



Международная лаборатория  
микрофизиологических систем

Москва  
2024

# Ферроптоз. Особенности и механизмы

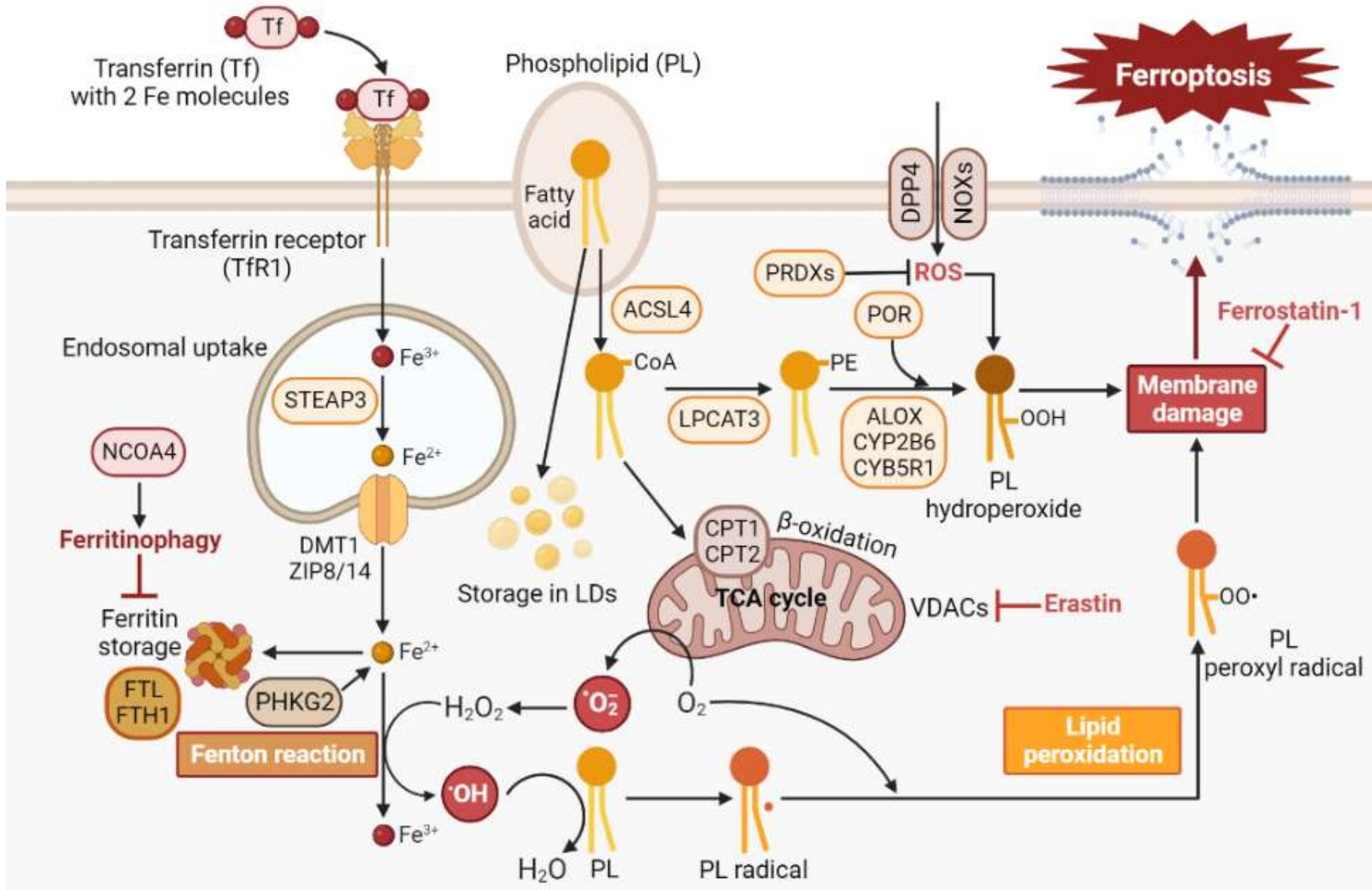


**NIKULIN**

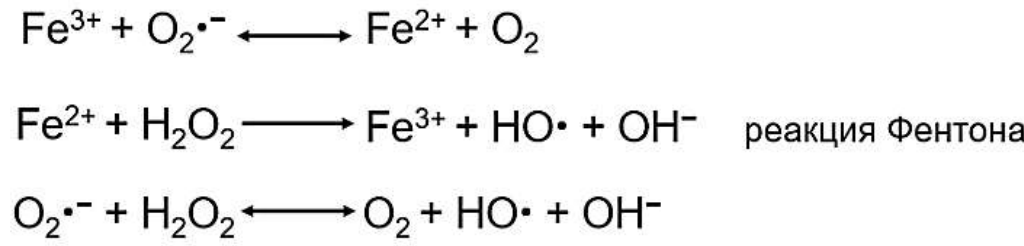
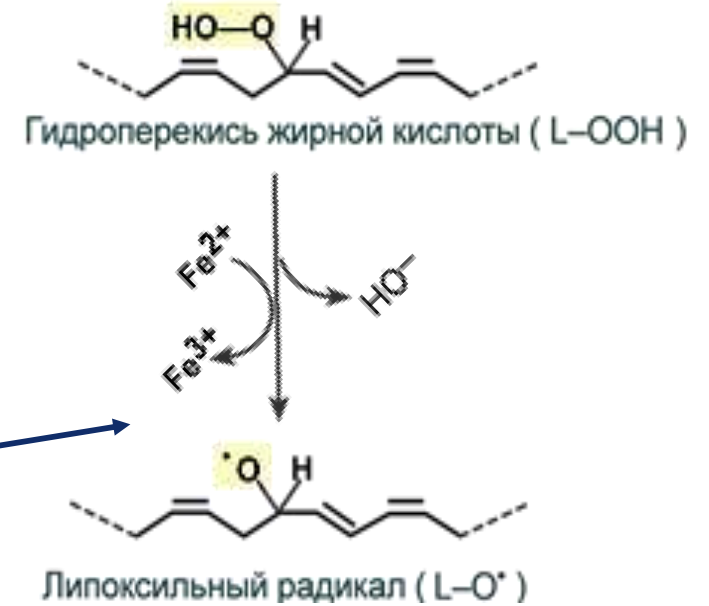
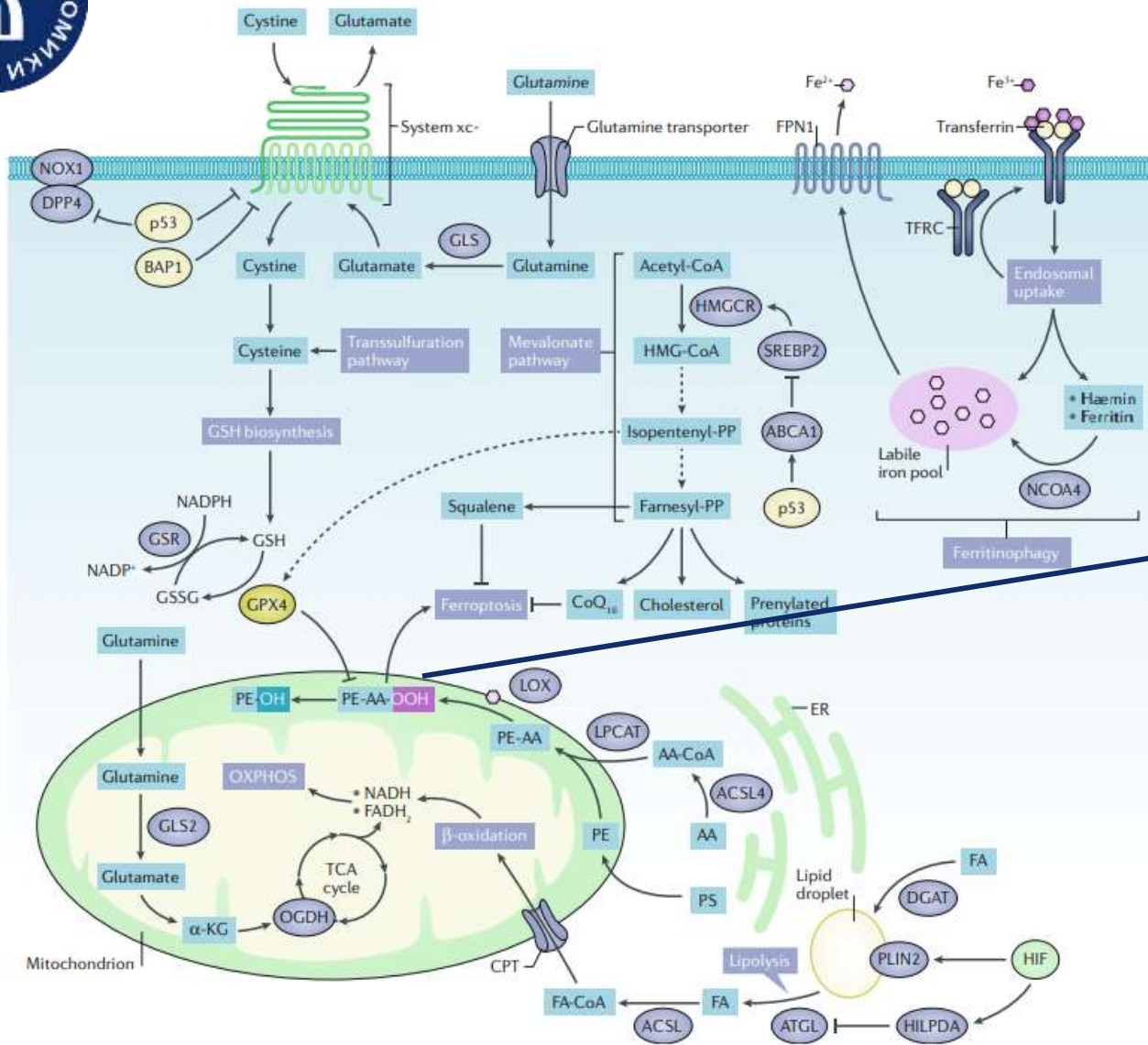
— SCIENTIFIC GROUP —

SINCE 2023

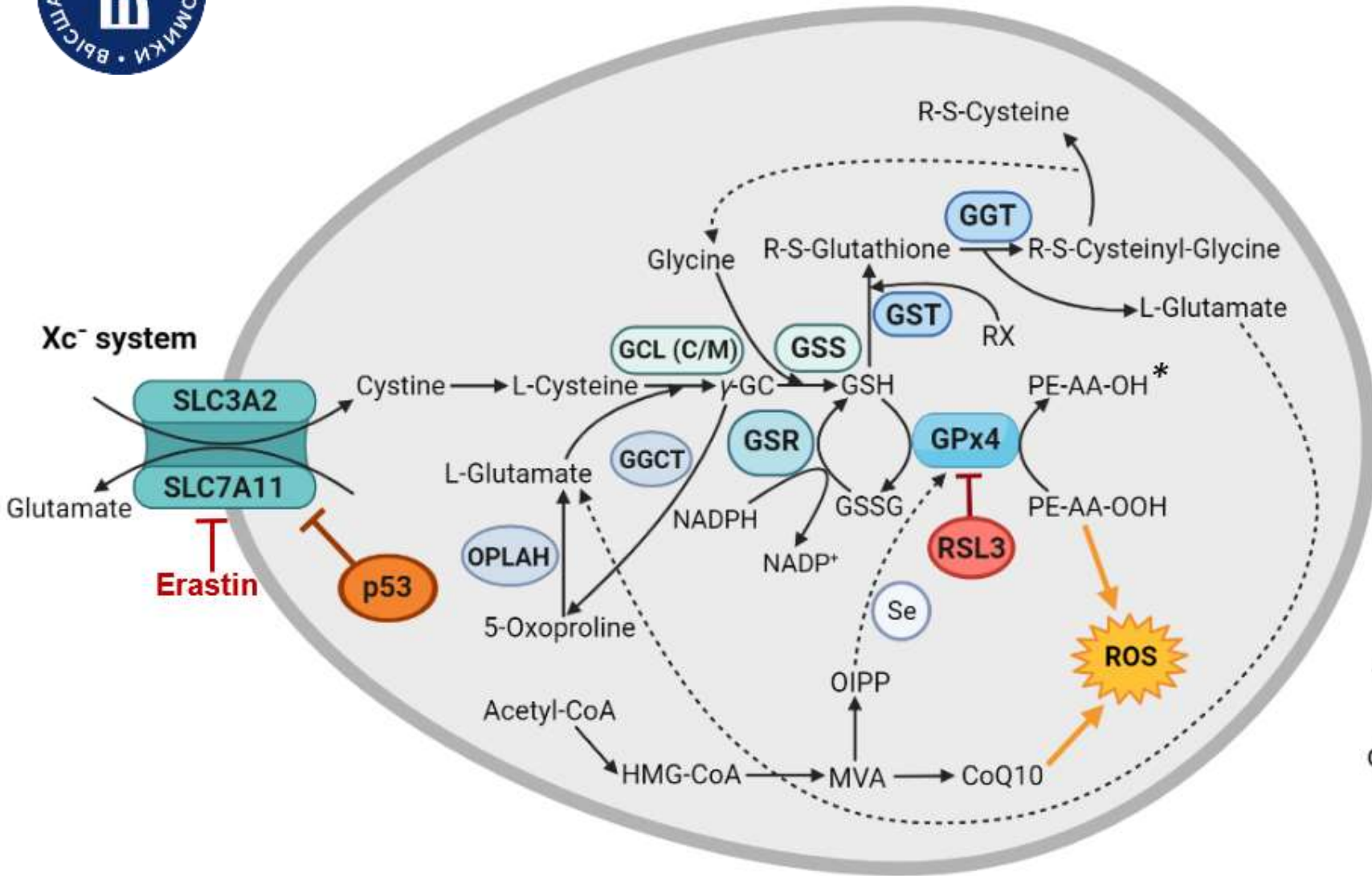
# Регуляторные пути ферроптоза, связанные с метаболизмом липидов и ионов железа



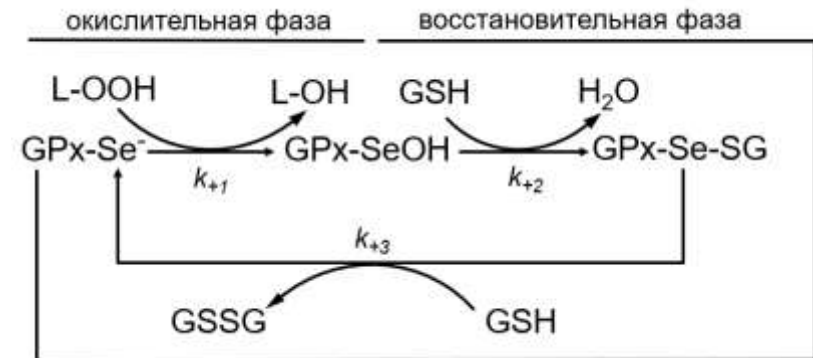
# Химия реакции железозависимого перекисного окисления



# Глутатионовый путь регуляции ферроптоза



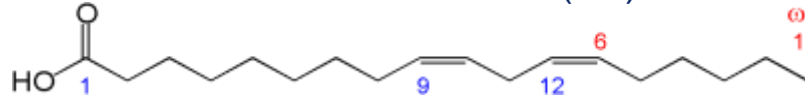
Основные метаболические процессы, протекающие в активном центре GPx4



