

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2023. Том 65

2023. Vol. 65

3



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 3, 2023

Новое в геномике центромер: уроки первой T2T-сборки хромосом человека <i>Л. И. Уральский, И. А. Александров, Ф. Д. Рябов, А. Л. Липидус, Е. И. Рогаев</i>	217
Убиквитин-протеасомная система в регуляции клеточной плюрипотентности и дифференцировки <i>У. И. Поденкова, И. В. Зубарев, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха</i>	232
Роль интегрированного ответа опухолевых клеток на стресс, аутофагии и шаперонов в возникновении рецидивов резистентных опухолей <i>С. Г. Зубова, О. О. Гнедина</i>	246
Характеристика клеток микроглии линии SIM-A9 – новые данные <i>Д. А. Шапошникова, Е. Ю. Москалева, Ю. П. Сёмочкина, О. В. Высоцкая, О. В. Комова, Е. А. Насонова, И. В. Кошлань</i>	259
Влияние стимуляции и подавления биосинтеза NAD^+ на поддержание плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток мыши <i>М. В. Антипова, В. А. Куликова, Л. В. Соловьева, А. В. Кропотов, М. П. Светлова, А. П. Якимов, К. Б. Нериновский, Е. И. Бахмет, А. А. Никифоров</i>	273
Наночастицы диоксида титана подавляют энтоз в культуре аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 <i>О. П. Кисурина-Евгеньева, М. А. Савицкая, Д. С. Смешнова, Г. Е. Онищенко</i>	283
Применение технологии CRISPR/Cas9 в зиготах мышей для получения дупликаций, делеций и инверсий влияет на стабильность кариотипа <i>Ю. М. Минина, А. Б. Сорока, Т. В. Карамышева, Н. А. Сердюкова, О. Л. Серов</i>	295
Визуализация одиночных клеток <i>Escherichia coli</i> в состоянии SOS-ответа при помощи экспансионной микроскопии <i>Н. А. Румянцева, Д. М. Голофеева, И. Е. Вишняков, А. Д. Ведяйкин</i>	303

Contents

Vol. 65, No. 3, 2023

New in Centromere Genomics: Lessons from the First T2T Human Genome Assembly <i>L. I. Uralsky, I. A. Alexandrov, F. D. Ryabov, A. L. Lapidus, E. I. Rogaev</i>	217
Ubiquitin–Proteasome System in Cell Pluripotency and Differentiation <i>U. I. Podenkova, I. V. Zubarev, A. N. Tomilin, A. S. Tsimokha</i>	232
The Role of the Integrated Response of Tumor Cells to Stress, Autophagy, and Chaperones in the Origin of Recurrent Resistant Tumors <i>S. G. Zubova, O. O. Gnedina</i>	246
Microglia Cell Line SIM-A9 Features – New Data <i>D. A. Shaposhnikova, E. Yu. Moskaleva, Yu. P. Semochkina, O. V. Vysotskaya, O. V. Komova, E. A. Nasonova, I. V. Koshlan</i>	259
Impact of the Stimulation and Inhibition of NAD ⁺ Biosynthesis on the Maintenance of Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells <i>M. V. Antipova, V. A. Kulikova, L. V. Solovjeva, A. V. Kropotov, M. P. Svetlova, A. P. Yakimov, K. B. Nerinovski, E. I. Bakhmet, A. A. Nikiforov</i>	273
Titanium Dioxide Nanoparticles Inhibits Entosis in the Human Breast Adenocarcinoma Cell Line <i>O. P. Kisurina-Evgenieva, D. S. Smeshnova, G. E. Onishchenko</i>	283
CRISPR/Cas9 Induced Duplications, Deletions and Inversions in Mouse Zygotes Lead to Karyotype Instability <i>J. M. Minina, A. B. Soroka, T. V. Karamysheva, N. A. Serdyukova, O. L. Serov</i>	295
Visualization of <i>Escherichia coli</i> Single Cells in the State of SOS Response Using Expansion Microscopy <i>N. A. Rumyantseva, D. M. Golofeeva, I. E. Vishnyakov, A. D. Vedyaykin</i>	303

УДК 575.174.015.3

НОВОЕ В ГЕНОМИКЕ ЦЕНТРОМЕР: УРОКИ ПЕРВОЙ T2T-СБОРКИ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Л. И. Уральский^{1, 2, *}, И. А. Александров^{2, 3, 4}, Ф. Д. Рябов⁵, А. Л. Лапидус³, Е. И. Рогаев^{2, 6}

¹Научно-технологический университет “Сириус”, Научный центр генетики и наук о жизни, пос. гор. типа Сириус, 354340 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Центр биоинформатики и алгоритмической биотехнологии СПбГУ,

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁴Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

⁵Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, 109028 Россия

⁶Медицинская школа Чан Массачусетского университета, Департамент психиатрии, Шрусбери, 01655 США

*E-mail: uralskiy.li@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 01.12.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Технологии секвенирования с длинными прочтениями, появившиеся недавно, позволили впервые прочесть полную, без пробелов, последовательность генома человека. Результатом явилась первая T2T (от теломеры до теломеры) геномная сборка, опубликованная одноименным международным консорциумом ученых в 2022 г. Наиболее значительным вкладом новой сборки явились центромерные области, состоящие из высокоповторяющейся сателлитной ДНК. В этом обзоре мы кратко перечислим основные достижения T2T-консорциума, связанные с центромерами, и более подробно рассмотрим неожиданные находки цитогенетического масштаба, которые принес анализ впервые собранных центромер человека, такие как “расщепленные” центромеры хромосом 3 и 4, мега-инверсия в активном массиве центромеры 1-ой хромосомы, гаплотипические эпиааллели в центромере X-хромосомы и макроповторы, найденные в нескольких центромерах.

Ключевые слова: альфа-сателлит, центромера, ПВП-гаплотипы, инверсии, макроповторы, центромерные эпиааллели, T2T-консорциум

DOI: 10.31857/S0041377123030094, **EDN:** VDUPJC

Геномная ДНК эукариотических организмов представлена в клетках в виде набора хромосом, которые реплицируются и поровну разделяются между дочерними клетками в каждом клеточном цикле. Центромеры — это участки хромосом, которые ответственны за их равное расхождение при делении, направляя сборку микротрубочек, связывающих кинетохоры, и служа местом адгезии между сестринскими хроматидами. Первичная структура ДНК центромер долгое время оставалась нерасшифрованной из-за сложности их структуры.

В предлагаемом обзоре изложены основные достижения, связанные с расшифровкой нуклеотидной последовательности центромер, осуществленной международным консорциумом ученых в процессе работы над первой полной сборкой референсного генома че-

ловека T2T-CHM13. В ходе проведенных исследований было получено около 200 Мб новых ранее не расшифрованных последовательностей генома человека, включающих все прицентромерные и прителомерные участки, короткие плечи пяти акроцентрических хромосом, длинные центромерные тандемные повторы, кластеры генов рибосомной РНК и другие непрочитанные ранее элементы. Расшифровка хромосом “от теломеры до теломеры” является новым достижением, после которого в геноме человека уже не осталось “белых пятен”. Высокоточное секвенирование с длинными прочтениями позволило преодолеть технологический барьер и достичь не только полноты охвата, но и беспрецедентной аккуратности полученной последовательности. Целью данного обзора является обобщение знаний, полученных в ходе анализа и аннотации центромер, а также освещение работы над проектами, связанны-

Принятые сокращения: АС — альфа-сателлит; ПВП — повторы высокого порядка; T2T — от теломеры до теломеры (telomere-to-telomere); Мб — мегабаза (миллион нуклеотидов ДНК).

ми с анализом повторов в сборках, запланированных к производству.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ЦЕНТРОМЕРАХ ЧЕЛОВЕКА И ПРИМАТОВ

Центромеры являются важными хромосомными структурами, которые, связываясь с комплексом центромерных белков (кинетохором), формируют места прикрепления микротрубочек веретена и, в конечном счете, обеспечивают правильную сегрегацию хромосом в митозе и мейозе. Дефекты центромер, их наследования и поддержания могут вызывать неравное распределение хромосом в дочерних клетках и нестабильность генома, приводя к раку, врожденным дефектам развития и бесплодию (Cimini et al., 2001; Levine, Holland, 2018; Vázquez-Diez, FitzHarris, 2018). Особо надо отметить важность когорты с численными нарушениями X-хромосомы в выборках пациентов с проблемами развития нервной системы (Vorsanova et al., 2021; Vorsanova et al., 2022). Несмотря на их важную клеточную функцию, детальная организация центромер человека была исключена из исходных эталонных сборок генома человека (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) и в значительной степени игнорировалась генетическими и геномными исследованиями в последние два десятилетия. Центромерные области и связанный с ними прицентромерный гетерохроматин обычно отмечены наличием длинных массивов почти идентичных (гомогенных) tandemных повторов, называемых также сателлитными ДНК (Singer, 1982). Эти повторяющиеся последовательности исторически недопредставлены в геномных сборках эукариот из-за неизбежных ошибок клонирования и секвенирования методами первого поколения: нестабильности в *Escherichia coli* во время клонирования на основе ВАС (бактериальные искусственные хромосомы), обилия или полного отсутствия в tandemных повторах сайтов рестрикции, используемых для клонирования, потенциальной токсичности и нестабильности клонированной ДНК (Carlson, Brutlag, 1977; Osoegawa et al., 2007). Методы второго поколения, исключившие клонирование, также не вызвали большого продвижения вперед. Они не могли надежно представить центромерные области из-за невозможности получения индивидуальных прочтений нуклеотидной последовательности достаточной длины, чтобы содержащиеся в них уникальные комбинации нуклеотидов (т. н. уникальные к-меры, которые используются для соединения отдельных прочтений в более длинные контиги) позволили определить линейную последовательность тысяч копий почти одинаковых tandemных повторов (Rudd, Willard, 2004; She et al., 2004). В результате до недавнего времени все центромерные области человека были представлены в сборках в виде огромных (миллионы п. н.) пробелов, соответствующих центромерам, про

которые было известно, что они заполнены сателлитной ДНК определенного типа (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Хотя последовательности этих регионов не были систематически представлены в первоначальных геномных сборках, они не были неизвестны. Целенаправленные экспериментальные исследования центромерных последовательностей человека показали, что все нормальные (характерные для вида, а не для отдельных клинических случаев) центромерные области образованы длинными массивами альфа-сателлитной (АС) ДНК, сложенными разнообразным классом AT-богатых tandemных ДНК повторов с мономерами длиной около 170 н. п. (Manuelidis, 1976; Manuelidis, Wu, 1978). Индивидуальные мономеры обычно организованы в более крупные единицы или повторы высокого порядка (ПВП) (Willard, Waye, 1987) и образуют один или несколько гомогенных массивов в каждой центромере человека. Экспериментальные усилия по выделению, клонированию и секвенированию репрезентативных ПВП из каждой центромерной области показали, что: (1) за несколькими исключениями все большие АС массивы хромосом-специфичны, т.е. структура и последовательность их ПВП разные в разных хромосомах (обзор Willard, 1985); (2) близкие хромосом-специфичные ПВП из разных массивов объединяются в надхромосомные семейства, отражающие недавнее общее происхождение отдельных групп хромосом-специфичных вариантов (обзор Alexandrov et al., 2001); (3) хотя в одной центромере может быть несколько разных хромосом-специфичных массивов, иногда из разных надхромосомных семейств, центромерные белки связываются только с одним из них, называемым активной центромерой, в то время как остальные ПВП-массивы можно считать неактивными центромерами или псевдоцентромерами (Mahtani, Willard, 1998; Wevrick, Willard, 1989, 1991; Schueler et al., 2001). Кроме того, в геномах человека и приматов обнаружены небольшие массивы дивергентных (в отличие от гомогенных) АС повторов. Они расположены в плечах хромосом и прилегают к гомогенным массивам, образуя дискретные и хронологически упорядоченные альфа-сателлитные слои (“мертвые” центромеры), которые представляют собой остатки центромер наших предков-приматов, потерявшие гомогенность и значительно уменьшившиеся в объеме (Rudd et al., 2006; Shepelev et al., 2009; Uralsky et al., 2019; Altemose et al., 2022a). Встречаются дивергентные массивы, как содержащие ПВП, так и лишенные их (мономерные). Средняя дивергенция копий ПВП в гомогенных массивах около 1%, в дивергентных массивах более 10%. Сформированные базы данных альфа-сателлитных повторов, извлеченные из данных секвенирования всего генома позволили произвести первые оценки частоты вариаций повторов в гомогенных массивах определенных хромосом и ранние оценки различий в по-

следовательности ДНК и длине массивов между людьми в популяции (Miga et al., 2014; Langley et al., 2019; Suzuki et al., 2020). Линейное представление наблюдаемых вариантов повторов и их расчетное количество копий в геноме HuRef (Levy et al., 2007) привели к созданию “моделированных” массивов альфа-сателлитов (референс-модели) в геномной сборке человека GRCh38/hg38, выпущенной в 2013 г., где референс-модели впервые заместили центромерные пробелы (Miga et al., 2014; Uralsky et al., 2019). Хотя эти модели не реконструируют реальную последовательность, а представляют собой своего рода мозаику, собранную из кусочков AC (в данном случае пришедших из двух несколько различающихся гомологичных хромосом), они позволяли картировать короткие прочтения на ту или иную центромеру, предсказывать возможные вариации ПВП и обнаруживать новые, отсутствующие в геноме HuRef варианты (Miga et al., 2014), а также обнаруживать некартируемые на сборку прочтения (Miga et al., 2015). Модели также предлагали улучшенное картирование последовательностей, связанных с внутренними белками кинетохора (Nechemia-Arbely et al., 2017, 2019; Dumont et al., 2020). В совокупности эти ранние исследования генома человека привели к развитию нашего первого концептуального представления о геномной организации центромер и эволюции их последовательностей в сложных геномах.

Достижения в технологиях секвенирования с длинными прочтениями (третье поколение) и недавние улучшения в методах геномной сборки повторов теперь позволяют генерировать полные и точные сборки массивов центромерных повторов человека (Jain et al., 2018a; Bzikadze, Pevzner, 2020; Miga et al., 2020; Nurk et al., 2020; Logsdon et al., 2021). Этот прогресс объясняется наличием длинных прочтений (~15–20 т.п.н.) с качеством 99.9% (Pacific Biosciences HiFi) (Wenger et al., 2019), а также “сверхдлинных” прочтений, которые обычно достигают сотен т.п.н. в длину (Jain et al., 2018a) (Nanopore UL) с точностью около 95%. Параллельно мы наблюдаем огромные успехи в автоматизированной сборке сателлитных массивов и протоколах биоинформатической оценки качества сборок (Bzikadze, Pevzner, 2020; Mikheenko et al., 2020; Nurk et al., 2020) в сочетании со стандартными методами проверки точности сборки с использованием гель-электрофореза в импульсном поле (PFGE) и Саузерн-блоттинга (Miga et al., 2020; Logsdon et al., 2021). Примечательно, что первые доступные центромерные эталонные сборки были получены из “эффективно гаплоидной” линии клеток человека, выделенной из пузырного заноса (внематочной беременности) CHM13hTERT (Steinberg et al., 2014), в котором клетки имеют две идентичные пары хромосом, что значительно упрощает задачу сборки повторов по сравнению с типичными диплоидными клеточными линиями, где гомологичные хромосомы несколько различаются. Недавние первые полные сборки двух хромосом человека

от начала до конца, или “от теломеры до теломеры” (T2T) (T2T-ChrX (Miga et al., 2020) и T2T-Chr8 (Logsdon et al., 2021)), дали первую возможность оценить эти новые методы в свете ожиданий, основанных на предыдущих экспериментальных исследованиях (Ge et al., 1992; Willard 1998; Mahtani et al., 2001). Наконец, в апреле 2022 г. была опубликована первая T2T-сборка всех аутосом и X-хромосомы из CHM13hTERT (Altemose et al., 2022a), а к концу года к этому была добавлена первая T2T-сборка Y-хромосомы из диплоидной клеточной линии HG002 (https://ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_009914755.1), что в сумме представляет собой первый полный референсный геном человека с полностью собранными центромерами. Эта монументальная работа была выполнена T2T-консорциумом исследователей (<https://www.genome.gov/about-genomics/telomere-to-telomere>), который теперь приступил к T2T сборке первого диплоидного генома клеточной линии HG002. Предварительные сборки аутосом этой линии отдельно для отцовской и материнской хромосом уже доступны на сайте консорциума (<https://humanpangenome.org/hg002/>). Налажена процедура T2T-сборки диплоидных геномов, основанная на использовании точных HiFi PacBio прочтений в комбинации с длинными, но неточными Ultra-Long Oxford Nanopore прочтениями для разрешения трудных мест и использовании геномов родителей, сделанных короткими прочтениями (Illumina), для различения (фазирования) гомологов. Другие методы фазирования используют технологии Hi-C (Lieberman-Aiden et al., 2009; Jarvis et al., 2022) и strand-seq (Ghareghani et al., 2018). Единичные оставшиеся трудные места разрешаются вручную. Короткие прочтения собственного генома также используются для окончательной “полировки” собранной последовательности. Все эти процедуры (до ручной доводки) выполняются автоматизированным сборщиком Verkko (Rautiainen et al., 2022).

Кроме преодоления технологических вызовов и успешной разработки протокола T2T-сборки диплоидного генома, деятельность T2T-консорциума ознаменовалась многочисленными открытиями и находками в области биологии и геномики центромер, а также нескольких других, сложенных различными повторами и потому ранее несобранных, регионов. Самые большие из них это кластеры классических сателлитных ДНК (Hsat) в прицентромерных областях (особенно крупные в хромосомах 1, 9, 16 и Y), кластеры рибосомных генов в коротких плечах акроцентрических хромосом и сами эти короткие плечи целиком, поскольку они насыщены классическими сателлитами и сегментными дупликациями. Эти достижения мы перечислим конспективно в следующем разделе, основываясь в основном на статьях, опубликованных в специальном выпуске журнала Science за апрель 2022 г., посвященном полной расшифровке генома человека (Altemose et al., 2022a; Gershman et al., 2022; Nurk et al., 2022).

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ T2T-КОНСОРЦИУМА

Первая полная сборка референсного генома человека. Первая версия сборки T2T-CHM13 v1.0, включающая в себя по одной копии каждой хромосомы, кроме Y, содержит приблизительно 200 Мб новых последовательностей, по сравнению с предыдущей сборкой GRCh38/hg38. В них входят 1956 генов (gene predictions), 99 из которых, по прогнозам, кодируют белки, все центромерные повторы, недавние сегментные дубликации и короткие плечи всех пяти акроцентрических хромосом целиком (Nurk et al., 2022). T2T сборка Y-хромосомы из линии HG002, которая добавлена во вторую версию сборки T2T-CHM13 v2.0, дополняет приблизительно половину этой хромосомы (30 Мб), отсутствующую в GRCh38 сборке (https://ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_009914755.1). Эта половина содержит центромеру, классические сателлитные повторы длинного плеча, а также 110 (42 белок-кодирующих) генов, не представленных в GRCh38.

Интересной иллюстрацией необходимости полной расшифровки высокоповторяющихся областей является следующая история, изложенная в работе Rhie с соавторами (Rhie et al., 2023). При секвенировании бактериальных геномов, последовательности, представляемые в базы данных, проверяются на чужеродные примеси. Частым источником загрязнения является ДНК человека, вероятно происходящая из геномов исследователей. Проверка на присутствие ДНК человека делается путем прикладывания бактериальных прочтений к человеческой геномной сборке. Поскольку в сборке Y-хромосомы человека отсутствовали огромные гетерохроматические районы, сложенные высококопийными классическими сателлитами (HSATII), эта примесь осталась незамеченной. Используя новую T2T сборку Y-хромосомы (Rhie et al., 2023), исследователи показали, что бактериальные базы данных содержат огромное количество контигов высокого уровня, построенных из этих сателлитов, и белков, транслированных из этих последовательностей.

Результаты T2T-сборки и аннотации центромер, выполненные T2T-консорциумом, в частности можно изучать в геномном браузере (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hub_3671779_hs1). В нем можно рассматривать центромеры (представленные аннотационными треками, описанными в одной из работ (Altemose N, et al., 2022a)) с высоты птичьего полета, оценивая их общую архитектуру, или, спускаясь ниже, рассматривать отдельные ПВП или мономеры. Иллюстрации, приведенные в этом обзоре, по большей части представляют собой скриншоты из этого браузера или их схематические изображения. В этой же работе представлена и новая классификация AC ПВП, которую мы тут подробно описывать не будем. Отметим только, что в имени ПВП, например, S2C4H1L, S2 означает надхромосомное семейство 2,

S4 хромосому 4, H1 означает ПВП №1 в данной хромосоме, а индекс L, что это активный массив.

Активная центромера в целом гиперметилирована, а кинетохор расположен вокруг гипометилированного участка внутри нее. Активный центромерный ПВП-массив определяется эпигенетически, связыванием с основным центромерным белком CENP-A, специальным вариантом гистона H3, встречающимся только в центромерных нуклеосомах вместо H3 (Earnshaw, Rothfield, 1985; Earnshaw et al., 1986; Palmer et al., 1987; Earnshaw, Cooke, 1989; Sullivan et al., 1994). Обычно эта связь выявляется в ChIP-seq эксперименте, где хроматин расщепляется нуклеазой, и фрагменты ДНК с нуклеосомами иммунопреципитируются антителами к CENP-A, очищаются от белка и секвенируются. В более сложном CUT&RUN эксперименте (Thakur, Henikoff, 2018) используются антитела к CENP-A, конъюгированные с нуклеазой и расщепление хроматина идет только в местах посадки CENP-A. Однако активный ПВП-массив очень велик, обычно занимает 1–3 млн п.н. и содержит тысячи ПВП. Только часть его (около 500 т.п.н.) покрыта CENP-A, вовлечена в белковые структуры кинетохора и представляет собой центрохроматин, остальная часть покрыта нуклеосомами с H3 и представляет собой гетерохроматин. Анализ профилей метилирования ДНК в центромерных сборках, полученных T2T-консорциумом, показал, что активный ПВП-массив в целом гиперметилирован по сравнению с соседними гетерохроматиновыми участками, но в районах, покрытых CENP-A, метилирование значительно снижено (“центромерный провал”). Длина “провала” обычно несколько меньше, чем весь участок, покрытый CENP-A, он видимо представляет собой район с наибольшей плотностью CENP-A нуклеосом. При этом вне “провала” они разбавляются нуклеосомами с H3. “Провал” соответствует участку центромеры с самым плотно упакованным, и наименее доступным для находящихся в растворе ферментов, хроматином (Gershman et al., 2022). Можно предполагать, что эти места просто не доступны для метилаз, ответственных за гиперметилирование в активном массиве (рис. 1). Эта модель нуждается в подтверждении и детализации. Большую роль в этом может сыграть недавно предложенный и активно используемый T2T-консорциумом метод DiMeLo-seq, который позволяет картировать места связывания CENP-A (или других белков) на сверхдлинных прочтениях ДНК (Altemose et al., 2022b).

