

## ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК NEAT1\_1 СНИЖАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОННЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭПР-СТРЕССЕ

Н. Е. Пукаева<sup>1,2</sup>, В. Н. Залевская<sup>2</sup>, А. В. Дейкин<sup>3</sup>, М. И. Таубинская<sup>2</sup>, О. А. Кухарская<sup>2</sup>, Р. К. Овчинников<sup>1,2</sup>, А. И. Антохин<sup>1</sup>, М. С. Кухарский<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, Черноголовка, Россия

<sup>3</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Длинная некодирующая РНК NEAT1 играет важную роль в работе центральной нервной системы (ЦНС) и участвует в развитии ряда патологических состояний. Повышение уровня NEAT1 в мозге происходит при нейродегенеративных и психических заболеваниях. Какую роль играет такое повышение остается неясным. Функционально NEAT1 связывают с реализацией ответа на клеточный стресс в нервной системе. Целью работы было оценить влияние повышенного уровня короткой изоформы NEAT1\_1 на выживаемость первичных гиппокампальных культур мышей, при ЭПР-стрессе, индуцированном с помощью ингибитора протеасом MG132. Первичные культуры были получены от трансгенных животных, экспрессирующих NEAT1\_1 человека. Характеристику клеточного состава и оценку апоптоза проводили с помощью иммуноцитохимического окрашивания. Анализ экспрессии генов сигнальных путей апоптоза осуществляли методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Первичные нейронные культуры, полученные от трансгенных животных, не отличались от культур дикого типа по клеточному составу и морфологическим характеристикам нейронов. При индукции ЭПР-стресса происходило усиление апоптотической гибели клеток, в том числе нейронов, в культурах, экспрессирующих NEAT1\_1 в сравнении с культурами дикого типа. Активация генов сигнальных путей ЭПР-стресса *Atf4* и *Ddit3* была менее выражена в трансгенных культурах при стрессе. Кроме того, был снижен уровень экспрессии антиапоптотических генов *Bcl2l2* и *Mcl1*. Таким образом, повышенный уровень NEAT1\_1 в первичных нейронных культурах усиливает апоптотическую гибель клеток при ЭПР-стрессе.

**Ключевые слова:** длинные некодирующие РНК, NEAT1\_1, ЭПР-стресс, первичные нейронные культуры, апоптоз

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00645.

**Благодарности:** авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования ИФАВ РАН (FFSN-2021-0005 (2021–2023)) за предоставленную возможность проведения экспериментов с использованием лабораторных животных.

**Вклад авторов:** Н. Е. Пукаева — проведение экспериментов на клеточных культурах, анализ клеточной гибели; В. Н. Залевская — работа с клеточными культурами; А. В. Дейкин — получение трансгенной линии мышей; М. И. Таубинская — работа с клеточными культурами, анализ морфологии нейронов, О. А. Кухарская — работа с клеточными культурами, анализ клеточной гибели; Р. К. Овчинников — анализ и интерпретация результатов, подготовка текста рукописи; А. И. Антохин — редактирование рукописи; М. С. Кухарский — планирование исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка и редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ИФАВ ФГБУН ФИЦ ПХФ и МХ РАН (протокол № 53 от 18 декабря 2020 г.); работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации» от 2016 г.

✉ **Для корреспонденции:** Михаил Сергеевич Кухарский  
ул. Островитянова, д. 1, стр. 9, г. Москва, 117997, Россия; kukharskym@rsmu.ru

**Статья получена:** 08.11.2023 **Статья принята к печати:** 16.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.053

## NEAT1\_1 LONG NON-CODING RNA REDUCES THE SURVIVAL OF PRIMARY NEURONAL CELLS UNDER ER-STRESS

Pukaeva NE<sup>1,2</sup>, Zalevskaya VN<sup>2</sup>, Deykin AV<sup>3</sup>, Taubinskaya MI<sup>2</sup>, Kukharskaya OA<sup>2</sup>, Ovchinnikov RK<sup>1,2</sup>, Antohin AI<sup>1</sup>, Kukharsky MS<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

<sup>3</sup> Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

NEAT1 long non-coding RNAs play an important role in the central nervous system (CNS) and are associated with a number of pathological conditions. Increased levels of NEAT1 in the brain have been observed in neurodegenerative and psychiatric diseases — the significance of such an increase is still poorly understood. Functionally, NEAT1 is associated with cellular stress pathways in the nervous system. The aim of the current study was to evaluate the effect of increased levels of the short isoform NEAT1\_1 on survival of mice primary hippocampal cultures under ER-stress induced by MG132 proteasome inhibitor. Primary cultures were obtained from transgenic animals expressing human NEAT1\_1. Cellular composition and apoptosis were assessed using immunocytochemical staining. The expression of apoptosis signaling pathway genes was analyzed by quantitative PCR with reverse transcription. No differences in cellular composition and morphological characteristics of neurons were observed in primary neuronal cultures obtained from transgenic animals as compared to wild type cultures. Induction of ER-stress resulted in a more significant increase in apoptotic death of cells including neurons in NEAT1\_1 expressing cultures in comparison with the wild type cultures. ER-stress signaling pathway genes *Atf4* and *Ddit3* were less expressed in transgenic cultures under stress. Expression of *Bcl2l2* and *Mcl1* anti-apoptotic genes was reduced as well. Thus, high levels of NEAT1\_1 in primary neuronal cultures increased apoptotic cell death under ER-stress.

**Keywords:** long non-coding RNAs, NEAT1\_1, ER-stress, primary neuronal cultures, apoptosis

**Funding:** The study was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 22-25-00645.

**Acknowledgements:** Authors would like to express their gratitude to FRC PCP MC RAS Collective Use Center (FFSN-2021-0005 (2021 – 2023)) for providing the opportunity to conduct experiments using laboratory animals.

**Author contribution:** Pukaeva NE — cell culture experiments, apoptosis data analysis, Zalevskaya VN — cell culture experiments, Deykin AV — generating transgenic mice, Taubinskaya MI — cell culture experiments, neuron morphology analysis, Kukharskaya OA — cell culture experiments, cell death analysis, Ovchinnikov RK — data analysis, manuscript writing, Antohin AI — manuscript editing, Kukharsky MS — study design, data analysis, manuscript writing and editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the FRC PCP MC RAS (Protocol № 53 dated December 18, 2020); animal experimental work was carried out in accordance with the Rules of Good Laboratory Practice in the Russian Federation (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Michail S. Kukharsky  
Ostrovitianova, 1/9, Moscow, 117997, Russia; kukharskym@rsmu.ru

