

УДК 577.11

ИНТЕРАКТОМ ПАРАОКСОНАЗЫ PON2 УКАЗЫВАЕТ НА НОВЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ОПУХОЛЕЙ

© 2023 г. В. Д. Карлов^{1,2}, Н. Б. Пестов^{1,3,4,5}, М. И. Шахпаронов¹, Т. В. Корнеев^{1,*}

Представлено академиком РАН А.Г. Габитовым

Поступило 30.11.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принято к публикации 15.12.2022 г.

Исследован интерактом белка параоксоназы-2, кодируемой геном PON2. Проведен скрининг библиотеки кДНК при помощи дрожжевой двугибридной системы с целью поиска новых белков, взаимодействующих с PON2 человека. Анализ идентифицированных кандидатов наряду с ранее опубликованными данными по интеракторам, полученными другими методами, указывает на наличие значительного количества не прямых взаимосвязей PON2 с EGFR и, соответственно, возможные регуляции роста опухолей с мутациями EGFR при участии PON2.

Ключевые слова: интерактом, параоксоназа, двугибридный дрожжевой скрининг, PON2, PPP4R2, ACAA2, DCN, CFAP53/CCDC11, SFRP4, ITM2A

DOI: 10.31857/S2686738922600984, **EDN:** QFDGAL

ВВЕДЕНИЕ

Исторически термин “параоксоназа” ассоциируется со способностью плазмы крови млекопитающих (в том числе человека) ферментативно разрушать параоксон, хлорпирофос-оксон, и многие другие органофосфаты [1], а в некоторой степени также и катализировать гидролиз связи Р-Ф в отравляющих веществах (далее — ОВ) типа зарина и зомана [2]. Это позволяет обеспечить защиту организма от низких доз ОВ, причем уровень этой защиты существенно варьирует между индивидуумами [3, 4]. Способность компонентов плазмы крови человека и кролика гидролизовать диизопропилфторфосфат была впервые обнаружена в 1946 г. [5], что можно считать первым упоминанием о параоксоназах, причем еще тогда была установлена зависимость их каталитиче-

ской активности от Ca^{2+} . В настоящее время семейство параоксоназ млекопитающих включает: параоксоназу-1, 2 и 3, (далее — PON1, PON2, PON3), у человека гены всех трех ферментов расположены в длинном плече 7-й хромосомы (7q21.3–q22.1) [6, 7]. Гены PON1 и PON3 имеются только у млекопитающих, однако у большого числа водных видов, особенно у способных глубоко нырять, наблюдается потеря гена PON1, что отражает их высокую чувствительность к некоторым инсектицидам [8]. Параоксоназы — белки с массой порядка 45 кДа, трехмерная структура стабилизирована одной дисульфидной связью (и один свободный остаток цистеина), представляет собой шестилопастный пропеллер, в активном центре которого находятся ключевые остатки гистидина и связанные ионы кальция [9]. PON1 и PON3 в основном синтезируются в печени и секретируются в кровь [10]. PON2 значительно выделяется среди своих паралоогов, экспрессируется практически равномерно во всех тканях, является внутриклеточным резидентом мембран, с гликозилированным [11] С-концевым эктодоменом, экспонированным наружу клетки или внутрь люмена ЭР, лизосом, межмембранного пространства митохондрий, или перинуклеарного пространства [12]. PON2 не секретируется в плазму крови, но секретируется в просвет кишки, что может вносить вклад в сопротивляемость бактериальным инфекциям [13, 14]. Параоксоназы являются мультифункциональными ферментами [11, 15]: за параоксоназную и низкоспецифичные

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁴ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук, Москва, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