Подтверждена модель “расширяющейся центромеры” и обнаружена “послойная экспансия” внутри активных массивов (слои ПВП-гаплотипов). Ранее, основываясь на ограниченном экспериментальном материале, была предложена модель “расширяющейся центромеры” (Miga, Alexandrov, 2021), когда в центромерном районе периодически возникает новый активный ПВП-массив, а остатки старого раздвигаются к краям и уменьшаются в результате деле-

ционного процесса, в то время как новый активный массив растет в результате дупликационного процесса (амплификации ПВП). Когда этот цикл повторяется несколько раз, формируется центромера, где огромный активный массив окаймлен слоистой структурой, содержащей прежние центромеры, где более старые слои находятся снаружи и тем меньше по размеру и более разрушены мутациями и делециями, чем больше их возраст. Вся структура в целом немного напоминает годовичные кольца деревьев, или культурные слои археологических раскопок.

Одним из последних достижений (Altemose et al., 2022a) стала систематическая (в масштабах полного генома) документация характерных черт этой послойной экспансии, которые можно суммировать следующим образом:

1) В массивах АС была показана зеркальная симметрия, начиная с ПВП-гаплотипов в активных массивах центромер (см. пункт 3), расположения сестринских ПВП (см. Miga, Alexandrov, 2021) вокруг активных ПВП, расположения неактивных ПВП вокруг активных массивов, расположения массивов дивергентных ПВП вокруг гомогенного ядра центромеры, и, наконец, симметричного расположения мономерных слоев мертвых центромер вокруг гомогенного кора, образованного различными ПВП. Все эти симметрии наблюдаются далеко не на всех индивидуальных хромосомах, но тенденция четко прослеживается, несмотря на прогрессирующее уменьшение размеров доменов в результате процесса делеции, который потенциально может разрушать и маскировать этот характерный ландшафт.

2) В неактивных массивах АС наблюдаются различные возрастные градиенты распада, причем признаки распада увеличиваются с расстоянием от активного ПВП-массива, включая: градиент размера массива, обусловленный делеционным процессом; градиент дивергенции, обусловленный накоплением мутаций, предположительно ускоренным стадией гипермутативности в недавно инактивированных массивах (Shepelev et al., 2009; Uralsky et al., 2019; Miga, Alexandrov, 2021); градиент плотности инсерций транспозонов, который особенно выражен для повторяющихся элементов LINE1 (L1), поскольку они являются наиболее распространенными вставками в АС; градиент возраста элементов L1, встроенных в АС (их возраст может быть оценен независимо от возраста АС путем подсчета замен относительно предкового консенсуса); градиент других менее распространенных признаков распада, таких как инверсии и экспансии других сателлитов, которые распространены в дивергентных компартментах (мономерных и дивергентных ПВП) и редки в активных ПВП-массивах. Эти характерные признаки были замечены ранее (см. обзор Miga, Alexandrov, 2021), но лишь в нескольких хромосомах, в которых имелись более полные центромерные сборки в GRCh38/hg38. Они также были подтверждены в первых двух Т2Т сборках

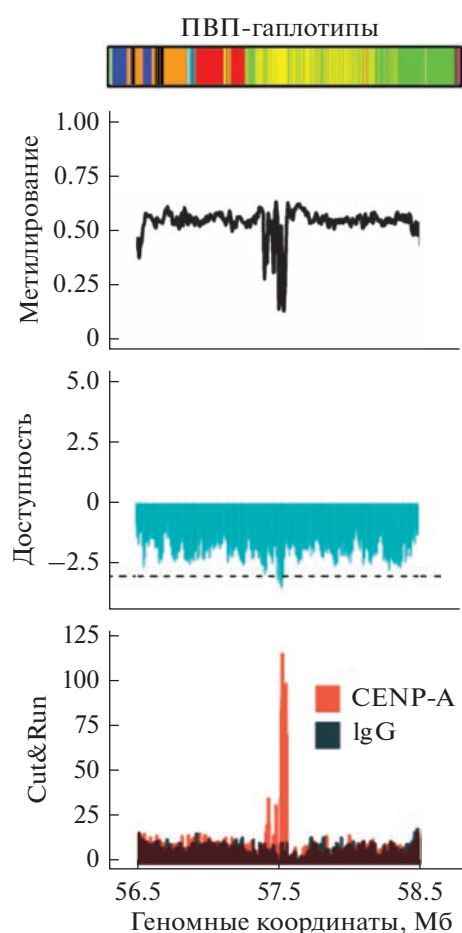


Рис. 1. Активный ПВП-массив X-хромосомы образца HG002. На верхней панели показан трек с аннотацией ПВП-гаплотипов, которые обозначены разными цветами. На второй панели показан уровень метилирования в центромерном регионе, гипометилированная область (“центромерный провал”) указывает на местоположение кинетохора. На третьей — доступность хроматина для экзогенных ферментов, измеренная методом *paNoMe* (Lee et al., 2020), на нижней панели — результаты CENP-A CUT&RUN эксперимента для X-хромосомы образца HG002. Красный цвет — антитела к CENP-A, черный цвет — контрольные неспецифические антитела. Представленные данные взяты из статьи Gershman et al., 2022. Видно, что гипометилированная область и область с минимальной доступностью хроматина соответствуют пику CENP-A, т.е. обозначают расположение кинетохора.

(хромосом X и 8) (Miga et al., 2020; Logsdon et al., 2021). Наконец теперь, когда центромеры всех хромосом достоверно собраны в Т2Т-СНМ13, мы смогли количественно и систематически исследовать все эти симметрии и градиенты и документировать процесс послойной экспансии, создающий характерный и сложный паттерн расширяющейся центромеры.

3) Оказалось также, что симметрии и градиенты послойного расширения можно отчасти наблюдать и внутри активных ПВП массивов центромер. Градиенты распада практически не видны, поскольку

инверсии, инсерции мобильных элементов и экспансии не-АС, хоть и встречаются, но настолько редки, что носят анекдотический характер. В то же время, градиенты размера и дивергенции и симметричное расположение внутренних слоев можно зарегистрировать. Путем сравнения отдельных ПВП друг с другом и фиксации замен (по сравнению с консенсусом), повторяющихся в одном регионе активного ПВП-массива, можно выделить комбинации мутаций, называемые ПВП-гаплотипами. Обычно гаплотип сформирован 3–10 мутациями на ПВП (считая мутации, которые встречаются только в этом гаплотипе). Построение филогенетического дерева из консенсусных ПВП всех гаплотипов позволяет поделить их на более старые (предковые) и более молодые (деривативные). ПВП одного гаплотипа образуют дискретные слои, причем слои предковых гаплотипов часто фланкируют более молодые с обеих сторон, располагаясь по краям центромеры. Кроме того, дивергенция внутри массивов в центральных ПВП-гаплотипах часто немного ниже, чем во фланкирующих массивах, что указывает на то, что экспансия центральных ПВП-гаплотипов произошла недавно. Это показывает, что модель послойного расширения распространяется и на активный массив. Кроме того, наличие идентифицируемых гаплотипических слоев дает внутреннюю топографию активного массива и позволяет изучить различия этой топографии между индивидами. Теперь можно понять: расположен ли кинетохор всегда на одном и том же слое в разных индивидуальных копиях одной и той же хромосомы, или его положение может варьировать.

Гипотеза кинетохор-селекции. Описанная выше картина расширяющейся центромеры и послойной экспансии может объясняться различными способами. Одно из возможных объяснений состоит в том, что экспансия АС происходит независимо от кинетохора, но он имеет сродство к активно растущим массивам, вызванное какими-то их свойствами, например, гомогенностью (“гипотеза независимого расширения”). Такая экспансия наблюдается в частности в виде мегабазных дупликаций в нецентромерных сателлитах, таких как массивы HSat3, которые не связаны с кинетохорами (Altemose et al., 2022a). Другая возможность состоит в том, что кинетохорные белки или другие белки, которые могут ассоциироваться с центромерами, такие как факторы загрузки гистонов, репликации, рекомбинации или репарации, играют причинную роль в экспансии конкретных вариантов ПВП (“гипотеза кинетохор-селекции” (Miga, Alexandrov, 2021)). В последнем случае возможный сценарий может быть сформулирован следующим образом. Кинетохор выбирает тот район в активном массиве (в простейшем случае тот гаплотип), к которому имеет наибольшее сродство. Оно может определяться одной или несколькими гаплотипическими мутациями, прямо или через конформацию ДНК или хроматина. При этом в месте занятом кинетохором (в простейшем случае, покрытом

СЕНР-А) дупликационный процесс (или другие формы амплификации ПВП) происходит более активно, чем снаружи, и значительно опережает делеционный процесс. В остальной части активного массива соотношение этих процессов может быть иное. В результате активный массив как бы растет своей подкинетохорной частью. Для того, чтобы оценить справедливость этой гипотезы, нужны дальнейшие исследования. Однако обнаруженные в одном из исследований (Altemose et al., 2022a) признаки недавней дупликационной активности под кинетохорами в СНМ13 как будто делают ее более правдоподобной.

НОВОЕ В ЦИТОГЕНЕТИКЕ ЦЕНТРОМЕР

Помимо перечисленных выше общих достижений и соображений, анализ первых полных центромерных сборок принес ряд новостей, модифицирующих наши представления о том, какой может и какой не может быть центромера у человека. Считалось, что активный ПВП-массив должен быть “протяженным, непрерывным и гомогенным” (Miga, Alexandrov, 2021). В частности было известно, что он может содержать АС повторы, идущие по прямой или по обратной цепи, но не может содержать переходов с прямой цепи на обратную (инверсий) (Jain et al., 2018b; Miga et al., 2020; Logsdon et al., 2021). Также было известно, что в отдельных, очень редких, случаях АС активного ПВП-массива может быть разорван инсерциями коротких или длинных мобильных элементов (LINEs или SINEs). Однако более протяженные разрывы никогда не обнаруживались. Ниже мы рассмотрим подробно только новости “цитогенетического масштаба”, т.е. модификации описанных выше представлений, которые вовлекают миллионы или сотни тысяч нуклеотидов и потенциально могут быть верифицированы с использованием микроскопических (в отличие от чисто молекулярных) методов исследования.

Расщепленные центромеры. Случаи экспансии не-АС повторов внутри АС массивов довольно часты в мертвых мономерных слоях и, как считалось раньше, не встречаются в активных центромерных ПВП-массивах. Однако Altemose с соавторами (Altemose et al., 2022a) впервые обнаружили три “расщепленные” центромеры, которые прерываются очень большими массивами не-АС повторов. При этом в центромерах хромосом 3 и 4 расщепленным оказался активный массив (рис. 2).

В центромере 3-й хромосомы активный АС массив S01/1C3H1L разделен на 3 части (0.8, 0.03 и 0.5 Мб) двумя большими доменами HSat1A (2.5 и 0.3 Мб), которые значительно превышает длину массива АС. То же самое можно наблюдать в центромере 4-й хромосомы, где домены HSat1A (1.7 и 0.1 Мб) разделяют активный АС массив S2C4H1L на 3 части (0.7, 2.7 и 0.2 Мб). Кроме того, в центромере хромосомы 5 на q-плече большой домен HSat3 (0.4 Мб) отделяет активный массив (2.5 Мб) от мо-

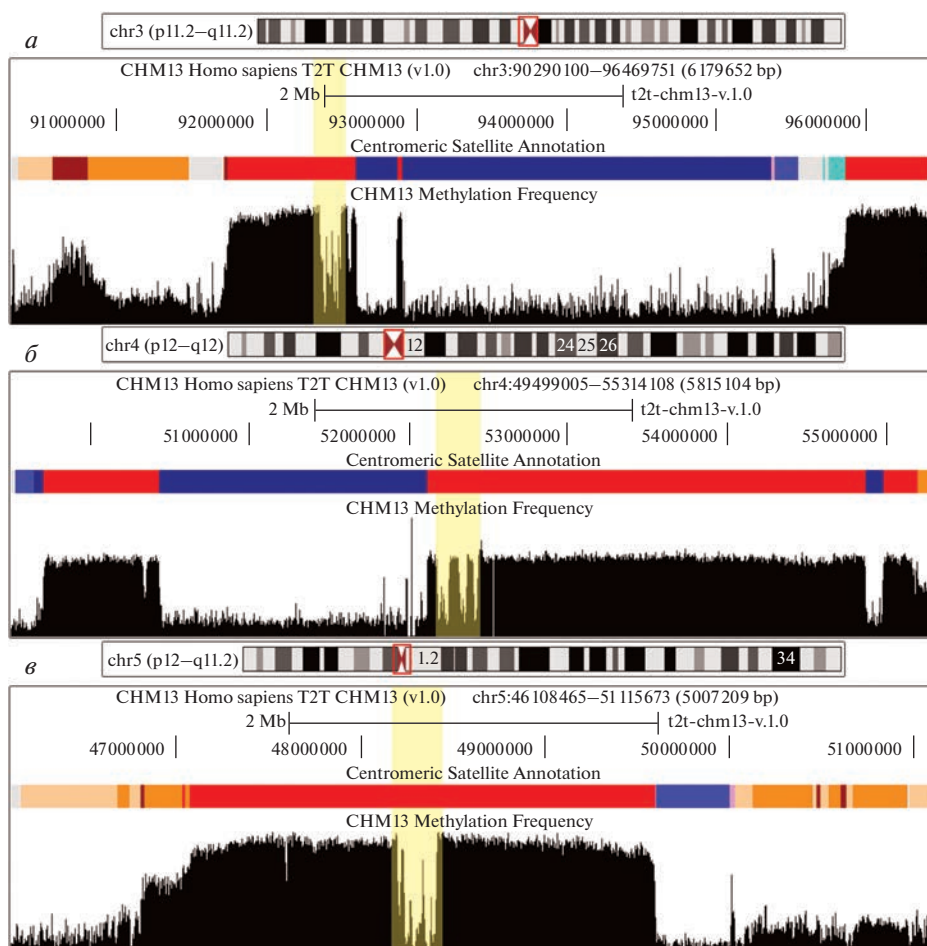


Рис. 2. Аннотация центромерных районов хромосом 3 (а), 4 (б) и 5 (в). Красным цветом на треке “Centromeric Satellite Annotation” показан активный ПВП, синим — классический сателлит, оранжевым — неактивные ПВП, коричневым — дивергентные ПВП, бежевым — мономерные массивы. Вертикальной линией желтого цвета показана область “провала” в метилировании — место расположения кинетохора. Во всех трех хромосомах видны протяженные блоки классического сателлита (синий цвет) внутри АС массивов (красный, оранжевый, коричневый, бежевый).

номерного и неактивного АС массивов (общей длиной 1 Мб). Само по себе это не является необычным, тем не менее, размер вставки классического сателлита ставит его в один ряд с вышеупомянутыми случаями. Авторы проверили ориентацию нитей расщепленных АС массивов и фланкирующих последовательностей в хромосомах 3 и 4, и обнаружили, что они совпадают, то есть вставки не могли возникнуть в результате инверсий на стыке между соседними массивами HSat1 и АС. Таким образом, вероятным объяснением является недавняя вставка и экспансия HSat1 в пределах этих двух активных массивов. Неожиданностью стало то, что вставки, которые, вероятно, сначала должны были быть маленькими, могли разрастись до таких гигантских размеров. Не ясно, за какой промежуток времени могла произойти такая амплификация. Авторы проверили “черновые версии” фазированных (с разделенными гомологами) сборок геномов 16 человек, которые получил Human Pangenome Reference Consortium

(HPRC), и во всех обнаружили расщепленные центромеры 3 и 4 хромосом. Это, однако, не исключает того, что в каких-то древних человеческих популяциях или в ископаемых останках могут обнаружиться нерасщепленные предковые активные массивы (какими они были до вставки HSat1 и экспансии). В этом случае можно будет попытаться понять, в какой период времени это произошло и определить скорость амплификации сателлитной вставки. В среднем в геноме человека частота контактов АС регионов с не-АС составляет: 0.17/Мб для ПВП, 6.48/Мб для дивергентных ПВП и 15.23/Мб для мономерных областей. Таким образом, экспансии не-АС, очевидно, являются частью общего градиента дивергенции и распада, наблюдаемого в ряду ПВП-дПВП-мономеры.

Еще одной особенностью центромер с расщепленными активными массивами является то, что дивергенция ПВП в разных разделенных сегментах может существенно различаться. Для сравнения, в неко-

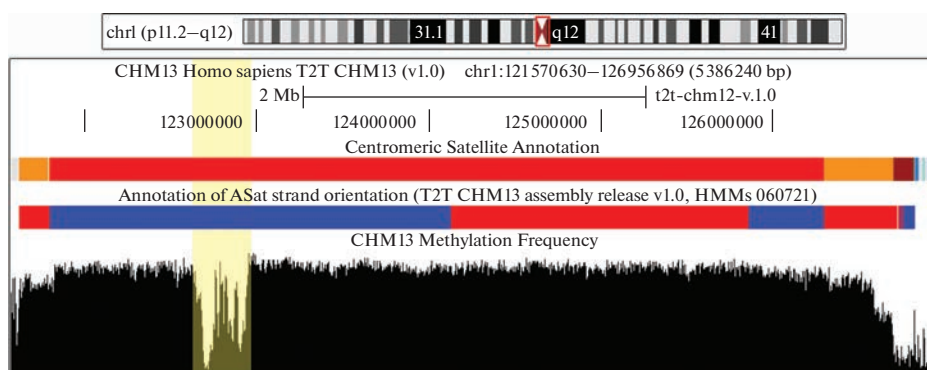


Рис. 3. Инверсия в активном ПВП массиве на 1-ой хромосоме. Красным цветом на треке Centromeric Satellite Annotation показан активный ПВП. На треке “Annotation of ASat strand orientation” синим цветом показана последовательность по прямой, красным — по обратной цепи. Вертикальной полосой желтого цвета показана область “провала” в метилировании — место расположения кинетохора.

торых активных ПВП-массивах (или их частях) мономеры имеют особенно низкую среднюю дивергенцию (0.52–0.65%, например, центромеры 6 и 13 хромосом). В то же время в расщепленной центромере 4-ой хромосомы в каждом из двух больших АС сегментов, способных разместить кинетохор, тот, в котором он действительно размещается, имеет несколько меньшую дивергенцию (0.91 против 1.36%). В центромере 3 эти величины тоже не одинаковы (0.65 против 0.86%). Это неравенство дивергенции в разделенных частях активного массива обращает на себя внимание, поскольку нечто подобное предсказывает гипотеза кинетохор-селекции (Miga, Alexandrov, 2021; Altemose et al., 2022a), которая связывает присутствие кинетохора с повышенной вероятностью дупликации (амплификации) ПВП активного массива, что должно повышать его гомогенность. В то же время предполагается, что участки активного массива перманентно отделенные от подкинетохорной области, могут превратиться в неактивные “мертвые центромеры”, которые, как считается, проходят период гипермутативности (Shepelev et al., 2009; Uralsky et al., 2019). Таким образом, различия дивергенции в разделенных сегментах активного массива входят в предсказания теории. Однако для того, чтобы оценить значимость этого совпадения, требуются дополнительные исследования.

Мегабазная полиморфная инверсия в активном домене центромеры 1. Хотя было известно, что дивергентные АС содержат множество инверсий (Rudd, Willard, 2004) и инсерций транспозонов (Kazakov, 2003), такие события в активных массивах ПВП являются неожиданными, поскольку ранее они считались однородными (Warburton, Willard, 1990, 1995).

Количественная оценка случаев инверсий нитей внутри (не на границах) массивов сателлитов выявила неожиданные аномалии. Например, была обнаружена 1.7 Мб инверсия внутри активного массива АС ПВП на 1-ой хромосоме (рис. 3), а также инверсии в

неактивных (но тоже гомогенных) массивах ПВП на хромосомах 3, 16 и 20 (Altemose et al., 2022a).

Общий подсчет точек переключения цепей в АС оценивал количество инверсий отдельно для ПВП, дПВП и мономерных областей, направление нитей было взято из трека “Annotation of ASat strand orientation”. Переключение, произошедшее прямо на границе сегмента (например, между разными массивами ПВП), не учитывалось, так как разные массивы ПВП часто идут по разным нитям. В однородных ПВП (общая длина в геноме 70 Мб) были обнаружены четыре инверсии: в ПВП S1C1/5/19H1L_1, S1C3H2, S2C16pH2-B/A и S2C20H2. Дивергентные ПВП (1.8 Мб) имели 11 переключений (7 инверсий), одна из которых включала только один мономер. Дивергентные мономерные массивы (10.7 Мб) имели 242 переключения. Таким образом, одно переключение происходило каждые 17.5, 0.16 и 0.44 Мб в однородных ПВП, дивергентных ПВП и мономерных слоях соответственно. Это иллюстрирует упомянутый выше возрастной градиент инверсий, который проявляется в том, что более молодые гомогенные ПВП содержат меньше инверсий, а более старые дивергентные ПВП и мономерные слои гораздо больше. Это один из градиентов распада, характерных для расширяющейся центромеры.

Чтобы лучше понять, являются ли сателлитные инверсии, инсерции и делеции обычными за пределами генома CHM13, авторы провели их поиск в 16 фазированных (с разделенными гомологами) черновых сборках индивидуумов из разнообразных популяций, полученных консорциумом HPRC (Miga, Wang, 2021). Он показал, что инверсия в активном АС ПВП-массиве на хромосоме 1 является полиморфной у разных особей и появляется примерно в половине индивидуальных хромосом 1 (11 из 24). Однако вставки HSat1A на хромосомах 3 и 4 присутствуют во всех проанализированных хромосомах (32 из 32 и 33 из 33 соответственно). Более того, отсутствующий в CHM13 массив HSat3B2 на хромосоме 1 целиком со-

держался в 400 Кб полиморфной делеции, которая была обнаружена в 29% (8 из 28) исследованных хромосом. В результате сделан вывод, что крупные пери/центромерные структурные перестройки, такие, как описанные выше расщепленные центромеры и мега-инверсия не являются специфичными для генома CHM13, а их присутствие либо варьирует, либо фиксировано у всех людей.

Поскольку мега-инверсия в центромере 1 является уникальной, для этого обзора мы изучили ее несколько более подробно. Из-за того, что рекомбинационный обмен между инверсией и основной частью массива, включающей подкинетохорную область, может быть затруднен, можно было бы ожидать отличий в дивергенции и последовательности ПВП между инверсией и остальным массивом. Однако таких отличий выявлено не было. Возможно, инверсия просто слишком недавняя, и с момента ее появления просто не прошло достаточное количество времени.