**Received:** 08.11.2023 **Accepted:** 16.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.053

Длинные некодирующие РНК (днРНК) — это молекулы длиной более 200 нуклеотидов, не имеющие открытых рамок считывания [1]. днРНК участвуют в различных физиологических и патологических процессах, таких как регуляция клеточного цикла, дифференцировка, апоптоз и воспаление [2]. Особое значение отводится роли днРНК в эволюции мозга млекопитающих и человека. В пользу этого говорит тот факт, что около 40% всех идентифицированных днРНК человека специфично экспрессируются в мозге [3]. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано участие днРНК в развитии нервной системы, нейрональной пластичности, а также в патогенезе неврологических заболеваний [4]. Одной из таких днРНК, для которой убедительно показана связь с развитием патологических состояний нервной системы, является NEAT1 (от англ. nuclear enriched abundant transcript 1). Изменение уровня NEAT1 в мозге происходит при ряде нейродегенеративных заболеваний и психических расстройств, таких как боковой амиотрофический склероз (БАС), фронтотемпоральная деменция (ФТД), хорея Гентингтона (ХГ), болезнь Альцгеймера (БА), шизофрения [5]. Причем в большинстве случаев обнаружено повышение ее уровня в головном мозге пациентов с данными заболеваниями [6–8]. Остается неясным, какую роль играет такое повышение, протекторную или патогенетическую. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что *NEAT1* является стресс-активируемым геном и повышает свою экспрессию в ответ на патологические воздействия стрессового характера на клеточном уровне [9, 10]. На основе гена *NEAT1* образуются две изоформы РНК: короткая NEAT1\_1 (3,7 т.п.о.) и длинная NEAT1\_2 (23 т.п.о.), последовательность которых перекрывается на 5'-конце молекулы [5]. Накопление длинной изоформы NEAT1\_2 в клетках нервной системы человека подтверждено только при развитии БАС [11, 12]. По-видимому, для других заболеваний нарушение функций NEAT1 связано с изменением уровня ее короткой изоформы (NEAT1\_1) [13]. В нервной ткани мышей в норме длинная изоформа не обнаружена, тогда как короткая экспрессируется во всех отделах ЦНС [14].

В физиологических условиях эндоплазматический ретикулум (ЭПР) является центральным субклеточным компартментом контроля качества белков, в котором происходят их правильная укладка, созревание и деградация [15]. При нарушении этих процессов и накоплении несвернутых или неправильно свернутых белков развивается особый тип клеточного стресса – ЭПР-стресс [16]. Это наиболее общее патологическое событие на клеточном уровне развивается в нервных клетках, которые находятся в зоне поражения при нейродегенерации [17]. В случае невозможности восстановления белкового гомеостаза адаптивные программы клетки смещаются в сторону индукции апоптотической сигнализации, что ведет к гибели необратимо поврежденных нейронов [18].

NEAT1 участвует в клетке в образовании специфических рибонуклеопротеиновых комплексов [6, 11, 13]. В состав последних входят белки, такие как TDP-43 и FUS, патологическая агрегация которых приводит к развитию ЭПР-стресса и гибели нервных клеток. Агрегацию TDP-43 и FUS в нервной системе обнаруживают при БАС, ФТД, БА и других нейродегенеративных заболеваниях. Прямое взаимодействие NEAT1 с такими белками ставит вопрос о возможном влиянии этой РНК на развитие процесса патологической агрегации и клеточной гибели [12, 13].

В данной работе мы исследовали влияние повышенного уровня днРНК NEAT1\_1 на выживаемость клеток в

первичных культурах гиппокампа, полученных от трансгенных мышей, при ЭПР-стрессе, индуцированном ингибитором протеасом MG132.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Первичные культуры гиппокампа

Исследование выполняли на первичных нейронных культурах, полученных от трансгенных мышей NEAT1\_1Tg, экспрессирующих в нервной системе короткую изоформу NEAT1\_1 человека. Мыши данной линии были получены методом трансгенеза, как описано ранее [19], и несут в геноме трансген, кодирующий NEAT1\_1 человека, под контролем паннейронального промотора *Thy1* на генетическом фоне линии C57Bl/6J (в печати). Наличие трансгена у животных подтверждали ПЦР-анализом. Животных содержали в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч светлого и 12 ч темного времени) со свободным доступом к воде и корму.

Первичные культуры нейронов получали из гиппокампа трансгенных мышей NEAT1\_1Tg и контрольных мышей дикого типа (WT) на третий день после рождения (P3), как описано ранее [20]. Для получения культуры использовали гиппокампы, выделенные не менее чем от трех животных одного генотипа, каждый эксперимент независимо повторяли, как минимум, дважды. Проводили диссекцию гиппокампов, далее образцы инкубировали в растворе 0,1%-го трипсина в солевом растворе Хенкса (HBSS) с 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) и 1 mM пирувата натрия в течение 40 мин. После этого осуществляли механическую диссоциацию в растворе среды Нейробазальная («ПанЭко»; Россия), содержащей 50 ед./мл пенициллина/стрептомицина, 0,2% бета-меркаптоэтанола, 500 мкМ L-глутамина, 0,36% глюкозы и 10% лошадиной сыворотки. Образцы центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин. Осадок ресуспендировали в свежеприготовленной среде, производили подсчет клеток в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. В среду вносили добавку B27 (Thermo Fisher Scientific; США) или НейроМакс («ПанЭко»; Россия), для повышения выживаемости первичных нейронов в культуре. Затем клетки высевали на покровное стекло диаметром 12 мм, покрытые поли-L-лизинном. На каждое стекло приходилось около  $3 \times 10^4$  клеток. На следующий день меняли среду на свежую без сыворотки. Последующую смену среды проводили через 3 дня, заменяя только половину объема на свежую. Культуры поддерживали в инкубаторе при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и относительной влажности 95%. Анализ культур проводили через 7 дней после посева.

Для индукции стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресса) клетки обрабатывали раствором ингибитора протеасом MG132 («Sigma-Aldrich»; США) в ДМСО («ПанЭко»; Россия) с конечной концентрацией в среде 200 мкМ или 10 мкМ.

Для визуализации тела нейронов и сети отростков для последующего Sholl-анализа проводили иммуноцитохимическую окраску на белок Tau, ассоциированный с микротрубочками (антитела SAB4300377; Sigma-Aldrich, США), для подтверждения нейронного фенотипа клетки параллельно окрашивали на маркер NeuN (антитела MAB377; Millipore, США). Получали микрофотографии с использованием микроскопа Carl Zeiss Axio Observer 3 (Германия), оснащенный камерой AxioCam 712 mono (Carl Zeiss; Германия). Полуавтоматический

Sholl-анализ проводили в программе ImageJ, как описано ранее [10]. Было проанализировано по 30 нейронов для каждого генотипа.

### Иммуноцитохимическое окрашивание

Для характеристики клеточного состава первичных нейронных культур проводили иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры основных типов клеток нервной ткани: NeuN — маркер дифференцированных нейронов (антитела MAB377; Millipore, США), GFAP — маркер астроцитов (антитела G9269; Sigma-Aldrich, США), Olig2 — маркер олигодендроцитов (антитела ab109186; Abcam, Великобритания) и Iba1 — маркер микроглиоцитов (антитела ab178846; Abcam, Великобритания). Для каждого маркера было проанализировано шесть стекол, полученных от двух независимых культур для каждого генотипа. Оценку апоптотической гибели клеток проводили с помощью окрашивания антителами к активированной форме каспазы 3, CC3 (антитела AB3623; Sigma-Aldrich, США). Клетки отмывали от среды 1 × ФСБ (фосфатно-солевой буфер), фиксировали 4%-м параформальдегидом в течение 15 мин и проводили пятиминутную пермеабиллизацию холодным метанолом. Блокирование неспецифического связывания проводили в растворе 5%-й сыворотки козла в ФСБ-Твин 20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее покровные стекла инкубировали с первичными антителами, в разведении 1 : 1000 в блокирующем растворе, в течение 1 ч при комнатной температуре. Промывали 1 × ФСБ и проводили инкубацию с вторичными флуоресцентно-мечеными антителами Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™ 568 (A-11011; Thermo Fisher Scientific, США) и Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor™ 488 (A-11029; Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1 : 1000 в растворе ФСБ-Твин 20, в течение 90 мин при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали с помощью раствора DAPI (Sigma-Aldrich; США). Покровные стекла монтировали на предметные стекла, в каплю среды Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific; США). Для анализа типов клеток и апоптоза проводили съемку препаратов на приборе Cytation 3 (BioTek; США), с программным обеспечением Gen5 3.08 (BioTek; США). Сканировали область размером не менее чем 3000 × 3000 мкм в мультисканальном флуоресцентном режиме. Отсканированную область сшивали в единое панорамное изображение и анализировали количество клеток, окрашенных на специфичный маркер. Результаты для каждого маркера нормализовали относительно общего числа клеток, которое оценивали путем подсчета ядер, окрашенных DAPI.