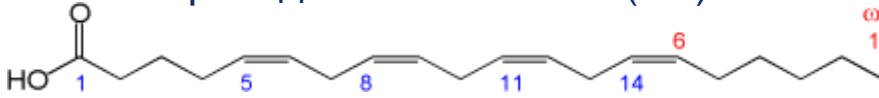
# MTS test: влияние ДПНЖК на жизнеспособность клеток

**ω-6**

Линолевая кислота (LA)

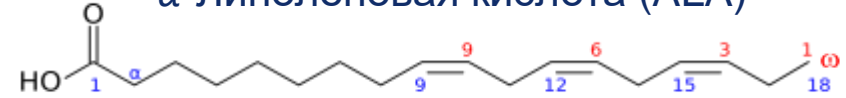


Арахидоновая кислота (AA)



**ω-3**

α-Линоленовая кислота (ALA)



Докозагексаеновая кислота (DHA)

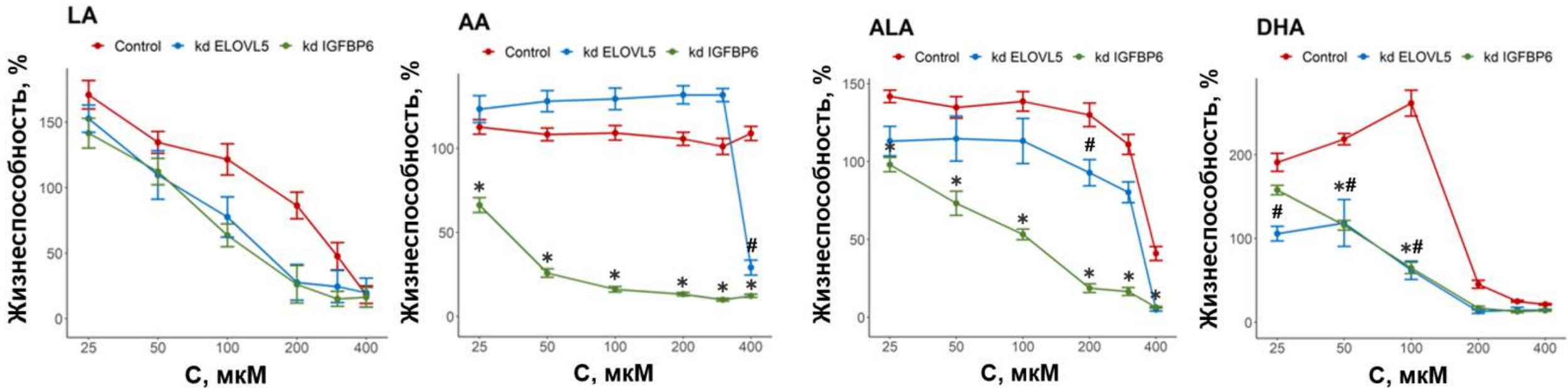
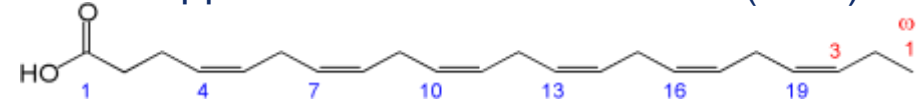
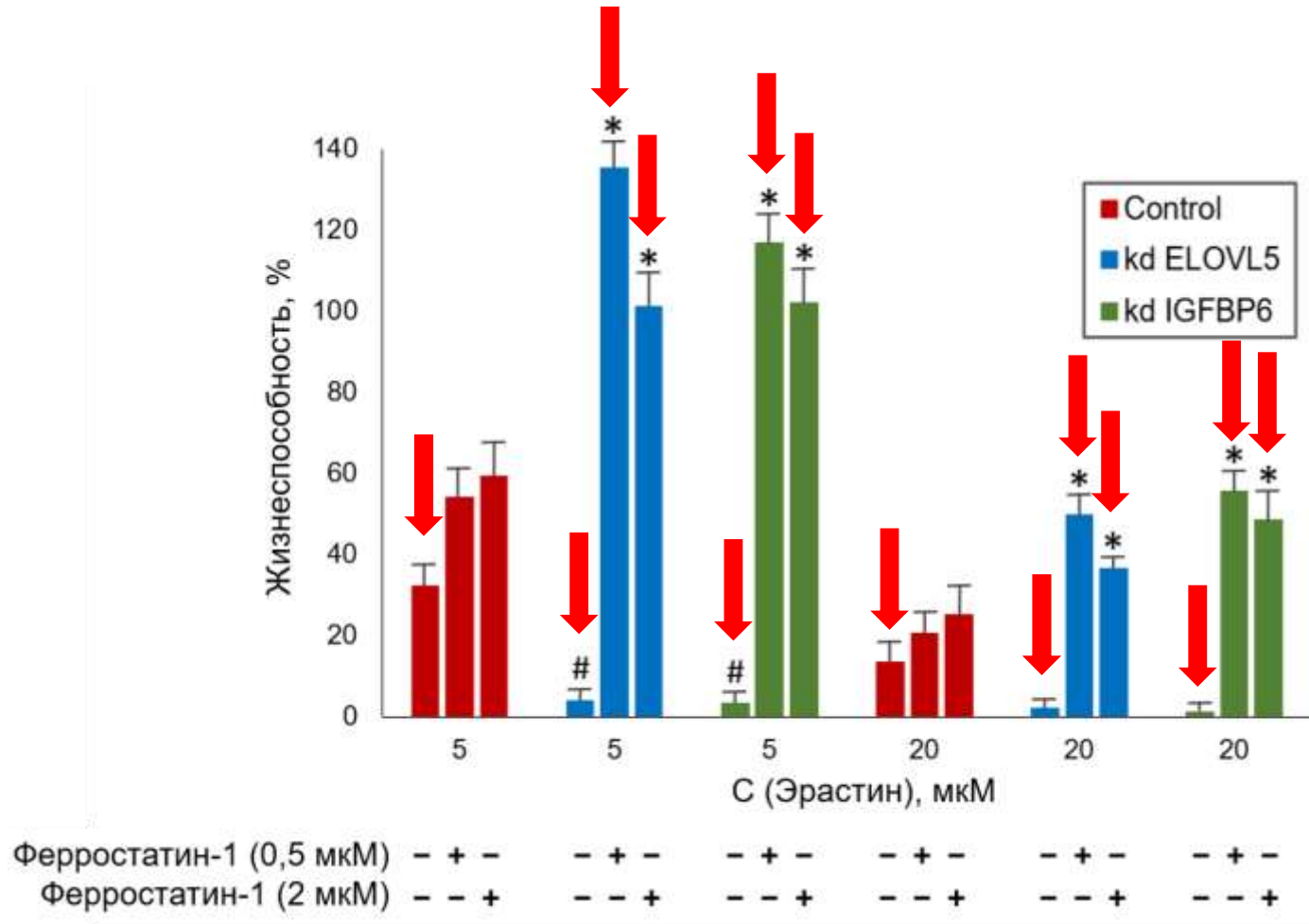


Рисунок 2. Влияние ДПНЖК из классов омега-6 и омега-3 на жизнеспособность клеток MDA-MB-231 с нокадаунами генов *ELOVL5* и *IGFBP6* и контрольной линии (*LUC*)

# Нокдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* повышает чувствительность к ферроптозу

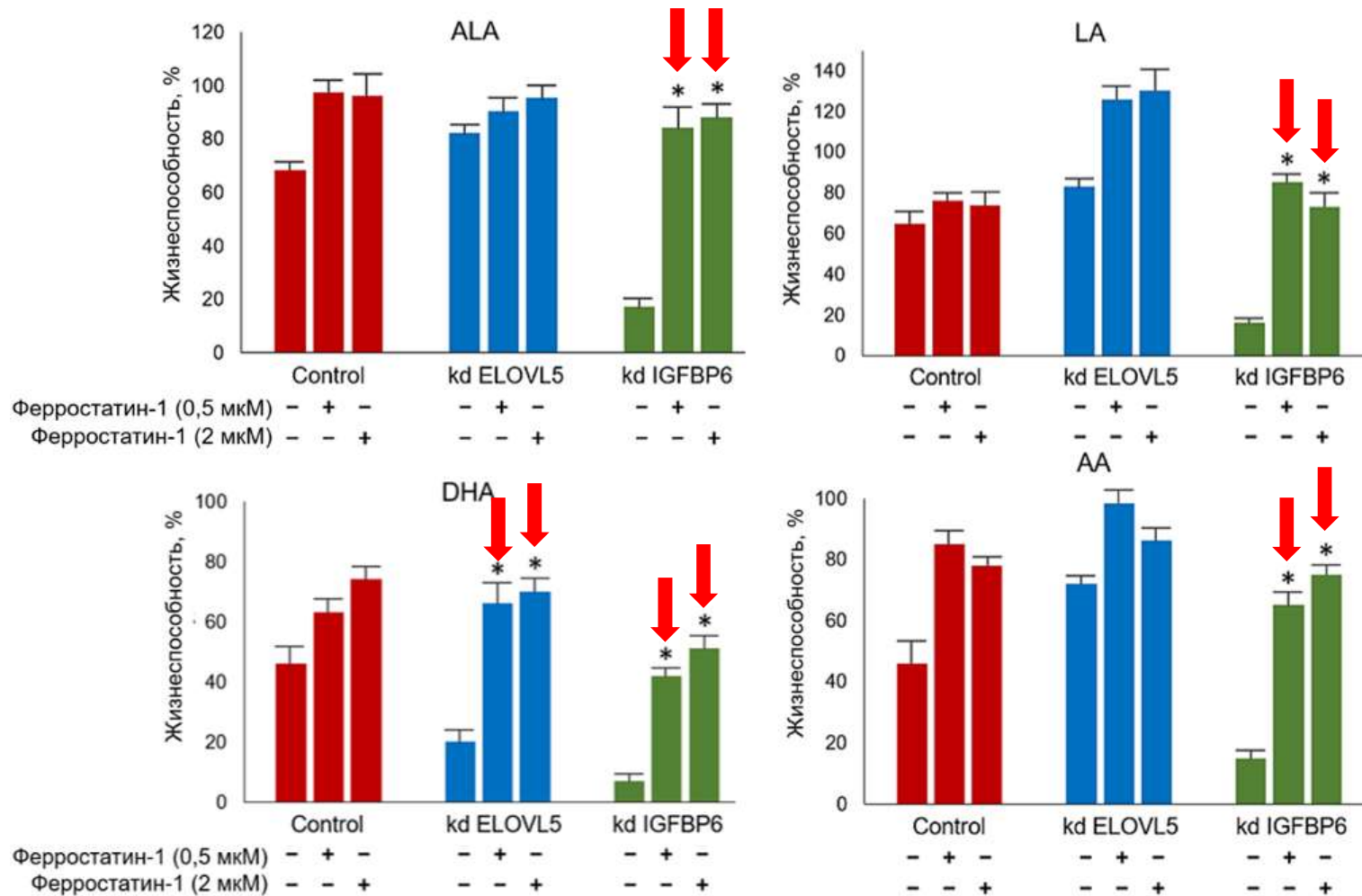


**Рисунок 3.** Оценка чувствительности клеток MDA-MB-231 к ферроптозу при их обработке стандартными препаратами эрастином и ферростатином-1 в различных сочетаниях в течение 24 ч. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM, n = 3)

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с чистым эрастином

# -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными клетками

# Нокдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* повышает чувствительность к ферроптозу

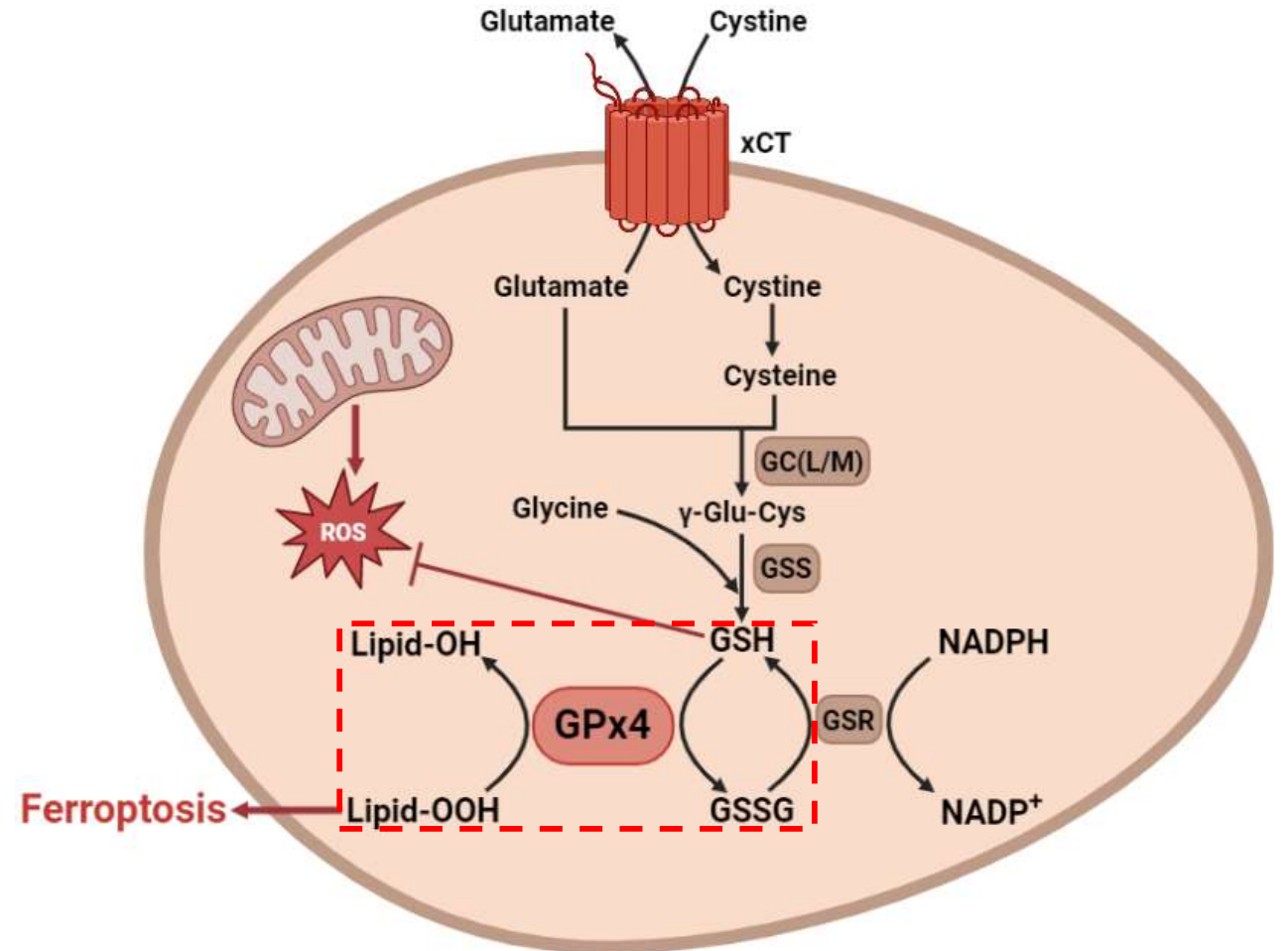
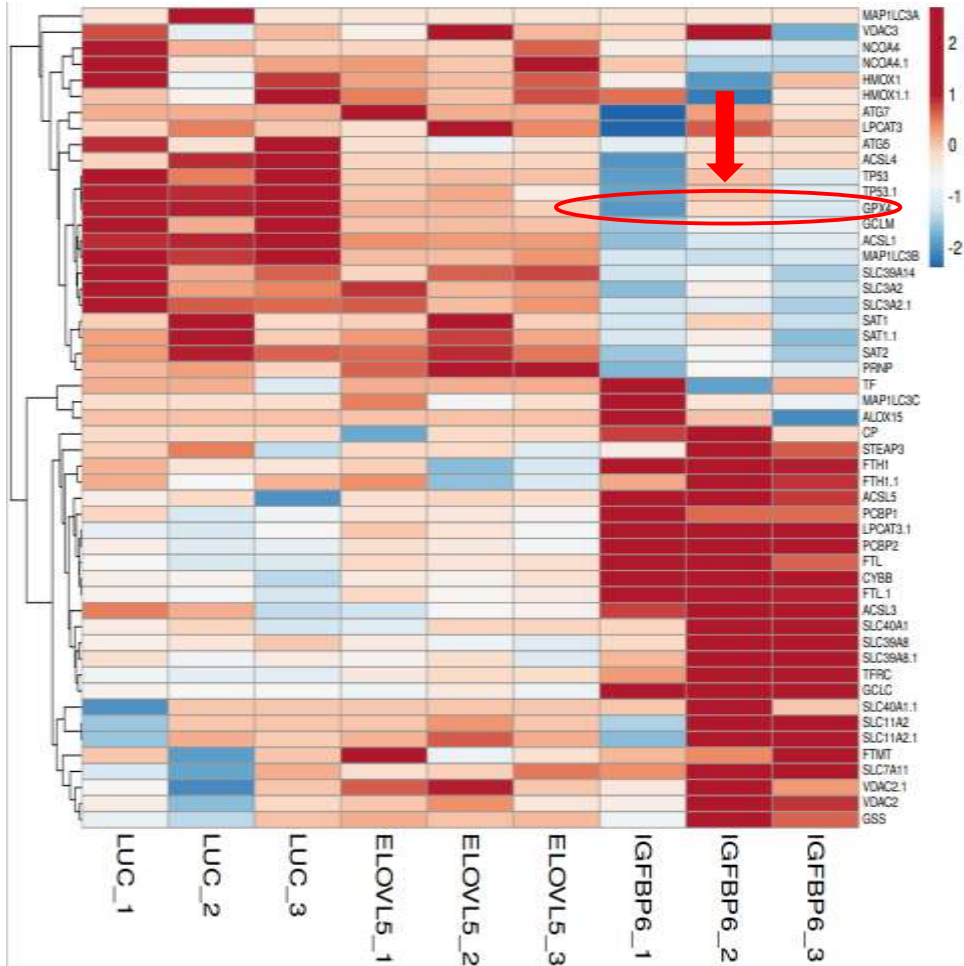