В связи с обнаружением этой мега-инверсии уместно задаться вопросом, не будет ли соединение двух разных гомологов в мейозе несколько нарушено, если в одном инверсия будет, а в другом нет, и не может ли такое нарушение привести к повышенной мис-сегрегации хромосомы 1?

Центромерные макро-повторы в ряде хромосом. Макро-повторы — это большие дубликации АС, которые могут довольно сильно различаться по возрасту. Недавние экспансии повторов можно определить путем построения и анализа точечных карт (dot plots) центромерных последовательностей при самовравнивании.

Длина единицы выбирается примерно равной длине ПВП (обычно 1000–3000 н.п.). Точка ставится на графике, если два ПВП идентичны в обеих последовательностях. Главная диагональ представляет 100% идентичность, дополнительные линии, параллельные диагонали, представляют почти идентичные внутренние повторы в последовательности (недавние дубликации или экспансии). Таким образом, различные рисунки из коротких отрезков вокруг главной диагонали, которые наблюдаются на графиках, интерпретировались как признаки недавней амплификационной активности. В сборке Т2Т-CHM13 такие узоры обычно наблюдались в районах, связанных с кинетохором (в 18–19 из 23-х хромосом), но отнюдь не исключительно в этих районах (см. рис. 4а, левая панель). Если нужно было исследовать отношения последовательностей с более низкой идентичностью в АС массиве, длина единицы постепенно уменьшалась (скажем, до 500 п.н.; рис. 4б правая панель), а, например, древний макро-повтор в центромере Х-хромосомы уже не виден на точечных картах, но может быть обнаружен как повторяющаяся последовательность гаплотипов в левой половине активного массива АС (рис. 4в). Кроме того, макро-повторы иногда можно обнаружить по повторяю-

щимся паттернам в распределении структурных вариантов ПВП на StV-картах (например, древний макро-повтор в хромосоме 3).

Интересно, что в работе Altomose с соавторами (Altomose et al., 2022a) также показано, что в активном АС массиве на хромосоме 12 CENP-A обогащен только один из двух больших макро-повторов, хотя оба содержат схожие молодые ПВП-гаплотипы. Причем обогащение CENP-A наблюдали в том макро-повторе, где имела место недавняя амплификация одного из молодых гаплотипов (рис. 4а). Возможно, что макро-повторы исходно были одинаковыми (или по крайней мере более похожими), но стабильное расположение кинетохора в одном из них привело к дополнительной амплификации ПВП молодого гаплотипа, находящегося под кинетохором.

Гаплотипические центромерные эпиааллели в Х-хромосоме. Как уже говорилось выше, работы Т2Т консорциума показали, что место локализации кинетохора отмечено в ДНК активного ПВП массива “провалом” в метилировании. Авторы также изучили вариацию расположения кинетохора на активном ПВП массиве Х-хромосом разных людей (рис. 5) (Gershman et al., 2022). Для этого использовали 3 метода: (1) сравнение паттернов обогащения различных ПВП-гаплотипов в коротких прочтениях из экспериментов CENP-A NChIP-seq и CUT&RUN; (2) прямое прикладывание прочтений из этих экспериментов на полностью собранные центромеры Х-хромосомы CHM13; (3) прямое определение положения центромерных “провалов” в метилировании ДНК, которое маркирует положение кинетохора, из ONT прочтений (Simpson et al., 2017). Все три метода показали, что в разных гомологичных Х-хромосомах кинетохор может находиться в разных положениях.

Было картировано по крайней мере три таких положения: на правом фланге активного массива, на левом фланге и посередине. Расстояния между тремя точками составляют около 1 Мб. Таким образом, если взять крайний случай и предположить, что в одной клетке имеются 2 гомологичные Х-хромосомы, где кинетохоры занимают 2 фланговых положения, расстояние между ними будет составлять около 2 Мб. В этой связи приходится задаться вопросом: не будет ли в мейозе бивалент, содержащий такие хромосомы, получать вращательный момент при разделении гомологов из-за асимметричного присоединения микротрубочек веретена? Это может привести к тому, что данный бивалент примет перпендикулярное положение (по отношению к обычному). Представляется, что такая ситуация может легко вызвать нерасхождение хромосом и привести к числовым аномалиям Х-хромосом, которые, как известно, встречаются очень часто (примерно 1/500 новорожденных (Berglund et al, 2020)). Хотя эти аномалии зачастую не вызывают драматических фенотипических проявле-

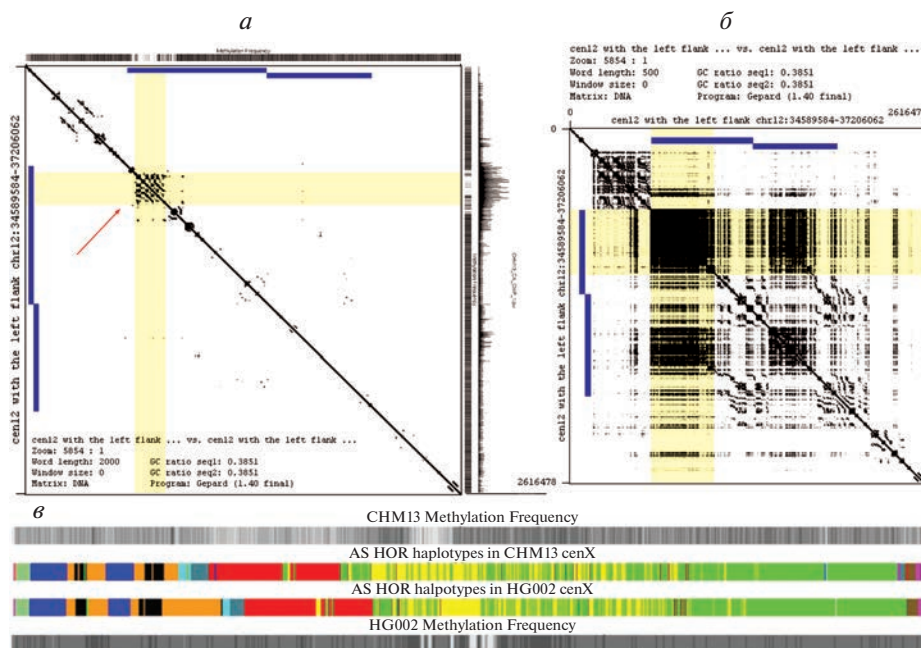


Рис. 4. Точечные карты для центромерных последовательностей 12-ой хромосомы. Слева (а) показана “жесткая” карта (точка ставится при совпадении 2000 т.н.п.). Кластер штрихов вне диагонали (указан стрелкой) показывает признаки недавней амплификационной активности, и видно, что это место совпадает с положением “центромерного провала” (показано желтой полосой) и расположением кинетохора. Справа (б) показана “мягкая” карта для этой же области (точка ставится при совпадении 500 т.н.п.), видны два макро-повтора (отмечены синими линиями), и положение кинетохора в более длинном макро-повторе. Можно предположить, что удлинение одной из копий произошло уже после дупликации из-за амплификационной активности под кинетохором. в – Древние макро-повторы в центромере X-хромосомы в CHM13 и HG002. Различные ПВП-гаплотипы S3CXH1L (DXZ1) в активном массиве обозначены разными цветами, как описано в Altomose et al., 2022. Видны 2 макро-повтора (синий–оранжевый–черный–оранжевый). Эти повторы настолько древние, что не удается подобрать условия, при которых они были бы видны на точечной карте, однако их можно видеть на карте ПВП-гаплотипов.

ний благодаря инактивации избыточных X-хромосом, имеются данные, что пациенты с такими аномалиями гораздо чаще страдают дефектами развития нервной системы и нейродегенеративными заболеваниями, а также меньше живут и быстрее стареют (Tartaglia et al., 2010; Bishop et al., 2011; Bojesen, Gravholt 2011; Skakkebaek et al., 2014). В особенностях мозаичная потеря X-хромосомы может являться скрытым фактором в ряде упомянутых патологий (Iourov et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ПЛАСТИЧНОСТЬ ЦЕНТРОМЕР, ЧТО ОНИ МОГУТ И ЧЕГО НЕ МОГУТ ДЕЛАТЬ

Вышеизложенные новые данные о макроструктуре центромера человека несколько модифицируют традиционные представления. До сих пор считалось, что гомогенный кор центромеры, занятый активным массивом, это однородное образование, состоящее из tandemных ПВП, всегда идущих в одном направлении (по одной нити). Единственным известным нарушением были очень редкие вставки мобильных элементов. Кроме того, было известно о существовании ПВП-гаплотипов, определяемых комбинацией

нескольких мутаций, но как они распределены в центромере не было ясно, поскольку отсутствовали протяженные сборки. Наиболее логичным считалось предположение, что близко расположенные ПВП больше похожи друг на друга, чем на ПВП, расположенные далеко (Durfy, Willard, 1989).

Действительность, как это нередко случается, оказалась отчасти похожей и отчасти непохожей на прежние представления. Гомогенный кор центромеры, действительно, в среднем является гомогенным, однако никакие его параметры не контролируются строго, и повсюду можно обнаружить весьма значительные исключения. Размеры активных доменов, всегда большие, варьируют в очень широком диапазоне (Miga et al., 2014; Altomose et al., 2022a), характерная дивергенция ПВП в активном массиве в среднем обычно в пределах 1%, но на краях встречаются копии ПВП (или небольшие массивы), где дивергенция достигает 2–3% (Altomose et al., 2022a). В целом отсутствие инверсий в гомогенных массивах является правилом, однако имеются рассмотренные выше исключения. Нужно отметить, что в других клеточных линиях (индивидуумах) они могут быть другими, так что действительная частота и спектр этих событий могут быть оценены только после ана-

лиза первых десятков полных геномных сборок из примерно 350, запланированных к производству консорциумом HPRC. При этом впервые должна получить конкретное освещение проблема взаимосвязи полиморфизма прицентромерных районов хромосом, имеющая первостепенное значение в анализе причин различных заболеваний, в первую очередь нервных и нейродегенеративных, а также сердечно-сосудистых заболеваний (Fung et al., 2006; Beecham et al., 2014; Herold et al., 2016; Miga 2019).

Наличие двух расщепленных активных массивов также явилось сюрпризом. Насколько можно было судить по ограниченной выборке из 16 человек, они расщеплены у всех людей (Altemose et al., 2022a). Однако можно ожидать исключений в каких-нибудь древних вариантах хромосом 3 и 4, сохранившихся либо в современных геномах, либо в ископаемой ДНК. В этой связи следует упомянуть важную особенность центромер: мейотическая гомологичная рекомбинация в них подавлена (Mahtani, Willard, 1998). Поэтому древние варианты центромер, привнесенные в современные геномы в результате скрещивания с архаическими людьми, такими как неандертальцы и денисовцы, или случайно сохранившие предковую структуру в неизменном виде, имеют шанс дойти до нас в целости. Они не будут “измельчены” рекомбинацией на небольшие куски самого разного “структурного возраста” (определяемого по основным редко меняющимся структурным чертам). В отличие от последнего “мутационный возраст” всех последовательностей в современном геноме одинаковый, поскольку мутации происходят по всему геному более или менее равномерно. Таким образом, в каких-то человеческих линиях могут случайным образом сохраниться центромеры, не претерпевшие крупных структурных изменений в течение очень долгого времени. Такие центромеры можно назвать древними, имея в виду именно их структурный возраст. Таким образом, если древняя нерасщепленная центромера каким-то образом уцелеет при прохождении популяционных “бутылочных горлышек”, она может быть обнаружена у современного человека в целости и сохранности (за исключением отдельных случайных мутаций) и ее структурные особенности могут быть идентифицированы с таковыми в ископаемой ДНК.

Кроме того, расщепленные активные массивы и макро-повторы могут представлять интерес в плане обоснования гипотезы кинетохор-селекции и общих сценариев эволюции ПВП массивов. Например, если кинетохор находится на одном из двух почти идентичных макро-повторов, можно предполагать, что в нем будет больше признаков недавней дупликационной активности, чем в другом макро-повторе. Также интересно насколько стабильным будет такое положение? Не будет ли кинетохор располагаться на разных копиях макро-повтора у разных

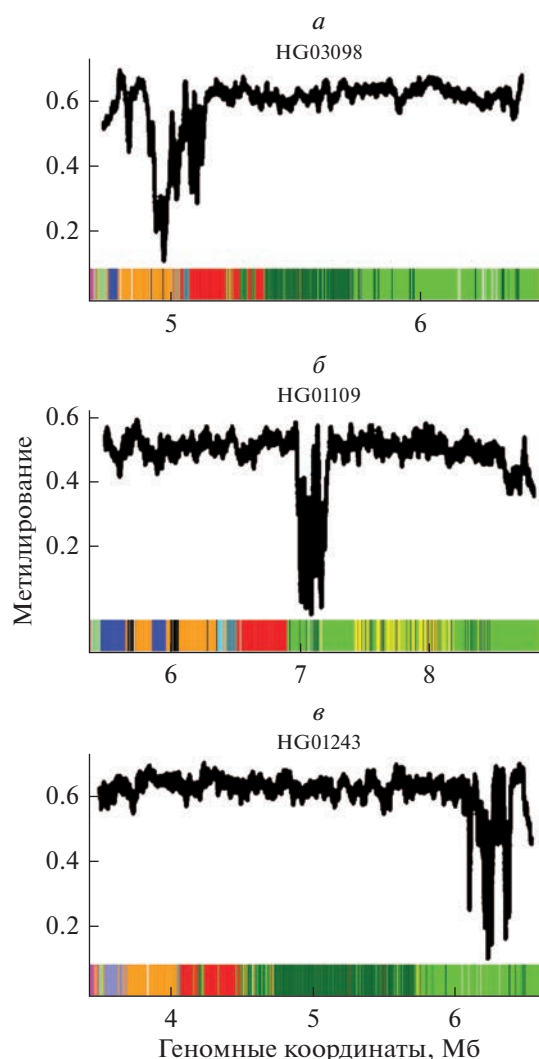


Рис. 5. Три варианта расположения кинетохора в активном ПВП-массиве X-хромосомы (гаплотипические центромерные эпизаллели). Черной линией показан уровень метилирования в активном ПВП-массиве. Гипометилированная область указывает на место расположения кинетохора в активном ПВП массиве X-хромосомы трех индивидов (HG03098 – а, HG01109 – б, HG01243 – в). Для каждого образца показаны треки с аннотацией ПВП-гаплотипов, где разные гаплотипы обозначены цветами. Можно видеть, что наряду с вариантами центромер, имеющими два макро-повтора (б), подобными показанным на рис. 4, имеются варианты (а и в), не имеющие макро-повторов.

людей? Возможны ли случаи, когда одна часть расщепленной центромеры остается активным массивом, а другая становится мертвой центромерой, претерпевает гипермутабильность и превращается в дивергентный ПВП-массив? Эти и другие интересные вопросы потребуют дальнейших исследований, однако технологическая база для них уже создана, и можно думать, что науку о центромерах ожидают захватывающие времена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 19-75-30039.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alexandrov I., Kazakov A., Tumeneva I., Shepelev V., Yurov Y. 2001. Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma*. V. 110. P. 253.
<https://doi.org/10.1007/s004120100146>
- Altomose N., Logsdon G.A., Bzikadze A.V., Sidhwani P., Langley S.A., Caldas G.V., Hoyt S.J., Uralsky L., Ryabov F.D., Shew C.J., Sauria M.E.G., Borchers M., Gershman A., Mikheenko A., Shepelev V.A. et al. 2022a. Complete genomic and epigenetic maps of human centromeres. *Science*. V. 376. NO. 6588.
<https://doi.org/10.1126/science.abl4178>
- Altomose N., Maslan A., Smith O.K., Sundararajan K., Brown R.R., Mishra R., DeWeiler A.M., Neff N., Miga K.H., Straight A.F., Streets A. 2022b. DiMeLo-seq: a long-read, single-molecule method for mapping protein–DNA interactions genome wide. *Nat Methods*. V. 19. P. 711.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01475-6>
- Beecham G.W., Hamilton K., Naj A.C., Martin E.R., Huentelman M., Myers A.J., Corneveaux J.J., Hardy J., Vonsattel J.-P., Younkin S.G., Bennett D.A., De Jager P.L., Larson E.B., Crane P.K., Kamboh M.I. et al. 2014. Genome-wide association Meta-analysis of neuropathologic features of Alzheimer's disease and related dementias. *PLoS Genet*. V. 10, e1004606.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004606>
- Berglund A., Stochholm K., Gravholt C.H. 2020. The epidemiology of sex chromosome abnormalities. *Am. J. Med. Genet*. V. 184. P. 202.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31805>
- Bishop D.V.M., Jacobs P.A., Lachlan K., Wellesley D., Barnicoat A., Boyd P.A., Fryer A., Middlemiss P., Smithson S., Metcalfe K., Shears D., Leggett V., Nation K., Scerif G. 2011. Autism, language and communication in children with sex chromosome trisomies. *Archives of Disease in Childhood*. V. 96. P. 954.
<https://doi.org/10.1136/adc.2009.179747>
- Bojesen A., Gravholt C.H. 2011. Morbidity and mortality in Klinefelter syndrome (47,XXY): Morbidity and mortality in KS. *Acta Paediatrica*. V. 100. P. 807.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02274.x>
- Bzikadze A.V., Pevzner P.A. 2020. Automated assembly of centromeres from ultra-long error-prone reads. *Nat. Biotechnol*. V. 38. P. 1309.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0582-4>
- Carlson M., Brutlag D. 1977. Cloning and characterization of a complex satellite DNA from drosophila melanogaster. *Cell*. V. 11. P. 371.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90054-X)
- Cimini D., Howell B., Maddox P., Khodjakov A., Degross F., Salmon E.D. 2001. Merotelic Kinetochore Orientation Is a Major Mechanism of Aneuploidy in Mitotic Mammalian Tissue Cells. *Journal of Cell Biology*. V. 153. P. 517.
<https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.517>
- Dumont M., Gamba R., Gestraud P., Klaasen S., Worrall J.T., De Vries S.G., Boudreau V., Salinas-Luypaert C., Maddox P.S., Lens S.M., Kops G.J., McClelland S.E., Miga K.H., Fachinetti D. 2020. Human chromosome-specific aneuploidy is influenced by DNA-dependent centromeric features. *EMBO J*. V. 39.
<https://doi.org/10.15252/embj.2019102924>
- Durfy S.J., Willard H.F. 1989. Patterns of intra- and interarray sequence variation in alpha satellite from the human X chromosome: Evidence for short-range homogenization of tandemly repeated DNA sequences. *Genomics*. V. 5. P. 810.
[https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90123-7)
- Earnshaw W., Bordwell B., Marino C., Rothfield N. 1986. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J. Clin. Invest*. V. 77. P. 426.
<https://doi.org/10.1172/JCI112320>
- Earnshaw W.C., Cooke C.A. 1989. Proteins of the inner and outer centromere of mitotic chromosomes. *Genome*. V. 31. P. 541.
<https://doi.org/10.1139/g89-103>
- Earnshaw W.C., Rothfield N. 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*. V. 91. P. 313.
<https://doi.org/10.1007/BF00328227>
- Fung H.-C., Scholz S., Matarin M., Simón-Sánchez J., Hernandez D., Britton A., Gibbs J.R., Langefeld C., Stiebert M.L., Schymick J., Okun M.S., Mandel R.J., Fernandez H.H., Foote K.D., Rodríguez R.L. et al. 2006. Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *The Lancet Neurology*. V. 5. P. 911.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70578-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70578-6)
- Ge Y., Wagner M.J., Siciliano M., Wells D.E. 1992. Sequence, higher order repeat structure, and long-range organization of alpha satellite DNA specific to human chromosome 8. *Genomics*. V. 13. P. 585.
[https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90128-F](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90128-F)
- Gershman A., Sauria M.E.G., Guitart X., Vollger M.R., Hook P.W., Hoyt S.J., Jain M., Shumate A., Razaghi R., Koren S., Altomose N., Caldas G.V., Logsdon G.A., Rhie A., Eichler E.E. et al. 2022. Epigenetic patterns in a complete human genome. *Science*. V. 376. NO. 6588.
<https://doi.org/10.1126/science.abj5089>
- Ghareghani M., Porubský D., Sanders A.D., Meiers S., Eichler E.E., Korbel J.O., Marschall T. 2018. Strand-seq enables reliable separation of long reads by chromosome via expectation maximization. *Bioinformatics*. V. 34. P. i115.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty290>
- Herold C., Hooli B.V., Mullin K., Liu T., Roehr J.T., Mattheisen M., Parrado A.R., Bertram L., Lange C., Tanzi R.E. 2016. Family-based association analyses of imputed genotypes reveal genome-wide significant association of Alzheimer's disease with OSBPL6, PTPRG, and PDCL3. *Mol. Psychiatry*.