*e-mail: tvkorn@gmail.com

арилэстеразную и лактоназную активности плазмы крови отвечают PON1 и PON3, в то время как PON2 с точки зрения субстратной специфичности нельзя назвать параоксоназой [16]. В плазме крови PON1 функционирует в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и основной функцией фермента считают липолактоназную активность, помогающую обезвреживать умеренно окисленный липопротеин [17], по всей видимости, путем отщепления от свободных гидроксиглицированных жирных кислот через циклизацию и раскрытие цикла. Параоксоназы плазмы имеют довольно широкую специфичность, гидролизуют различные лактоны и ациклические сложные эфиры (такие как нафтилацетат) [18]. Параоксоназы имеют заметный потенциал в борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями, нокаут гена PON1 приводит к развитию тяжелого атеросклероза [19], находясь в ЛПВП, защищает липопротеины низкой плотности (ЛПНП) от окислительного стресса, снижает образование пенистых клеток из макрофагов. То же самое верно и в отношении PON2 — нокаут гена PON2 имеет сходные физиологические последствия [20], и некоторое время основной функцией PON2 считалась именно антиатерогенная [28]. Но в действительности PON2 плохо гидролизует большинство субстратов PON1 и PON3, считается, что, в сравнении с ними, PON2 способна хорошо гидролизовать такие вещества, как N-ацилгомосеринлактон (N-АГЛ) [16], являющиеся факторами вирулентности многих патогенных бактерий, как, например, пиоцианин синегнойной палочки (далее — СГП). PON2 наиболее эффективна по отношению к N-АГЛ с длинной цепью (например, N-(3-оксодеcanoил)-гомосеринлактон, 3OC12-HSL). Поэтому считается, что активность PON2 играет большую роль в ингибировании чувства кворума оппортунистических бактерий, в особенности СГП, которая чрезвычайно распространена при внутрибольничных инфекциях. Нокаут гена PON2 вызывает снижение сопротивляемости к СГП [21]. Более того, PON2 и PON3 являются важной частью врожденного иммунитета к СГП [22], проявляя антиоксидантные и противовоспалительные функции. Оверэкспрессия PON2 и PON3 может предотвращать активируемое пиоцианином СГП образование свободных радикалов, активацию NF-κB-сигнального пути и усиление IL-8 секреции, уменьшая таким образом окислительный стресс и воспаление [22]. СГП, в свою очередь, стремится подавить ферментативную активность PON2 путем выделения неидентифицированных ингибиторов [23]. Парадоксальным образом, при инфекции СГП и воздействии 3OC12-HSL у PON2 может проявиться проапоптотическая функция, которая связана с неидентифицированными белок-белковыми взаимодействиями [24]. Вполне вероятно, что в от-

сутствие образования полноценных рабочих комплексов PON2 становится доступной мишенью для ингибиторов бактериальной природы, что неизбежно вызывает более агрессивное поведение СГП и повышенную чувствительность клеток хозяина к токсинам типа пиоцианина, секреция которых активируется чувством кворума.

Интересно, что экспрессия PON2 повышена при заболеваниях вирусной этиологии, например, при инфекции вирусом иммунодефицита человека, ВИЧ, [25, 26], но неизвестно, отражает ли это активацию некоторого механизма сопротивляемости, или, наоборот, способствует развитию патологии. PON2 уменьшает вызванный активацией каспаз стресс эндоплазматического ретикула [12]. Многофункциональность PON2 иллюстрируется также нарушением инсулиновой сигнализации при нокауте этого гена [27]. Исключительно важной особенностью PON2 — в отличие от секретируемых PON1 и PON3, работающих в ЛПВП — является то, что она выполняет “антиоксидантные” функции в плазматической мембране [28]. Защитная функция PON2 при окислительном стрессе проявляется в мозге, причем некоторые полиморфизмы демонстрируют ассоциацию с нейросенсорной потерей слуха [29]. Здесь хочется отметить, что ухудшение слуха у детей также встречается у пациентов с нарушенным геном ATR8B1 (болезнь Байлера), который по нашим данным является белковым партнером PON2 [30]. К сожалению, защитная функция PON2 может в некоторых случаях иметь и негативные последствия, например, в некоторых раковых клеточных линиях оверэкспрессия PON2 повышает устойчивость клеток к химиотерапевтическим агентам [31]. Также уровень PON2 повышен *in vivo* и *in vitro* при раке головы и шеи, и причем клетки приобретают большую резистентность к радиотерапии [32]. Необходимо отметить, что высокий уровень PON2 при многих видах онкологических заболеваний — негативный фактор, снижающий выживаемость больных [33].