Таблица. Последовательности праймеров для ОТ-кПЦР

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
<i>B2m</i>	CATGGCTCGCTCGGTGAC	CAGTTCAGTATGTTCCGGCTTCC
<i>Atf4</i>	GGGTTCTGTCTTCCACTCCA	AAGCAGCAGAGTCAGGCTTTC
<i>Ddit3</i>	CCACCACACCTGAAAGCAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<i>Hspa5</i>	TCGACTTGGGGACCACCTAT	AGTGAAGGCCACATACGACG
<i>Emc4</i>	ATACCAGCGTGCAAGAGACC	GGAATCTGCTTGAGGGGACC
<i>Bcl2l1</i>	CGGATTGCAAGTTGGATGGC	TGCTGCATTGTTCCCGTAGA
<i>Bcl2l2</i>	ATTGGATGGTGGCCTACCTG	CCCGTATAGAGCTGTGAAGCTCC
<i>Mcl1</i>	AACGGGACTGGCTTGCAAA	CTGATGCCGCCTTAGGTC
<i>Casp3</i>	CGGGGAGCTTGGAAACGGTA	CCACTGACTTGCTCCCATGT

### Анализ экспрессии генов

Оценку экспрессии генов, основных сигнальных путей ЭПР-стресса и апоптоза проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) на приборе CFX96 (Bio-Rad; США). Клетки выращивали на шестилуночном планшете в течение 7 дней. Выделение тотальной РНК проводили с помощью реагента ExtractRNA («Евроген»; Россия), согласно протоколу производителя. Далее пробы РНК обрабатывали ДНКазой (Sigma-Aldrich; США), по протоколу производителя. Концентрацию очищенной РНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Далее проводили синтез комплементарной цепи (кДНК) с использованием набора «Обратная транскриптаза Magnus» («Евроген»; Россия) согласно протоколу производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad; США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия) согласно протоколу производителя. В качестве эндогенного контроля использовали ген бета-2 микроглобулина (*B2m*). Список использованных праймеров представлен в таблице.

Программа для кПЦР включала первичную денатурацию в течение 5 мин при 95 °С, затем 40 циклов: 20 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 68 °С. Результаты анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad; США).

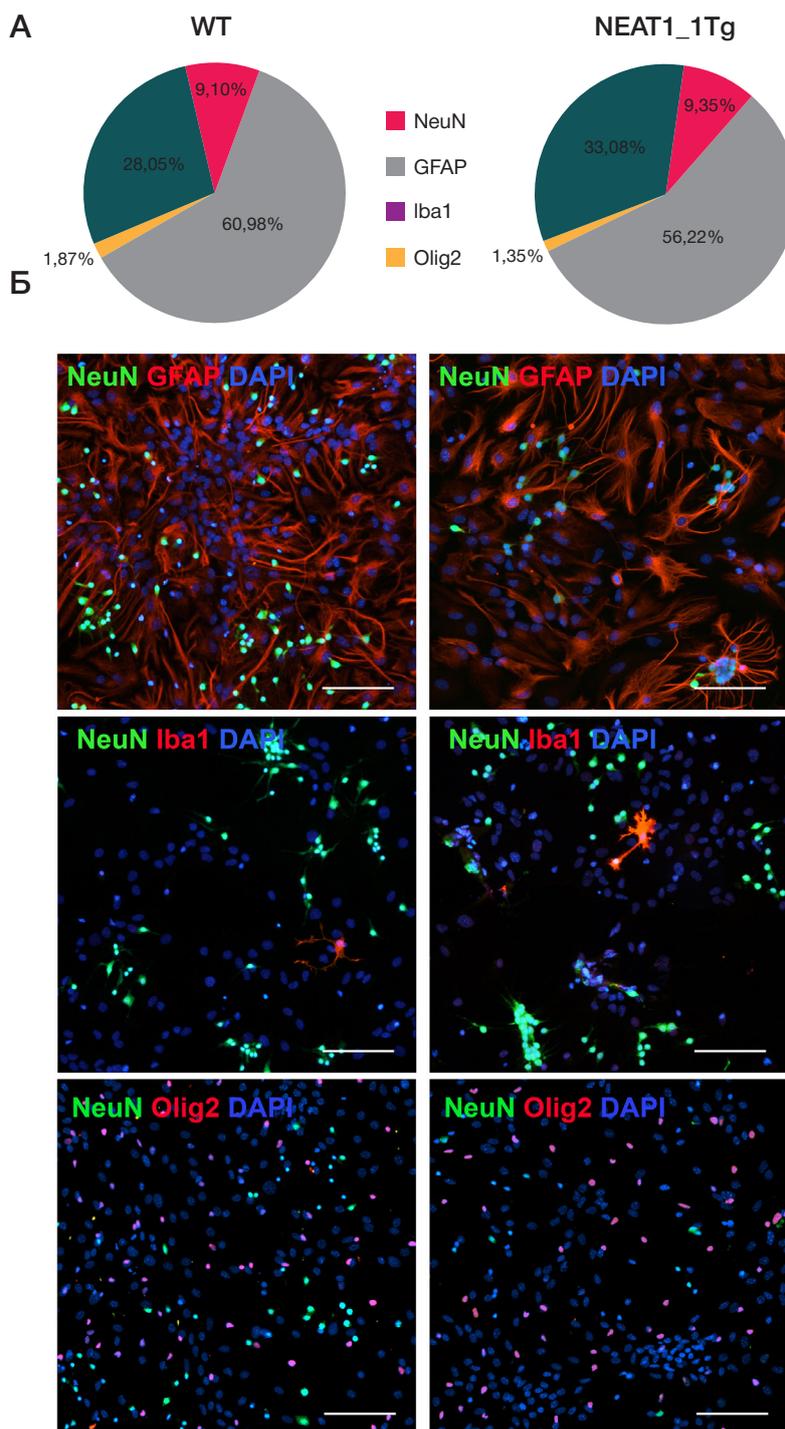
### Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.; США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США). Во всех случаях результаты представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ( $\bar{x} \pm m$ ) с указанием индивидуальных значений, где это целесообразно. Детали статистического анализа для каждой группы данных представлены в описании к рисункам. Различия полученных результатов считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Первичные нейронные культуры, экспрессирующие NEAT1\_1, не отличаются по клеточному составу и морфологии нейронов от контрольных

В эксперименте были использованы первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от трансгенных мышей