- try. V. 21. P. 1608.
<https://doi.org/10.1038/mp.2015.218>
- International Human Genome Sequencing Consortium*. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. V. 431. P. 931.
<https://doi.org/10.1038/nature03001>
- International Human Genome Sequencing Consortium*, Whitehead Institute for Biomedical Research, Center for Genome Research., *Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D. et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. V. 409. P. 860.
<https://doi.org/10.1038/35057062>
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Kutsev S.I.* 2019. Ontogenetic and pathogenetic views on somatic chromosomal mosaicism. *Genes*. V. 10. P. 379.
<https://doi.org/10.3390/genes10050379>
- Jain M., Koren S., Miga K.H., Quick J., Rand A.C., Sasani T.A., Tyson J.R., Beggs A.D., Dillthey A.T., Fiddes I.T., Malla S., Marriott H., Nieto T., O'Grady J., Olsen H.E. et al.* 2018a. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.* V. 36. P. 338.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
- Jain M., Olsen H.E., Turner D.J., Stoddart D., Bulazel K.V., Paten B., Haussler D., Willard H.F., Akeson M., Miga K.H.* 2018b. Linear assembly of a human centromere on the Y chromosome. *Nat. Biotechnol.* V. 36. P. 321.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4109>
- Jarvis E.D., Formenti G., Rhie A., Guarracino A., Yang C., Wood J., Tracey A., Thibaud-Nissen F., Vollger M.R., Porubsky D., Cheng H., Asri M., Logsdon G.A., Carnevali P., Chaisson M.J.P. et al.* 2022. Semi-automated assembly of high-quality diploid human reference genomes. *Nature*. V. 611. P. 519.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05325-5>
- Kazakov A.E., Shepelev V.A., Tumenewa I.G., Alexandrov A.A., Yurov Y.B., Alexandrov I.A.* 2003. Interspersed repeats are found predominantly in the "old" α satellite families. *Genomics*. V. 82. P. 619.
[https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00182-4](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00182-4)
- Langley S.A., Miga K.H., Karpen G.H., Langley C.H.* 2019. Haplotypes spanning centromeric regions reveal persistence of large blocks of archaic DNA. *eLife*. V. 8. e42989.
<https://doi.org/10.7554/eLife.42989>
- Lee I., Razaghi R., Gilpatrick T., Molnar M., Gershman A., Sadowski N., Sedlazeck F.J., Hansen K.D., Simpson J.T., Timp W.* 2020. Simultaneous profiling of chromatin accessibility and methylation on human cell lines with nanopore sequencing. *Nat. Methods*. V. 17. P. 1191.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-01000-7>
- Levine M.S., Holland A.J.* 2018. The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev*. V. 32. P. 620.
<https://doi.org/10.1101/gad.314351.118>
- Levy S., Sutton G., Ng P.C., Feuk L., Halpern A.L., Walenz B.P., Axelrod N., Huang J., Kirkness E.F., Denisov G., Lin Y., MacDonald J.R., Pang A.W.C., Shago M., Stockwell T.B. et al.* 2007. The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. *PLoS Biol.* V. 5. P. e254.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050254>
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A. et al.* 2009. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science*. V. 326. P. 289.
<https://doi.org/10.1126/science.1181369>
- Logsdon G.A., Vollger M.R., Hsieh P., Mao Y., Liskovych M.A., Koren S., Nurk S., Mercuri L., Dishuck P.C., Rhie A., de Lima L.G., Dvorkina T., Porubsky D., Harvey W.T., Mikheenko A. et al.* 2021. The structure, function and evolution of a complete human chromosome 8. *Nature*. V. 593. P. 101.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03420-7>
- Mahtani M.M., Willard H.F.* 1998. Physical and Genetic Mapping of the Human X Chromosome Centromere: Repression of Recombination. *Genome Res*. V. 8. P. 100.
<https://doi.org/10.1101/gr.8.2.100>
- Manuelidis L.* 1976. Repeating restriction fragments of human DNA. *Nucleic Acids Research*. V. 3. P. 3063.
<https://doi.org/10.1093/nar/3.11.3063>
- Manuelidis L., Wu J.C.* 1978. Homology between human and simian repeated DNA. *Nature*. V. 276. P. 92.
<https://doi.org/10.1038/276092a0>
- Miga K.H.* 2019. Centromeric satellite DNAs: Hidden sequence variation in the human population. *Genes*. V. 10. P. 352.
<https://doi.org/10.3390/genes10050352>
- Miga K.H., Alexandrov I.A.* 2021. Variation and Evolution of Human Centromeres: A Field Guide and Perspective. *Annu. Rev. Genet.* V. 55. P. 583.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-020519>
- Miga K.H., Eisenhart C., Kent W.J.* 2015. Utilizing mapping targets of sequences underrepresented in the reference assembly to reduce false positive alignments. *Nucleic Acids Res.* V. 43. P. e133.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv671>
- Miga K.H., Koren S., Rhie A., Vollger M.R., Gershman A., Bzikadze A., Brooks S., Howe E., Porubsky D., Logsdon G.A., Schneider V.A., Potapova T., Wood J., Chow W., Armstrong J. et al.* 2020. Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature*. V. 585. P. 79.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2547-7>
- Miga K.H., Newton Y., Jain M., Altemose N., Willard H.F., Kent W.J.* 2014. Centromere reference models for human chromosomes X and Y satellite arrays. *Genome Res*. V. 24. P. 697.
<https://doi.org/10.1101/gr.159624.113>
- Miga K.H., Wang T.* 2021. The Need for a Human Pangenome Reference Sequence. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* V. 22. P. 81.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120120-081921>
- Mikheenko A., Bzikadze A.V., Gurevich A., Miga K.H., Pevzner P.A.* 2020. TandemTools: mapping long reads and assessing/improving assembly quality in extra-long tandem repeats. *Bioinformatics*. V. 36. P. i75.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa440>
- Nechemia-Arbely Y., Fachinetti D., Miga K.H., Sekulic N., Soni G.V., Kim D.H., Wong A.K., Lee A.Y., Nguyen K., Dekker C., Ren B., Black B.E., Cleveland D.W.* 2017. Human centromeric CENP-A chromatin is a homotypic, octameric nucleosome at all cell cycle points. *Journal of Cell Biology*. V. 216. P. 607.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201608083>
- Nechemia-Arbely Y., Miga K.H., Shoshani O., Aslanian A., McMahon M.A., Lee A.Y., Fachinetti D., Yates J.R., Ren B.,*

- Cleveland D.W. 2019. DNA replication acts as an error correction mechanism to maintain centromere identity by restricting CENP-A to centromeres. *Nat. Cell Biol.* V. 21. P. 743.
<https://doi.org/10.1038/s41556-019-0331-4>
- Nurk S., Koren S., Rhie A., Rautiainen M., Bzikadze A.V., Mikheenko A., Vollger M.R., Altemose N., Uralsky L., Gershman A., Aganezov S., Hoyt S.J., Diekhans M., Logsdon G.A., Alonge M. et al. 2022. The complete sequence of a human genome. *Science*. V. 376. P. 44.
<https://doi.org/10.1126/science.abj6987>
- Nurk S., Walenz B.P., Rhie A., Vollger M.R., Logsdon G.A., Grothe R., Miga K.H., Eichler E.E., Phillippy A.M., Koren S. 2020. HiCanu: accurate assembly of segmental duplications, satellites, and allelic variants from high-fidelity long reads. *Genome Res.* V. 30. P. 1291.
<https://doi.org/10.1101/gr.263566.120>
- Osoegawa K., Vessere G.M., Li Shu C., Hoskins R.A., Abad J.P., de Pablos B., Villasante A., de Jong P.J. 2007. BAC clones generated from sheared DNA. *Genomics*. V. 89. P. 291.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.10.002>
- Palmer J.D., Nugent J.M., Herbon L.A. 1987. Unusual structure of geranium chloroplast DNA: A triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 84. P. 769.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.3.769>
- Rautiainen M., Nurk S., Walenz B.P., Logsdon G.A., Porubsky D., Rhie A., Eichler E.E., Phillippy A.M., Koren S. 2022. Verkko: telomere-to-telomere assembly of diploid chromosomes (preprint). *Bioinformatics*.
<https://doi.org/10.1101/2022.06.24.497523>
- Rhie A., Nurk S., Cechova M., Hoyt S.J., Taylor D.J., Altemose N., Hook P.W., Koren S., Rautiainen M., Alexandrov I.A., Allen J., Asri M., Bzikadze A.V., Chen N.-C., Chin C.-S. et al. 2022. The complete sequence of a human Y chromosome (preprint). *Genomics*.
<https://doi.org/10.1101/2022.12.01.518724>
- Rudd M.K., Willard H.F. 2004. Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends in Genetics*. V. 20. P. 529.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.008>
- Rudd M.K., Wray G.A., Willard H.F. 2006. The evolutionary dynamics of α -satellite. *Genome Res.* V. 16. P. 88.
<https://doi.org/10.1101/gr.3810906>
- Schueler M.G., Higgins A.W., Rudd M.K., Gustashaw K., Willard H.F. 2001. Genomic and Genetic Definition of a Functional Human Centromere. *Science*. V. 294. P. 109.
<https://doi.org/10.1126/science.1065042>
- She X., Horvath J.E., Jiang Z., Liu G., Furey T.S., Christ L., Clark R., Graves T., Gulden C.L., Alkan C., Bailey J.A., Sahinalp C., Rocchi M., Haussler D., Wilson R.K. et al. 2004. The structure and evolution of centromeric transition regions within the human genome. *Nature*. V. 430. P. 857.
<https://doi.org/10.1038/nature02806>
- Shepelev V.A., Alexandrov A.A., Yurov Y.B., Alexandrov I.A. 2009. The Evolutionary Origin of Man Can Be Traced in the Layers of Defunct Ancestral Alpha Satellites Flanking the Active Centromeres of Human Chromosomes. *PLoS Genet.* V. 5, e1000641.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000641>
- Simpson J.T., Workman R.E., Zuzarte P.C., David M., Dursi L.J., Timp W. 2017. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat Methods*. V. 14. P. 407.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4184>
- Singer M.F. 1982. Highly Repeated Sequences in Mammalian Genomes. *International Review of Cytology*. V. 76. P. 67.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61789-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61789-1)
- Skakkebaek A., Gravholt C.H., Rasmussen P.M., Bojesen A., Jensen J.S., Fedder J., Laurberg P., Hertz J.M., Østergaard J.R., Pedersen A.D., Wallentin M. 2014. Neuroanatomical correlates of Klinefelter syndrome studied in relation to the neuropsychological profile. *NeuroImage: Clinical*. V. 4. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.10.013>
- Steinberg K.M., Schneider V.A., Graves-Lindsay T.A., Fulton R.S., Agarwala R., Huddleston J., Shiryev S.A., Morgulis A., Surti U., Warren W.C., Church D.M., Eichler E.E., Wilson R.K. 2014. Single haplotype assembly of the human genome from a hydatidiform mole. *Genome Res.* V. 24. P. 2066.
<https://doi.org/10.1101/gr.180893.114>
- Sullivan B.A., Wolff D.J., Schwartz S. 1994. Analysis of centromeric activity in Robertsonian translocations: implications for a functional acrocentric hierarchy. *Chromosoma*. V. 103. P. 459.
<https://doi.org/10.1007/BF00337384>
- Suzuki Y., Myers E.W., Morishita S. 2020. Rapid and ongoing evolution of repetitive sequence structures in human centromeres. *Sci. Adv.* V. 6. eabd9230.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abd9230>
- Tartaglia N.R., Howell S., Sutherland A., Wilson R., Wilson L. 2010. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J. Rare Dis.* V. 5. P. 8.
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-8>
- Thakur J., Henikoff S. 2018. Unexpected conformational variations of the human centromeric chromatin complex. *Genes Dev.* V. 32. P. 20.
<https://doi.org/10.1101/gad.307736.117>
- Uralsky L.I., Shepelev V.A., Alexandrov A.A., Yurov Y.B., Rogaev E.I., Alexandrov I.A. 2019. Classification and monomer-by-monomer annotation dataset of suprachromosomal family 1 alpha satellite higher-order repeats in hg38 human genome assembly. *Data in Brief*. V. 24. P. 103708.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103708>
- Vázquez-Diez C., FitzHarris G. 2018. Causes and consequences of chromosome segregation error in preimplantation embryos. *Reproduction*. V. 155. P. R63.
<https://doi.org/10.1530/REP-17-0569>
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., Gocayne J.D., Amanatides P., Ballew R.M., Huson D.H., Wortman J.R. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. V. 291. P. 1304.
<https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Kurinnaia O.S., Kravets V.S., Demidova I.A., Soloviev I.V., Yurov Y.B., Iourov I.Y. 2021. Turner's syndrome mosaicism in girls with neurodevelopmental disorders: a cohort study and hypothesis. *Mol. Cytogenet.* V. 14. P. 9.
<https://doi.org/10.1186/s13039-021-00529-2>
- Vorsanova S.G., Demidova I.A., Kolotii A.D., Kurinnaia O.S., Kravets V.S., Soloviev I.V., Yurov Y.B., Iourov I.Y. 2022. Klinefelter syndrome mosaicism in boys with neurodevel-

- omental disorders: a cohort study and an extension of the hypothesis. *Mol. Cytogenet.* V. 15. P. 8.
<https://doi.org/10.1186/s13039-022-00588-z>
- Warburton P.E., Willard H.F. 1990. Genomic analysis of sequence variation in tandemly repeated DNA. *Journal of Molecular Biology.* V. 216. P. 3.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80056-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80056-7)
- Warburton P.E., Willard H.F. 1995. Interhomologue sequence variation of alpha satellite DNA from human chromosome 17: Evidence for concerted evolution along haplotypic lineages. *J. Mol. Evol.* V. 41.
<https://doi.org/10.1007/BF00173182>
- Wenger A.M., Peluso P., Rowell W.J., Chang P.-C., Hall R.J., Concepcion G.T., Ebler J., Fungtammasan A., Kolesnikov A., Olson N.D., Töpfer A., Alonge M., Mahmoud M., Qian Y., Chin C.-S. et al. 2019. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat. Biotechnol.* V. 37. P. 1155.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0217-9>
- Wevrick R., Willard H.F. 1991. Physical map of the centromeric region of human chromosome 7: relationship between two distinct alpha satellite arrays. *Nucl. Acids Res.* V. 19. P. 2295.
<https://doi.org/10.1093/nar/19.9.2295>
- Wevrick R., Willard H.F. 1989. Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 86. P. 9394.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9394>
- Willard H.F. 1985. Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am. J. Hum. Genet.* V. 37. P. 524.
- Willard H.F., Wayne J.S. 1987. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends in Genetics.* V. 3. P. 192.
[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(87\)90232-0](https://doi.org/10.1016/0168-9525(87)90232-0)

New in Centromere Genomics: Lessons from the First T2T Human Genome Assembly

L. I. Uralsky^{a, b, *}, I. A. Alexandrov^{b, c, d}, F. D. Ryabov^e, A. L. Lapidus^c, and E. I. Rogaev^{b, f}

^aSirius University of Science and Technology, Sirius, 354340 Russia

^bDepartment of Genomics and Human Genetics, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cCenter for Bioinformatics and Algorithmic Biotechnology, Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^dResearch Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^eNational Research University, Higher School of Economics, Moscow, 109028 Russia

^fUMass Chan Medical School, Department of Psychiatry, Shrewsbury, MA, 01655 USA

*e-mail: uralskiy.li@talantiuspeh.ru

With the recent development of long-read sequencing technologies, it is now possible for the first time to read a complete gapless sequence of the human genome. The result was the first T2T (telomere-to-telomere) genomic assembly, published by an international consortium of scientists in 2022. The most significant contribution of the new assembly were the centromeric regions consisting of highly repetitive satellite DNA. In this review, we will briefly list the major achievements of the T2T consortium related to centromeres and take a closer look at the unexpected findings of cytogenetic magnitude that analysis of first assembled human centromeres has brought, such as the “split” centromeres of chromosomes 3 and 4, mega-inversion in the active centromere array of chromosome 1, haplotypic epialleles in the centromere of X chromosome and the macro-repeats found in several centromeres.

Keywords: alpha satellite, centromere, HOR-haplotype, inversion, macro-repeats, centromeric epialleles, T2T-consortium

УДК 57.052:57.041:576.53

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

© 2023 г. У. И. Поденкова¹, И. В. Зубарев¹, А. Н. Томилин¹, А. С. Цимоха¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: atsimokha@incras.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 05.12.2022 г.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) демонстрируют уникальную способность к непрерывному самообновлению и дифференцировке во все типы соматических клеток. Понимание механизмов, контролирующих эти свойства, приблизит к эффективному и безопасному использованию ЭСК и иПСК в клеточной терапии. Недавние совокупные данные подчеркнули важность протеостаза в поддержании функции ЭСК. Настоящий обзор посвящен роли убиквитин-протеасомной системы (УПС) — ключевого участника сети протеостаза — в регуляции плюрипотентности и дифференцировки ЭСК и иПСК.

Ключевые слова: деубиквитиназы, дифференцировка, плюрипотентность, протеасома, убиквитин-лигазы, убиквитин-протеасомная система, эмбриональные стволовые клетки

DOI: 10.31857/S0041377123030069, **EDN:** VDOROR

Плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты способны дифференцироваться во все эмбриональные и экстраэмбриональные ткани. Клетки ВКМ бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) (Thomson et al., 1998; Abu-Dawud et al., 2018). Работами последних лет установлена способность ЭСК противостоять повреждающим факторам, которые могли бы привести к выходу из состояния плюрипотентности и старению (Young, 2011). Так, показано, что ЭСК имеют пониженную частоту мутаций, что способствует большей стабильности генома, и продуцируют гораздо меньше радикалов кислорода по сравнению с дифференцированными клетками (Saretzki et al., 2004; Sinenko et al., 2021). Эти свойства ЭСК в значительной степени обеспечиваются усиленной активностью защитных систем клетки. К плюрипотентным стволовым клеткам (ПСК) относятся как ЭСК, так и индуцированные ПСК (иПСК). иПСК впервые были получены в результате генетического репрограммирования соматических клеток в 2006 г. с помощью экзогенной экспрессии факторов транскрипции Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc (Takahashi, Yamanaka, 2006). Научившись поддерживать плюрипотентное состояние в условиях лаборатории и культивировать ЭСК и иПСК неограничен-

ное время *in vitro*, ученые получили новые возможности для более подробного исследования как состояния плюрипотентности, так и выхода из него, в том числе посредством изучения функций отдельных генов.

В настоящее время очевидны большие перспективы применения ПСК в четырех основных областях: биологии развития, регенеративной и трансплантационной медицине, моделировании заболеваний и разработке лекарственных препаратов. Поскольку в основе многих заболеваний лежат генетические нарушения, моделирование таких заболеваний может быть облегчено путем изучения конкретных генотипов в подходящем экспериментальном контексте. Так, огромный потенциал ПСК для моделирования заболеваний человека был быстро реализован с появлением работ, в которых с помощью генетических модификаций в ПСК были получены модельные *in vitro* системы, позволяющие изучать ассоциированный с определенной мутацией фенотип. ПСК человека используют также и для моделирования хромосомных нарушений путем изоляции спонтанно возникающих в культуре анеуплоидных клеток, например, клеток с моносомией по X-хромосоме, характерной для синдрома Тернера (Urbach, Benvenisty, 2009). В настоящее время ЭСК успешно использовали для создания моделей хромосомных и моногенных заболеваний человека, таких как синдром Дауна и синдром Тернера (Biancotti et al., 2010), а также сложных психических заболеваний, включающих расстрой-

Принятые сокращения: ПСК — плюрипотентные стволовые клетки; иПСК — индуцированные ПСК; УПС — убиквитин-протеасомная система; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

ства аутистического спектра и шизофрению (Pak et al., 2015).

Разработаны протоколы получения мезэнцефальных дофаминовых нейронов из ПСК, которые успешно приживаются и устраняют двигательные нарушения после трансплантации в модели болезни Паркинсона у крыс (Alekseenko et al., 2022). Терапия на основе ПСК таких заболеваний сетчатки, как возрастная дегенерация желтого пятна и Болезнь Штаргардта, также может обеспечить безопасное и эффективное лечение, поскольку не было зарегистрировано серьезных побочных эффектов и свидетельств аномального роста клеток или образования опухоли при трансплантации полученных из ПСК клеток в глаза пациентов (Schwartz et al., 2015; Liu et al., 2018). Активно исследуется возможность использования панкреатических клеток-предшественников или инсулин-секретирующих клеток, полученных из ЭСК человека в терапии диабета. На модельных животных было показано, что такие клетки способны секретировать инсулин в ответ на глюкозу и снижать высвобождение инсулина для предотвращения гипогликемии (Rezania et al., 2014).

Помимо этого, интенсивно разрабатываются стратегии применения ПСК для скрининга лекарств, где одним из направлений является исследование токсичности препаратов. Этот подход включает дифференцировку ПСК человека в клетки ткани, на которую воздействует исследуемый препарат, а затем проведение дозозависимого анализа токсичности. Многие подобные исследования сосредоточены на кардиомиоцитах и гепатоцитах, полученных из ПСК, поскольку применение лекарственных препаратов часто сопровождается неблагоприятными последствиями для сердца или печени (Behbahan et al., 2011).

Несмотря на большой потенциал применения ПСК, необходимо решить многочисленные проблемы, чтобы эффективно реализовать все преимущества технологии плюрипотентных стволовых клеток в регенеративной медицине и при разработке лекарственных препаратов. Так, например, для того чтобы клеточные системы считались надежной моделью для скрининга лекарств, требуется определить, действительно ли на основе результатов таких исследований можно предсказать токсичность лекарств, сравнимую с той, которая наблюдается во время приема препаратов при развитии заболевания *in vivo*. Кроме того, различные методы культивирования ПСК могут изменить эпигенетический статус клеток (Young et al., 2001). Другой критической проблемой клеточной терапии на основе ПСК является иммунное отторжение реципиентами аллогенных клеток, полученных из ПСК человека, что заставляет использовать иммуносупрессоры для подавления реакции, вызванной трансплантацией (Fu, 2014). Еще одним препятствием применения ПСК в регенеративной медицине является риск онкогенеза, по-

скольку трансплантируемые клетки могут содержать фракцию недифференцированных клеток, которые способны индуцировать образование тератом (Schuldiner et al., 2001; Fujikawa et al., 2005; Cao et al., 2006).

В связи с этим, одной из основных целей исследований стволовых клеток является разработка и стандартизация простых и надежных методов дифференцировки, чтобы свести к минимуму существенную неоднородность дифференцируемых культур и научиться получать стабильные клеточные линии. Большинство существующих протоколов были разработаны на основе наших знаний о релевантных для различных этапов развития дифференцировки сигналах, выявленных в моделях животных. Тем не менее, чтобы полностью понять сложность сигналов и генетических программ, которые контролируют дифференцировку каждого отдельного типа клеток, необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, можно заключить, что на пути к безопасному и эффективному использованию ПСК необходимо всестороннее изучить биологию стволовых клеток, в том числе особенности работы внутриклеточных систем регуляции поддержания клеточной плюрипотентности и дифференцировки. Одной из таких систем является убиквитин-протеасомная система (УПС) деградации белков, которая осуществляет большую часть регулируемого протеолиза в клетке, тем самым играя роль важного регулятора многих клеточных процессов. В последние годы появляется все больше свидетельств того, что функционирование УПС имеет большое значение в регуляции плюрипотентности и дифференцировки ПСК (Buckley et al., 2012; Okita, Nakayama, 2012; Vilchez et al., 2012a; Селенина и др., 2017; Choi, Baek, 2018; Noormohammadi et al., 2018).

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА (УПС)

УПС действует как основная протеолитическая система клетки, которая, деградируя регуляторные белки (например, циклины, вовлеченные в контроль клеточного цикла, и транскрипционные факторы) и аномальные белки (неправильно свернутые, старые или поврежденные), играет важную роль в различных клеточных процессах, включая контроль качества белков (протеостаз), клеточный цикл, презентацию антигена при иммунном ответе, апоптоз и клеточный сигналинг (Konstantinova et al., 2008). Функции УПС можно разделить на две части — убиквитинирование (деубиквитинирование) и деградацию. Основными функциональными элементами УПС являются: белок убиквитин, ферменты E1, E2 и E3, а также протеасомы.