Важно, что существуют данные в пользу того, что “антиоксидантная” функция PON2 может быть не связана с ее лактоназной активностью [34]. Многочисленные противоречивые свидетельства в пользу той или иной активности привели нас к необходимости продолжения изучения интерактома PON2, поскольку поиск новых белков партнеров PON2 может углубить понимание функциональной значимости этого белка и выявить возможные сигнальные пути, регулирующие метаболизм клетки при различных патологиях. Целью нашего исследования являлся поиск белков партнеров PON2, определение которых расширит наше понимание функциональной значимости этого белка и, возможно, выявит новые пути коммуникации в клетке, лежащие в ос-

нове патофизиологических процессов при онкологических заболеваниях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дрожжевая двугибридная система. Двугибридный скрининг проводился согласно подходам, опубликованным ранее [35]. Для поиска белков-партнёров использовался коммерческий набор Matchmaker® (“Clontech”, США) и библиотеку кДНК ткани легкого человека, клонированную в вектор pGADT7 AD (“Clontech”, США). Библиотекой кДНК были трансформированы дрожжи штамма Y187. Два варианта PON2 — изоформа CRA_a с лидерной последовательностью (GenBank: EAW76763.1) и без нее (NM_001018161.2) — были клонированы в плазмиду pGBKT7 (“Clontech”, США). Сконструированными плазмидами трансформировали дрожжи штамма Y2HGold (“Clontech”, США), а полученные клоны затем гибридизировали с дрожжами Y187, несущими библиотеку кДНК [35]. Первая стадия отбора проводилась путем роста на селективной среде, дефицитной по гистидину, лейцину и триптофану, т.е. трех аминокислот, что важно как для предотвращения потери плазмид, так и для индукции селективного маркера при наличии взаимодействия белка, кодируемого кДНК скринируемой библиотеки, с PON2. Выросшие колонии затем пересеивали на высокоселективные среды, обеспечивающие более жесткий отбор. Такой пересев повторяли несколько раз для выявления гетерогенности библиотечных плазмид и их сегрегации. Затем из положительных дрожжевых клонов выделяли плазмиды, которыми трансформировали клетки *E. coli*, а плазмиды выделяли и секвенировали. Полученные последовательности затем использовались для идентификации клонов путем анализа баз данных последовательностей при помощи BLAST. После этого несколько ложноположительных клонов было отсеяно путем контрольных котрансформаций плазмидами, несущими вместо PON2 контрольную вставку. После этого несколько ложноположительных клонов было отсеяно путем контрольных котрансформаций плазмидой с потенциальным белком партнером и пустой pGBKT7.

Биоинформатический анализ интерактомонов. Использовались базы данных белок-белковых взаимодействий BioGRID (<https://thebiogrid.org/>), IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/home>), STRING (<https://string-db.org/>), GeneMania (<https://genemania.org/>), InBio Discover (<https://inbio-discover.com/>), HitPredict (<http://www.hitpredict.org/>) как через их веб-интерфейсы, так и через запросы при помощи программы Cytoscape 3.9.1. Поиск интерактомных кластеров проводили при помощи модуля MCODE.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы опубликовали выявление новых белков-партнеров PON2 в клеточной линии рака, когда на С-концевой последовательности белка присутствовал аффинный тег Halo-tag с последующей идентификацией связавшихся с PON2 белков при помощи LC-MS/MS [33]. Однако полученный список ассоциированных белков, очевидно, был обогащен большим количеством белков, прямо с PON2 не взаимодействующих. Поэтому мы провели скрининг библиотеки кДНК при помощи дрожжевой двугибридной системы, используя для этого два варианта PON2 (с лидерной последовательностью и без нее). При этом успешным был скрининг только в случае полноразмерной PON2. В этом случае мы идентифицировали несколько новых партнеров: один клон показал взаимодействие с изоформой декорина (DCN) CRA_g (GenBank: EAW97458.1), два клона с последовательностью, кодирующей интегральный мембранный белок 2A (ITM2A, AAN40437.1), один клон с секретрируемым frizzled-родственным белком 4 (SFRP4, NM_003014.4), в трех клонах были обнаружены ацетил-КоА ацилтрансфераза (ACAA2, NM_006111.3), два клона CFAP53/CCDC11 (NP_659457.2) и два клона изоформы 4 регуляторной субъединицы протеинфосфатазы 2 (PPP4R2, NP_001304956.1).