**Рисунок 4.** Оценка чувствительности клеток MDA-MB-231 к ферроптозу при их обработке ДПНЖК и ферростатином-1 в течение 24 часов. Концентрация для LA, AA и ALA составляла 300 мкМ и для DHA 200 мкМ. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM, n = 3)

\* - p < 0,05 по сравнению с чистыми ДПНЖК

# Снижение активности GPx4 является потенциальной причиной повышенной чувствительности к ферроптозу

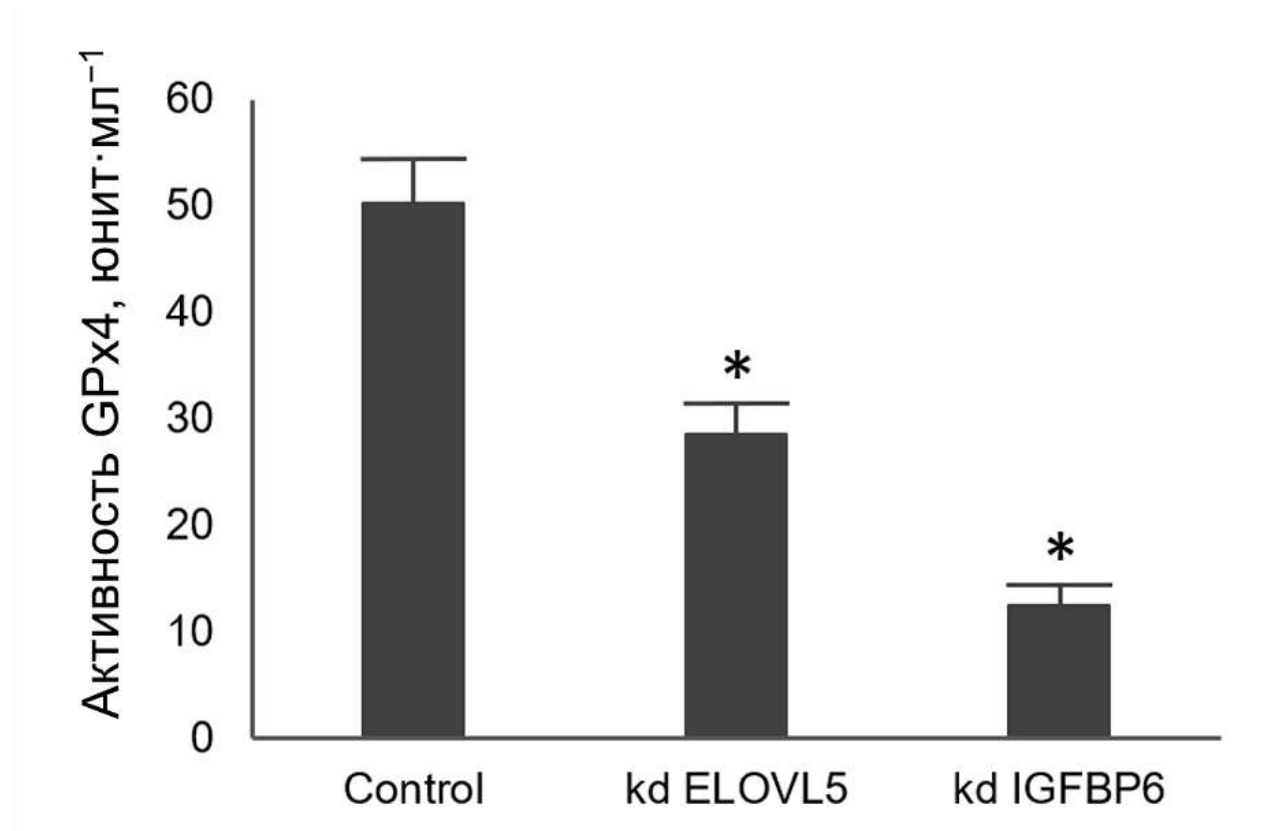
Тепловая карта экспрессии генов, регулирующих ферроптоз



**Рисунок 5.** Роль GPx4 в ферроптозе. GSH – глутатион; GSSG – дисульфид глутатиона; GPx4 – глутатионпероксидаза 4; ROS – реактивные формы кислорода; GSR – глутатиондисульфидредуктаза.



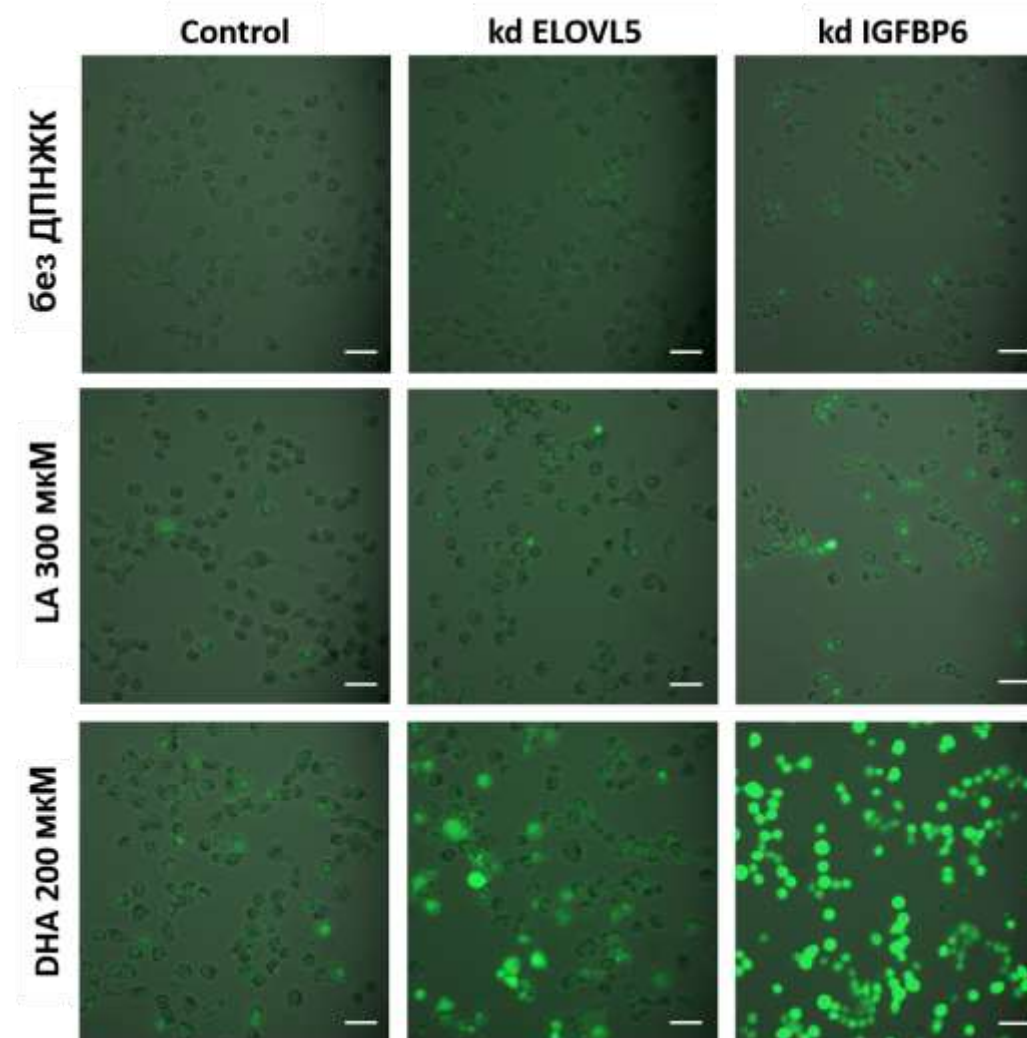
## Снижение активности GPx4 является потенциальной причиной повышенной чувствительности к ферроптозу



**Рисунок 6.** Активность глутатионпероксидазы, измеренная в клеточных лизатах на 1 миллион клеток после 10 минут инкубации. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM, n = 3).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными клетками

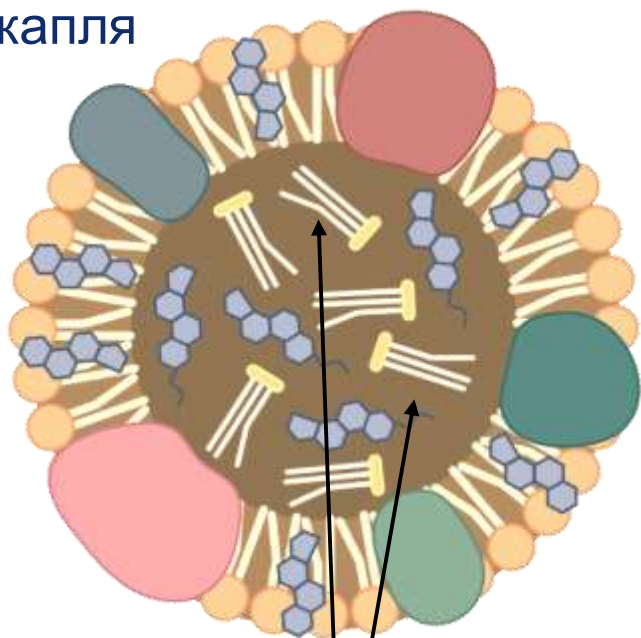
## Нокдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* активирует генерацию ROS из внешних ДПНЖК



**Рисунок 7.** Фотографии клеток MDA-MB-231 в культуральной среде без внешних ДПНЖК и с добавлением 300 мкМ LA или 200 мкМ DHA. Длина отрезка масштаба – 50 мкм

## Нокдаун гена *IGFBP6* снижает накопление липидных капель

липидная капля

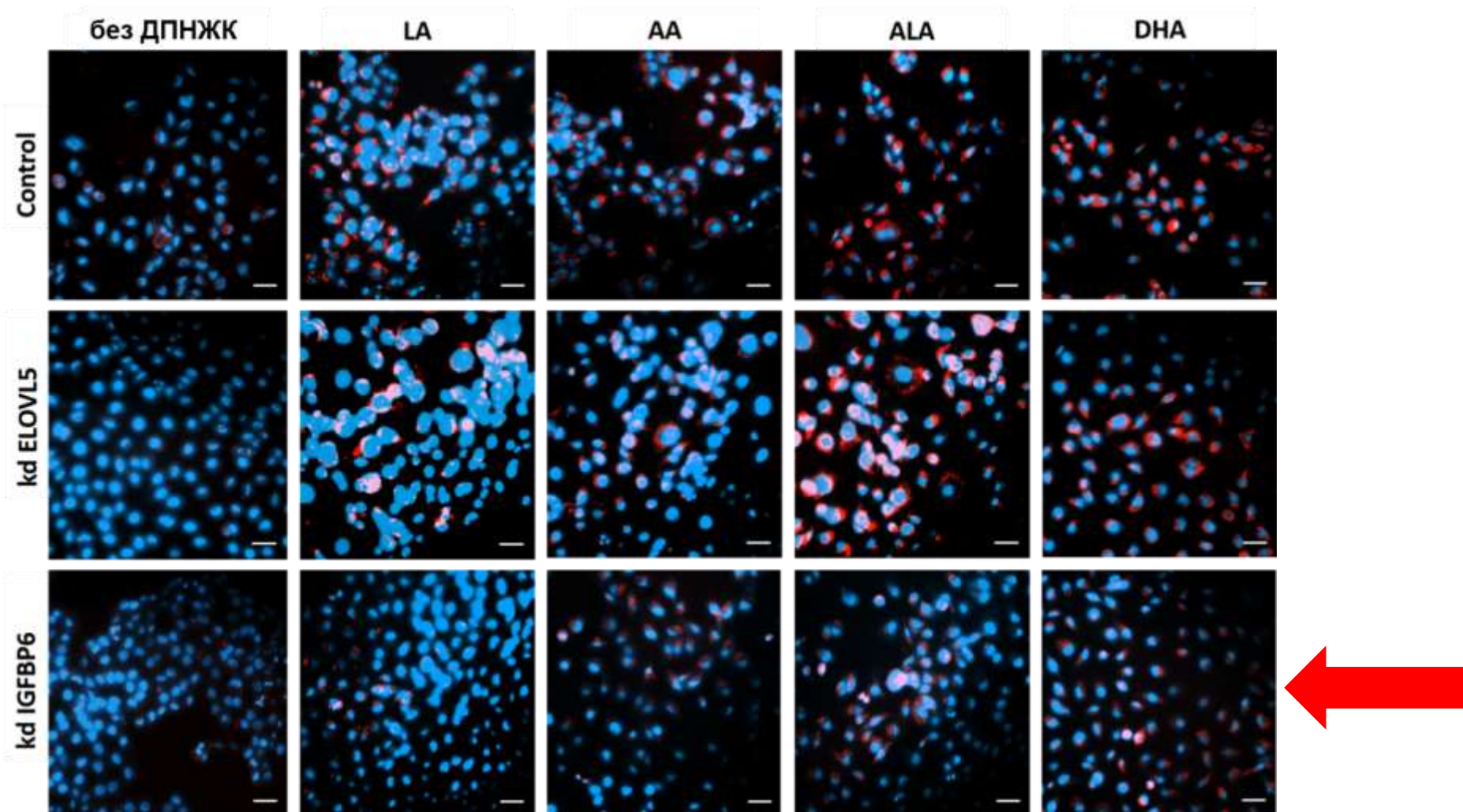


триацилглицериды  
(ТАГ)