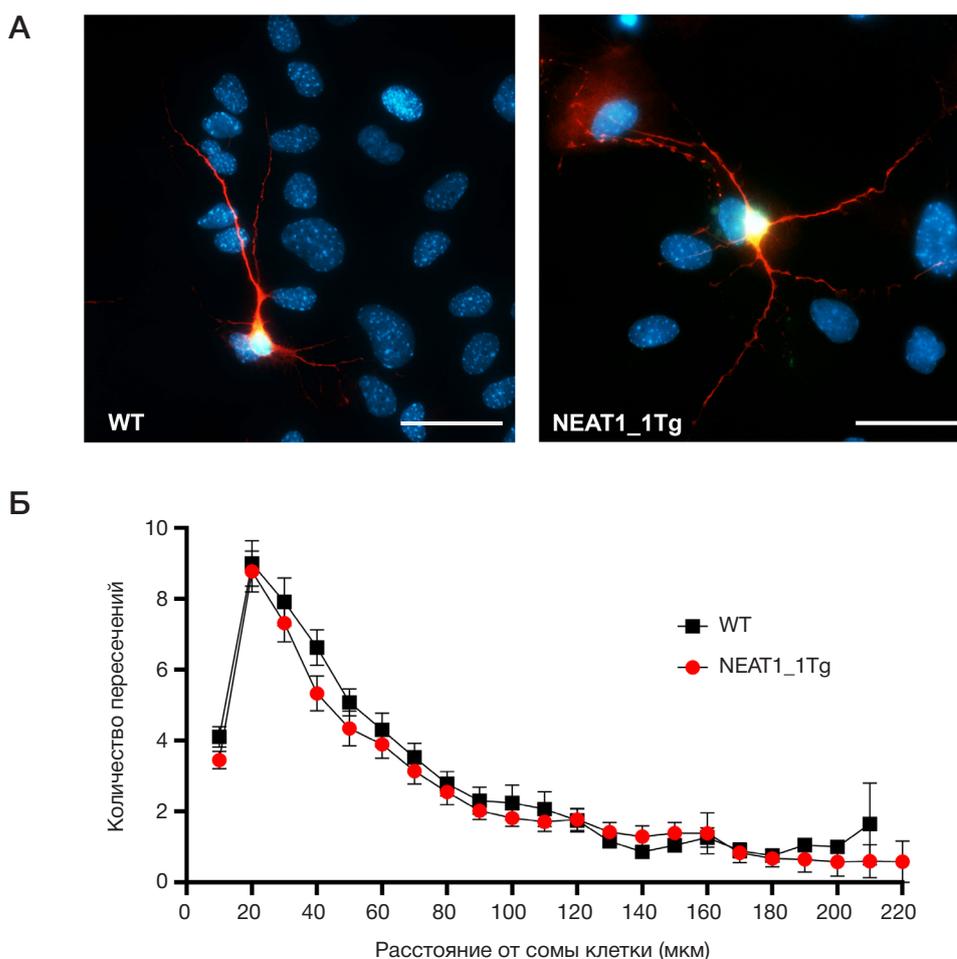


**Рис. 1.** Характеристика первичных культур гиппокампа, полученных от трансгенных мышей (NEAT1\_1Tg) и мышей дикого типа (WT), по клеточному составу. **А.** Процентное содержание нейронов (NeuN), астроцитов (GFAP), микроглиоцитов (Iba1) и олигодендроцитов (Olig2) в первичных культурах. **Б.** Репрезентативные фотографии первичных культур, окрашенных на маркеры разных типов клеток. Ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 100 мкм

NEAT1\_1Tg и от животных дикого типа (WT) на третий день постнатального развития (P3). Выделенные клетки культивировали *in vitro* на протяжении 7 дней. Условия культивирования (использование сыворотки, питательной добавки B27 и др.) были подобраны таким образом, чтобы получить смешанную культуру, содержащую все основные типы клеток, характерные для нервной ткани. Характеристика клеточного состава культур с помощью окраски на маркеры основных типов клеток показала, что полученные первичные нейронные культуры содержали около  $9 \pm 1,3\%$  нейронов,  $61 \pm 5,6\%$  астроцитов,  $28 \pm 2,5\%$  олигодендроцитов и  $2 \pm 0,5\%$  микроглиоцитов

(рис. 1А, Б). Различий между культурами клеток разного генотипа NEAT1\_1Tg и WT по клеточному составу обнаружено не было.

Для морфологической характеристики нейронов и оценки влияния повышенной экспрессии NEAT1\_1 на морфофункциональные характеристики, связанные с активностью и пластичностью этих клеток, был проведен Sholl-анализ, который позволяет оценить разветвленность сети нейритов. Значимых различий в разветвленности отростков у нейронов разного генотипа (NEAT1\_1Tg и WT) выявлено не было, хотя отмечена тенденция к снижению числа отростков в проксимальной области сети у нейронов



**Рис. 2.** Морфофункциональная характеристика первичных нейронов. **А.** Репрезентативные фотографии нейронов дикого типа (WT) и трансгенных нейронов (NEAT1\_1Tg). Иммуноцитохимическая окраска на белок Tau (показано красным), ассоциированный с микротрубочками, маркер нейронов NeuN (показано зеленым), ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 50 мкм. **Б.** Анализ разветвленности отростков первичных нейронов (Sholl-анализ). На графике отражено среднее количество пересечений условных окружностей заданного радиуса с отростками. Множественный *t*-тест с поправкой Холма–Сидака

из трансгенных NEAT1\_1Tg-культур (рис. 2А, Б). Таким образом экспрессия NEAT1\_1 не оказывает выраженного влияния на пластичность нейронов.

### В трансгенных NEAT1\_1Tg-культурах выявлена более выраженная апоптотическая гибель при ЭПР-стрессе

Анализ апоптотической гибели клеток методом иммуноцитохимического окрашивания к активированной каспазе 3 (CC3) показал, что при обычных условиях в культурах выявляется небольшое количество (2–4%) CC3-позитивных (CC3+) клеток, при этом сигнал в основном не колокализовался с маркером NeuN, что говорит о глиальной природе гибнущих клеток (рис. 3А–В).