В отличие от других PON, открытая рамка считывания PON2 человека и других приматов обладает N-концевым удлинением, не имеющим явной гомологии ни с какими другими последовательностями. Возможно, что этот пептид вносит свой вклад в формирование специфического интерактома PON2 (так как у других параоксоназ вообще отсутствует цитоплазматическая часть).

Используя литературные сведения и данные из баз интерактомонов белков человека в сочетании с идентифицированными ранее взаимодействием PON2 с ATP8B1, мы произвели конструирование новой версии интерактома PON2 человека. Большинство данных о взаимодействиях PON2 получены такими высокопроизводительными методами, как аффинный захват или проксимальное лигирование биотином с последующей масс-спектрометрией. Как многочисленные данные высокопроизводительных анализов (например, [36]), так и наши, полученные ранее для PON2 [33], отличаются большим количеством белков, идентифицированных как компоненты больших и сложных комплексов или просто находящихся в одном клеточном компартменте, а те из них, кто непосредственно взаимодействует с исследуемым белком, остаются неизвестными. Дрожжевая двугибридная система, напротив, способствует выявлению именно бинарных взаимодействий, но из-за чужеродного контекста тоже склонна к интерактивным сигналам как ложноположитель-

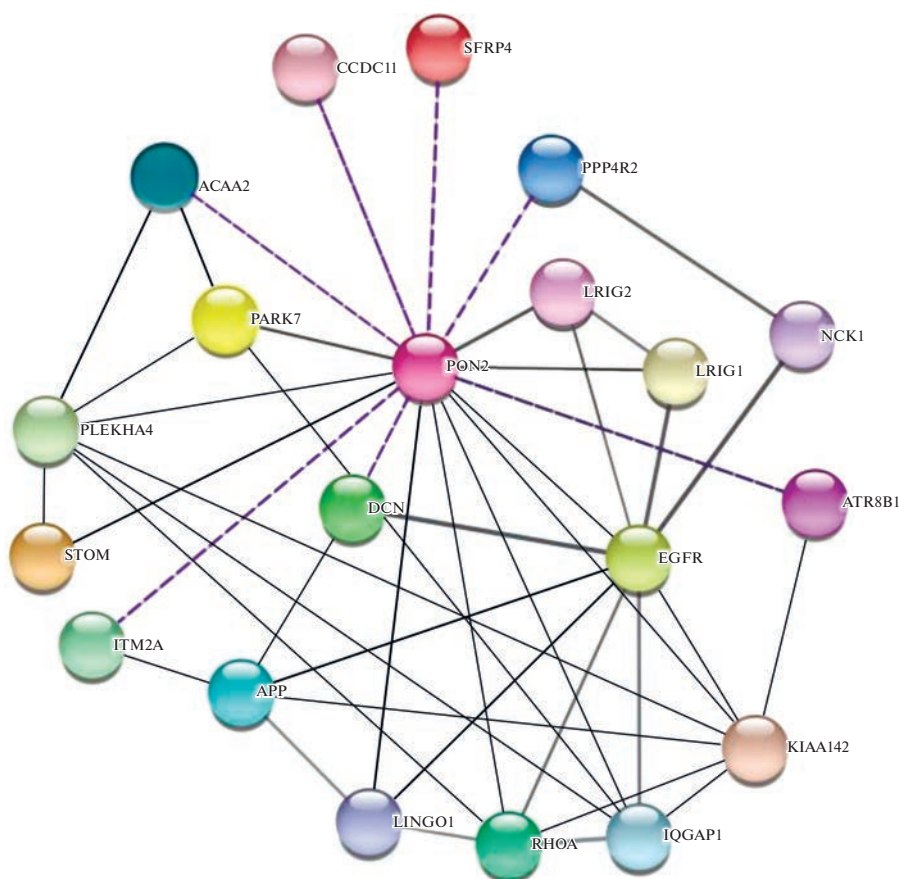


Рис. 1. Интерактом PON2. Высококонтфидентные взаимодействия (взаимодействия, изученные при помощи не менее двух различных методов, и опубликованные не менее двух независимых авторских коллективов) отмечены жирными линиями. Взаимодействия, выявленные нами при помощи двугибридной системы, показаны фиолетовым пунктиром.

ным, так и — в еще большей степени — ложноотрицательным. Поэтому любые взаимодействия нуждаются в тщательной перепроверке.

К сожалению, в настоящее время высококонтфидентными взаимодействиями PON2 среди белков человека следует считать только PARK7 (другое название — DJ-1) [37], а также LRIG1,2 [38]. Также можно было бы считать подтвержденным взаимодействие PON2 с EGFR, так как оно встречается в нескольких исследованиях с применением высокопроизводительных методов (например, [36]), но это может отражать большое количество работ по EGFR, играющего огромную роль в онкогенезе, в сравнении с любым средним белком. Всего по совокупности имеется 428 белков-кандидатов, которые могут специфически взаимодействовать с PON2, однако, как оказалось, почти все они имеют незначительную коннективность с высококонтфидентными белковыми партнерами, за исключением EGFR. Поэтому с большой долей уверенности следует заметить, что интерактом PON2 может быть значительно расширен в будущем, в настоящее время мы ограничились созданием для иллюстративных целей