**Таблица 1.** Достоверно изменившаяся (FDR  $p < 0,05$ ) экспрессия генов регуляции биосинтеза и транслокации ТАГ после нокдауна гена *IGFBP6* по данным транскриптомного анализа

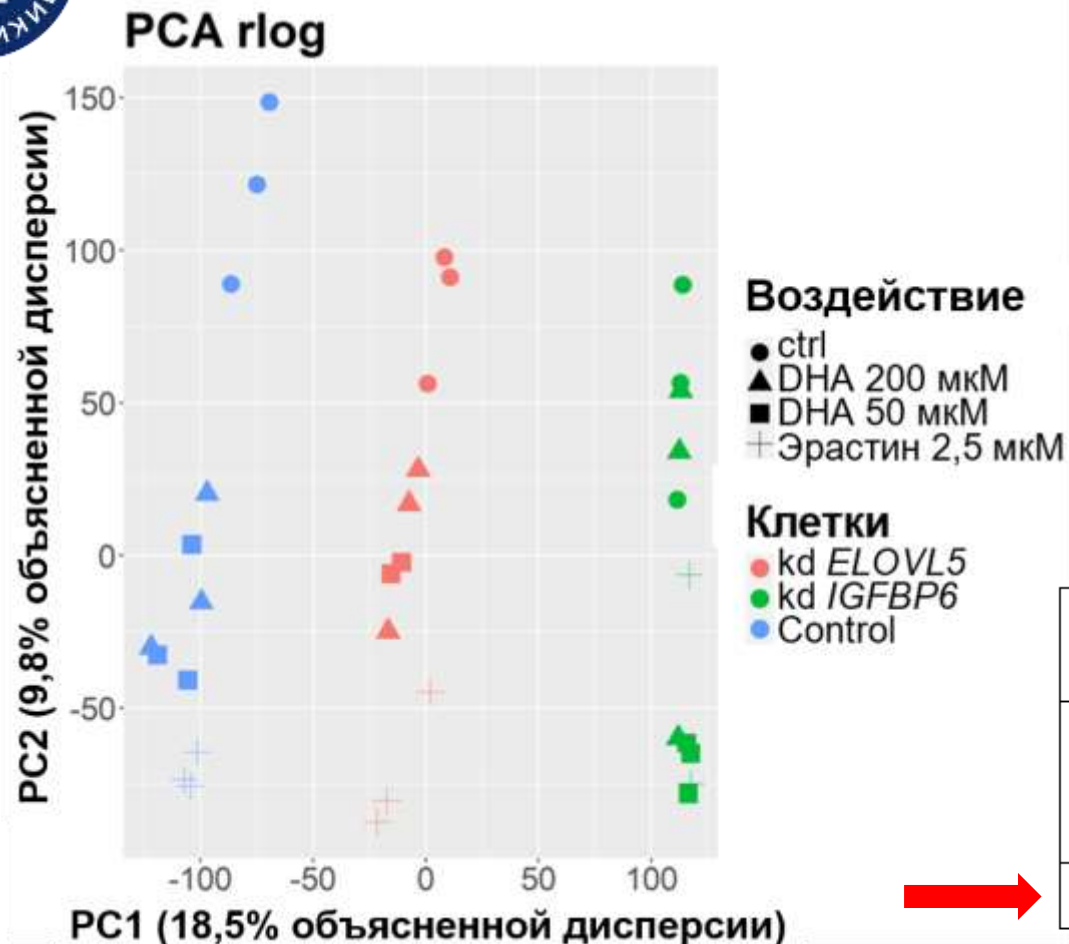
Ген	Кодируемый белок	Кратность изменения	$p$ -уровень значимости
<i>AGPAT3</i>	1-ацилглицерин-3-фосфат O-ацилтрансфераза	-1,63	$3,43 \cdot 10^{-8}$
<i>GPAT2</i>	глицерин-3-фосфат O-ацилтрансфераза, митохондриальная	-1,22	$4,10 \cdot 10^{-3}$
<i>GPAT3</i>	глицерин-3-фосфат ацилтрансфераза 3	-1,58	$3,50 \cdot 10^{-3}$
<i>DGAT1</i>	диацилглицерин O-ацилтрансфераза 1	-1,70	$1,69 \cdot 10^{-5}$

## Нокдаун гена *IGFBP6* снижает накопление липидных капель



**Рисунок 8.** Окрашивание липидных капель в клетках MDA-MB-231 в контрольной среде и в среде, содержащей 50 мкМ LA, AA, ALA и DHA. Длина отрезка масштаба – 50 мкм. Ядра (синие) окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), липидные капли (красные) окрашивали Oil Red O

# Нокдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231 в ответ на воздействие ДНА и эрастина



## Контрольная линия после обработки 50 мкМ ДНА

Обогащенные наборы генов ( $p < 0,05$ )	NES
Репликация ДНК	2,09
Активация пре-репликативного комплекса	2,05
Прохождение контрольных точек клеточного цикла	1,97

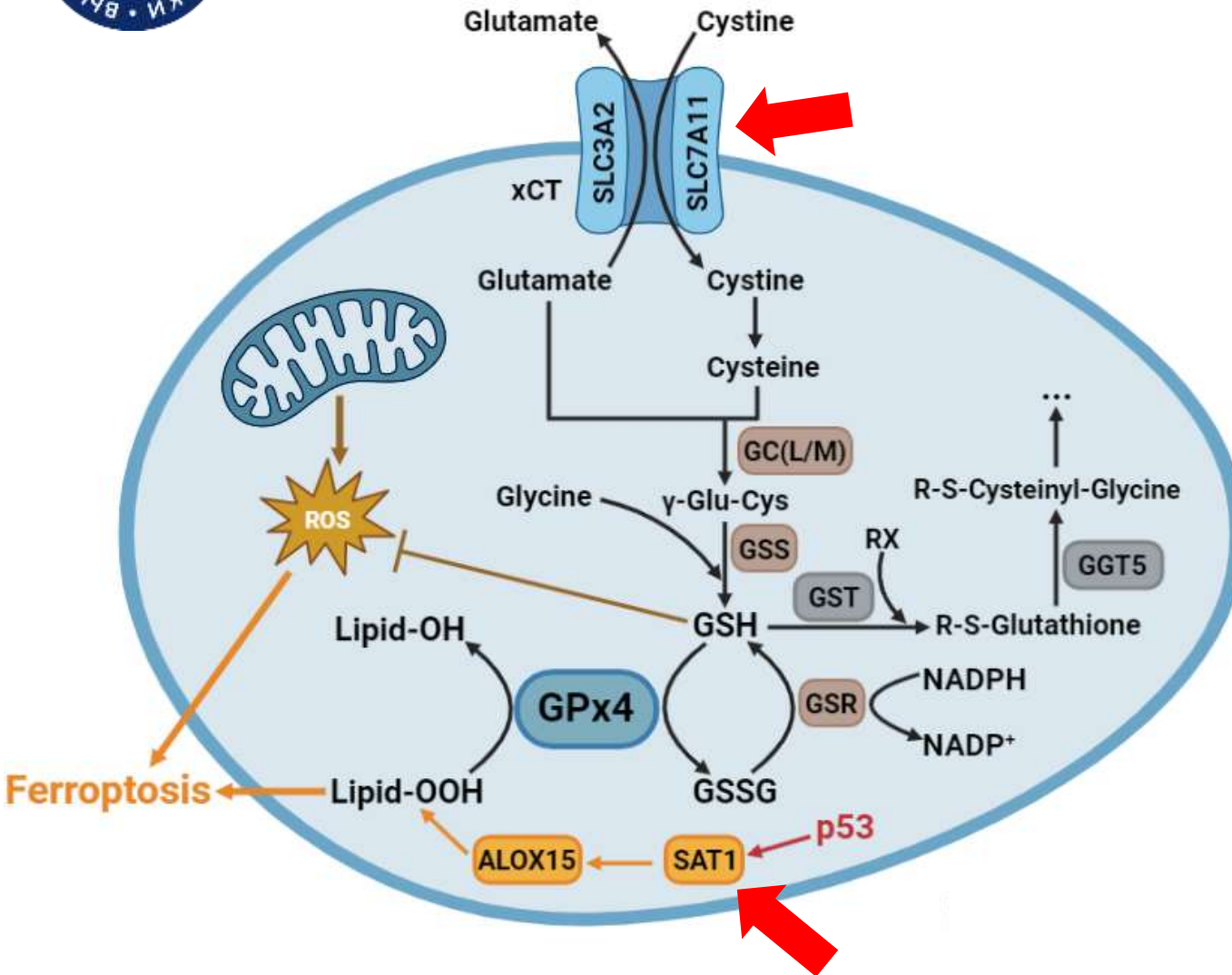
## Клетки MDA-MB-231 после обработки 200 мкМ ДНА

Обогащенные наборы генов ( $p < 0,05$ )	NES		
	Control	kd <i>ELOVL5</i>	kd <i>IGFBP6</i>
NRF2-опосредованная регуляция антиоксидантных ферментов детоксикации	2,00	2,06	2,16
Ферроптоз	1,67	1,47	2,13

**Рисунок 9.** Анализ главных компонент для идентификации генов, коррелирующих и антикоррелирующих с главными компонентами (клеточные линии и тип воздействия) двумерного пространства PCA

\*NES (Normalized Enrichment Score) – нормализованная оценка обогащения .по сравнению с контрольными условиями (без обработки препаратом)

# Нокдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231 в ответ на воздействие ДНА и эрастина



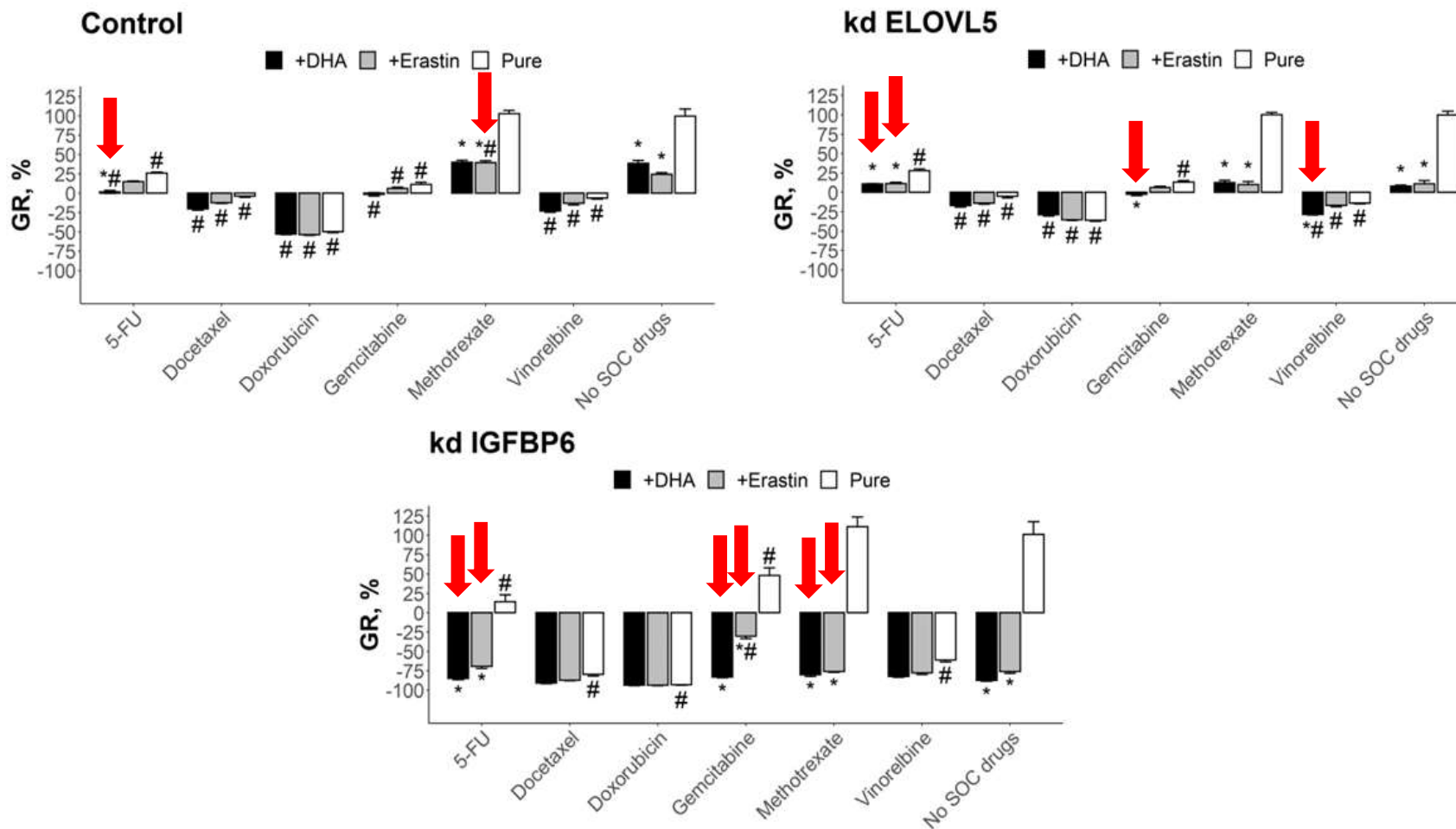
## После обработки 2,5 мкМ эрастина

Ген	Кратность изменения (FDR $p < 0,05$ )		
	Control	kd <i>ELOVL5</i>	kd <i>IGFBP6</i>
<i>SLC7A11</i>	12,0	6,8	2,2
<i>SAT1</i>	1	1	4,9

## После обработки 200 мкМ ДНА

Ген	Кратность изменения (FDR $p < 0,05$ )		
	Control	kd <i>ELOVL5</i>	kd <i>IGFBP6</i>
<i>SLC7A11</i>	4,4	3,2	3,0
<i>SAT1</i>	1	-2,0	3,0

## Комбинация препаратов SOC с индукторами ферроптоза



**Рисунок 10.** Результаты испытаний лекарственных препаратов SOC и их комбинации с DHA и эрастином на сфероиде в матриксе из клеток MDA-MB-231. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM, n = 3)

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей обработкой чистым SOC (без DHA или эрастина)