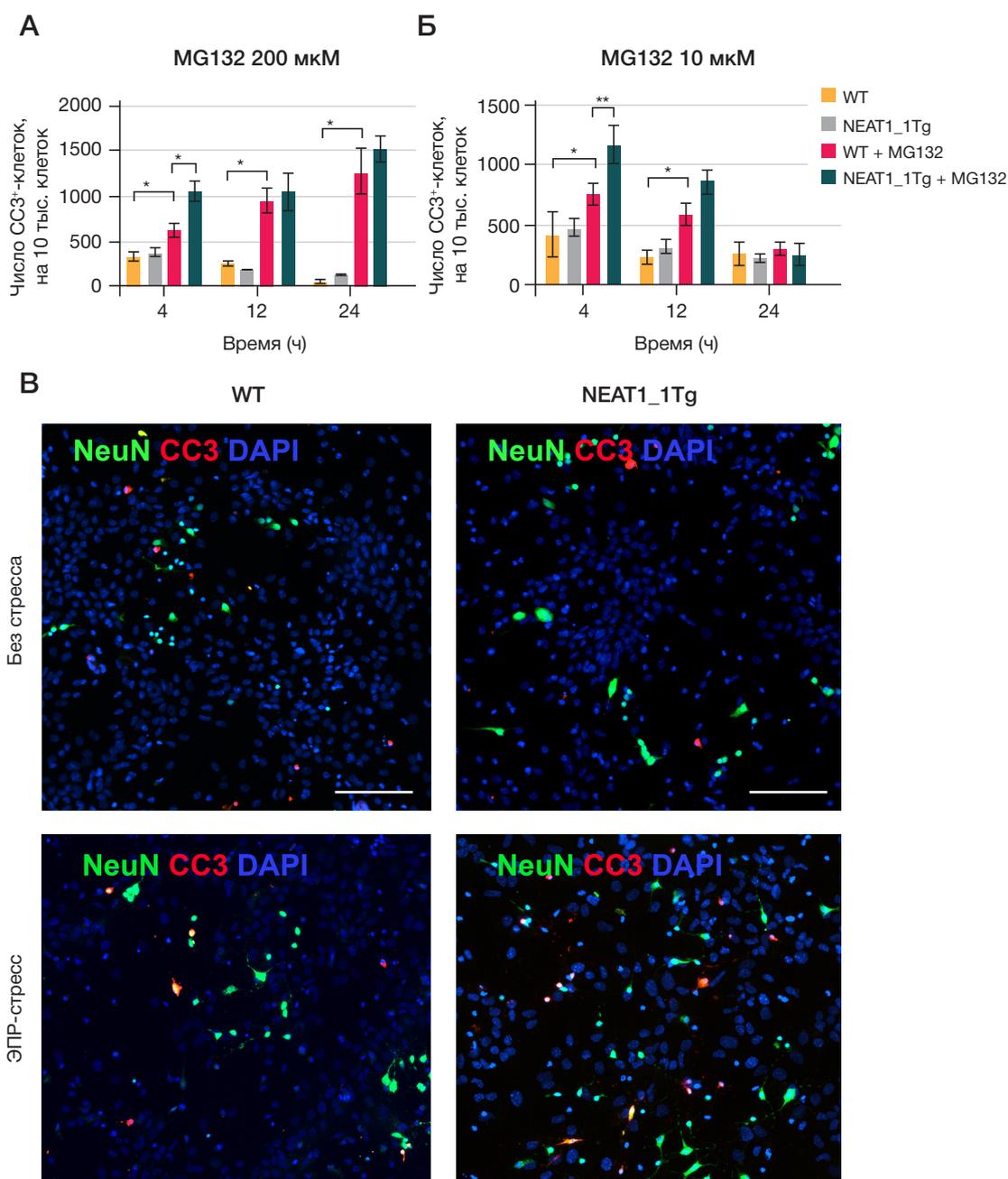
Далее в культурах клеток индуцировали острый и умеренный ЭПР-стресс обработкой ингибитором протеасом MG132 в концентрации 200 мкМ и 10 мкМ соответственно. На седьмой день культивирования в среду вносили ингибитор протеасом MG132 на 4 ч, после чего воздействие вещества снимали путем смены среды. Далее оценивали уровень апоптоза в культуре через 4, 12 и 24 ч. При этом анализировали общую клеточную гибель, т. е. подсчитывали все CC3+ клетки без учета их принадлежности к нейронам или глие.

При остром ЭПР-стрессе, вызванном высокой концентрацией MG132 (200 мкМ) в WT-культурах, выраженная гибель клеток детектировалась уже через

4 ч после обработки. Число гибнущих в результате апоптоза клеток было еще больше через 12 ч и сохранялось таким же высоким через 24 ч. При этом в культурах, полученных от трансгенных животных, обнаруживалось значительно большее число гибнущих при апоптозе клеток через 4 ч после обработки, тогда как в последующие временные точки этот показатель был сравним с WT-культурами, обработанными MG132 (рис. 3А).

Для моделирования умеренного транзистентного ЭПР-стресса использовали низкую концентрацию MG132 (10 мкМ). В таких условиях общая апоптотическая гибель также увеличивалась через 4 ч, однако к 12 ч количество CC3+ клеток снижалось, а к 24 ч соответствовало значениям для контрольных культур без обработки MG132, что свидетельствует о восстановлении клеточных культур после стресса. В NEAT1\_1Tg-культурах в сравнении с WT после стресса количество апоптотических клеток было больше через 4 ч после обработки, и такая же тенденция сохранялась на 12 ч, тогда как на 24 ч разница нивелировалась (рис. 3Б).

Для оценки того как ЭПР-стресс влияет на выживаемость нейронов, проводили совместную окраску на CC3 и маркер дифференцированных нейронов NeuN, после чего подсчитывали клетки, экспрессирующие оба маркера. В культурах с высокой концентрацией MG132 пик гибели нейронов приходился на 4 ч (рис. 4А), тогда как при низкой концентрации MG132 — на 12 ч (рис. 4Б).



**Рис. 3.** Апоптотическая гибель в трансгенных (NEAT1\_1Tg) первичных культурах и культурах дикого типа (WT). **А.** Апоптоз в культурах при обработке 200 мкМ MG132. **Б.** Апоптоз в культурах при обработке 10 мкМ MG132. Двухфакторный дисперсионный анализ, тест Фишера. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ . **В.** Репрезентативные фотографии клеточных культур при обработке 10 мкМ MG132 через 12 ч. Нейроны окрашены на маркер дифференцированных нейронов NeuN (показано зеленым), маркер апоптотической гибели клеток — активированная каспаза 3, CC3 (показано красным), ядра окрашены DAPI (показано синим). Масштабный отрезок — 100 мкм

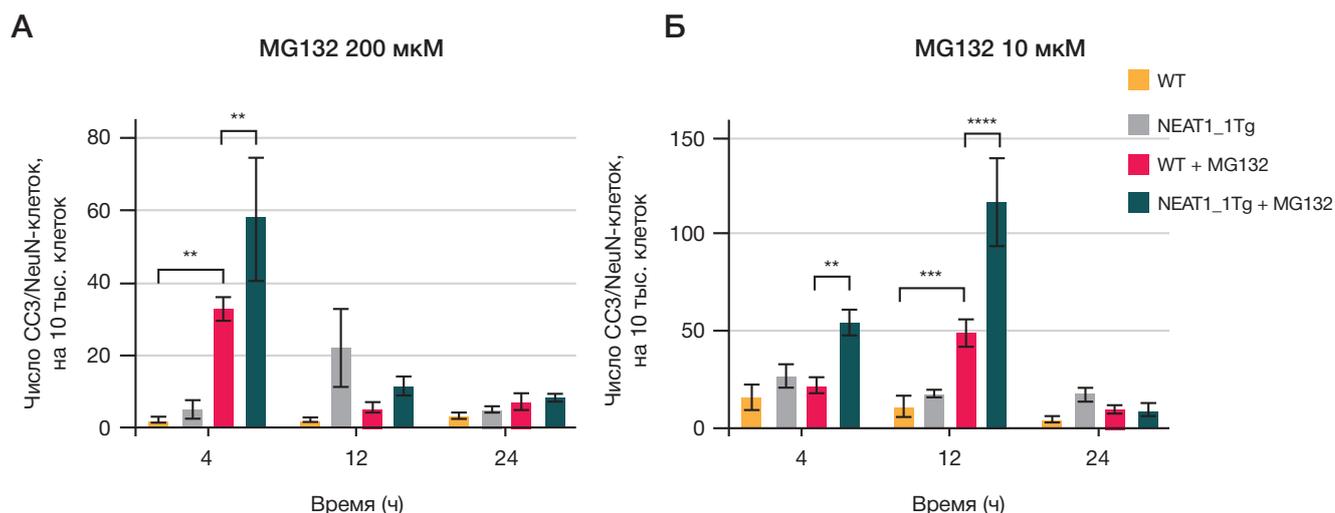
При этом в каждом случае гибель нейронов была значимо выше в культурах, экспрессирующих трансген NEAT1\_1Tg.