В настоящее время термин “протеасома” охватывает все семейство отдельных комплексов, которые имеют общее протеолитическое ядро (коровую часть 20S) и различаются присоединенными к ним

активаторами протеасом (Budenholzer et al., 2017). Каждый из таких протеасомных комплексов играет определенную роль в контроле функций клетки, а регуляторы протеасом, как особые белки, взаимодействующие с протеасомами, могут служить для более тонкой подстройки функции протеасом в соответствии с потребностями клетки (Mogozov, Kargov, 2018). Например, в последние годы активно разрабатываются ингибиторы протеасом, которые инактивируют их каталитические активные центры и эффективно блокируют деградацию белков в клетке, что приводит к подавлению пролиферации и апоптозу (Meiners et al., 2008). Соответственно, активность протеасомы является ключевой детерминантой почти всех клеточных процессов, от пролиферации и выживания клеток до дифференцировки и иммунных ответов, что делает протеасомы эффективной терапевтической мишенью для лечения рака и других заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, легочные и аутоиммунные (Drews, Taegtmeyer, 2014; Meiners et al., 2014; Ciechanover, Kwon, 2015; Zhang et al., 2020; Yadav et al., 2022).

Протеолитическим “ядром” УПС является 26S-протеасома, которая лежит в основе убиквитин-зависимой протеасомной деградации белка в клетке (Budenholzer et al., 2017). Интактная 26S-протеасома — это АТФ-зависимый протеолитический комплекс с молекулярной массой около 2.5 МДа, состоящий из коровой 20S-протеасомы и одного или двух 19S-регуляторных комплексов (Dahlmann, 2005).

20S-частицы эволюционно высококонсервативны и в клетке широко представлены в цитоплазме и ядре в свободной от регуляторов форме (Fabre et al., 2015). Протеасома 20S состоит из 28 субъединиц α - и β -типа, которые образуют стопку из четырех гептамерных колец (α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7) (Groll et al., 1997). Два внешних кольца состоят из семи гомологичных α -субъединиц, а два внутренних — из семи подобных консервативных β -субъединиц (рис. 1). α -Субъединицы протеасомы имеют высококонсервативные N-концевые удлинения, отсутствующие в β -субъединицах, которые образуют ворота, контролирующие прохождение субстрата через центральный канал α -кольца (Groll et al., 2000). В отсутствие активаторов ворота чаще всего находятся в закрытой конформации (Osmulski et al., 2009). Центральные кольца 20S-протеасомы из субъединиц β -типа формируют протеолитическую полость, где осуществляется гидролиз белка. Известно, что пептидные связи субстрата гидролизуются N-терминальным остатком треонина (Thr1), который присутствует в β -субъединицах (Seemuller et al., 1995). Интересно, что в гомологах 20S-протеасом архей все β -субъединицы являются идентичными, а у высших эукариот деградация субстрата является более специфичной, и только три из семи субъединиц β -типа — β 1 (*PSMB6*), β 2 (*PSMB7*) и β 5 (*PSMB5*) — протеолитически активны по типу каспазы, трипсина и химотрип-

сина соответственно (Groll et al., 2005). Эти, так называемые “стандартные” или “конститутивные” каталитические субъединицы, образуют стандартную 20S-протеасому, которая конститутивно присутствует во всех клетках.

В клетках млекопитающих было описано несколько вариантов коровых частиц протеасом, в которых активные субъединицы “конститутивной” 20S-протеасомы были замещены индуцибельными или тканеспецифическими паралогами (рис. 1). Иммунопротеасома является наиболее изученным из этих вариантов; в данной конфигурации происходит замена трех конститутивных β -субъединиц на индуцибельные β 1i, β 2i и β 5i (Bai et al., 2014). Существуют также промежуточные типы протеасом (рис. 1), что, как предполагают, ведет к увеличению пептидного разнообразия для презентации антигена (Kammerl et al., 2016). Другой альтернативной изоформой коровой частицы является тимус-специфическая протеасома или тимопропротеасома (рис. 1), в которой субъединица β 5t обладает сниженной химотрипсин-подобной активностью по сравнению с β 5 и β 5i. Тимопропротеасома играет важную роль в позитивном отборе иммунных CD8⁺-Т-клеток (Murata et al., 2008). Известен еще один вариант коровой протеасомы — сперматопротеасома — содержащая альтернативную α -субъединицу α 4s, которая синтезируется исключительно в мужских половых клетках после их дифференцировки в сперматоциты (Qian et al., 2013; Uechi et al., 2014). Показано, что сперматопротеасомы в комплексе с регулятором PA200, участвуют в сперматогенезе и осуществляют убиквитин-независимую деградацию ацетилованных гистонов (Qian et al., 2013).

Для распознавания убиквитинированных белков 26S-протеасомой и подготовки их к деградации (выбор и связывание субстрата, отщепление убиквитина, разворачивание и перенос субстрата в протеолитическую камеру 20S-частицы) существуют регуляторные комплексы. Комплекс 19S (PA700) имеет молекулярную массу около 1 МДа и состоит из АТФазных и не-АТФазных субъединиц (рис. 1). Согласно биохимическим и структурным исследованиям, 19S-частица состоит из двух субкомплексов: “основания” и “крышки” (Glickman et al., 1998). Было показано, что основание 19S-частицы имеет форму гексамерного кольца из шести АТФаз (*regulatory particle triple A proteins Rpt1–6*), двух адаптерных белков (*Rpn1, Rpn2*) и двух рецепторов убиквитина (*Rpn10, Rpn13*) и контактирует с внешним α -кольцом 20S-частицы. Предполагается, что эти АТФазы AAA-семейства участвуют в линеаризации и транслокации белковых субстратов в протеолитическую полость 20S-частицы (Zhang et al., 2007). К настоящему времени показано, что субъединицы, расположенные в верхней части кольца, такие как *Rpt3* и *Rpt4*, вносят больший вклад в связывание и транслокацию субстратов по сравнению с субъединицами, расположенными ниже в кольце, такими как *Rpt1* и *Rpt2* (Beckwith et al., 2013). Крышка регуляторно-

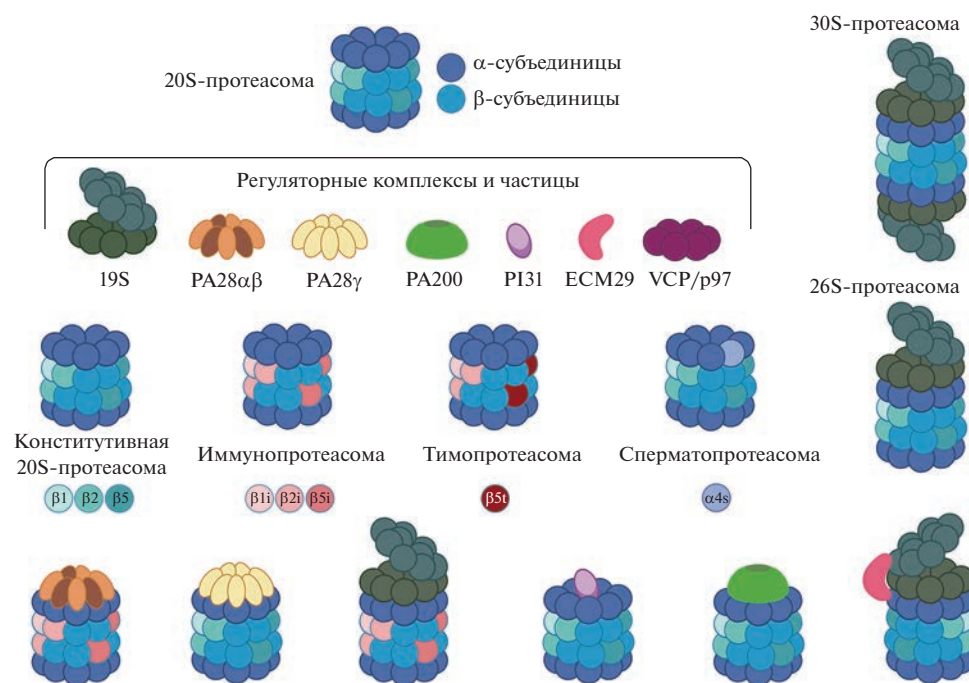


Рис. 1. Схематическое изображение организации протеасом. По составу каталитических субъединиц 20S-протеасомы делятся на конститутивные ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$), иммунопротеасомы ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$), тимопротеасомы ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5t$). Сперматопротеасомы имеют уникальную субъединицу $\alpha 4s$. Протеасомы 20S находятся в клетке без регулятора (“свободные”) или могут связывать один или два активатора 19S, формируя 26S- или 30S-протеасомы, которые осуществляют убиквитин-зависимый протеолиз в клетке. Протеасомы 20S могут связываться также с регуляторами PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ и PA200 и, вероятно, с PI31. Гибридные формы протеасом несут два разных регулятора.

Рис. 1 и 2 выполнены с помощью сервиса BioRender (<https://biorender.com>).

го комплекса 19S является структурой из восьми не-АТФазных субъединиц Rpn (Regulatory particle non-ATPases) – Rpn3, Rpn5–9 и Rpn11–12 (Finley et al., 1998; Glickman et al., 1998; Smalle, Vierstra, 2004). Субъединицы Rpn10 и Rpn13 осуществляют захват полиубиквитинированных белков, а субъединица Rpn11 является Zn^{2+} -зависимым деубиквитинирующим ферментом (Verma et al., 2002; Yao, Cohen, 2002). Для большинства субъединиц крышки функции не установлены, однако известно, что она способна распознавать полиубиквитиновые цепи, так как протеасома осуществляет протеолиз убиквитинированных белков только в присутствии этой крышки (Glickman et al., 1998).

Регуляторный комплекс PA28 (11S) обнаружен только у высших эукариот и имеет структуру гептамерного кольца, собранную из гомологичных субъединиц двух типов PA28 α и PA28 β и отдельного, но родственного белка, называемого PA28 γ , который также известен как антиген Ki (Fort et al., 2015). Подобно иммунным субъединицам 20S-протеасом, синтез α - и β -субъединиц PA28-активатора стимулируется IFN- γ ; известно также, что иммунопротеасомы часто ассоциированы с активатором PA28 $\alpha\beta$ (Fabre et al., 2015). Согласно существующим данным, связывание 20S-протеасомы с PA28 $\alpha\beta$ вызывает резкое увеличение образования небольших олигопеп-

тидов, подходящих для презентации главного комплекса гистосовместимости MHC I (Cascio et al., 2001; Saric et al., 2002). 20S-протеасомы в комплексе PA28 $\alpha\beta$ осуществляют также деградацию окисленных белков (Pickering, Davies, 2012).

С 20S-протеасомами могут связываться и другие регуляторные комплексы и белки, причем 20S-протеасомы в такой конфигурации опосредуют убиквитин-независимую деградацию субстрата (Stadtmueller, Hill, 2011; Jiang et al., 2018). К таким регуляторам 20S-протеасомы относят активатор PA200, играющий роль в репарации ДНК и поддержании нормального сперматогенеза в семенниках, ингибитор протеасомы PI31 и взаимодействующие с протеасомой белки ECM29 или VCP/p97 (рис. 1). С каждым из этих регуляторов потенциально может связываться 20S-протеасома, образуя так называемые гибридные протеасомные комплексы. Теоретически комбинация всех возможных взаимодействий ядра 20S с различными активаторами и регуляторами дает 56 возможных протеасомных комплексов (Wang et al., 2020). Несмотря на то, что пока еще нет систематических доказательств существования и функциональной значимости всех этих комплексов, можно предполагать, что каждый из них обладает способностью деградировать специфические белки в раз-

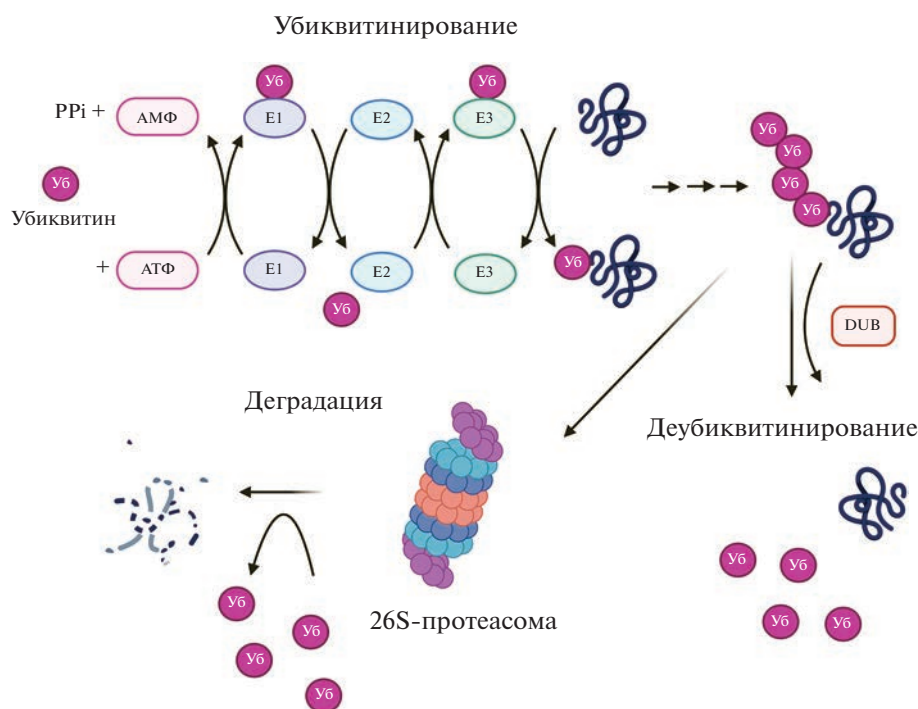


Рис. 2. Схематичное изображение убиквитин-зависимой деградации белкового субстрата протеасомой. Убиквитинирование белкового субстрата осуществляется в результате АТФ-зависимого ковалентного присоединения убиквитина (Уб) каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитинлигаз (E3). Повторяющиеся действия этих трех ферментов вызывают полиубикитинирование субстрата с последующей его деградацией протеасомой и высвобождением свободных молекул убиквитина. Полиубикитинированные субстраты также могут быть деубикитинированы ферментами, называемыми деубикитиназами (DUB), что приводит к высвобождению свободных молекул убиквитина и субстрата.

личных субклеточных сайтах или модулировать функцию протеасом определенным образом.

Известно, что селективное присоединение убиквитина — эволюционно консервативного белка из 76 аминокислотных остатков — зачастую является начальным сигналом для деградации белка (Nandi et al., 2006). Убиквитинирование — это присоединение одной или нескольких молекул убиквитина к белкам-субстратам, обеспечивающее селективную деградацию полиубикитинированных субстратов, а также регулирующее локализацию, функциональную активность и белок-белковые взаимодействия. Ковалентное присоединение убиквитина к целевому белку осуществляется с образованием изопептидной связи между глицином на карбоксильном конце убиквитина и внутренним лизином на субстрате. Дополнительные фрагменты убиквитина последовательно добавляются друг к другу с образованием полиубикитиновой цепи, которая функционирует как маркер распознавания для протеасомы (рис. 2).

Убиквитинирование белка осуществляется в три последовательных этапа с участием трех ферментов: E1, E2 и E3 (Hershko, Ciechanover, 1992). Каскад убиквитинирования начинается с АТФ-зависимой активации убиквитина убиквитин-активирующим ферментом E1. Убиквитин присоединяется к внут-

реннему остатку Cys фермента E1 через промежуточный тиоловый эфир, генерирующий E1-S-убиквитин. Затем убиквитин переносится на убиквитин-конъюгирующий фермент E2. На третьем этапе добавление убиквитина к белковому субстрату катализируется убиквитинлигазой E3. Важно отметить, что цепочки убиквитина могут быть удалены с белка-субстрата под действием группы белков, называемых деубикитинирующими ферментами или деубикитиназами (DUB), представляющих из себя металло- и цистеиновые протеазы (He et al., 2016).

Высокая специфичность и селективность УПС заключается в разнообразии различных убиквитинлигаз E3, которые могут распознавать определенный субстрат (Hershko, Ciechanover, 1998). Одним из наиболее важных паттернов распознавания является “дестабилизирующая” N-концевая аминокислота, такая как аргинин и лизин. Эти уникальные N-концевые остатки могут определять период полужизни внутриклеточного белка; это явление получило название “правило N-конца”. Помимо субстратов, активность самой УПС могут модулировать множество факторов, таких как гормоны щитовидной железы, глюкокортикоидные стероиды, цитокины и белки, экспрессируемые в злокачественных клетках, такие как, например, фактор, индуцирующий протеолиз (PIF).

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

ЭСК способны давать начало всем клеточным типам, представленным в организме, что подразумевает существование жесткого контроля самообновления и плюрипотентности, включающего в себя транскрипционные факторы, сигнальные каскады, микроРНК, взаимодействующие с системой регуляторных белков и белков, вовлеченных в формирование структуры хроматина, свойственной плюрипотентным клеткам (Meshorer, Misteli, 2006). Недавние исследования показали, что УПС играет важную и сложную роль в контроле плюрипотентности за счет динамической регуляции количества белков, включая факторы транскрипции стволовых клеток. Как было отмечено выше, специфичность работы УПС обеспечивается большим количеством разнообразных убиквитинлигаз.

В настоящее время ежегодно появляются исследования, сообщающие об идентификации все новых Е3-убиквитинлигаз, которые работают посредством взаимодействия с факторами плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 и др., а также с другими участниками ключевых сигнальных путей. Так, стабильность и транскрипционная активность Oct4 регулируются Е3-убиквитинлигазой Itch (Liao et al., 2013). Интересно, что хотя Itch-опосредованное убиквитинирование способствует деградации Oct4 протеасомами, тем не менее, эта модификация на молекулярном уровне увеличивает аффинность связывания Oct4 с генами-мишенями и, таким образом, повышает его транскрипционную активность. Функционирование Itch необходимо для поддержания и индукции плюрипотентности, поскольку истощение этой убиквитинлигазы приводит к дифференцировке ЭСК мыши и снижает эффективность образования и ПСК (Liao et al., 2013).

Другая Е3-лигаза, Wwp2, может взаимодействовать как с Oct4, так и с Sox2, что приводит к протеолизу этих факторов и, соответственно, к дифференцировке ЭСК человека и мыши (Fang et al., 2014; Xu et al., 2009). Было отмечено, однако, что ЭСК, полученные от Wwp2-дефицитных мышей, имели типичную для ЭСК морфологию и экспрессировали нормальные уровни факторов плюрипотентности (Oct4, Sox2 и Klf4), поэтому Wwp2-опосредованное убиквитинирование Oct4 кажется необязательным для поддержания плюрипотентности, но критичным для детерминации клеточной судьбы и перепрограммирования (Li et al., 2018). Убиквитинлигаза FBXW7 также контролирует плюрипотентность ЭСК, регулируя стабильность белка с-Мус, и действует как ключевой регулятор дифференцировки ЭСК, поскольку подавление экспрессии FBXW7 ингибирует дифференцировку этих клеток и усиливает клеточное перепрограммирование (Buckley et al., 2012; Okita et al., 2012). Кроме того, показано, что Е3-убиквитинлигаза FBXW8 способствует полиубиквитинированию Nanog и его последующей деградации

протеасомами, что также приводит к дифференцировке ЭСК мыши (Kim et al., 2014).

Все основные пост-трансляционные модификации белков, включая убиквитинирование, являются обратимыми благодаря работе определенных ферментов. Очевидно, что для поддержания “стволовости” ПСК или же, наоборот, для направления в дифференцировку процессы убиквитинирования и деубиквитинирования ключевых факторов плюрипотентности и других участников сигнальных каскадов должны происходить своевременно и хорошо скоординированным образом. В масштабном исследовании с помощью скрининга интерферирующих РНК, нацеленных на компоненты УПС, удалось идентифицировать значительное количество убиквитинирующих и деубиквитинирующих ферментов, необходимых для регуляции плюрипотентности и дифференцировки ЭСК мыши, что свидетельствует о важности обоих способов регуляции (Buckley et al., 2012). Недавние исследования показали, что ключевой фактор с-Мус может стабилизироваться за счет деубиквитинирования с помощью DUB-ферментов Usp28, Usp36 и Usp37 (Diefenbacher et al., 2015; Pan et al., 2015; Sun et al., 2015). Субъединица “крышки” 19S-регулятора протеасомы Rpn11 также обладает деубиквитинирующей активностью, а при подавлении экспрессии Rpn11 в ЭСК мыши наблюдали значительное снижение белка Oct4 в сочетании с морфологическими изменениями клеток (Buckley et al., 2012). Идентифицирована еще одна DUB, необходимая для поддержания плюрипотентного состояния ЭСК, Usp21, истощение которой в ЭСК мыши приводит к деградации фактора плюрипотентности Nanog и к дифференцировке клеток (Liu et al., 2016).

Белок Dppa3 (также известный как Stella или PGC7) играет решающую роль в раннем эмбриональном развитии, модулируя программу транскрипции и регулируя эпигенетическую модификацию (Nakamura et al., 2007, 2012; Liu et al., 2012;). Помимо роли в эмбриогенезе, Dppa3 неодинаково экспрессируется в ЭСК: наивные ЭСК экспрессируют Dppa3 на более высоком уровне, чем праймированные клетки (Hayashi et al., 2008; Sang et al., 2019), что предполагает роль Dppa3 в поддержании именно наивного состояния плюрипотентности. Состояния плюрипотентности подробно описаны в недавней обзорной работе Гордеева с коллегами (2021). Согласно последним данным, важным фактором в поддержании плюрипотентности является взаимодействие белка Dppa3 с компонентами УПС (Zhao et al., 2022). Установлено, что белок Dppa3 может служить субстратом для протеасомной деградации и конкуррировать за связывание протеасомой с другими белками, что приводит к накоплению в клетке последних. Так, увеличение экспрессии Dppa3 в ЭСК сопровождалось накоплением Е3-убиквитин-лигазы Uhrf1 и фактора плюрипотентности Nanog (Zhao et al., 2022).

Известно, что ПСК демонстрируют уникальный эпигенетический ландшафт, который в значительной степени выражен модификациями гистонов (Bernstein et al., 2006; Mattout, Meshorer, 2010). По сравнению с метилированием и ацетилизацией гистонов, информация о корреляции между убиквитинированием и плюрипотентностью ограничена, однако существуют свидетельства о вовлеченности компонентов УПС в регуляцию плюрипотентности на эпигенетическом уровне. Например, моноубиквитинирование гистона H2A в положении K119 коррелирует с репрессией транскрипции (Nakagawa et al., 2008; Zhou et al., 2008). Этот сигнал может быть опосредован E3-убиквитинлигазой Ring1A/1B и является критическим для поддержания недифференцированного состояния ЭСК, поскольку двойная делеция Ring1A и Ring1B приводит к дифференцировке ЭСК (de Napoles et al., 2004; Endoh et al., 2008; van der Stoep et al., 2008; Weitzman et al., 2010). Другая E3-убиквитинлигаза Dzip3 также может моноубиквитинировать гистон H2A в положении K119 и специфически действует на области промотора генов в ЭСК, связанных с дифференцировкой, посредством регуляции организации 3D-хроматина (Inoue et al., 2015).