# -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующими условиями без препаратов SOC



## Основные выводы:

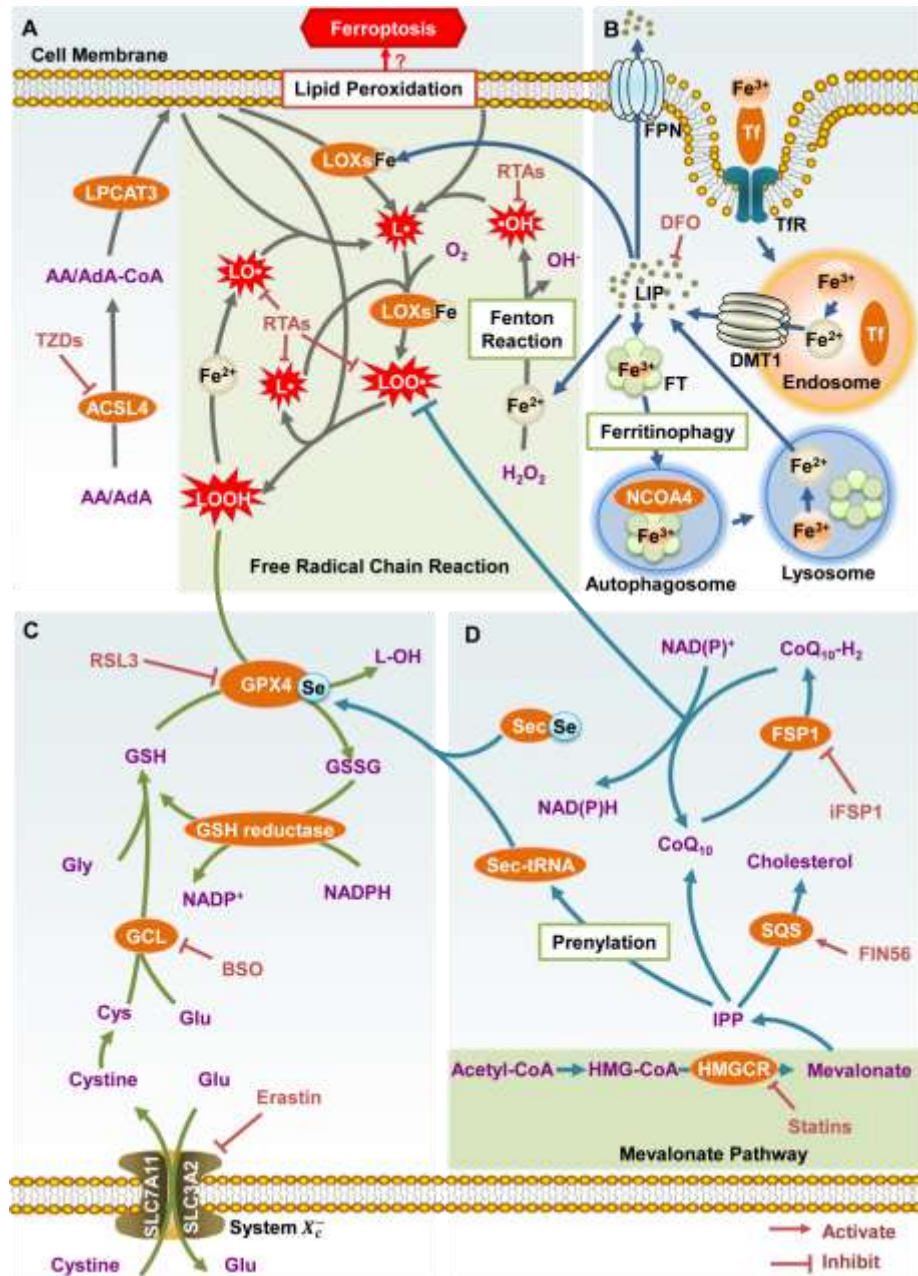
- 1) Снижение экспрессии либо гена *ELOVL5*, либо гена *IGFBP6* повышает чувствительность клеток рака молочной железы MDA-MB-231 к  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ДПНЖК, которые вызывают гибель клеток путем активации ферроптоза.
- 2) Снижение активности основного антиоксидантного фермента GPx4, усиление генерации ROS и нарушения аккумуляции липидных капель в клетках после нокадаунов маркерных генов, вероятно, являются ключом к более низкому антиоксидантному потенциалу и, как следствие, к более высокой чувствительности к ферроптозу.
- 3) Все три клеточные линии MDA-MB-231 (контрольная, с нокадауном гена *ELOVL5* и с нокадауном гена *IGFBP6*) существенно отличаются друг от друга на уровне экспрессии.
- 4) Обработка клеток 50 мкМ DHA приводит к достоверному обогащению наборов генов, обеспечивающих пролиферацию, что подтверждает стимулирующие рост эффекты малых концентраций ДПНЖК, особенно на контрольные клетки MDA-MB-231. При этом обработка всех клеточных линий 200 мкМ DHA стимулирует усиленную регуляцию генов, ассоциированных с ферроптозом, причем наиболее эффективно такая регуляция протекает в клетках с нокадауном гена *IGFBP6*, что хорошо согласуется с большей чувствительностью данных клеток к индукции ферроптоза.
- 5) Комбинации стандартных химиотерапевтических средств с индукторами ферроптоза могут значительно усиливать действие препаратов, особенно для клеток с низкой экспрессией гена *IGFBP6*.



**Спасибо за внимание!**



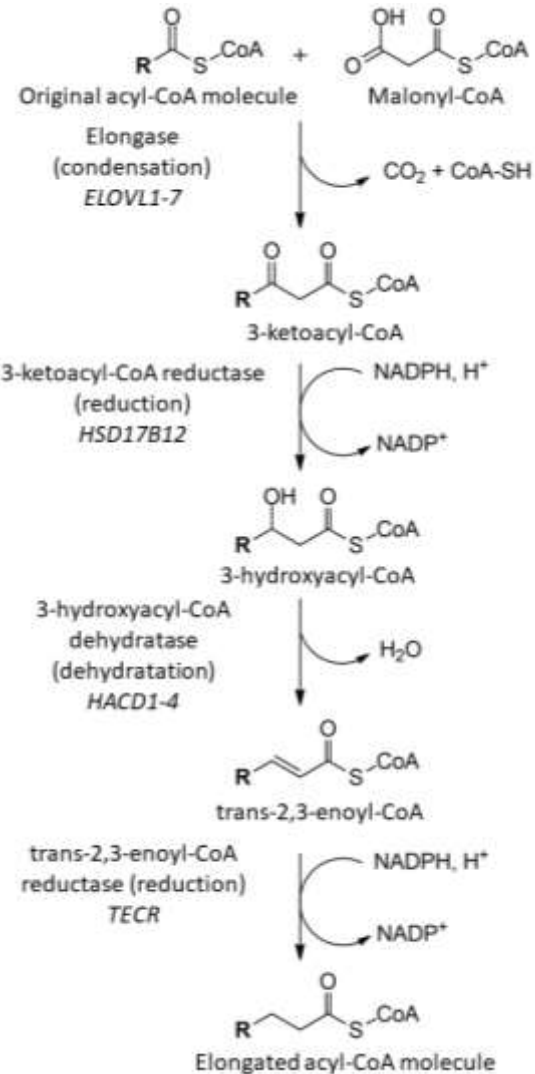
Москва, 2024 год



# Приложение

Нокдаун генов *ELOVL5* и *IGFBP6* влияет липидный метаболизм

а)



б)

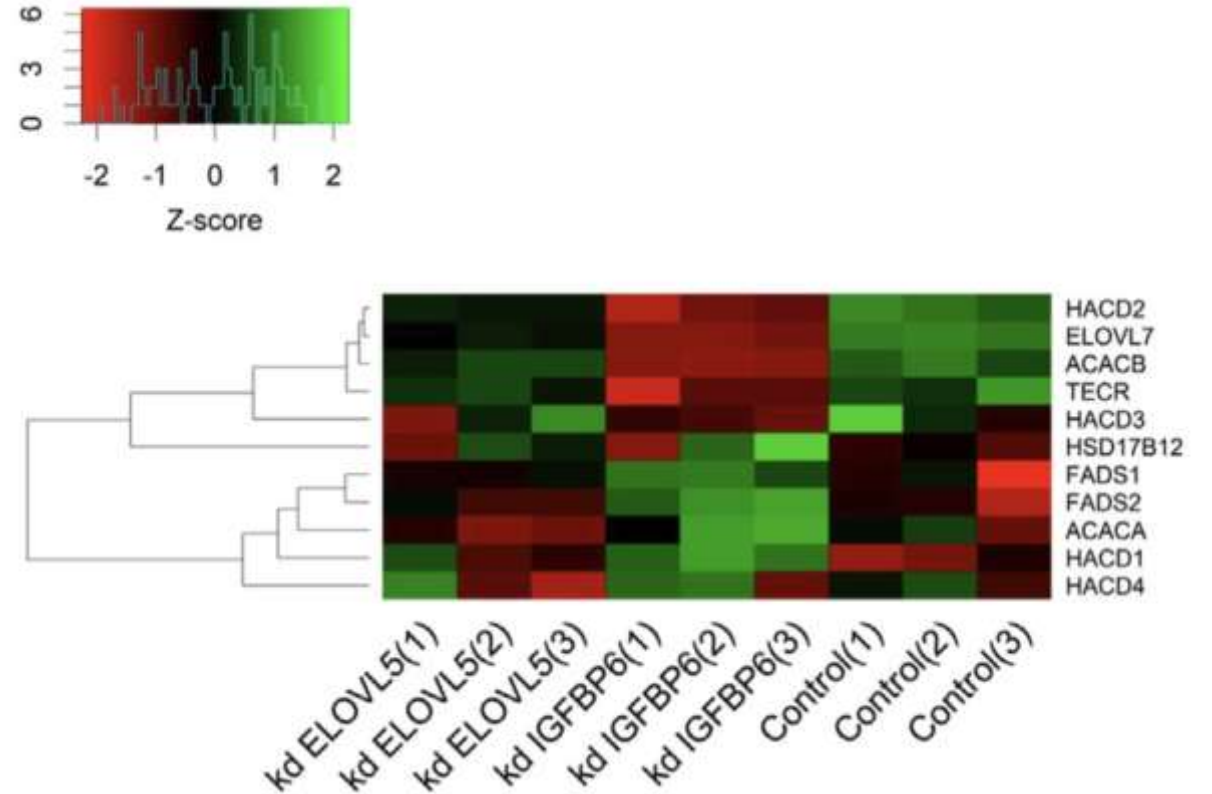
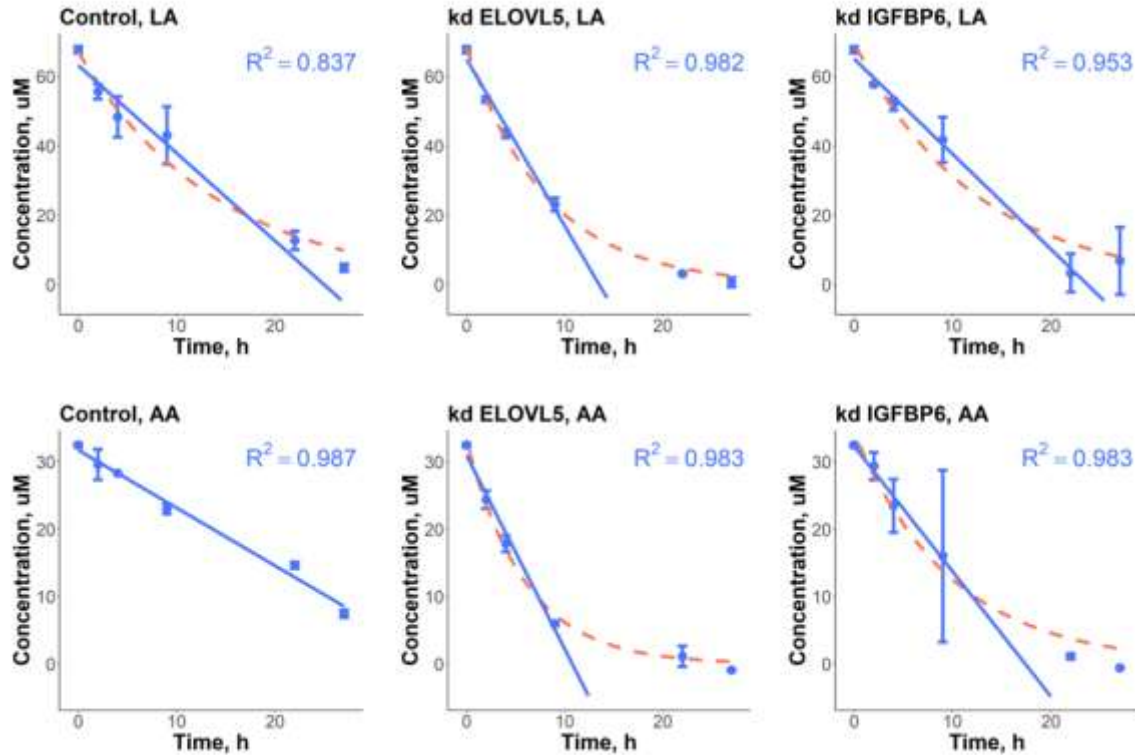


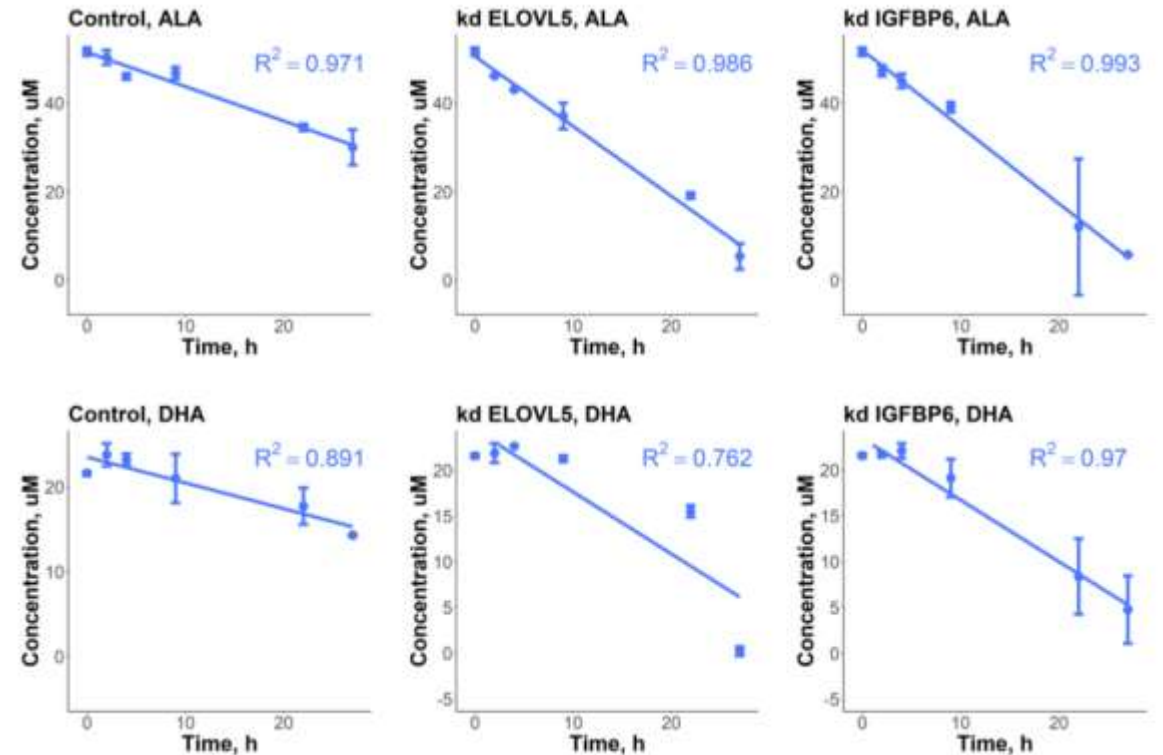
Рисунок S2. а) Схематическое изображение процесса элонгации жирных кислот; б) Тепловая карта экспрессии генов, регулирующих элонгацию жирных кислот