### В трансгенных NEAT1\_1Tg-культурах изменен ответ на ЭПР-стресс

Для определения возможного механизма повышенной гибели клеток, и в частности нейронов, в трансгенных нейронных культурах, экспрессирующих NEAT1\_1 человека, был проведен анализ экспрессии генов, участников сигнальных путей реализации клеточного ответа на ЭПР-стресс, а также генов апоптоза. Показано, что через 4 ч после обработки клеточных культур 10 мкМ MG132 происходит повышение экспрессии генов-маркеров ЭПР-стресса: транскрипционного фактора

*Atf4*, проапоптотического гена *Chop* (*Ddit3*), шаперона *Hspa5* (*Grp78* или *BiP*) (рис. 5А–В). Аналогичные изменения экспрессии данных генов происходили в трансгенных культурах после обработки MG132. В то же время уровни экспрессии *Atf4* и *Ddit3* не достигали уровня, наблюдаемого в WT-культурах после индукции ЭПР-стресса. Уровень экспрессии гена, кодирующего белок ЭПР *Emc4*, который обладает протекторными свойствами при стрессе [21], был значимо снижен в культурах NEAT1\_1Tg как в нормальных условиях, так и при ЭПР-стрессе (рис. 5Г).

Уровень мРНК гена каспазы 3 (*Casp3*) не различался между трансгенными и контрольными культурами и не изменялся в ответ на стресс (рис. 5Д). Анализ экспрессии известных генов-ингибиторов (*Bcl2l1*, *Bcl2l2*, *Mcl1*) апоптоза (рис. 5Е–З) показал, что индукция умеренного



**Рис. 4.** Апоптотическая гибель нейронов в трансгенных (NEAT1\_1Tg) первичных культурах и культурах дикого типа (WT). **А.** Апоптоз при обработке культур 200 мкМ MG132. **Б.** Апоптоз при обработке культур 10 мкМ MG132. Двухфакторный дисперсионный анализ, тест Фишера. \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* —  $p < 0,0001$

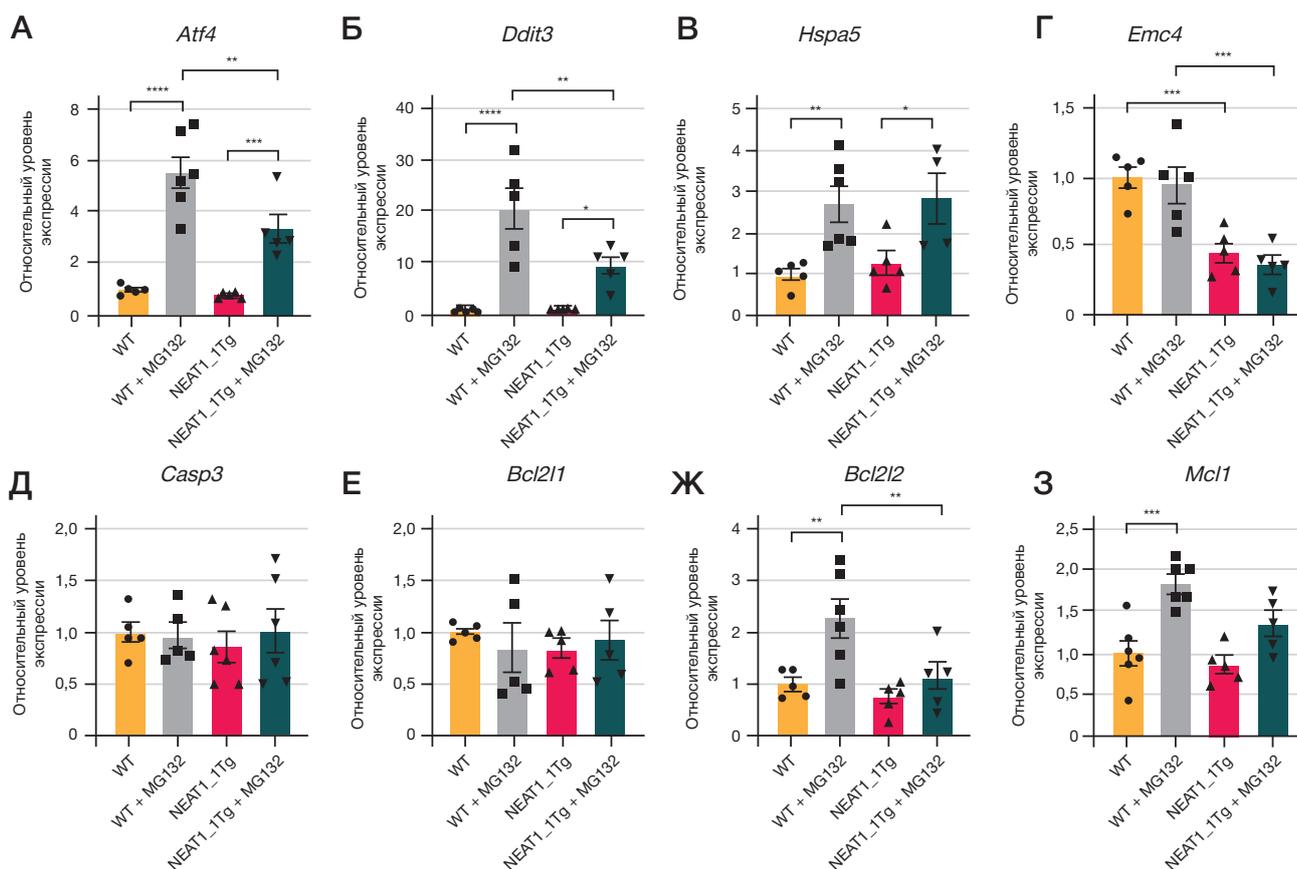
ЭПР-стресса в WT-культурах приводит к повышению уровня мРНК генов *Bcl2l2* и *Mcl1*, тогда как экспрессия *Bcl2l1* остается неизменной. В трансгенных NEAT1\_1Tg-культурах, в отличие от этого, при стрессе не наблюдалось значимой активации *Bcl2l2* и *Mcl1*, хотя для последнего имел место тренд к повышению.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для NEAT1 убедительно показано участие в различных патологических процессах, связанных с нейродегенерацией, включая нейровоспаление и апоптоз [5]. Промотор гена *NEAT1* имеет сайт связывания с белком р53, который способен повышать уровень NEAT1 [22]. Большое количество экспериментальных данных указывает на протекторную роль NEAT1. В экспериментах на мышах с использованием аденовирусного вектора для доставки РНК было показано, что *Neat1\_1* обладает антиапоптотическим эффектом на модели травмы мозга, а также на клеточной культуре нейронов гиппокампов мышей HT-22 в условиях гипоксии и недостатка глюкозы [23]. Нокадаун *NEAT1* в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y повышал апоптотическую гибель при имитации вирусной инфекции с помощью обработки двуцепочечной РНК [12]. В то же время сверхэкспрессия NEAT1 способна стимулировать ферроптоз в клетках гепатокарциномы HepG2 [24], а ингибирование NEAT1 в токсических (МФП<sup>+</sup>) клеточных и животных моделях болезни Паркинсона приводило к снижению гибели клеток и проапоптотических маркеров [25, 26]. Таким образом существуют противоречивые данные о влиянии NEAT1 на гибель клеток. Возможно, что конкретный про- или антиапоптотический эффект NEAT1 зависит от типа повреждающего воздействия, которое оказывается на них. Понимание механизма действия NEAT1 осложнено еще и тем, что, в отличие от нервной ткани *in vivo* и первичных нейронов, в большинстве культур клеток дополнительно к короткой изоформе экспрессируется еще и длинная изоформа (NEAT1\_2), которая служит основой для сборки параспеклов [5, 12]. Образование параспеклов, в свою очередь, может быть стимулировано клеточным стрессом разного типа, в том числе при ингибировании протеасом [27]. Поэтому сложно выделить независимые функции короткой и длинной изоформ NEAT1 при реализации клеточного ответа на стресс.