сети, в которую включены: а) высококонтфидентные взаимодействия с PARK7 и LRIG1,2; б) интеракторы, идентифицированные нами при помощи двугибридного скрининга; в) белки-хабы, позволяющие оценить взаимосвязанность групп “а” и “б” между собой в глобальном интерактоме (рис. 1).

Важно отметить, что в любом случае в интерактом PON2 попадает EGFR и это может быть указанием на особую роль PON2 именно в мутантных по EGFR раковых клетках. Нельзя исключать, что PON2 взаимодействует с EGFR напрямую. Также нужно кратко обозреть уровень знаний о новых кандидатах-интеракторах PON2. ITM2A, интегральный мембранный белок второго типа, является супрессором опухолей, и его утерия повышает агрессивность рака яичников [39]. ACAA2 — митохондриальная 3-кетоацил-CoA-тиолаза, может играть особую роль в IDH-мутантных глиомах [40]. PPP4R2 (protein phosphatase 4 regulatory subunit 2) входит в комплекс регуляции репарации ДНК и играет роль в регуляции чувствительности к препаратам платины [41]. Декорин (DCN) — важный противоопухоле-

вый компонент внеклеточного матрикса [42], продуцируемый фибробластами, взаимодействие которого с EGFR изучено довольно хорошо, причем декорин действует как пан-рецепторный ингибитор тирозинкиназ, связываясь также и с HER2, HGFR/Met, VEGFR2, TLR и IGFR [43]. SFRP4 — секретируемый белок, связанный с агрессивными формами рака, в случае глиобластомы его действие может быть проапоптотическим [44], вероятно является онкосупрессором, а его мутации меняют функцию на противоположную, что особенно ярко проявляется в случае рака яичников [45, 46].

Экспериментально подтвержденным является взаимодействие PON2 с белками LRIG1 и LRIG2, являющимися лигандами рецепторных тирозинкиназ и участвующими в развитии опухолей. Оказалось, что посредством LRIG1 PON2 влияет на экспрессию другого белка — PDGFRA, участвующего в клеточной пролиферации [38]. Взаимодействие PON2 с PARK7/DJ-1, возможно, играет роль в патогенезе некоторых разновидностей болезни Паркинсона, например, при отравлении 1-метил-4-фенилпиридинием [37], однако белок PARK7/DJ-1 также играет важную роль в устойчивости многих видов раковых клеток к противоопухолевой терапии [47].