Нокаун генов *ELOVL5* и *IGFBP6* влияет на поглощение внешних жирных кислот

$\omega$ -6



$\omega$ -3

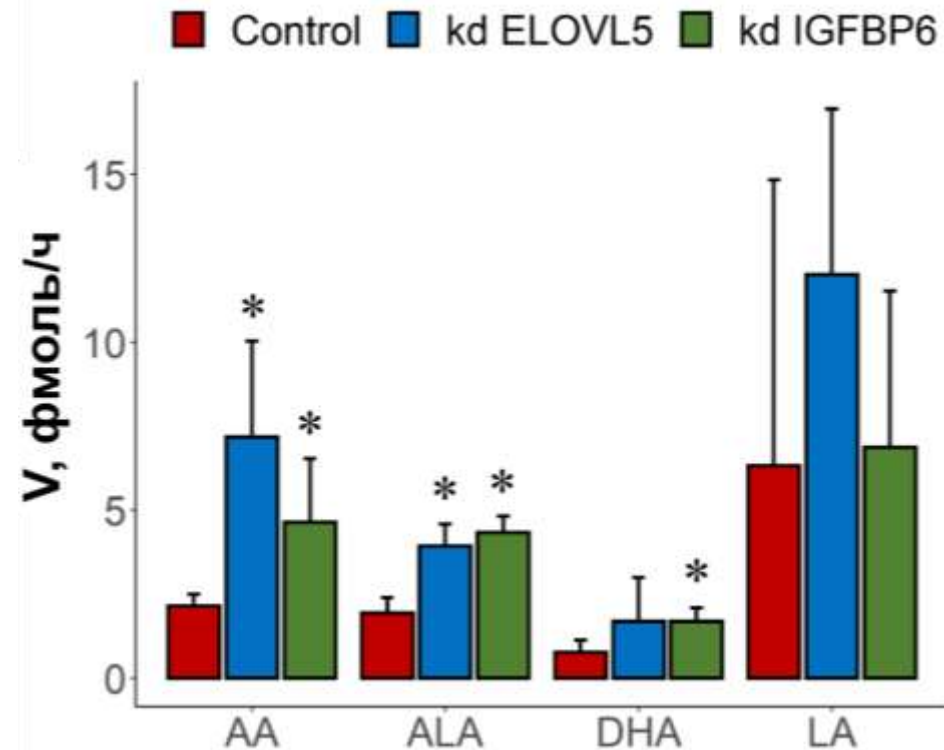


**Рисунок S3.** Кинетика изменения концентрации различных ДПНЖК (LA, AA, ALA и DHA) в культуральной среде в присутствии контрольных клеток MDA-MB-231 и клеток с нокауном генов *ELOVL5* и *IGFBP6*.

Столбики погрешностей представляют собой стандартное отклонение (SD, n = 2)

## Приложение

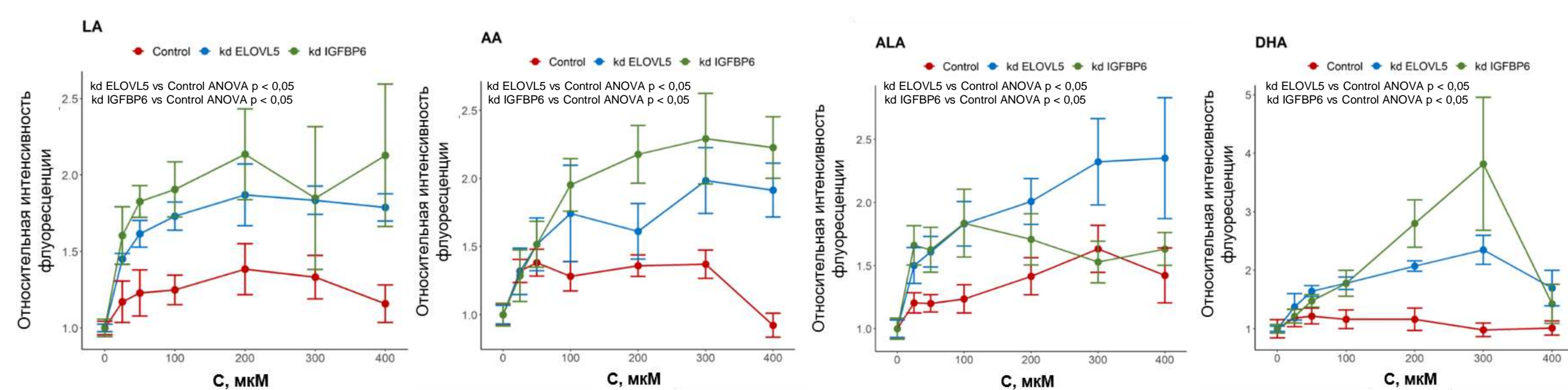
Нокадаун генов *ELOVL5* и *IGFBP6* влияет на поглощение внешних жирных кислот



**Рисунок S4.** Рассчитанные скорости поглощения (на одну клетку) различных ДПНЖК (LA, AA, ALA и DHA) для контрольных клеток MDA-MB-231 и для клеток с нокадауном генов *ELOVL5* и *IGFBP6*. Столбики погрешностей представляют собой 95% доверительные интервалы

# Приложение

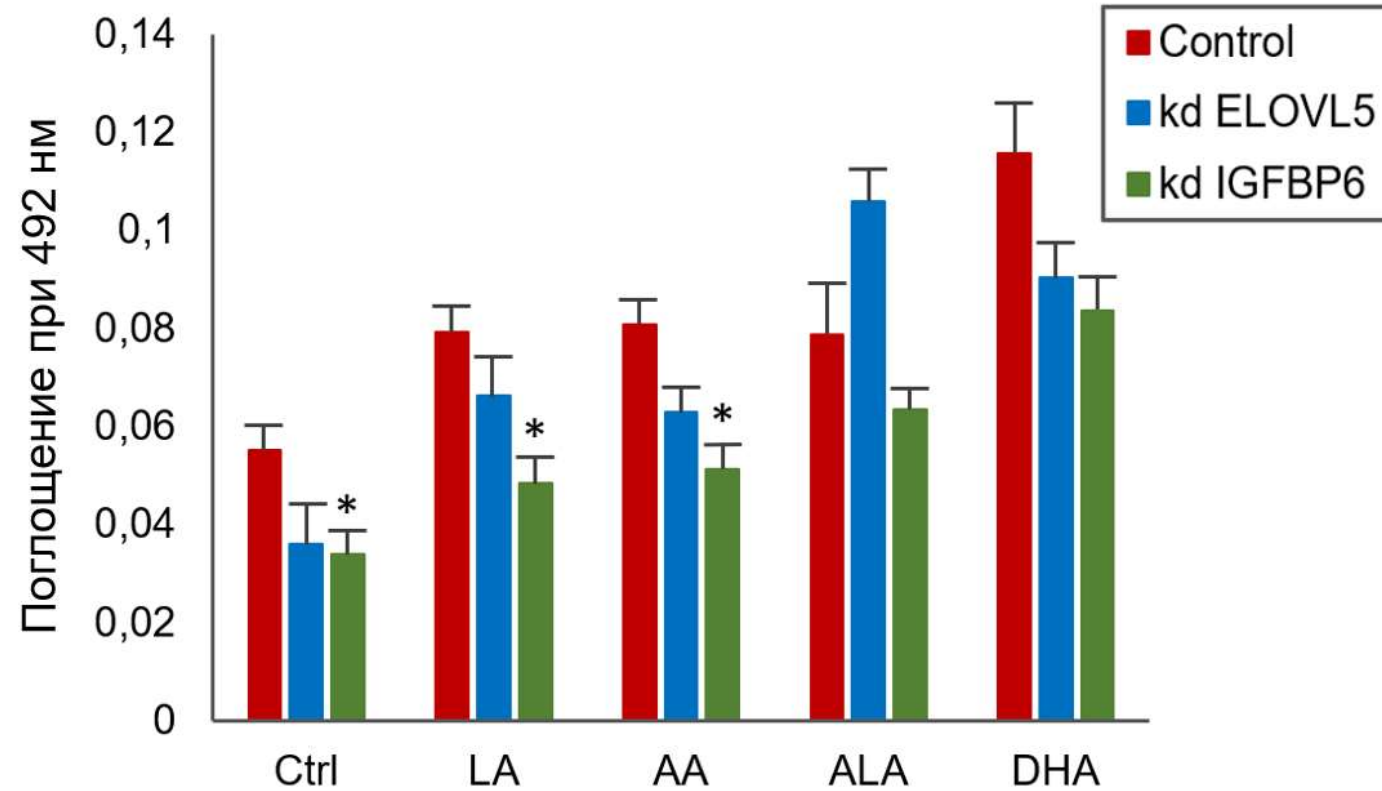
## Нокадаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* активирует генерацию ROS из внешних ДПНЖК



**Рисунок S5.** Оценка окислительного стресса в клетках MDA-MB-231 под влиянием различных ДПНЖК путем детекции активных форм кислорода (ROS). Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM, n = 3)

# Приложение

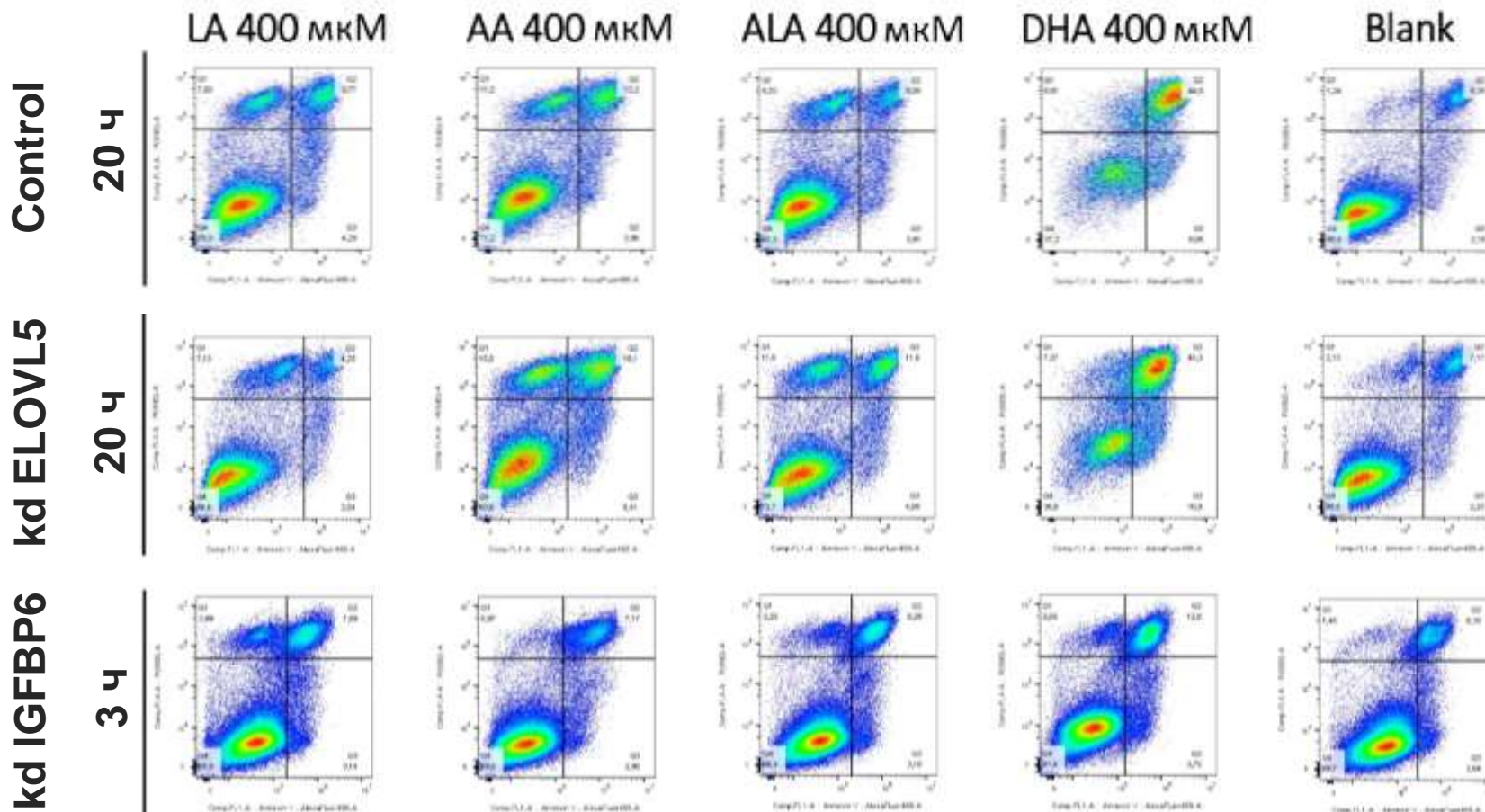
Нокаун гена *IGFBP6* снижает накопление липидных капель



**Рисунок S6.** Количественное определение липидных капель в клетках MDA-MB-231 после обработки различными ДПНЖК. На диаграмме представлена абсорбция экстрагированного Oil Red O. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM, n = 3)