Нами показано, что эктопная экспрессия трансгена, кодирующего короткую изоформу NEAT1\_1 человека в нервной системе мышей, не влияет на клеточный состав (рис. 1) и морфологию первичных нейронных культур (рис. 2), полученных из гиппокампов. Индукция ЭПР-стресса с помощью ингибитора протеасом MG132 приводила к апоптотической гибели клеток первичной культуры (рис. 3), и выраженность такой гибели зависела от силы стресса (концентрации MG132). При этом в культурах, экспрессирующих трансген NEAT1\_1, количество апоптотических клеток было больше в сравнении с клетками WT в условиях стресса. Как ранее было показано на нокаутных по гену *Neat1* эмбриональных фибробластах мыши, отсутствие *Neat1* повышает гибель этих клеток в ответ на обработку MG132 [27]. Возможно, что для выживания клеток при стрессе важен определенный стабильный уровень *Neat1* либо ее влияние на гибель зависит от типа клеток. Первичная культура, которую мы использовали в данном исследовании, была смешанной и содержала как нейроны, так и глиальные клетки. Это позволяет учитывать в эксперименте выживаемость нейронов в условиях взаимного влияния разных популяций клеток нейронного происхождения. Для того чтобы определить специфичное влияние повышения уровня NEAT1\_1 на выживаемость нейронов, мы оценили количество клеток, экспрессирующих одновременно маркер зрелых нейронов NeuN и активированную каспазу 3 (CC3). Стресс приводил к более выраженной гибели нейронов в трансгенных культурах (NEAT1\_1Tg) по сравнению с культурами дикого типа (WT) (рис. 4). Таким образом, экспрессия NEAT1\_1 усиливает апоптоз первичных нейронов при ЭПР-стрессе. Обращает на себя внимание тенденция к увеличению количества апоптотических нейронов в трансгенных культурах без обработки в сравнении с контрольными культурами, которая проявляется на всех временных точках. Хотя данные различия и не достигали статистической значимости можно предположить, что существует некоторая предрасположенность трансгенных нейронов к запуску апоптоза в нормальных условиях. Этот факт требует дальнейшего исследования.

Реакция ЭПР-стресса в клетке реализуется через три основные сигнальные пути, в основе которых лежат киназы, играющие роль сенсоров стресса: PERK, ATF6 и IRE1 [16]. При их активации в клетке тормозится общий синтез



**Рис. 5.** Изменения экспрессии генов в трансгенных (NEAT1\_1Tg) первичных культурах и культурах дикого типа (WT) при обработке 10 мкМ MG132. **А-Г.** Экспрессия генов, связанных с ЭПР-стрессом. **Д-З.** Экспрессия генов, связанных с апоптозом. Однофакторный дисперсионный анализ, тест Фишера. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* —  $p < 0,0001$

белка и запускаются защитные механизмы, направленные прежде всего на адаптацию к стрессу и восстановление белкового гомеостаза. Однако при сильном стрессе или его длительном сохранении баланс сдвигается в сторону активации проапоптотических сигнальных путей, что ведет к гибели клетки [28]. Мы показали, что ЭПР-стресс вызывает активацию PERK-пути, о чем говорит повышение уровня мРНК гена *Atf4*, однако эта активация менее выражена в NEAT1\_1Tg-культурах (рис. 5). В соответствии с этим в NEAT1\_1Tg-культурах также снижена активация проапоптотического гена *Ddit3* (*Chop*), который относится к тому же сигнальному пути PERK/ATF4/CHOP и является активатором перехода клетки к апоптозу при ЭПР-стрессе [29]. В обеих культурах при стрессе повышается экспрессия гена шаперона *Hspa5* (BiP), что также указывает на развертывание ЭПР-стресса. Быстрый ответ NEAT1\_1Tg-клеток на стресс и запуск апоптоза через активацию каспазы 3 мог бы быть объяснен изначальными различиями в количестве неактивной формы каспазы 3 в клетках. Анализ экспрессии каспазы 3 (*Casp3*) показал, что по крайней мере на начальном этапе развития стресса, через 4 ч после обработки клеток MG132, ее уровень одинаков во всех четырех группах. Учитывая повышение числа клеток, окрашивающихся антителами к активированной форме каспазы 3 уже через 4 ч после запуска стресса, можно сделать вывод о том, что различия в гибели между NEAT1\_1Tg- и WT-клетками обусловлены другими регулируемыми факторами, в частности расщеплением прокаспазы 3 с образованием

ее активированной формы. Далее мы проанализировали экспрессию ряда генов ингибиторов апоптоза: *Bcl2l1*, *Bcl2l2*, *Mcl1* [30]. Экспрессия *Bcl2l1* не изменялась в ответ на ЭПР-стресс. Для генов *Bcl2l2* и *Mcl1* выявлено повышение их уровня в WT-культурах, тогда как в культурах NEAT1\_1Tg такая активация практически отсутствовала для *Bcl2l2* и была значительно менее выражена для *Mcl1*. Мы также обнаружили, что в NEAT1\_1Tg-культурах снижен уровень мРНК гена *Emc4*, который относится к семейству консервативных трансмембранных белков, необходимых для укладки белков в ЭПР. Недостаток белков Emc сам по себе способен приводить к развитию ЭПР-стресса [31]. Таким образом, повышенный уровень NEAT1\_1 в нейронных культурах при развитии ЭПР-стресса приводит к снижению регуляторных антиапоптотических сигналов, что усиливает клеточную гибель, в том числе и нейронов.

## Выводы

Дополнительная экспрессия трансгенной длинной некодирующей РНК NEAT1\_1 человека в условиях развития ЭПР-стресса способствует апоптотической гибели нервных клеток в первичных культурах гиппокампов. Повышение уровня данной РНК в нервной системе пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (БАС, ФТД, ХГ), при которых происходят белковая агрегация и развитие ЭПР-стресса, может быть рассмотрено как патогенетический фактор.