Можно предположить, что как субклеточная локализация, так и интерактом PON-2 может отличаться в клетках разных тканей в зависимости от их физиологического состояния. Например, выяснилось, что PON2 взаимодействует с несколькими белками вируса иммунодефицита человека-1 и SARS-CoV-2 [48, 49]. Очевидно, что интерактом может претерпевать значительные пертурбации, особенно при различных патологических процессах.

Наши данные наряду с другими указывают на значительную роль PON2 и ее белковых партнеров в агрессивности многих видов рака и чувствительности к терапевтическим воздействиям. Разнообразие белковых партнеров PON2 может также служить подтверждением предполагаемой функции PON2 в качестве шаперона, регулирующего оборот многих других функционально важных белков [50]. Для подтверждения роли предполагаемых взаимодействий PON2 с идентифицированными белковыми партнерами (декорин, EGFR и т.д.) необходимо проводить анализ взаимодействий как с белками дикого типа, так и известными для раковых клеток мутантными вариантами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны И.А. Оккельман за ее участие на ранних этапах работы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по теме: “Молекулярно-клеточные механизмы онкологических, иммунных, метаболических заболеваний, моделирование и экспериментальное обоснование методов репрограммирования и онкотаргетинга” Соглашение № 075-15-2021-773 (руководитель академик РАН С.М. Деев).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *La Du, N.B.* Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med.* 1996. V. 2. P. 1186–7.
2. *Davies H.G., Richter R.J., Keifer M., Broomfield C.A., Sowalla J., Furlong C.E.* The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 1996. V. 14. P. 334–6.
3. *Ortigoza-Ferado J., Richter R.J., Hornung S.K., Motulsky A.G., Furlong C.E.* Paraoxon hydrolysis in human serum mediated by a genetically variable arylesterase and albumin. *Am J Hum Genet.* 1984. V. 36. P. 295–305.
4. *Adkins S., Gan K.N., Mody M., La Du B.N.* Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* 1993. V. 52. P. 598–608.
5. *Mazur A.* An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* 1946. V. 164. P. 271–89.
6. *Primo-Parmo S.L., Sorenson R.C., Teiber J., La Du B.N.* The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996. V. 33. P. 498–507.
7. *Mochizuki H., Scherer S.W., Xi T., Nickle D.C., Majer M., Huizenga J.J., Tsui L.C., Prochazka M.* Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998. V. 213. P. 149–57.
8. *Meyer W.K. et al.* Ancient convergent losses of Paraoxonase 1 yield potential risks for modern marine mammals. *Science.* 2018. V. 361. P. 591–4.
9. *Harel M. et al.* Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004. V. 11. P. 412–9.
10. *Draganov D.I., La Du B.N.* Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2004. V. 369. P. 78–88.
11. *Horke S., Witte I., Wilgenbus P., Altenhöfer S., Krüger M., Li H., Förstermann U.* Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis. *Biochem J.* 2008. V. 416. P. 395–405.