# Приложение

Цитотоксический эффект ДПНЖК нельзя объяснить апоптозом

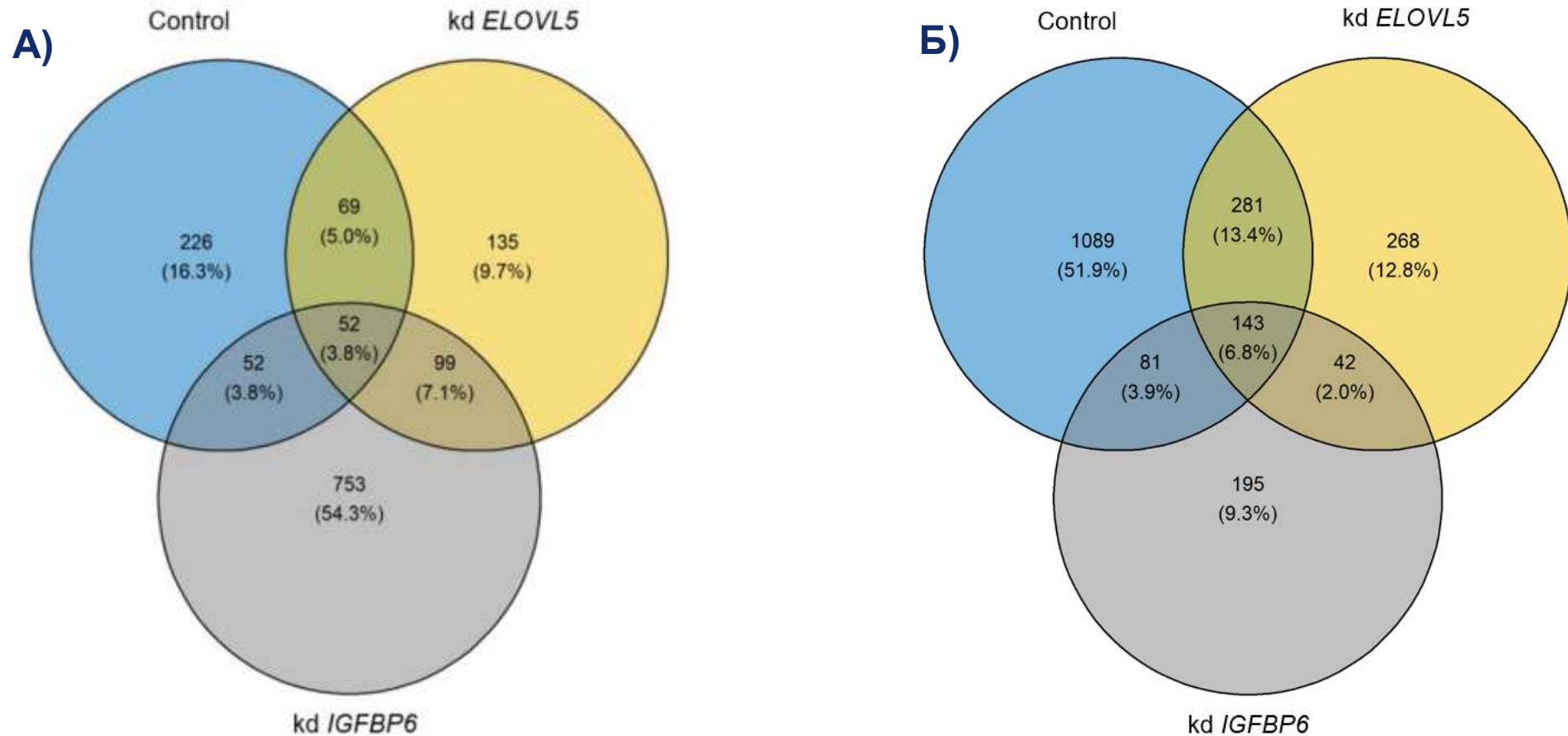


**Рисунок S7.** Влияние различных ДПНЖК на активацию апоптоза в клетках MDA-MB-231. Двумерные графики интегральной интенсивности флуоресценции конъюгата аннексина V с красителем Alexa Fluor 488 (горизонтальная ось) и интегральной интенсивности флуоресценции йодида пропидия (вертикальная ось) в клетках с нокадауном генов *ELOVL5* или *IGFBP6*, а также в контрольных клетках



## Приложение

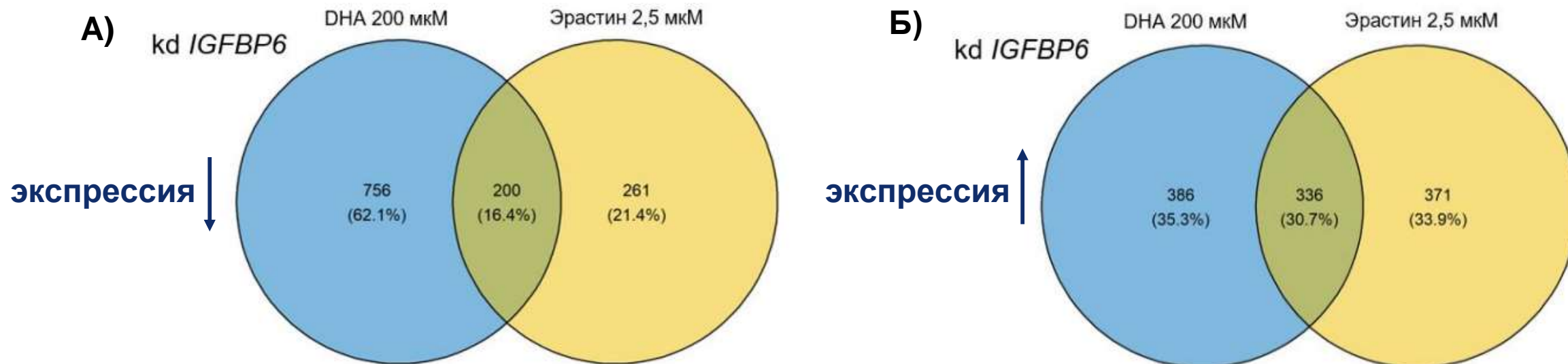
Нокадаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231 в ответ на воздействие ДНА и эрастина



**Рисунок S8.** Диаграммы Венна, показывающие общее количество дифференциально экспрессируемых генов в каждой клеточной линии, значимо снизивших свою экспрессию после обработки **А)** 200 мкМ ДНА и **Б)** 2,5 мкМ эрастина

## Приложение

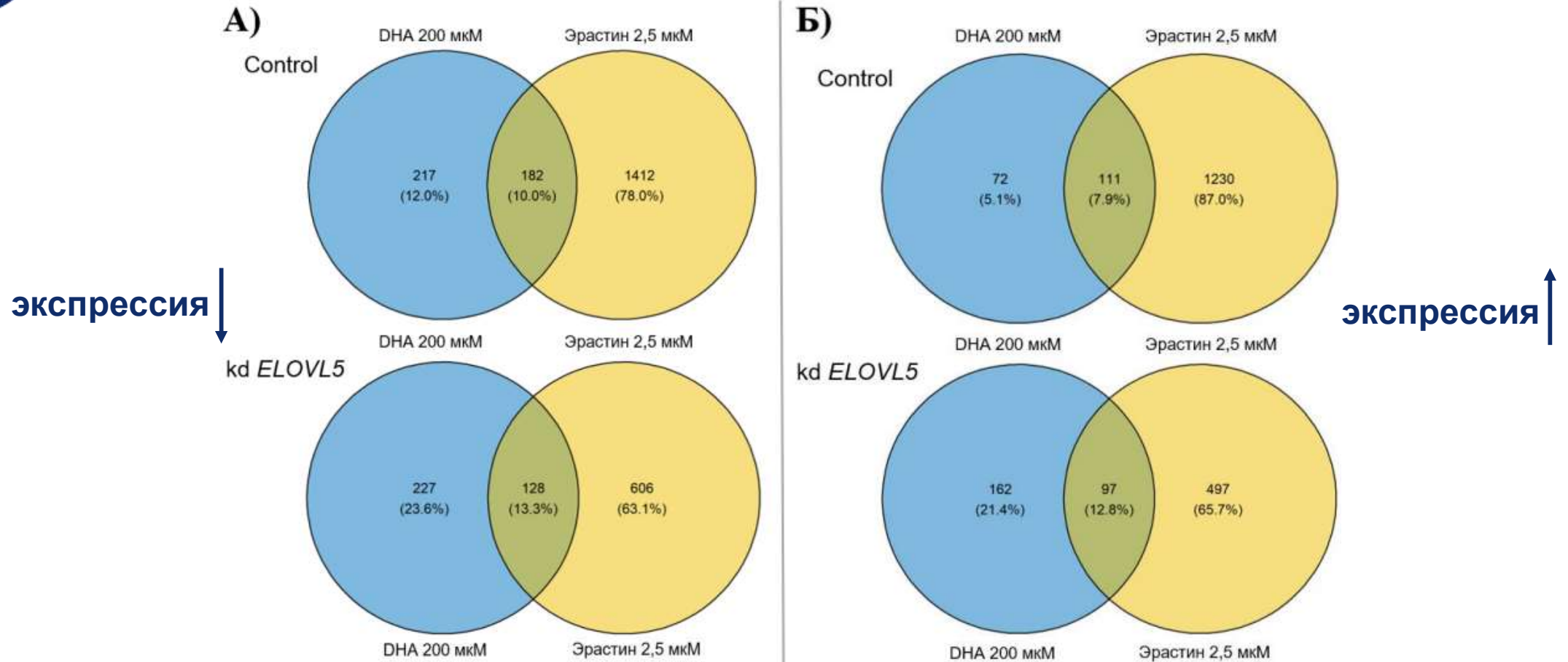
Но́кдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231 в ответ на воздействие DHA и эрастина



**Рисунок S9.** Диаграммы Венна, показывающие общее количество дифференциально экспрессируемых генов в клетках с но́кдауном *IGFBP6*, **А)** значимо снизивших свою экспрессию или **Б)** значимо повысивших свою экспрессию по сравнению с контрольными условиями в результате воздействия 200 мкМ DHA или 2,5 мкМ эрастина

## Приложение

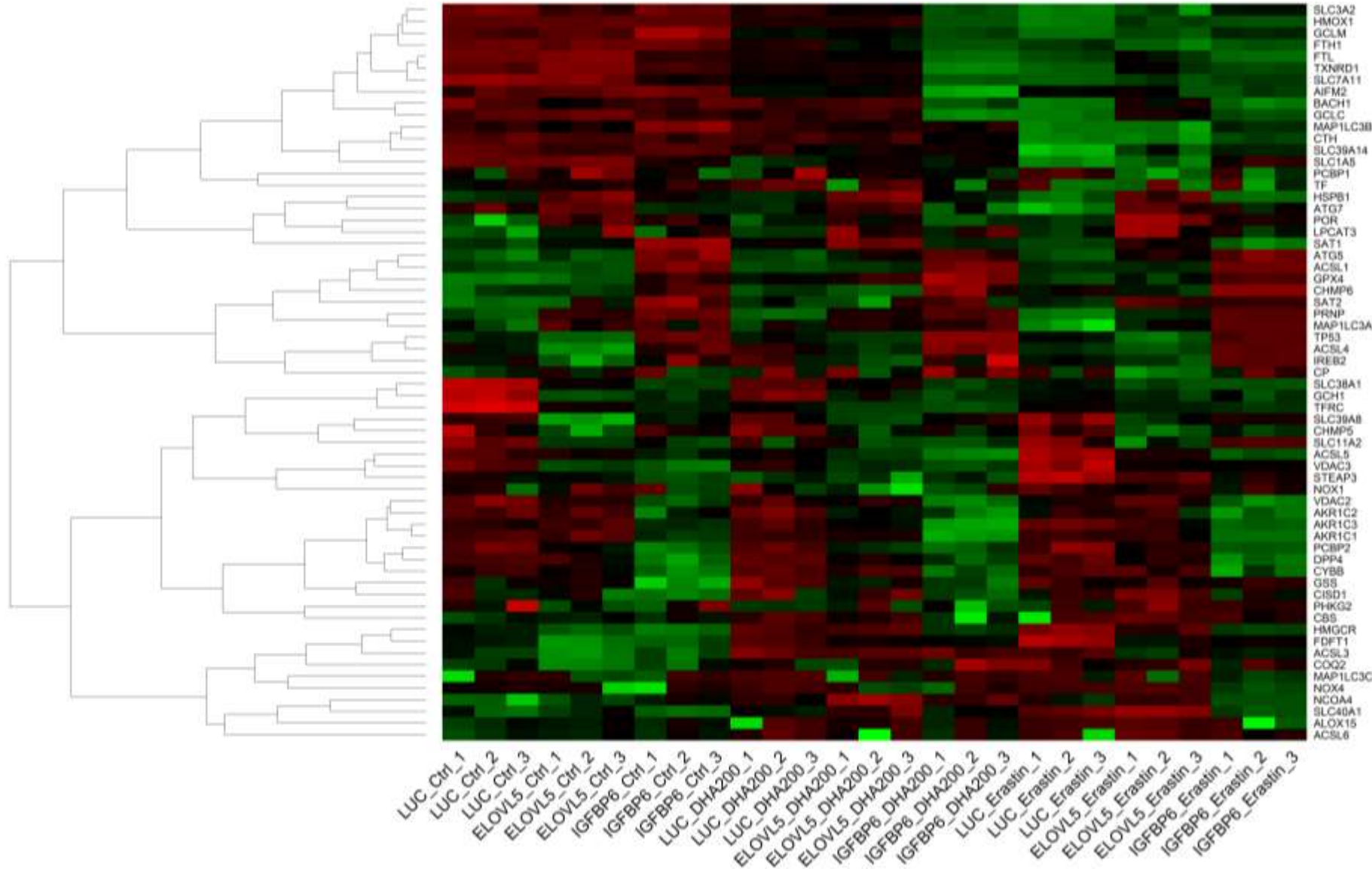
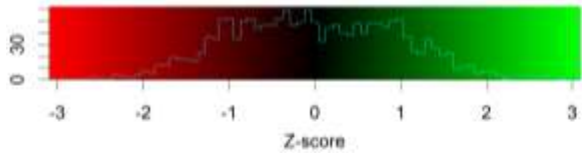
Но́кдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231 в ответ на воздействие DHA и эрастина



**Рисунок S10.** Диаграммы Венна, показывающие общее количество дифференциально экспрессируемых генов в контрольной линии и в клетках с но́кдауном *ELOVL5*, **А)** значимо снизивших свою экспрессию или **Б)** значимо повысивших свою экспрессию по сравнению с контрольными условиями в результате воздействия 200 мкМ DHA или 2,5 мкМ эрастина

# Приложение

Нокдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231 в ответ на воздействие ДНА и эрастина



**Рисунок S11.** Тепловая карта экспрессии генов, участвующих в регуляции ферроптоза. Приведены данные для трех биологических повторов для каждой линии (контрольной, с нокдауном *ELOVL5* и с нокдауном *IGFBP6*) после обработки клеток 200 мкМ ДНА или 2,5 мкМ эрастина



## Приложение

Но́кдаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* изменяет транскриптомные профили клеток MDA-MB-231

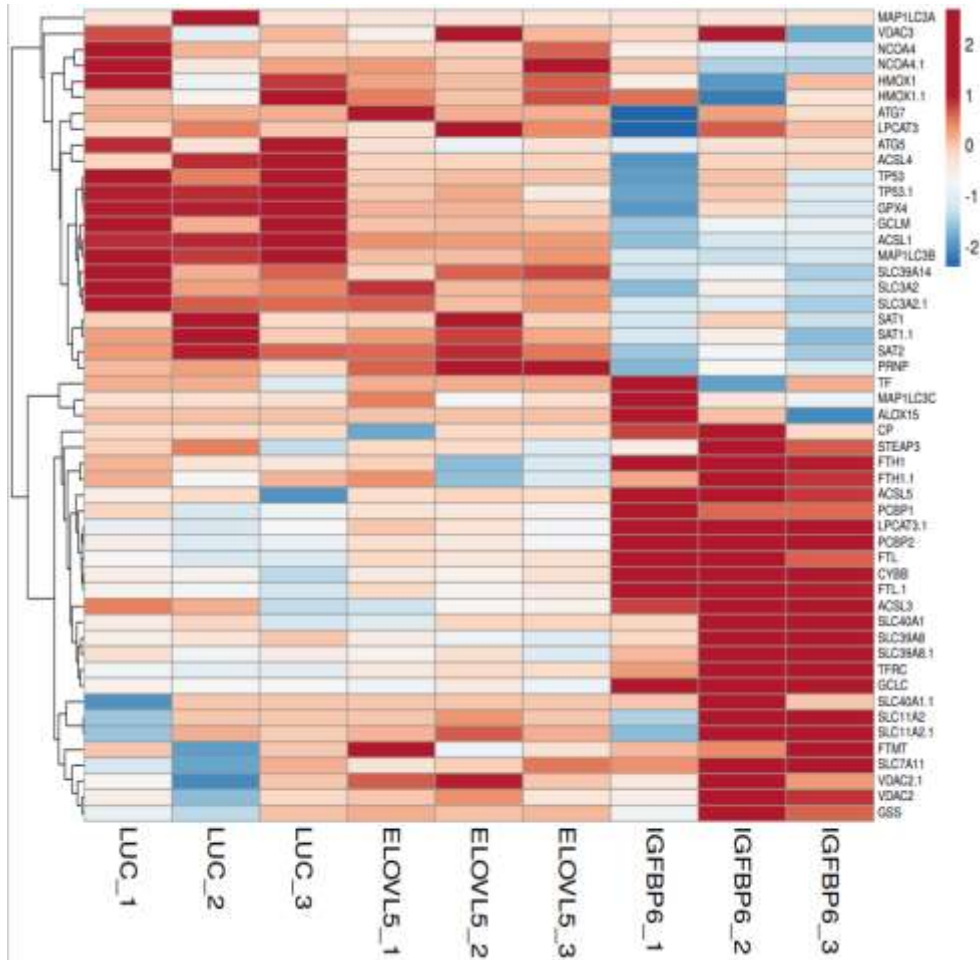
Изменившаяся по данным секвенирования экспрессия генов в клетках с но́кдаунами *ELOVL5* и *IGFBP6* относительно контрольной линии MDA-MB-231

