shown the participation of caspase-2 in the functioning the ciliary apparatus and in the processes of cell differentiation, the impairment of which can lead to infertility.

This work was supported by RSCF grant 23-74-30006.