12. Horke S., Witte I., Wilgenbus P., Krüger M., Strand D., Förstermann U. Paraoxonase-2 Reduces Oxidative Stress in Vascular Cells and Decreases Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Caspase Activation. *Circulation*. 2007. V. 115. P. 2055–64.
13. Précourt L.-P., Marcil V., Ntimbane T., Taha R., Lavoie J.-C., Delvin E., Seidman E.G., Beaulieu J.-F., Levy E. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012. V. 303. P. G623–634.
14. Rothem L., Hartman C., Dahan A., Lachter J., Eliakim R., Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med*. 2007. V. 43. P. 730–9.
15. Manco G., Porzio E., Carusone T.M. Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation. *Antioxidants (Basel)*. 2021. V. 10. P. 256.
16. Draganov D.I., Teiber J.F., Speelman A., Osawa Y., Sunahara R., La Du B.N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res*. 2005. V. 46. P. 1239–47.
17. Mackness M.I., Arrol S., Durrington P.N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Letters*. 1991. V. 286. P. 152–4.
18. Watson A.D., Berliner J.A., Hama S.Y., La Du B.N., Faull K.F., Fogelman A.M., Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995. V. 96. P. 2882–91.
19. Shih D.M. *et al.* Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998. V. 394. P. 284–7.
20. Devarajan A. *et al.* Paraoxonase 2 Deficiency Alters Mitochondrial Function and Exacerbates the Development of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2011. V. 14. P. 341–51.
21. Stoltz D.A. *et al.* Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007. V. 292. P. L852–60.
22. Schweikert E.-M., Amort J., Wilgenbus P., Förstermann U., Teiber J.F., Horke S. Paraoxonases-2 and -3 Are Important Defense Enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors due to Their Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Properties. *J Lipids*. 2012. V. 352857.
23. Horke S. *et al.* Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J*. 2010. V. 426. P. 73–83.
24. Schwarzer C., Fu Z., Morita T., Whitt A.G., Neely A.M., Li C., Machen T.E. Paraoxonase 2 serves a proapoptotic function in mouse and human cells in response to the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-Oxododecanoyl)-homoserine lactone. *J Biol Chem*. 2015. V. 290. P. 7247–58.
25. Devarajan A., Bourquard N., Grijalva V.R., Gao F., Ganapathy E., Verma J., Reddy S.T. Role of PON2 in innate immune response in an acute infection model. *Mol Genet Metab*. 2013. V. 110. P. 362–70.
26. Yuan J. *et al.* Putative innate immunity of antiatherogenic paraoxonase-2 via STAT5 signal transduction in HIV-1 infection of hematopoietic TF-1 cells and in SCID-hu mice. *J Stem Cells*. 2010. V. 5. P. 43–8.
27. Bourquard N., Ng C.J., Reddy S.T. Impaired hepatic insulin signalling in PON2-deficient mice: a novel role for the PON2/apoE axis on the macrophage inflammatory response. *Biochem J*. 2011. V. 436. P. 91–100.
28. Hagmann H. *et al.* Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane. *FASEB J*. 2014. V. 28. P. 1769–79.
29. Li X.-T., Li X., Hu F.-F., Shen H.-X., Cao J.-L., Zhong L., Zhang Z.-D., Zhu B.-L. Association between Paraoxonase 2 Gene Polymorphisms and Noise-induced Hearing Loss in the Chinese Population. *Journal of Occupational Health*. 2013. V. 55. P. 56–65.
30. Korneenko T.V., Pestov N.B., Okkelman I.A., Modyanov N.N., Shakhparonov M.I. [P4-ATP-ase Atp8b1/FIC1: structural properties and (patho)physiological functions]. *Bioorg Khim*. 2015. V. 41. P. 3–12.
31. Witte I., Altenhöfer S., Wilgenbus P., Amort J., Clement A.M., Pautz A., Li H., Förstermann U., Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis*. 2011. V. 2. P. e112.
32. Krüger M., Pabst A.M., Al-Nawas B., Horke S., Moergel M. Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015. V. 141. P. 1757–66.
33. Shakhparonov M.I., Antipova N.V., Shender V.O., Shneider P.V., Arapidi G.P., Pestov N.B., Pavlyukov M.S. Expression and Intracellular Localization of Paraoxonase 2 in Different Types of Malignancies. *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 92–9.
34. Altenhöfer S. *et al.* One Enzyme, Two Functions: PON2 PREVENTS MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE FORMATION AND APOPTOSIS INDEPENDENT FROM ITS LACTONASE ACTIVITY*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010. V. 285. P. 24398–403.
35. Korneenko T.V., Pestov N.B., Ahmad N., Okkelman I.A., Dmitriev R.I., Shakhparonov M.I., Modyanov N.N. Evolutionary diversification of the BetaM interactome acquired through co-option of the ATP1B4 gene in placental mammals. *Sci Rep*. 2016. V. 6. P. 22395.
36. Huttlin E.L. *et al.* Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*. 2017. V. 545. P. 505–9.
37. Parsanejad M. *et al.* DJ-1 Interacts with and Regulates Paraoxonase-2, an Enzyme Critical for Neuronal Survival in Response to Oxidative Stress. *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e106601.
38. Faraz M., Herdenberg C., Holmlund C., Henriksson R., Hedman H. A protein interaction network centered on leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) regulates growth factor receptors. *J Biol Chem*. 2018. V. 293. P. 3421–35.
39. Nguyen T.M.H., Shin I.-W., Lee T.J., Park J., Kim J.H., Park M.S., Lee E.-J. Loss of ITM2A, a novel tumor