В исследованиях транскриптомных профилей ЭСК человека и мыши гены, кодирующие компоненты УПС были выявлены среди высоко экспрессируемых, что также подтверждает важную роль УПС в индукции и поддержании плюрипотентности (Sato et al., 2003; Babaie et al., 2007; Zhou et al., 2009). Изучение особенностей протеома ЭСК человека позволило идентифицировать около 60 наиболее активно синтезируемых белков, большинство из которых являются шаперонами и компонентами УПС (Baharvand et al., 2006), что свидетельствует в пользу большого значения протеостаза в поддержании идентичности стволовых клеток. Для ЭСК человека характерна повышенная протеасомная активность (Buckley et al., 2012; Vilchez et al., 2012a), что указывает на тесную связь между протеостазом и идентичностью ЭСК. В ЭСК человека активность протеасом индуцируется высокими уровнями Rpn6 (*PSMD11*) — каркасной субъединицы 19S-регулятора, которая способствует сборке активных протеасом. Повышенную экспрессию Rpn6 (*PSMD11*), в свою очередь, строго регулирует фактор транскрипции FOXO4 (Vilchez et al., 2012a, 2012b, 2013).

Таким образом, в настоящее время накоплено немало данных, подтверждающих ключевую роль УПС в регуляции плюрипотентности. Однако нет сомнений в необходимости проведения исследований, уточняющих механизмы индукции клеточной плюрипотентности, а также развития понимания как именно УПС регулирует различные состояния плюрипотентности, такие как наивное и праймированное.

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭСК

Дифференцировка ЭСК управляется самоусиливающимися регуляторными петлями, работающими параллельно как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне. Менее известно о пост-трансляционных механизмах регуляции дифференцировки, включая возможное участие в них УПС. На уровне посттрансляционной модификаций белков УПС управляет несколькими процессами, среди которых следует выделить полиубиквитинирование белков, которое контролирует пул сигнальных белков, и факторов транскрипции в ЭСК. Некоторые из этих факторов транскрипции (Oct4, Nanog и cMyc) известны как регуляторы плюрипотентности, связанные с поддержанием плюрипотентности и баланса между самообновлением и дифференцировкой. Как было отмечено ранее, высокая скорость и субстратная специфичность — характерные черты протеолиза, опосредованного УПС, и, следовательно, эта система идеально подходит для ремоделирования протеома ЭСК во время перехода от плюрипотентного состояния к дифференцированному. В настоящее время появляется все больше свидетельств важной роли компонентов УПС в этом процессе (Buckley et al., 2012; Suresh et al., 2016; Werner et al., 2017; Wang et al., 2019).

С одной стороны, УПС осуществляет регуляцию различных сигнальных путей, включая регулирующие плюрипотентность и дифференцировку ЭСК: LIF/JAK/Stat3, Fgf/MAPK, TGFβ/Activin/Nodal, Wnt/β-catenin, Bmp и Notch (Miyazono, 2000; Zhang, Laiho, 2003; Ng, Surani, 2011; Hatakeyama, 2012; Voutsadakis, 2012; Gao et al., 2014; Dutta et al., 2021). Так, например, путь JAK—STAT, играющий ключевую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК мыши, модулируется несколькими посттрансляционными модификациями, включая фосфорилирование, ацетилизацию и убиквитинирование. Было установлено, что E3-лигаза Trim8 посредством Hsp90β взаимодействует с фактором STAT3 и селективно подавляет транскрипцию Nanog, поддерживая плюрипотентное состояние ЭСК мыши (Okumura et al., 2010). Для E3-лигазы c-Cbl показана регуляция остеобластной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток посредством контроля протеасомной деградации и активности фактора STAT5 (Dieudonne et al., 2013).

С другой стороны, УПС играет роль и в поддержании физиологических уровней основных факторов плюрипотентности в ЭСК (Choi, Baek, 2018). В недавней работе показано, что E3-убиквитинлигаза Stub1 функционирует как ключевой протеостатический регулятор белков Sox2, Oct4 и Nanog в ЭСК мыши (Al Mamun et al., 2022). Этот фермент опосредует протеасомную деградацию факторов плюрипотентности, катализируя их полиубиквитинирование. Дефицит Stub1 усиливал репрограммирование соматических клеток и задерживал дифференцировку

ку ЭСК, тогда как его повышенная экспрессия запускала дифференцировку ЭСК мыши. Кроме того, было продемонстрировано, что E3-убиквитинлигазы β -TrCP1 и β -TrCP2 способны распознавать и убиквитинировать транскрипционный фактор Tfc2l1 в ЭСК мыши, который является центральным игроком в поддержании наивной плюрипотентности (Zhang et al., 2021). Сверхэкспрессия генов β -TrCP приводила к снижению уровня белка Tfc2l1 и инициировала дифференцировку ЭСК.

Известно, что ЭСК поддерживают высокую геномную пластичность, которая важна для их способности вставать на различные пути дифференцировки, и посттранскрипционные модификации гистонов играют ключевую роль в поддержании этой пластичности. Например, показано, что E3-лигаза Rnf2 и DUB-фермент Usp44 регулируют дифференцировку ЭСК путем модуляции моноубиквитилирования гистона H2B (Fuchs et al., 2012). Активность E3-лигазы Rnf12/RLIM также регулирует дифференцировку ЭСК мыши в нейроны (Bustos et al., 2018). E3-лигаза Lin41 взаимодействует с белком p53, контролируя количество последнего посредством его убиквитинирования и последующей деградации в протеасоме; также Lin41 противодействует p53-зависимым проапоптотическим и продифференцировочным ответам (Nguyen et al., 2017). Поскольку Lin41-дефицитные мыши обнаруживают дефекты закрытия нервной трубки, можно предполагать, что Lin41 является критическим для регуляции функций p53 в спецификации судьбы клеток и выживаемости во время раннего развития мозга (Nguyen et al., 2017).

Кроме того, результаты исследований эмбриогенеза *Caenorhabditis elegans* демонстрируют участие E3-лигаз в управлении процессом дифференцировки и указывают на то, что убиквитин-опосредованная деградация белка приводит к выбору в сторону дифференцировки (Du et al., 2015). Так, для двух E3-лигаз были идентифицированы три субстрат-связывающих белка: LIN-23/ β -TrCP, FBXB-3 и ZYG-11/ZYG-11B, которые управляют прогрессией дифференцировки во время развития эндомезодермы. Предполагается, что эти E3-лигазы функционируют через многофункциональный белок OMA-1, способствуя деградации транскрипционного фактора SKN-1 (ортолога белков Nrf/CNC млекопитающих).

В других исследованиях на модели дифференцировки миобластов, первичных сателлитных клеток мыши и человека *in vitro* было показано, что активность E3-лигазы семейства Cullin необходима на каждом этапе дифференцировки мышечных клеток (Blondelle et al., 2017). Интересно, что E3-лигаза Itch является решающим регуляторным фактором в дифференцировке Т-лимфоцитов (Xiao et al., 2014). Кроме того, было продемонстрировано, что Itch положительно регулирует такую дифференцировку путем стимуляции конъюгации убиквитина с транскрипционным фактором Foxo1 и последующей деграда-

ции Foxo1. Сверхэкспрессия E3-лигазы Nrdp1 в В-клетках мыши приводила к значительному снижению уровней рецепторов EPO, IL-3 и RAR α и ослабляла дифференцировку (Jing et al., 2008). Лигаза Trim23 играет критическую роль в дифференцировке адипоцитов, стабилизируя ядерный рецептор PPAR γ (Watanabe et al., 2015). Ddb1, компонент убиквитин-лигазы CUL4-DDB1, высоко экспрессируется в мультипотентных гематopoэтических предшественниках, и его делеция приводит к отмене гемопоэза (Gao et al., 2015). Снижение экспрессии Ddb1 активирует путь Trp53 и приводит к значительному влиянию на прогрессирование клеточного цикла и быстрый апоптоз гемопоэтических стволовых клеток. Наоборот, истощение Ddb1 в ЭСК приводит к инициации дифференцировки, но не к апоптозу.

Ингибирование активности протеасом в миобластах мыши индуцировало остеобластную дифференцировку путем модификации активности Runx2, что свидетельствует о функции протеасом в контроле деградации факторов транскрипции, связанных с остеогенной дифференцировкой (Uyama et al., 2012).

С другой стороны, клетки, проходящие через дифференцировку, сталкиваются с активацией процессов окисления, что приводит к увеличению пула окисленных белков. Так, например, было обнаружено, что ЭСК содержат относительно высокий уровень карбонилированных белков и конечных продуктов гликирования, но после дифференцировки *in vitro* такое повреждение эффективно устраняется (Hernebring et al., 2006). Важно, что данное явление наблюдали и при сравнении содержания окисленных белков в ВКМ бластоцист и клетках, дифференцированных в трофобласту, что свидетельствует о том, что устранение повреждения белков происходит также и во время нормального эмбрионального развития. Примечательно, что удаление окислительно модифицированных белков во время дифференцировки ЭСК мыши было связано с повышенной экспрессией протеасомного активатора PA28 и иммуносубъединицы протеасомы (Hernebring et al., 2013). Так, нокдаун PA28 препятствовал удалению поврежденных белков, подтверждая, что регулятор протеасомы PA28 играет важную роль в элиминации поврежденных белков при переходе от самообновления к дифференцировке клеток (Hernebring et al., 2013).

Интересно, что повышение уровня иммунопротеасом было также обнаружено при дифференцировке скелетных мышц, а нокдаун иммуносубъединицы протеасом LMP2/ β 1i (*PSMB9*) или использование специфических для иммунопротеасомы ингибиторов предотвращало дифференцировку клеток скелетных мышц (Cui et al., 2014). Кроме того, подавление иммунопротеасомной активности увеличивало пул окисленных белков и проапоптотических белков. Эти результаты указывают на усиление окислительной среды во время дифференцировки,

равно как и на важную роль иммунопротеасом в удалении окисленных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПСК обладают уникальными транскриптомными, эпигеномными и протеомными характеристиками, которые обеспечиваются работой высокоточной регуляторной сети. Кроме того, эти клетки характеризуются усиленной активностью защитных клеточных систем, включая УПС. УПС регулирует протеостаз клетки, и, тем самым, играет одну из определяющих ролей в поддержании плюрипотентности и в дифференцировке ПСК посредством координации уровней транскрипционных факторов плюрипотентности и участников регуляторных сетей с помощью убиквитинирования ферментами E1, E2 и E3 и деубиквитинирования DUB-ферментами, а также за счет модуляции экспрессии, активности и субстратной специфичности протеасомных комплексов. Совместная работа ферментов E1, E2 и E3 с одной стороны, и DUB, с другой, обеспечивает определенный баланс между протеолизом и стабилизацией факторов плюрипотентности и других ключевых факторов и, тем самым, определяет судьбу ПСК — поддержание плюрипотентного состояния или выход из него в процесс дифференцировки.

Известно, что ЭСК намного более чувствительны к манипуляциям с сетью протеостаза (например, к ингибированию протеасом) чем дифференцированные клетки (Vilchez et al., 2012a). Это можно объяснить, в частности, накоплением поврежденных белков вследствие инактивации протеасом и, следовательно, запуском гибели ЭСК. Кроме того, самоподдержание ЭСК также требует высокой строгости и точности протеостаза, в то время как его дисфункция может запускать проапоптотические сигналы до того, как начнут накапливаться поврежденные белки.

С каждым годом благодаря появлению новых высокотехнологичных подходов и высокопроизводительных скрининговых исследований растет понимание роли УПС в поддержании плюрипотентности ПСК и в их дифференцировке, однако, остается все еще много нерешенных вопросов. Как, например, убиквитинирование и деубиквитинирование динамически регулирует различные состояния плюрипотентности, такие как наивное, формативное и праймированное (Гордеев и др., 2021). Какие механизмы обеспечивают модуляцию работы различных форм протеасомных комплексов в различных состояниях плюрипотентности и в разных направлениях дифференцировки? Дальнейшее изучение протеостаза и его регуляции поможет ответить на эти и другие вопросы, достичь лучшего понимания биологии ПСК, а также привести к разработке новых подходов к модуляции клеточной спецификации и дифференцировки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22-14-00390).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы не проводили эксперименты с участием животных или человека.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

У.И. Поденкова, И.В. Зубарев: написание основной части работы, подбор литературы (внесли равный вклад в подготовку статьи). У.И. Поденкова и А.С. Цимоха: подготовка иллюстраций. А.С. Цимоха: подбор литературы, написание заключения; А.Н. Томилин и А.С. Цимоха: редактирование и правки текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеев М.Н., Бахмет Е.И., Томилин А.Н. 2021. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре. Онтогенез. Т. 52. № 6. С. 429. (Gordeev M., Bakhmet E., Tomilin A. 2021. Pluripotency dynamics during embryogenesis and in cell culture. Russ. J. Dev. Biol. V. 52. № 6. P. 379.)
<https://doi.org/10.1134/S1062360421060059>
- Селенина А.В., Цимоха А.С., Томилин А.Н. 2017. Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток. Acta Naturae. Т. 9. № 3. С. 42. (Selenina A.V., Tsimokha A.S., Tomilin A.N. 2017. Proteasomes in protein homeostasis of pluripotent stem cells. Acta Naturae. V. 9. № 3. P. 42.)
- Abu-Dawud R., Graffmann N., Ferber S., Wruck W., Adjaye J. 2018. Pluripotent stem cells: induction and self-renewal. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. V. 373. P. 20170213.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0213>
- Al Mamun M.M., Khan M.R., Zhu Y., Zhang Y., Zhou S., Xu R., Bukhari I., Thorne R.F., Li J., Zhang X.D. 2022. Stub1 maintains proteostasis of master transcription factors in embryonic stem cells. Cell Rep. V. 39. P. 110919.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110919>
- Alekseenko Z., Dias J.M., Adler A.F., Kozhevnikova M., van Lunteren J.A., Nolbrant S., Jeggari A., Vasylovskaya S., Yoshitake T., Kehr J. 2022. Robust derivation of transplantable dopamine neurons from human pluripotent stem cells by timed retinoic acid delivery. Nature Commun. V.13. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30777-8>
- Babaie Y., Herwig R., Greber B., Brink T.C., Wruck W., Groth D., Lehrach H., Burdon T., Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. Stem Cells. V. 25. P. 500.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0426>
- Baharvand H., Hajheidari M., Ashtiani S.K., Salekdeh G.H. 2006. Proteomic signature of human embryonic stem cells.

- Proteomics. V. 6. P. 3544.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200500844>
- Bai M., Zhao X., Sahara K., Ohte Y., Hirano Y., Kaneko T., Yashiroda H., Murata S. 2014. Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules*. V. 4. P. 662.
<https://doi.org/10.3390/biom4030662>
- Beckwith R., Estrin E., Worden E.J., Martin A. 2013. Reconstitution of the 26S proteasome reveals functional asymmetries in its AAA+ unfoldase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 20. P. 1164.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2659>
- Behbahan I.S., Duan Y., Lam A., Khoobyari S., Ma X., Ahuja T.P., Zern M.A. 2011. New approaches in the differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells toward hepatocytes. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 7. P. 748.
<https://doi.org/10.1007/s12015-010-9216-4>
- Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. V. 125. P. 315.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Biancotti J.C., Narwani K., Buehler N., Mandefro B., Golan-Lev T., Yanuka O., Clark A., Hill D., Benvenisty N., Lavon N. 2010. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. *Stem Cells*. V. 28. P. 1530.
<https://doi.org/10.1002/stem.483>
- Blondelle J., Shapiro P., Domenighetti A.A., Lange S. 2017. Cul-1 E3 ligase activity is required for myoblast differentiation. *J. Mol. Biol.* V. 429. P. 1045.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.012>
- Buckley S.M., Aranda-Orgilles B., Strikoudis A., Apostolou E., Loizou E., Moran-Crusio K., Farnsworth C.L., Koller A.A., Dasgupta R., Silva J.C., Stadtfeld M., Hochedlinger K., Chen E.I., Aifantis I. 2012. Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin-proteasome system. *Cell Stem Cell*. V. 11. P. 783.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.011>
- Budenholzer L., Cheng C.L., Li Y., Hochstrasser M. 2017. Proteasome Structure and Assembly. *J. Mol. Biol.* V. 429. P. 3500.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>
- Bustos F., Segarra-Fas A., Chaugule V.K., Brandenburg L., Branigan E., Toth R., Macartney T., Knebel A., Hay R.T., Walden H. 2018. RNF12 X-linked intellectual disability mutations disrupt E3 ligase activity and neural differentiation. *Cell Rep.* V. 23. P. 1599.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.022>
- Cao F., Lin S., Xie X., Ray P., Patel M., Zhang X., Drukker M., Dylla S.J., Connolly A.J., Chen X. 2006. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. V. 113. P. 1005.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.588954>
- Cascio P., Hilton C., Kisselev A.F., Rock K.L., Goldberg A.L. 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* V. 20. P. 2357.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2357>
- Choi J., Baek K.H. 2018. Cellular functions of stem cell factors mediated by the ubiquitin-proteasome system. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 75. P. 1947.
<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2770-7>
- Ciechanover A., Kwon Y.T. 2015. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* V. 47. P. e147.
<https://doi.org/10.1038/emmm.2014.117>
- Cui Z., Hwang S.M., Gomes A.V. 2014. Identification of the immunoproteasome as a novel regulator of skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* V. 34. P. 96.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00622-13>
- Dahlmann B. 2005. Proteasomes. *Essays Biochem.* V. 41. P. 31.
<https://doi.org/10.1042/EB0410031>
- de Napoles M., Mermoud J.E., Wakao R., Tang Y.A., Endoh M., Appanah R., Nesterova T.B., Silva J., Otte A.P., Vidal M. 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell*. V. 7. P. 663.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.005>
- Diefenbacher M.E., Chakraborty A., Blake S.M., Mitter R., Popov N., Eilers M., Behrens A. 2015. Usp28 counteracts Fbw7 in intestinal homeostasis and cancer. *Cancer Res.* V. 75. P. 1181.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1726>
- Dieudonne F.-X., Sévère N., Biosse-Duplan M., Weng J.-J., Su Y., Marie P.J. 2013. Promotion of osteoblast differentiation in mesenchymal cells through Cbl-mediated control of STAT5 activity. *Stem Cells*. V. 31. P. 1340.
<https://doi.org/10.1002/stem.1380>
- Drews O., Taegtmeyer H. 2014. Targeting the ubiquitin-proteasome system in heart disease: the basis for new therapeutic strategies. *Antioxid. Redox. Signal.* V. 21. P. 2322.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5823>
- Du Z., He F., Yu Z., Bowerman B., Bao Z. 2015. E3 ubiquitin ligases promote progression of differentiation during C. elegans embryogenesis. *Dev. Biol.* V. 398. P. 267.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.009>
- Dutta D., Sharma V., Mutsuddi M., Mukherjee A. 2021. Regulation of Notch signaling by E3 ubiquitin ligases. *FEBS J.* V. 289. P. 937.
<https://doi.org/10.1111/febs.15792>
- Endoh M., Endo T.A., Endoh T., Fujimura Y.-I., Ohara O., Toyoda T., Otte A.P., Okano M., Brockdorff N., Vidal M. 2008. Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development*. V. 135. P. 1513.
<https://doi.org/10.1242/dev.014340>
- Fabre B., Lambour T., Garrigues L., Amalric F., Vigneron N., Menneteau T., Stella A., Monsarrat B., Van den Eynde B., Burlet-Schiltz O. 2015. Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case. *Mol. Syst. Biol.* V. 11. P. 771.
<https://doi.org/10.15252/msb.20145497>
- Fang L., Zhang L., Wei W., Jin X., Wang P., Tong Y., Li J., Du J.X., Wong J. 2014. A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation. *Mol. Cell*. V. 55. P. 537.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.018>
- Finley D., Tanaka K., Mann C., Feldmann H., Hochstrasser M., Vierstra R., Johnston S., Hampton R., Haber J., McCusker J., Silver P., Frontali L., Thorsness P., Varshavsky A., Byers B. et al. 1998. Unified nomenclature for subunits of the Saccharomyces cerevisiae proteasome regulatory particle. *Trends Biochem. Sci.* V. 23. P. 244.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01222-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01222-5)