Ген	Кратность изменения ( $p < 0,05$ )	
	kd <i>ELOVL5</i>	kd <i>IGFBP6</i>
<i>GPx4</i>	1	-1,73
<i>AGPAT3</i>	1	-1,63
<i>GPAT2</i>	-4,17	1
<i>DGAT1</i>	-1,98	-1,73

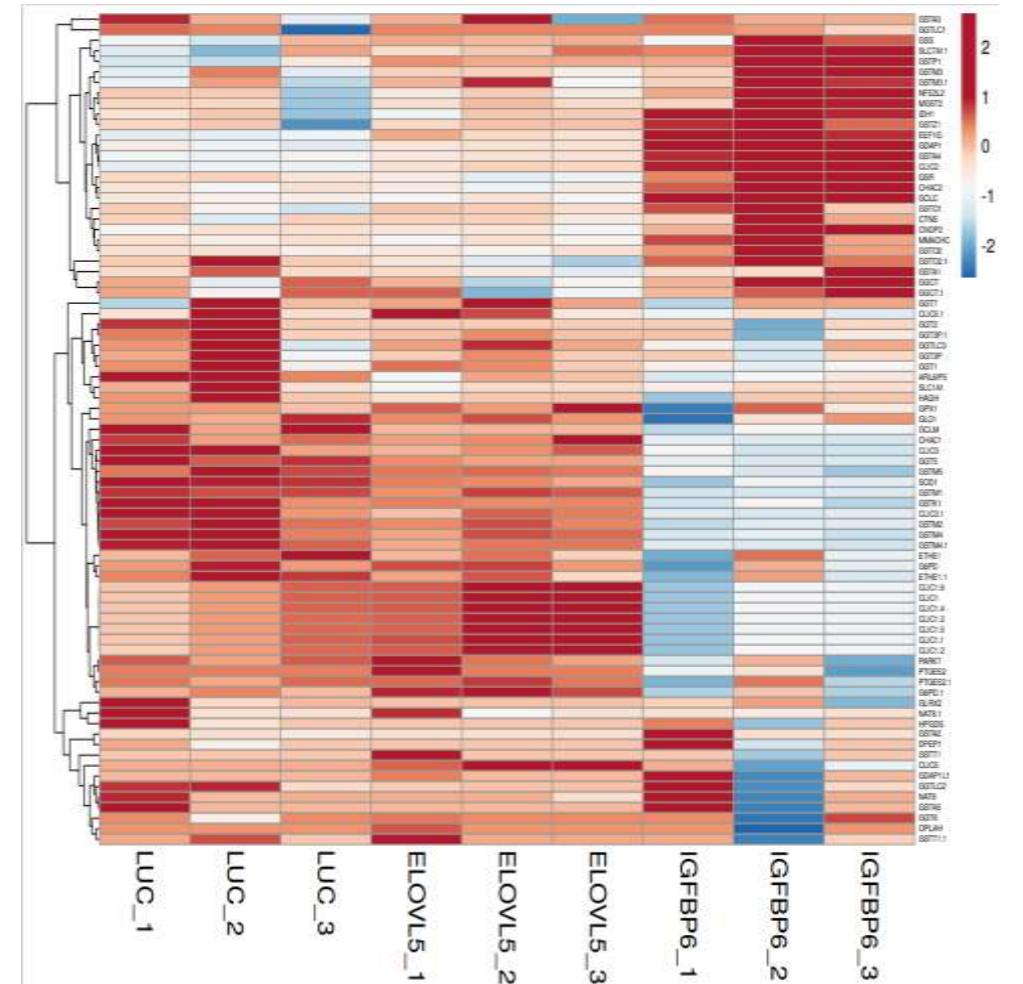
# Приложение

## Транскриптомный анализ на микрочипах

Тепловая карта экспрессии генов, регулирующих ферроптоз

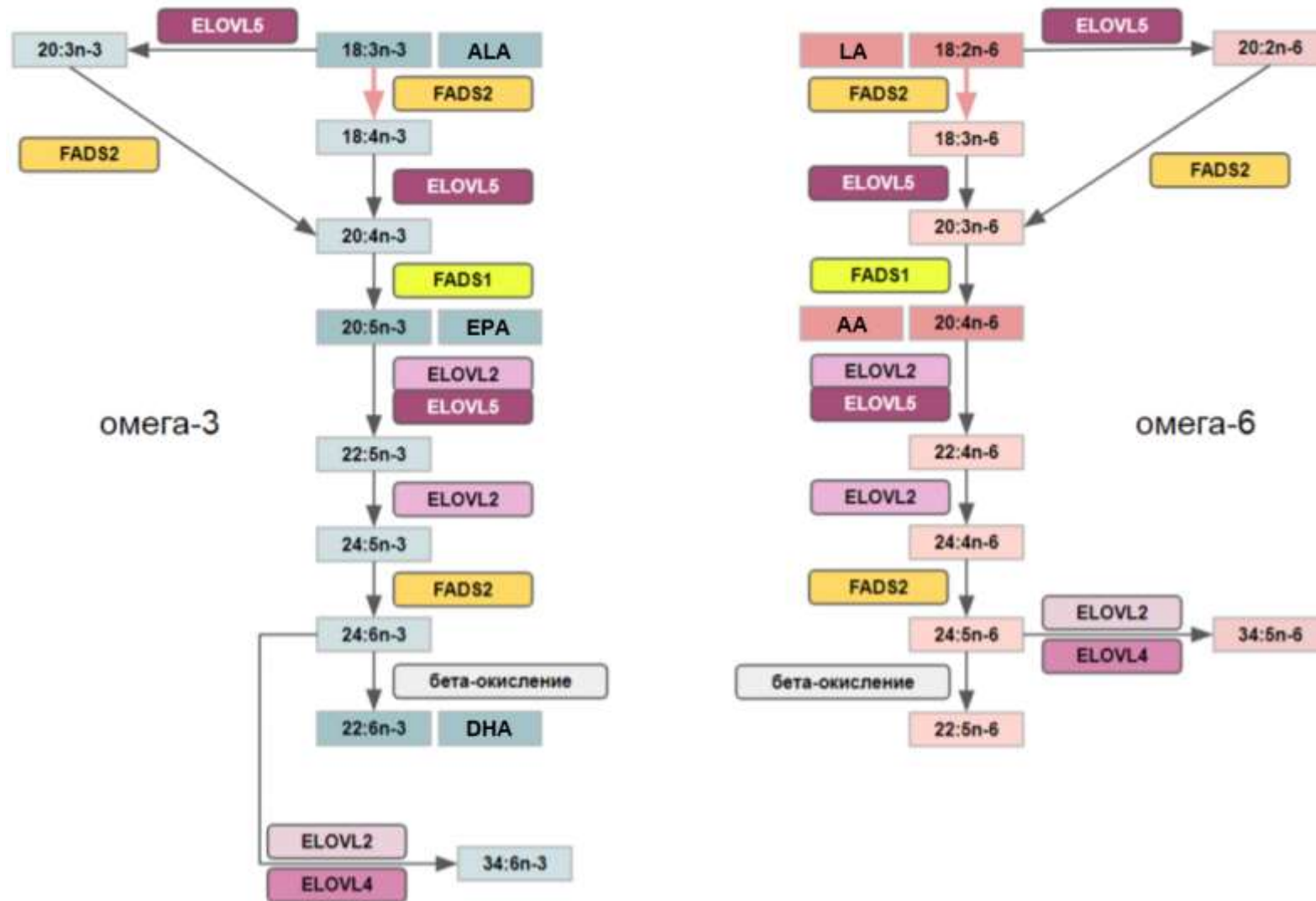


Тепловая карта экспрессии генов, регулирующих глутатионовый путь ингибирования ферроптоза



# Приложение

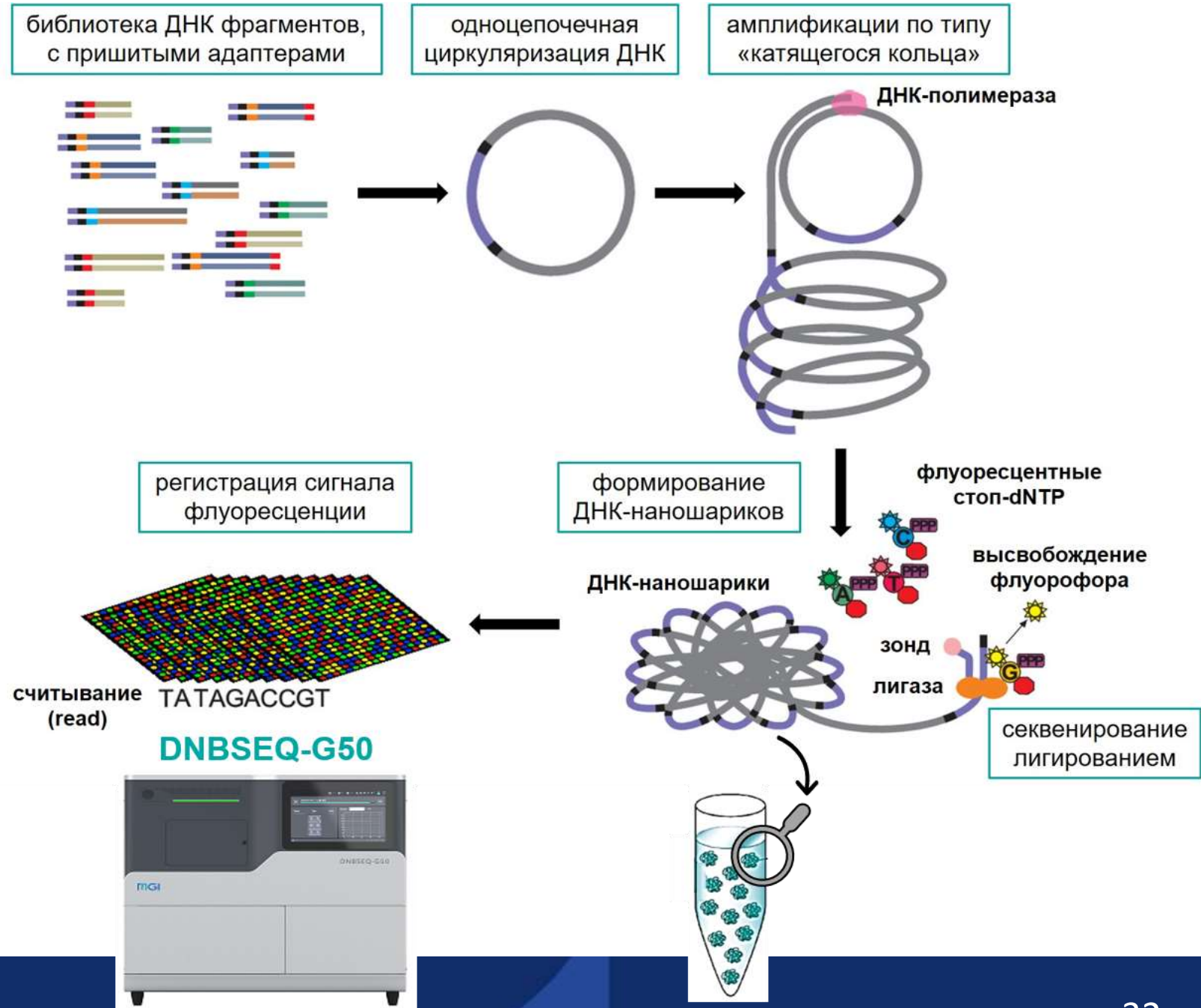
## Схема синтеза ДПНЖК





# Приложение

## Секвенирование MGI





# Приложение

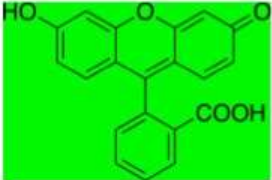
Нокадаун генов *ELOVL5* или *IGFBP6* активировывает генерацию ROS из внешних ДПНЖК

**A**

CC(=O)Oc1ccc2c(c1)oc3cc(OC(=O)C)ccc3c2C(=O)c4ccccc4

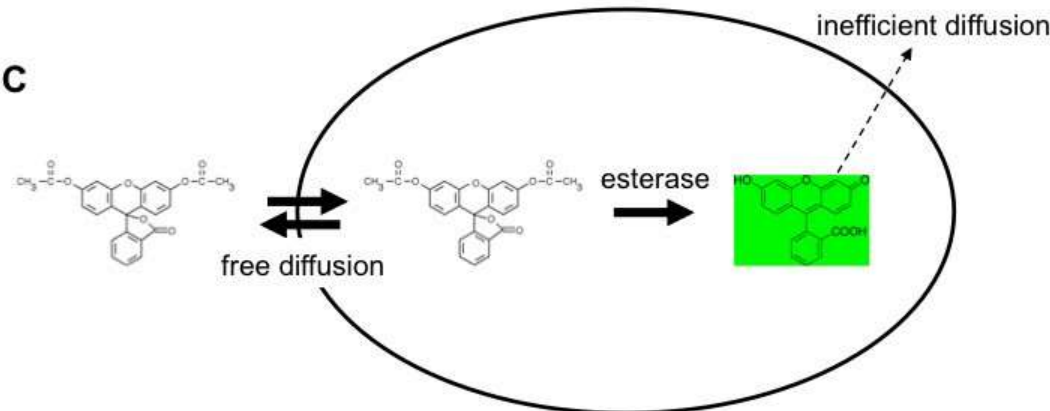
FDA (Fluorescein Diacetate)

**B**



Fluorescein

**C**



free diffusion

esterase

inefficient diffusion

The diagram illustrates the mechanism of FDA (Fluorescein Diacetate) as a cell-permeable fluorescent probe. Panel A shows the chemical structure of FDA, which is a fluorescein derivative with two acetyl groups (CH<sub>3</sub>-C(=O)-O-) attached to the 3 and 6 positions of the xanthene ring system. Panel B shows the chemical structure of fluorescein, which has a hydroxyl group (-OH) and a carboxylic acid group (-COOH) at the 3 and 6 positions, respectively. Panel C depicts a cell membrane as a boundary. FDA molecules are shown outside the cell, moving into the cell via 'free diffusion' (indicated by a double-headed arrow). Once inside, FDA is converted into fluorescein by the enzyme 'esterase' (indicated by a single-headed arrow). The resulting fluorescein is shown inside the cell, with a dashed arrow pointing away from it labeled 'inefficient diffusion', indicating that it is not easily transported out of the cell.