- suppressor of ovarian cancer through G2/M cell cycle arrest, is a poor prognostic factor of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016. V. 140. P. 545–53.
40. Wu C., Song H., Fu X., Li S., Jiang T. Transcriptomic Analysis of Glioma Based on IDH Status Identifies ACAA2 as a Prognostic Factor in Lower Grade Glioma. *Biomed Res Int*. 2020. P. 1086792.
 41. Gingras A.-C. et al. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics*. 2005. V. 4. P. 1725–40.
 42. Neill T., Schaefer L., Iozzo R.V. Decorin as a multivalent therapeutic agent against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016. V. 97. P. 174–85.
 43. Xie C., Mondal D.K., Ulas M., Neill T., Iozzo R.V. Onco-suppressive roles of decorin through regulation of multiple receptors and diverse signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022. V. 322. P. C554–66.
 44. Yasmin I.A., Mohana Sundaram S., Banerjee A., Varier L., Dharmarajan A., Warriar S. Netrin-like domain of sFRP4, a Wnt antagonist inhibits stemness, metastatic and invasive properties by specifically blocking MMP-2 in cancer stem cells from human glioma cell line U87MG. *Exp Cell Res*. 2021. V. 409. P. 112912.
 45. Jacob F. et al. Loss of secreted frizzled-related protein 4 correlates with an aggressive phenotype and predicts poor outcome in ovarian cancer patients. *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e31885.
 46. Choudhury S.R. et al. In Vivo Selection Yields AAV-B1 Capsid for Central Nervous System and Muscle Gene Therapy. *Mol Ther*. 2016. V. 24. P. 1247–57.
 47. Kim J.-Y., Kim H.-J., Jung C.-W., Choi B.-I., Lee D.-H., Park M.-J. PARK7 maintains the stemness of glioblastoma stem cells by stabilizing epidermal growth factor receptor variant III. *Oncogene*. 2021. V. 40. P. 508–21.
 48. Jäger S. et al. Global landscape of HIV–human protein complexes. *Nature*. 2011. V. 481. P. 365–70.
 49. Naji S. et al. Host Cell Interactome of HIV-1 Rev Includes RNA Helicases Involved in Multiple Facets of Virus Production. *Mol Cell Proteomics*. 2012. V. 11. P. M111.015313.
 50. Shi S., Buck T.M., Nickerson A.J., Brodsky J.L., Kleyman T.R. Paraoxonase 2 is an ER chaperone that regulates the epithelial Na⁺ channel. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022. V. 322. P. C111–21.

INTERACTOME OF PARAOXONASE PON2 REVEALS NEW PATHWAYS FOR TUMOR GROWTH REGULATION

V. D. Karlov^{a,b}, N. B. Pestov^{a,c,d,e}, M. I. Shakhparonov^a, and T. V. Korneenko^{a,#}

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

^b All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology Moscow, Russian Federation

^c Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

^d Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^e Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: tvkorn@gmail.com

Presented by Academician of the RAS A.G Gabibov

The interactome of paraoxonase-2 encoded by the PON2 gene was investigated. A cDNA library was screened using a yeast two-hybrid system to search for new proteins interacting with human PON2. Analysis of the identified candidates, along with previously published data on interactors obtained by other methods, indicates the presence of a significant number of indirect interactions between PON2 and EGFR and, consequently, possible regulation of tumor growth with mutant EGFR involving PON2.

Keywords: interactome, paraoxonase, two-hybrid yeast screening, PON2, PPP4R2, ACAA2, DCN, CFAP53/CCDC11, SFRP4, ITM2A