- Fort P., Kajava A.V., Delsuc F., Coux O. 2015. Evolution of proteasome regulators in eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* V. 7. P. 1363.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evv068>
- Fu X. 2014. The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells. *Cell. Mol. Immunol.* V. 11. P. 14.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2013.60>
- Fuchs G., Shema E., Vesterman R., Kotler E., Wolchinsky Z., Wilder S., Golomb L., Pribluda A., Zhang F., Haj-Yahya M., Feldmesser E., Brik A., Yu X., Hanna J., Aberdam D., Domany E., Oren M. 2012. RNF20 and USP44 regulate stem cell differentiation by modulating H2B monoubiquitylation. *Mol. Cell.* V. 46. P. 662.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.023>
- Fujikawa T., Oh S.-H., Pi L., Hatch H.M., Shupe T., Petersen B.E. 2005. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am. J. Pathol.* V. 166. P. 1781.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62488-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62488-1)
- Gao C., Xiao G., Hu J. 2014. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell Biosci.* V. 4. P. 13.
<https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-13>
- Gao J., Buckley S.M., Cimmino L., Guillaumot M., Strikoudis A., Cang Y., Goff S.P., Aifantis I. 2015. The CUL4-DDB1 ubiquitin ligase complex controls adult and embryonic stem cell differentiation and homeostasis. *Elife.* V. 4. P. e07539.
<https://doi.org/10.7554/eLife.07539>
- Glickman M.H., Rubin D.M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V.A., Finley D. 1998. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* V. 94. P. 615.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81603-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81603-7)
- Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin D.M., Huber R., Glickman M.H., Finley D. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* V. 7. P. 1062.
<https://doi.org/10.1038/80992>
- Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T., Huber R. 2005. Molecular machines for protein degradation. *Chem-biochem.* V. 6. P. 222.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200400313>
- Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* V. 386. P. 463.
<https://doi.org/10.1038/386463a0>
- Hatakeyama S. 2012. Ubiquitin-mediated regulation of JAK-STAT signaling in embryonic stem cells. *JAKSTAT.* V. 1. P. 168.
<https://doi.org/10.4161/jkst.21560>
- Hayashi K., de Sousa Lopes S.M.C., Tang F., Surani M.A. 2008. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell.* V. 3. P. 391.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.027>
- He M., Zhou Z., Shah A.A., Zou H., Tao J., Chen Q., Wan Y. 2016. The emerging role of deubiquitinating enzymes in genomic integrity, diseases, and therapeutics. *Cell Biosci.* V. 6. P. 62.
<https://doi.org/10.1186/s13578-016-0127-1>
- Hernebring M., Brolén G., Aguilaniu H., Semb H., Nystrom T. 2006. Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 103. P. 7700.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510944103>
- Hernebring M., Fredriksson A., Liljevald M., Cvijovic M., Norrman K., Wiseman J., Semb H., Nystrom T. 2013. Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28. *Sci. Rep.* V. 3. P. 1381.
<https://doi.org/10.1038/srep01381>
- Hershko A., Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* V. 61. P. 761.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.003553>
- Hershko A., Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* V. 67. P. 425.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Inoue D., Aihara H., Sato T., Mizusaki H., Doiguchi M., Higashi M., Imamura Y., Yoneda M., Miyanishi T., Fujii S. 2015. Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. *Sci. Rep.* V. 5. P. 16567.
<https://doi.org/10.1038/srep16567>
- Jiang T.X., Zhao M., Qiu X.B. 2018. Substrate receptors of proteasomes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* V. 93. P. 1765.
<https://doi.org/10.1111/brv.12419>
- Jing X., Infante J., Nachtman R.G., Jurecic R. 2008. E3 ligase FLRF (Rnf41) regulates differentiation of hematopoietic progenitors by governing steady-state levels of cytokine and retinoic acid receptors. *Exp. Hematol.* V. 36. P. 1110.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.04.001>
- Kammerl I.E., Dann A., Mossina A., Brech D., Lukas C., Vasyka O., Nathan P., Conlon T.M., Wagner D.E., Overkleeft H.S. 2016. Impairment of immunoproteasome function by cigarette smoke and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* V. 193. P. 1230.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201506-1122OC>
- Kim S.-H., Kim M.O., Cho Y.-Y., Yao K., Kim D.J., Jeong C.-H., Yu D.H., Bae K.B., Cho E.J., Jung S.K. 2014. ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal. *Stem Cell Res.* V. 13. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.001>
- Konstantinova I.M., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* V. 267. P. 59.
[https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00602-3](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00602-3)
- Li S., Xiao F., Zhang J., Sun X., Wang H., Zeng Y., Hu J., Tang F., Gu J., Zhao Y., Jin Y., Liao B. 2018. Disruption of OCT4 ubiquitination increases OCT4 protein stability and ASH2L-B-mediated H3K4 methylation promoting pluripotency acquisition. *Stem Cell Reports.* V. 11. P. 973.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.001>
- Liao B., Zhong X., Xu H., Xiao F., Fang Z., Gu J., Chen Y., Zhao Y., Jin Y. 2013. Itch, an E3 ligase of Oct4, is required for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency induction. *J. Cell. Physiol.* V. 228. P. 1443.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24297>
- Liu X., Yao Y., Ding H., Han C., Chen Y., Zhang Y., Wang C., Zhang X., Zhang Y., Zhai Y. 2016. USP21 deubiquitylates Nanog to regulate protein stability and stem cell pluripotency. *Signal Transduct. Target. Ther.* V. 1. P. 16024.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2016.24>

- Liu Y.-J., Nakamura T., Nakano T. 2012. Essential role of DP-PA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis. *Biol. Reprod.* V. 86. P. 40.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095018>
- Liu Y., Xu H.W., Wang L., Li S.Y., Zhao C.J., Hao J., Li Q.Y., Zhao T.T., Wu W., Wang Y. 2018. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium transplants as a potential treatment for wet age-related macular degeneration. *Cell Discov.* V. 4. P. 50.
<https://doi.org/10.1038/s41421-018-0053-y>
- Mattout A., Meshorer E. 2010. Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 22. P. 334.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.02.001>
- Meiners S., Keller I.E., Semren N., Caniard A. 2014. Regulation of the proteasome: evaluating the lung proteasome as a new therapeutic target. *Antioxid. Redox. Signal.* V. 21. P. 2364.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5798>
- Meiners S., Ludwig A., Stangl V., Stangl K. 2008. Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med. Res. Rev.* V. 28. P. 309.
<https://doi.org/10.1002/med.20111>
- Meshorer E., Misteli T. 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 7. P. 540.
<https://doi.org/10.1038/nrm1938>
- Miyazono K. 2000. TGF- β signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* V. 11. P. 15.
[https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(99\)00025-8](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(99)00025-8)
- Morozov A.V., Karpov V.L. 2018. Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon.* V. 4. P. e00894.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00894>
- Murata S., Takahama Y., Tanaka K. 2008. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.* V. 20. P. 192.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.002>
- Nakagawa T., Kajitani T., Togo S., Masuko N., Ohdan H., Hishikawa Y., Koji T., Matsuyama T., Ikura T., Muramatsu M. 2008. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev.* V. 22. P. 37.
<https://doi.org/10.1101/gad.1609708>
- Nakamura T., Arai Y., Umehara H., Masuhara M., Kimura T., Taniguchi H., Sekimoto T., Ikawa M., Yoneda Y., Okabe M. 2007. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* V. 9. P. 64.
<https://doi.org/10.1038/ncb1519>
- Nakamura T., Liu Y.-J., Nakashima H., Umehara H., Inoue K., Matoba S., Tachibana M., Ogura A., Shinkai Y., Nakano T. 2012. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature.* V. 486. P. 415.
<https://doi.org/10.1038/nature11093>
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* V. 31. P. 137.
<https://doi.org/10.1007/BF02705243>
- Ng H.-H., Surani M.A. 2011. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat. Cell Biol.* V. 13. P. 490.
<https://doi.org/10.1038/ncb0511-490>
- Nguyen D.T.T., Richter D., Michel G., Mischka S., Kolanus W., Cuevas E., Wulczyn F.G. 2017. The ubiquitin ligase LIN41/TRIM71 targets p53 to antagonize cell death and differentiation pathways during stem cell differentiation. *Cell Death Differ.* V. 24. P. 1063.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2017.54>
- Noormohammadi A., Calculli G., Gutierrez-Garcia R., Khodakarami A., Koyuncu S., Vilchez D. 2018. Mechanisms of protein homeostasis (proteostasis) maintain stem cell identity in mammalian pluripotent stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 75. P. 275.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2602-1>
- Okita Y., Matsumoto A., Yumimoto K., Isoshita R., Nakayama K.I. 2012. Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation. *Genes Cells.* V. 17. P. 768.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01626.x>
- Okita Y., Nakayama K.I. 2012. UPS delivers pluripotency. *Cell Stem Cell.* V. 11. P. 728.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.009>
- Okumura F., Matsunaga Y., Katayama Y., Nakayama K.I., Hatakeyama S. 2010. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.* V. 123. P. 2238.
<https://doi.org/10.1242/jcs.068981>
- Osmulski P.A., Hochstrasser M., Gaczynska M. 2009. A tetrahedral transition state at the active sites of the 20S proteasome is coupled to opening of the alpha-ring channel. *Structure.* V. 17. P. 1137.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2009.06.011>
- Pak C., Danko T., Zhang Y., Aoto J., Anderson G., Maxeiner S., Yi F., Wernig M., Südhof T.C. 2015. Human neuropsychiatric disease modeling using conditional deletion reveals synaptic transmission defects caused by heterozygous mutations in NRXN1. *Cell Stem Cell.* V. 17. P. 316.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.017>
- Pan J., Deng Q., Jiang C., Wang X., Niu T., Li H., Chen T., Jin J., Pan W., Cai X., Yang X., Lu M., Xiao J., Wang P. 2015. USP37 directly deubiquitinates and stabilizes c-Myc in lung cancer. *Oncogene.* V. 34. P. 3957.
<https://doi.org/10.1038/onc.2014.327>
- Pickering A.M., Davies K.J. 2012. Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* V. 109. P. 227.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397863-9.00006-7>
- Qian M.X., Pang Y., Liu C.H., Haratake K., Du B.Y., Ji D.Y., Wang G.F., Zhu Q.Q., Song W., Yu Y., Zhang X.X., Huang H.T., Miao S., Chen L.B., Zhang Z.H., Liang Y.N. et al. 2013. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell.* V. 153. P. 1012.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.032>
- Rezania A., Bruin J.E., Arora P., Rubin A., Batushansky I., Asadi A., O'dwyer S., Quiskamp N., Mojibian M., Albrecht T. 2014. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* V. 32. P. 1121.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3033>
- Sang H., Wang D., Zhao S., Zhang J., Zhang Y., Xu J., Chen X., Nie Y., Zhang K., Zhang S. 2019. Dppa3 is critical for Lin28a-regulated ES cells naïve–primed state conversion. *J. Mol. Cell Biol.* V. 11. P. 474.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy069>
- Saretzki G., Armstrong L., Leake A., Lako M., von Zglinicki T. 2004. Stress defense in murine embryonic stem cells is su-

- prior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells*. V. 22. P. 962.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-962>
- Saric T., Chang S.-C., Hattori A., York I.A., Markant S., Rock K.L., Tsujimoto M., Goldberg A.L. 2002. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* V. 3. P. 1169.
<https://doi.org/10.1038/ni859>
- Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., Uchida M., Naef F., Brivanlou A.H. 2003. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev. Biol.* V. 260. P. 404.
[https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00256-2](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00256-2)
- Schuldiner M., Eiges R., Eden A., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Goldstein R.S., Benvenisty N. 2001. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res.* V. 913. P. 201.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02776-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02776-7)
- Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., Elliott D., Rosenfeld P.J., Gregori N.Z., Hubschman J.-P., Davis J.L., Heilwell G., Spirn M. 2015. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. V. 385. P. 509.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
- Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W. 1995. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*. V. 268. P. 579.
<https://doi.org/10.1126/science.7725107>
- Sinenko S.A., Starkova T.Y., Kuzmin A.A., Tomilin A.N. 2021. Physiological signaling functions of reactive oxygen species in stem cells: From flies to man. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9. P. 714370.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.714370>
- Smalle J., Vierstra R.D. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* V. 55. P. 555.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801>
- Stadtmueller B.M., Hill C.P. 2011. Proteasome activators. *Mol. Cell*. V. 41. P. 8.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.020>
- Sun X.X., He X., Yin L., Komada M., Sears R.C., Dai M.S. 2015. The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 112. P. 3734.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1411713112>
- Suresh B., Lee J., Kim K.S., Ramakrishna S. 2016. The importance of ubiquitination and deubiquitination in cellular reprogramming. *Stem Cells Int.* V. 2016. P. 6705927.
<https://doi.org/10.1155/2016/6705927>
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. V. 126. P. 663.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. V. 282. P. 1145.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Uechi H., Hamazaki J., Murata S. 2014. Characterization of the testis-specific proteasome subunit alpha4s in mammals. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 12365.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558866>
- Urbach A., Benvenisty N. 2009. Studying early lethality of 45, XO (Turner's syndrome) embryos using human embryonic stem cells. *PLoS One*. V. 4. P. e4175.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004175>
- Uyama M., Sato M.M., Kawanami M., Tamura M. 2012. Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib. *Genes Cells*. V. 17. P. 548.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01611.x>
- van der Stoop P., Boutsma E.A., Hulsman D., Noback S., Heimerikx M., Kerkhoven R.M., Voncken J.W., Wessels L.F., van Lohuizen M. 2008. Ubiquitin E3 ligase Ring1b/Rnf2 of polycomb repressive complex 1 contributes to stable maintenance of mouse embryonic stem cells. *PLoS One*. V. 3. P. e2235.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002235>
- Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates J.R., 3rd, Koonin E.V., Deshaies R.J. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. V. 298. P. 611.
<https://doi.org/10.1126/science.1075898>
- Vilchez D., Boyer L., Lutz M., Merkwirth C., Morante I., Tse C., Spencer B., Page L., Masliah E., Berggren W.T., Gage F.H., Dillin A. 2013. FOXO4 is necessary for neural differentiation of human embryonic stem cells. *Aging Cell*. V. 12. P. 518.
<https://doi.org/10.1111/accel.12067>
- Vilchez D., Boyer L., Morante I., Lutz M., Merkwirth C., Joyce D., Spencer B., Page L., Masliah E., Berggren W.T., Gage F.H., Dillin A. 2012a. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature*. V. 489. P. 304.
<https://doi.org/10.1038/nature11468>
- Vilchez D., Morante I., Liu Z., Douglas P.M., Merkwirth C., Rodrigues A.P., Manning G., Dillin A. 2012b. RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature*. V. 489. P. 263.
<https://doi.org/10.1038/nature11315>
- Voutsadakis I.A. 2012. The ubiquitin-proteasome system and signal transduction pathways regulating epithelial mesenchymal transition of cancer. *J. Biomed. Sci.* V. 19. P. 67.
<https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-67>
- Wang D., Bu F., Zhang W. 2019. The role of ubiquitination in regulating embryonic stem cell maintenance and cancer development. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2667.
<https://doi.org/10.3390/ijms20112667>
- Wang X., Meul T., Meinert S. 2020. Exploring the proteasome system: a novel concept of proteasome inhibition and regulation. *Pharmacol. Ther.* V. 211. P. 107526.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107526>
- Watanabe M., Takahashi H., Saeki Y., Ozaki T., Itoh S., Suzuki M., Mizushima W., Tanaka K., Hatakeyama S. 2015. The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR γ . *Elife*. V. 4. P. e05615.
<https://doi.org/10.7554/eLife.05615>
- Weitzman M.D., Lilley C.E., Chaurushiya M.S. 2010. Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annu. Rev. Microbiol.* V. 64. P. 61.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134016>

- Werner A., Manford A.G., Rape M. 2017. Ubiquitin-dependent regulation of stem cell biology. *Trends Cell Biol.* V. 27. P. 568.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.04.002>
- Xiao N., Eto D., Elly C., Peng G., Crotty S., Liu Y.-C. 2014. The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells. *Nat. Immunol.* V. 15. P. 657.
<https://doi.org/10.1038/ni.2912>
- Xu H., Wang W., Li C., Yu H., Yang A., Wang B., Jin Y. 2009. WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells. *Cell Res.* V. 19. P. 561.
<https://doi.org/10.1038/cr.2009.31>
- Yadav D., Lee J.Y., Puranik N., Chauhan P.S., Chavda V., Jin J.-O., Lee P.C. 2022. Modulating the ubiquitin–proteasome system: a therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Cells.* V. 11. P. 1093.
<https://doi.org/10.3390/cells11071093>
- Yao T., Cohen R.E. 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature.* V. 419. P. 403.
<https://doi.org/10.1038/nature01071>
- Young L.E., Fernandes K., McEvoy T.G., Butterwith S.C., Gutierrez C.G., Carolan C., Broadbent P.J., Robinson J.J., Wilmut I., Sinclair K.D. 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat. Genet.* V. 27. P. 153.
<https://doi.org/10.1038/84769>
- Young R.A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell.* V. 144. P. 940.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>
- Zhang F., Hu Y., Huang P., Toleman C.A., Paterson A.J., Kudlow J.E. 2007. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* V. 282. P. 22460.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702439200>
- Zhang F., Laiho M. 2003. On and off: proteasome and TGF- β signaling. *Exp. Cell Res.* V. 291. P. 275.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.07.007>
- Zhang X., Linder S., Bazzaro M. 2020. Drug development targeting the ubiquitin–proteasome system (UPS) for the treatment of human cancers. *Cancers.* V. 12. P. 902.
<https://doi.org/10.3390/cancers12040902>
- Zhang Y., Ding H., Wang X., Wang X., Wan S., Xu A., Gan R., Ye S.-D. 2021. MK2 promotes Tfcp2l1 degradation via β -TrCP ubiquitin ligase to regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Cell Rep.* V. 37. P. 109949.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109949>
- Zhao S., Zhang C., Xu J., Liu S., Yu L., Chen S., Wen H., Li Z., Liu N. 2022. Dppa3 facilitates self-renewal of embryonic stem cells by stabilization of pluripotent factors. *Stem Cell Res. Ther.* V. 13. P. 169.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02846-8>
- Zhou L., Mideros S.X., Bao L., Hanlon R., Arredondo F.D., Tripathy S., Krampis K., Jerauld A., Evans C., St Martin S.K. 2009. Infection and genotype remodel the entire soybean transcriptome. *BMC Genomics.* V. 10. P. 49.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-49>
- Zhou W., Zhu P., Wang J., Pascual G., Ohgi K.A., Lozach J., Glass C.K., Rosenfeld M.G. 2008. Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell.* V. 29. P. 69.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.002>

Ubiquitin–Proteasome System in Cell Pluripotency and Differentiation

U. I. Podenkova^a, I. V. Zubarev^a, A. N. Tomilin^a, and A. S. Tsimokha^a *

^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: atsimokha@incras.ru*

Pluripotent stem cells (PSCs), represented primarily by embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (iPSCs), have a unique ability to self-renew and differentiate into all types of somatic cells. Dissecting molecular mechanisms controlling these properties is important for an efficient and safe introduction of PSCs into clinics. Growing evidence indicates that the proteostasis plays a central role in PSCs fate decisions. This review focuses on the role of the ubiquitin–proteasome system, a key member of the proteostasis network, in the regulation of pluripotency and differentiation of PSCs.

Keywords: deubiquitinases, differentiation, embryonic stem cells, pluripotency, proteasome, ubiquitin ligases, ubiquitin–proteasome system

РОЛЬ ИНТЕГРИРОВАННОГО ОТВЕТА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА СТРЕСС, АУТОФАГИИ И ШАПЕРОНОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ РЕЦИДИВОВ РЕЗИСТЕНТНЫХ ОПУХОЛЕЙ

© 2023 г. С. Г. Зубова¹, *, О. О. Гнедина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: egretta_julia@mail.ru

Поступила в редакцию 07.11.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Химио- и радиотерапия представляют собой для опухолевых клеток колоссальный стрессорный фактор. В ответ на терапию активируется вся эволюционно закрепленная реакция клеток на стресс. Это происходит на всех уровнях организации клетки, а именно на белковом уровне и уровне ДНК. В этот ответ включаются система протеостаза клетки, системы репарации ДНК, гены-онкосупрессоры и многие другие системы клетки. Мы рассмотрим роль в этих процессах основных систем протеостаза, а именно макроаутофагии и шаперонов, которые являются частью интегрированного ответа клетки на стресс. В результате ответа клетки на стресс, опухолевая клетка становится еще менее дифференцированной, активируя необходимые для выживания гены и внутриклеточные системы. Клетки, которые ответили на стресс таким образом, имеют более агрессивный фенотип, который оказывается значительно устойчивее к терапии. Под воздействием стресса клетка эволюционно упрощается, что дает ей дополнительные шансы для выживания. Аутофагия, с одной стороны, способствует снижению дифференцировки опухолевой клетки, ее пластичности, а с другой — поддерживает определенную стабильность, отвечая за целостность генома и освобождая клетку от поврежденных органелл и дефектных белков. И аутофагия, и шапероны способствуют приобретению опухолью множественной лекарственной устойчивости, что еще более затрудняет терапию. Понимание этих процессов с учетом многостадийности канцерогенеза делает возможной разработку новых терапевтических подходов.

Ключевые слова: аутофагия, шапероны, ДНК стабильность, МЛУ фенотип, старение, апоптоз, стволовой компонент

DOI: 10.31857/S0041377123030100, **EDN:** VDVWZ

В основе интегрированного ответа клетки на стресс лежит внутриклеточная сигнальная сеть, которая активируется при действии различных факторов стресса и является эволюционно консервативной (Tian et al., 2021). Интегрированный ответ клетки на стресс, в частности на действие цитостатиков, мобилизует адаптивные внутриклеточные механизмы, за счет которых раковая клетка приобретает более злокачественный фенотип гораздо быстрее, чем это позволили бы сделать случайные мутации. Именно эволюционная консервативность интегрированного ответа позволяет клетке активировать более эволюционно древние гены, которые обеспечивают ее выживание.

Клетки опухоли, которые пережили стресс и стали более автономными, дают начало рецидивирующему росту опухоли. В первую очередь, конечно, под воздействием стресса в клетках активируется стволовой компонент, а также активируются гены, которые обеспечивают неограниченную пролиферацию и рост, независимый от микроокружения. Пла-

стичность опухолевых клеток после действия цитостатиков и их устойчивость являются серьезной проблемой для терапии. Система протеостаза активируется в ответ на фактически любой тип стресса и отвечает за гомеостаз белков; она регулирует их синтез и деградацию и обеспечивает необходимый баланс, отвечающий за оптимальное функциональное состояние белков. Система протеостаза включает шапероны, аутофагию и убиквитин-протеосомную систему деградации белка (Margulis et al., 2020).

В последнее время в литературе появляются отрывочные данные, свидетельствующие о том, что аутофагия и шапероны участвуют в обеспечении множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток, а также играют роль в поддержании целостности и стабильности ДНК.

Цель настоящего обзора — показать роль интегрированного ответа опухолевой клетки на стресс в опухолевой прогрессии и рецидивах, а также показать роль аутофагии и шаперонов в этих процессах,

как участников ответа на стресс, который вызывает, в частности, терапия. Нам кажется важным оценить значение аутофагии и шаперонов для стабильности ДНК и МЛУ, поскольку эти параметры опухолевых клеток могут определять опухолевую прогрессию и злокачественность, а также последующие рецидивы.

ШАПЕРОНЫ И АУТОФАГИЯ

Аутофагия — это эволюционно консервативный катаболический процесс, который поддерживает гомеостаз клетки, утилизируя долгоживущие белки и поврежденные органеллы. В настоящее время описаны три типа аутофагии: микроаутофагия, макроаутофагия, и опосредованная шаперонами аутофагия. Микроаутофагия имеет место, когда фрагменты клеточных мембран и макромолекул просто захватываются лизосомой. При аутофагии, опосредованной шаперонами, происходит направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы непосредственно в лизосому (Margulis et al., 2020). Макроаутофагия является более сложным процессом, чем микроаутофагия, и ей мы уделили практически все внимание, поскольку именно она участвует в тех молекулярных событиях, которые мы описываем в обзоре.

Макроаутофагия — это такой процесс, при котором дефектные белки и органеллы окружаются двойной мембраной, и образуемая таким образом аутофагосома в дальнейшем сливается с лизосомой. Содержимое аутофагосомы переваривается за счет лизосомальных ферментов, а образующиеся в результате аминокислоты используются в качестве материалов для поддержания жизнедеятельности и энергетики клетки (Mizushima, 2007). Аутофагия является механизмом выживания, поскольку утилизирует органеллы, дефектные белки и участки цитоплазмы и подвергает их переработке. В то же время, аутофагия является формой гибели клетки, когда ее процесс не ограничен, и разрушению подвергаются необходимые для жизни клеточные элементы.

Процессы аутофагии контролируются генами семейства *Atg* (autophagy-related gene) (Kametaka et al., 1998). Эти гены обеспечивают инициацию аутофагии, образование и созревание аутофагосом. Можно предположить, что в одноклеточном организме аутофагия отвечает за синтез и деградацию белков, а также регулирует численность органелл, например, таких, как митохондрии. Недаром митохондрии считаются симбиотическим организмом (Mehta et al., 2018). Когда появились многоклеточные организмы, функции генов семейства *Atg* расширились, теперь они осуществляют надзор за генетической стабильностью многоклеточного организма и поддерживают ткани в функциональном состоянии, то есть отвечают за тканевой гомеостаз.