## Литература

- Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018; 172 (3): 393–407.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009; 10 (3): 155–9.
- Zimmer-Bensch G. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs as Drivers of Brain Evolution. *Cells*. 2019; 8 (11).
- Wan P, Su W, Zhuo Y. The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2017; 54 (3): 2012–21.
- An H, Williams NG, Shelkovnikova TA. NEAT1 and paraspeckles in neurodegenerative diseases: A missing linc found? *Noncoding RNA Res*. 2018; 3 (4): 243–52.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011; 14 (4): 452–8.
- Sunwoo JS, Lee S, Kim JH, Lim JA, Kim TJ, Byun JI, et al. Altered functional connectivity in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a resting-state EEG study. *Sleep*. 2017; 40 (6).
- Cheng C, Spengler RM, Keiser MS, Monteys AM, Rieders JM, Ramachandran S, et al. The long non-coding RNA NEAT1 is elevated in polyglutamine repeat expansion diseases and protects from disease gene-dependent toxicities. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (24): 4303–14.
- An H, Tan JT, Shelkovnikova TA. Stress granules regulate stress-induced paraspeckle assembly. *J Cell Biol*. 2019; 218 (12): 4127–40.
- Kukharsky MS, Ninkina NN, An H, Telezhkin V, Wei W, Meritens CR, et al. Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice. *Transl Psychiatry*. 2020; 10 (1): 171.
- Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, et al. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1\_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain*. 2013; 6: 31.
- Shelkovnikova TA, Kukharsky MS, An H, Dimasi P, Alexeeva S, Shabir O, et al. Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2018; 13 (1): 30.
- Matsukawa K, Kukharsky MS, Park SK, Park S, Watanabe N, Iwatsubo T, et al. Long non-coding RNA NEAT1\_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy. *RNA Biol*. 2021; 18 (11): 1546–54.
- Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol*. 2011; 193 (1): 31–9.
- Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM. Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2022; 82 (8): 1477–91.
- Kukharsky MS, Everett MW, Lytkina OA, Raspopova MA, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, et al. Protein homeostasis dysregulation in pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Biol (Mosk)*. 2022; 56 (6): 1044–56.
- Merighi A, Lossi L. Endoplasmic reticulum stress signaling and neuronal cell death. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (23).
- Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci*. 2010; 30 (50): 16938–48.
- Deikin AV, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, Bronovitskii EV, Razinskaia OD, Smirnov AP, et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2014; 114 (8): 62–9.
- Kukharsky MS, Quintiero A, Matsumoto T, Matsukawa K, An H, Hashimoto T, et al. Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 20.
- Bai L, You Q, Feng X, Kovach A, Li H. Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*. 2020; 584 (7821): 475–8.
- Mello SS, Sinow C, Raj N, Mazur PK, Biegging-Rolett K, Broz DK, et al. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev*. 2017; 31 (11): 1095–108.
- Zhong J, Jiang L, Huang Z, Zhang H, Cheng C, Liu H, et al. The long non-coding RNA Neat1 is an important mediator of the therapeutic effect of bexarotene on traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun*. 2017; 65: 183–94.
- Zhang Y, Luo M, Cui X, O'Connell D, Yang Y. Long noncoding RNA NEAT1 promotes ferroptosis by modulating the miR-362-3p/MIOX axis as a ceRNA. *Cell Death Differ*. 2022; 29 (9): 1850–63.
- Dong LI, Zheng Y, Gao L, Luo X. lncRNA NEAT1 prompts autophagy and apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease by impairing miR-374c-5p. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021; 53 (7): 870–82.
- Liu Y, Lu Z. Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018; 45 (8): 841–8.
- Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell*. 2014; 25 (1): 169–83.
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*. 2006; 4 (11): e374.
- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol*. 2018; 9: 3083.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37 (3): 299–310.
- Tian S, Wu Q, Zhou B, Choi MY, Ding B, Yang W, et al. Proteomic analysis identifies membrane proteins dependent on the ER membrane protein complex. *Cell Rep*. 2019; 28 (10): 2517–26 e5.

## References

- Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018; 172 (3): 393–407.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009; 10 (3): 155–9.
- Zimmer-Bensch G. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs as Drivers of Brain Evolution. *Cells*. 2019; 8 (11).
- Wan P, Su W, Zhuo Y. The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2017; 54 (3): 2012–21.
- An H, Williams NG, Shelkovnikova TA. NEAT1 and paraspeckles in neurodegenerative diseases: A missing linc found? *Noncoding RNA Res*. 2018; 3 (4): 243–52.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011; 14 (4): 452–8.
- Sunwoo JS, Lee S, Kim JH, Lim JA, Kim TJ, Byun JI, et al. Altered functional connectivity in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a resting-state EEG study. *Sleep*. 2017; 40 (6).
- Cheng C, Spengler RM, Keiser MS, Monteys AM, Rieders JM, Ramachandran S, et al. The long non-coding RNA NEAT1 is elevated in polyglutamine repeat expansion diseases and protects from disease gene-dependent toxicities. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (24): 4303–14.
- An H, Tan JT, Shelkovnikova TA. Stress granules regulate stress-induced paraspeckle assembly. *J Cell Biol*. 2019; 218 (12): 4127–40.
- Kukharsky MS, Ninkina NN, An H, Telezhkin V, Wei W, Meritens CR, et al. Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice. *Transl Psychiatry*. 2020; 10 (1): 171.
- Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, et al. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1\_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the

- early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain*. 2013; 6: 31.
12. Shelkova TA, Kukharsky MS, An H, Dimasi P, Alexeeva S, Shabir O, et al. Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2018; 13 (1): 30.
  13. Matsukawa K, Kukharsky MS, Park SK, Park S, Watanabe N, Iwatsubo T, et al. Long non-coding RNA NEAT1\_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy. *RNA Biol*. 2021; 18 (11): 1546–54.
  14. Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol*. 2011; 193 (1): 31–9.
  15. Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM. Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2022; 82 (8): 1477–91.
  16. Kukharsky MS, Everett MW, Lytkina OA, Raspopova MA, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, et al. Protein homeostasis dysregulation in pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Biol (Mosk)*. 2022; 56 (6): 1044–56.
  17. Merighi A, Lossi L. Endoplasmic reticulum stress signaling and neuronal cell death. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (23).
  18. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci*. 2010; 30 (50): 16938–48.
  19. Deikin AV, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, Bronovitskii EV, Razinskaia OD, Smirnov AP, et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2014; 114 (8): 62–9.
  20. Kukharsky MS, Quintiero A, Matsumoto T, Matsukawa K, An H, Hashimoto T, et al. Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 20.
  21. Bai L, You Q, Feng X, Kovach A, Li H. Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*. 2020; 584 (7821): 475–8.
  22. Mello SS, Sinow C, Raj N, Mazur PK, Biegging-Rolett K, Broz DK, et al. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev*. 2017; 31 (11): 1095–108.
  23. Zhong J, Jiang L, Huang Z, Zhang H, Cheng C, Liu H, et al. The long non-coding RNA Neat1 is an important mediator of the therapeutic effect of bexarotene on traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun*. 2017; 65: 183–94.
  24. Zhang Y, Luo M, Cui X, O'Connell D, Yang Y. Long noncoding RNA NEAT1 promotes ferroptosis by modulating the miR-362-3p/MIOX axis as a ceRNA. *Cell Death Differ*. 2022; 29 (9): 1850–63.
  25. Dong LI, Zheng Y, Gao L, Luo X. lncRNA NEAT1 prompts autophagy and apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease by impairing miR-374c-5p. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021; 53 (7): 870–82.
  26. Liu Y, Lu Z. Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018; 45 (8): 841–8.
  27. Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell*. 2014; 25 (1): 169–83.
  28. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*. 2006; 4 (11): e374.
  29. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol*. 2018; 9: 3083.
  30. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37 (3): 299–310.
  31. Tian S, Wu Q, Zhou B, Choi MY, Ding B, Yang W, et al. Proteomic analysis identifies membrane proteins dependent on the ER membrane protein complex. *Cell Rep*. 2019; 28 (10): 2517–26 e5.