Недавно было показано, что эти функции включают в себя участие в DDR-ответе (DNA damage re-

sponse). Аутофагия оказывает положительный эффект на гомологичную рекомбинацию, играет позитивную роль в таких репарационных процессах, как эксцизионная репарация и репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch). При участии аутофагии деградируют такие протеины, как KAP1 (Kruppel associated box domain-associated protein 1), HP1 (heterochromatin protein 1) и SQSTM1/p62. Модуляция HP1 изменяет структуру хроматина таким образом, что становится возможной репарация двухцепочечных разрывов (Gomes et al., 2017). Таким образом, у многоклеточных организмов поддерживается стабильность ДНК, что предохраняет ткани от новообразований.

Шапероны принадлежат к семействам белков теплового шока (Hsp100, Hsp90, Hsp70 и Hsp27). Эти белки активируются в ответ на лекарственные препараты, радиацию и другие стресс-факторы. Они поддерживают баланс белков в клетке, способствуют выживанию клетки, участвуя в адаптивных реакциях. Шапероны поддерживают гомеостаз и предотвращают токсичность неправильно сложенных и денатурированных белков. Это особенно важно для опухолевых клеток, которые избыточно экспрессируют белки теплового шока и выживают даже при наличии высоких уровней белков с неправильной укладкой (Sannino et al., 2021). Шапероны нековалентно присоединяются к белкам и восстанавливают их третичную или четвертичную структуру. Шапероны отвечают также за образование и диссоциацию белковых комплексов. Шапероны предоставляют опухоли селективные преимущества, подавляя апоптозные пути, некроз, помогая преодолеть старение, промотируя ангиогенез и стимулируя метастазирование. Таким образом, шапероны способствуют прогрессии опухолей. Шапероны предохраняют клетки от аноксии и обеспечивают жизнеспособность клеток, утративших контакт с экстраклеточным матриксом. Таким способом, шапероны способствуют метастазированию (Albakova et al., 2020).

Белки теплового шока (Hsp) обеспечивают репарацию ДНК и стабильность генома. Известно, что Hsp быстро активируются в ответ на повреждающие ДНК агенты. Они обнаруживаются в фокусах репарации ДНК и активируются фосфорилированием такими факторами и стражами генома, как ATM, ATR и ДНК-зависимая протеинкиназа (ДНК-ПК) (Dubrez et al., 2020). Делеция транскрипционного фактора 1 теплового шока (*HSP1*), который контролирует экспрессию белков теплового шока, основательно повреждает способность фибробластов крысы репарировать DSB (Dubrez et al., 2020). Белки теплового шока ассоциированы с протеинами, вовлеченными в DDR-сигнальный путь (Sottile, Nadin, 2018).

Применение терапевтических воздействий — цитостатиков и облучения — служит стресс-фактором для опухолевых клеток. Несомненно, стрессовое

действие на опухолевые клетки оказывают и гипоксия, и закисление окружающей среды, и активность иммунной системы. Но мы в данном обзоре ограничимся рассмотрением влияния на опухоль цитостатиков и облучения, поскольку описание именно их действия на химиорезистентность и стабильность ДНК входит в задачи обзора. За счет своих цитопротективных свойств аутофагия и белки теплового шока способствуют устойчивости опухолевых клеток к проводимой терапии. (Das et al., 2018a).

На основании последних данных из литературы можно предположить, что подавление реакции клеток на стресс, а именно супрессия активности аутофагии и шаперонов увеличит чувствительность к цитостатикам, радиотерапии, увеличит апоптоз опухолевых клеток, приведет к генетической нестабильности опухолей, а также гибели старых клеток и поврежденных опухолевых клеток. Аутофагия рассматривается как двуликий Янус в процессах выживания и гибели клеток, но все больше данных свидетельствует о том, что при стрессовой ситуации, вызванной терапией опухолей, аутофагия действует как механизм выживания опухолевых клеток (Das et al., 2018a).

ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СТРЕСС

Фактически все виды стресса приводят к активации четырех специфических сенсорных киназ (PERK, HRI, GCN2 и PKR). Эти киназы отвечают на такие внешние стрессы как, например, истощение аминокислот, вирусная инфекция, недостаток глюкозы, гипоксия, окислительный стресс и повреждение ДНК. Активация каждой из этих четырех киназ от любого вида стресса приводит к фосфорилированию фактора eIF2a, что вызывает глобальное ингибирование синтеза белка и избирательную трансляцию мРНК активирующего транскрипционного фактора 4 (ATF4).

ATF4 связывается с такими ДНК мишенями, которые контролируют клеточное выживание, адаптацию и апоптоз (Tian et al., 2021). ATF4 — это своеобразное “бутылочное горлышко”, через которое проходят все сигнальные пути, активируемые стрессом. В частности, мишенями ATF4 являются шапероны и гены аутофагии. Аутофагия может активироваться одновременно с другими клеточными реакциями на стресс, например, с шаперонами, АА-транспортёрами, метаболическими ферментами и способствовать выживанию клетки. В настоящее время обсуждается ключевая роль аутофагии в индукции плюрипотентности и активации стволового компонента в опухолях. Можно предположить, что для репрограммирования и перехода к плюрипотентности требуется активация другой программы в клетке, смена белкового содержания, экспрессия другого набора генов и рецепторов, а также включение другого типа метаболизма. Как катаболический процесс, аутофагия может участвовать в решении этой задачи.

Активация аутофагии сопровождается сменой рецепторов фокальной адгезии, индукцией эпителиально-мезенхимного перехода, секрецией цитокинов, ответственных за миграцию, увеличением стволовости и устойчивости к лекарствам. Аутофагия способствует плюрипотентности, в раковых стволовых клетках повышает экспрессию маркеров стволовых клеток, например, CD44, а также экспрессию мезенхимных маркеров, например, виментина. Аутофагия индуцирует плюрипотентность с помощью фактора плюрипотентности SOX2, подавляющего экспрессию mTOR, что еще больше усиливает аутофагию, которая необходима для перепрограммирования (Smith et al., 2019). Таким образом, ситуация напоминает змею, кусающую хвост.

При ответе на стресс клетка как бы балансирует между старением и проявлением стволовых свойств. На клетках карциномы печени было показано, что обе эти программы могут активироваться одновременно. Несмотря на то, что доксорубин является ДНК-повреждающим агентом, вызывающим старение, было установлено, что обработка доксорубином вызывает старение в клетках карциномы печени, но это старение сопровождается значительным увеличением экспрессии генов репрограммирования *SOX2*, *KLF4* и *c-myc*, а также генов, связанных со стволовой структурой печени *EpCAM*, *CK19* и *ANXA3* (Karabici et al., 2021).

Подобные результаты получены на клетках остеосаркомы (Tian et al., 2019). Было установлено, что доксорубин может увеличивать миграцию и стволовость клеток остеосаркомы и быть причиной рецидива и лекарственной устойчивости. Он повышает экспрессию фактора KLF4 в клетках остеосаркомы, чем увеличивает их стволовые свойства (Tian et al., 2019). Все больше данных свидетельствует о том, что интегрированная реакция на стресс управляет пластичностью рака. В пользу этого говорят результаты, доказывающие, что ингибиторы mTOR и химиотерапевтические препараты индуцируют трансляционную активацию подмножества изоформ мРНК NANJG, SNAIL и NODAL, что приводит к возникновению фенотипов, подобным стволовым клеткам. Такие же процессы происходят при гипоксии. Эти эффекты преодолеваются с помощью лекарств, препятствующих трансляционному перепрограммированию, которое запускается фосфорилированием фактора eIF2a, отвечающего за активацию интегрированного ответа на стресс (Jewer et al., 2020).

Химиопрепараты, в частности доксорубин, вызывая гибель раковых клеток, усиливают стволовость, инвазивность и лекарственную устойчивость оставшихся опухолевых клеток (Liu et al., 2019). В клетках, переживших стресс, стволовой компонент может активироваться за счет активации гена *Nanog*, клетка становится более плюрипотентной и менее дифференцированной (Jewer et al., 2020). В этом случае можно говорить о некотором эволюционном

упрощении таких клеток. У примитивных форм, например, у гидр, клетки выполняют несколько физиологических функций, являясь одновременно и стволовыми. Они осуществляют процесс самообновления, сохраняя определенную дифференцировку (Chakraborty, Agoramoorthy, 2012). Поэтому активация стволового компонента в опухолевых клетках может считаться примером эволюционного регресса, возвращением к эволюционно более примитивной форме. Можно утверждать, что опухолевая клетка находится в перманентном стрессе, что соответствует теории, согласно которой опухолевая клетка вообще представляет собой атавистическую эволюционно примитивную форму (Egenpreisa et al., 2022). С точки зрения эволюции, в опухолях активируются наиболее древние транскрипционные программы (Trigos et al., 2017).

Мы предполагаем, что эволюционный консерватизм интегрированного ответа на стресс и обеспечивает опухолевую прогрессию, увеличение ее злокачественного потенциала и приобретение лекарственной устойчивости. Клетки, сумевшие выжить в условиях стресса, служат источником для рецидивирующего роста. Пластичность клетки, возникновение плюрипотентности обеспечивает аутофагия, в частности митофагия, то есть удаление поврежденных митохондрий, которые продуцируют свободные радикалы. Известно, что низкая митохондриальная активность и недостаточно развитая митохондриальная сеть являются отличительными признаками стволовости (Menendez et al., 2011). Считается, что митохондрии в плюрипотентных клетках возвращаются к незрелому состоянию, в котором они пребывают в эмбриональных стволовых клетках. Если аутофагию подавить, образуются гигантские аномальные митохондрии, и клетка стареет.

Несомненно, старение также является своеобразным ответом на стресс, и активация процесса старения в опухолевых клетках является предпочтительной целью терапии. Как уже говорилось выше, в условиях стресса клетка балансирует между старением и плюрипотентностью, и этот баланс во многом определяет ингибитор аутофагии белковый комплекс mTORC1 (Menendez et al., 2011). Переход к плюрипотентности сопровождается катастрофической перестройкой метаболизма опухолевой клетки. Утрата митохондрий приводит к еще более активному гликолизу; согласно теории Варбурга, опухолевые клетки существуют преимущественно за счет гликолиза. Можно утверждать, что гликолиз более эволюционно древний путь метаболизма, поскольку окислительное фосфорилирование возникло гораздо позже, только после интеграции митохондрии в прокариотический организм. Таким образом, интегрированный ответ на стресс приводит к масштабному эволюционному упрощению опухолевой клетки, затрагивая не только адаптивные гены, но и изменяя метаболизм.

Конечно же, аутофагия регулируется на посттрансляционном уровне, но основная регуляция идет через транскрипционный фактор ATF4, который активируется при интегрированном ответе клетки на стресс. Возможно, ATF4 может служить предпочтительной терапевтической мишенью, и его супрессия позволит подавить интегрированный ответ на стресс и, в частности, снизить уровень активности аутофагии и шаперонов. Уже существуют препараты, подавляющие фосфорилирование фактора eIF2 α , что предотвращает активацию ATF4 (Tian et al., 2021). Например, препарат ISRIB является ингибитором интегрированного ответа на стресс и нарушает синтез транскрипционного фактора ATF4 (Tian et al., 2021). Шапероны могут, как и аутофагия, не только способствовать дифференцировке, но и поддерживать стволовость. Сообщается о роли Hsp90 в поддержании плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток и в экспрессии факторов плюрипотентности, особенно *Oct4* и *Nanog* (Bradley et al., 2012).

Одним из адаптивных генов, поддерживающих неограниченную пролиферацию, является *c-myc*. Было показано, что окислительный стресс активирует сигнальные пути, отвечающие за выживание и находящиеся в зависимости от фосфорилирования фактора *c-myc*, которое приводит к устойчивости опухолевых клеток к окислительному стрессу (Venassi et al., 2006). В ответ на окислительный стресс опухолевая клетка использует активные формы кислорода в качестве промежуточных продуктов для выживания и активации агрессивного поведения, а также перестройки цитоскелета, лежащего в основе подвижности (Pani et al., 2010). Таким образом, окислительный стресс вносит свой вклад в метастазирование и рецидивы опухолей, он активирует адаптивные гены, которые способствуют выживанию.

Гипоксия при раке поджелудочной железы увеличивает злокачественный потенциал опухоли, в частности ее способность к метастазированию (Buchler et al., 2004). Таким образом, различные виды стресса способствуют опухолевой прогрессии и устойчивости опухолевых клеток к терапии.

СИСТЕМА ПРОТЕОСТАЗА И МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

Проведение длительной терапии часто сопровождается приобретением опухолевыми клетками множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Аутофагия имеет неоднозначное значение для приобретения клетками МЛУ. С одной стороны, она способствует приобретению клетками фенотипа МЛУ и защищает опухолевые клетки от химиотерапии, а с другой — может активировать апоптоз в тех клетках, в которых он неактивен. В то же время ингибирование аутофагии увеличивает чувствительность опухолевых клеток яичника с фенотипом МЛУ к проводимой химиотерапии, стимулируя апо-

птоз этих клеток (Liang et al., 2016). Показано, что аутофагия может быть причиной развития фенотипа МЛУ за счет ингибирования апоптоза в опухолевых клетках молочной железы (Sun et al., 2015). Можно предположить, что развитие фенотипа МЛУ также является своеобразным ответом клетки на стресс.

Относительно недавно была описана взаимосвязь между АВС-транспортерами, к которым относится Р-гликопротеин, и аутофагией. Р-гликопротеин является трансмембранной помпой, которая выкачивает из опухолевых клеток лекарственные препараты в независимости от их конформации. Было показано, что уровень экспрессии АВС-транспортеров позитивно коррелирует с экспрессией LC3, Beclin 1 (маркеров активации аутофагии) и Rictor и негативно коррелирует с экспрессией Raptor в образцах опухолей толстой кишки. Было установлено, что аутофагия, которую вызывает химиотерапия, способствует устойчивости опухолевых клеток к цитостатикам паклитакселу, тамоксифену, эпирубицину и другим (Li et al., 2017).

Белки теплового шока, как и аутофагия, относятся к системе протеостаза и также участвуют в формировании фенотипа МЛУ. Было показано, что ингибирование Hsp90 приводит к деградации определенных белков и снижает устойчивость к противоопухолевым препаратам. Авторами было установлено, что экспрессия Hsp90 выше в клетках меланомы, устойчивых к мелфалану, а ингибиторы Hsp90 восстанавливают чувствительность меланомы к этому препарату. Ингибирование Hsp90 приводит к подавлению Src и его нижележащих эффекторов, к которым относятся ERK, AKT и NF- κ B (Tabata et al., 2020). HSF1 является транскрипционным фактором, регулирующим белки теплового шока, он также контролирует множество путей, участвующих в становлении фенотипа МЛУ. HSF1 регулирует экспрессию MDR1/P-gp на уровне транскрипции, что следует из экспериментов с HSF1⁺ (аденовирусной конструкцией, несущей к ДНК HSF1), который связывает консенсусные элементы белка теплового шока (HSE) в промоторе гена *MDR1* (Vilaboa et al., 2000). Таким образом, HSF1 может регулировать экспрессию Р-гликопротеина в условиях стресса и тем самым активировать белки теплового шока и ген *mdr1* одновременно. HSF1 вызывает транскрипционную активность белков теплового шока Hsp70/Hsp27, которые защищают опухолевые клетки от апоптоза (Kim et al., 2015a).

Показано (Wang et al., 2013), что ингибитор Hsp90 препарат SNX-2112 эффективно индуцирует апоптоз и вторичный некроз в лейкозных клетках K-562/ADR. Клетки под действием этого препарата останавливали клеточный цикл. Апоптоз в этих клетках активировался митохондриями, продуцирующими цитохром *c*. Также этот препарат активировал каспазы 3, 8 и 9. Параллельно этим эффектам этот препарат инактивировал сигнальные пути Akt и NF- κ B, что способствовало апоптозу (Wang et al., 2013). Уровень экс-

прессии Р-гликопротеина и шаперонов, связанных с лекарственной устойчивостью, также снижался. Таким образом, авторы заключают, что ингибирование шаперонов может быть перспективным подходом к лечению лейкозов с фенотипом МЛУ (Wang et al., 2013). Ингибиторы Hsp90 на основе изоксазолонафтохинона способны непосредственно взаимодействовать с Р-гликопротеином и ингибировать его АТФазную активность. Эти соединения подавляют экспрессию Р-гликопротеина и снижают устойчивость к доксорубину и паклитакселу (Dinic et al., 2019). Можно заключить, что стресс, возникающий в опухолевых клетках в результате терапии, вызывает интегрированную защитную реакцию, в которую вовлечены аутофагия, шапероны и механизмы МЛУ, которая связана с неспособностью клетки к апоптозу и экспрессией АВС-транспортеров

В то же время старение клетки, особенно ускоренное старение, которое включается в ответ на стресс или экспрессию онкогенов, также является своеобразным ответом клетки на стресс. Известно, что старые клетки более устойчивы к воздействиям разного типа, и уровень апоптоза у них снижен. Интересно отметить, что в старых лимфоцитах увеличивается уровень экспрессии Р-гликопротеина, но его активность не возрастает (Vilas-Boas et al., 2011). По данным других авторов активность Р-гликопротеина также увеличивается с возрастом (Aggarwal et al., 1997). Экспрессия АВС-транспортеров является адаптивной реакцией опухолевой клетки, которая приводит к рецидивам резистентных опухолей (Li et al., 2017).

СИСТЕМА ПРОТЕОСТАЗА И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ

Гибель и выживаемость клеток зависит от стабильности ДНК. Хромосомные аномалии и мутации приводят к гибели клеток, в том числе опухолевых. Перспективным подходом для терапии онкозаболеваний представляется возможность увеличения неустойчивости ДНК опухолевых клеток при радио- и химиотерапии. Этот эффект также может быть достигнут при нивелировании ответа клетки на стресс при снижении уровня аутофагии и шаперонов в клетке. Применение ингибиторов аутофагии и шаперонов может способствовать подавлению DDR-ответа и угнетению репарации ДНК (Apel et al., 2008; Dubrez et al., 2020). Нарушения аутофагии ассоциированы с повреждениями ДНК, амплификацией геномных регионов и нестандартным числом хромосом (Feng et al., 2017). Известно, что модуляция шаперонов также влияет на стабильность хромосом. Инактивация Hsp70 приводит к неустойчивости теломер, частым спонтанным абберациям (Pandita et al., 2004). Мы предполагаем, что сеть протеостаза одновременно с белковым балансом регулирует и стабильность ДНК. Иными словами, сеть протеостаза регулирует процессы жизни и смерти клетки на белковом уровне и уровне ДНК. Так осуществляется

контроль генетических процессов со стороны белкового или клеточного уровня, поскольку всякая биологическая система многоуровневая и регулируется сетью взаимодействий.

Как уже говорилось выше, аутофагия эволюционно консервативный процесс, который активируется в опухолевых клетках как интегральный ответ на стресс после проведения радио- и химиотерапии (Kim et al., 2015b). Аутофагия может способствовать выживанию опухолевых клеток, быть механизмом устойчивости к проводимой терапии или быть причиной их гибели. Но эффект цитопротекции можно ожидать вероятнее, чем гибель опухолевых клеток от аутофагии (Chen et al., 2009). Известно, что блокада генов аутофагии *Beclin1*, *Atg3*, *Atg4b*, *Atg4c*, *Atg5* и *Atg12* с помощью специфических siRNA приводит к ингибированию аутофагии и увеличению цитотоксичности радиотерапии в устойчивых к терапии опухолевых клетках (Apel et al., 2008). В опухолевых клетках наблюдается повышенный уровень аутофагии, что и является причиной их радио- и хемотрепивности. Аутофагия активируется в ответ на повреждение ДНК. АТМ позитивно регулирует аутофагию через AMPK и TSC1/2 (Zhang et al., 2015). Было установлено, что отсутствие аутофагии ингибирует репарацию ДНК, приводит к персистенции повреждений генома и быстрой клеточной гибели (Zhang et al., 2015). Белковый комплекс mTORC1 негативно регулирует аутофагию и может быть мишенью для терапии, увеличивающей нестабильность ДНК в опухолевых клетках (Condon, Sabatini, 2019).

Известно, что некоторые сенсоры повреждений ДНК, такие как FOXO3a, АТМ, АТР и p53 являются важными регуляторами аутофагии, и поэтому аутофагия играет важную роль в реакциях на повреждение ДНК. Подавление или отмена аутофагии вызывает увеличение повреждений ДНК. Во время DDR-ответа аутофагия может действовать как источник энергии для поддержания остановки клеточного цикла и поддержания активности репарации ДНК. Индукция аутофагии рапамицином снижает генотоксическую активность окислительного стресса. Это исследование подтверждает цитопротективную роль аутофагии и говорит о том, что ее ингибирование может повысить чувствительность опухолевых клеток к агентам, повреждающим ДНК (Galati et al., 2019). Известно, что если повреждения ДНК оказываются нерепарируемыми, аутофагия может активировать клеточную гибель. Сигнальные пути, которые активируют аутофагию после ДНК-повреждений, затрагивают DDR-киназы АТМ, АТР и ДНК-ПК, и это приводит к инактивации комплекса mTORC1, который, как уже говорилось выше, является ингибитором аутофагии (Anand et al., 2020; Juretschke, Beli, 2021).

Интересно отметить, что цитоплазматический p53 подавляет аутофагию, а ядерный p53 ее стимулирует (Lin et al., 2018). Именно p53 решает во многом

судьбу клетки после повреждений ДНК. Либо повреждения ДНК репарируются, либо, если они слишком серьезны, клетка отправляется в апоптоз (Roshani-Asl et al., 2020). Множество протеинов, которые участвуют в процессе аутофагии, регулируются p53, который вовлекает в регуляцию такие белки как DRAM, DAPK и AMPK (Anand et al., 2020).

С большой вероятностью можно предположить, что митохондриальная ДНК гораздо более сильно подвержена повреждениям, чем ядерная ДНК по той причине, что расположена в непосредственной близости к месту генерации свободных радикалов. В зависимости от степени повреждения запускается либо механизм восстановления митохондриальной ДНК, либо митофагия (Anand et al., 2020). Есть предположение (Chao et al., 2021), что при гамма-облучении подавление аутофагии вызывает не связанную с апоптозом проницаемость мембраны митохондрии, в результате чего высвобождается митохондриальная эндонуклеаза G, которая перемещается в ядро и вызывает повреждения ядерной ДНК. Этими же авторами (Chao et al., 2021) было показано, что блокировка функций лизосом приводит к утечке митохондриальной ДНК в цитозоль, что приводит к образованию митохондрий без эндонуклеазы G и накоплению эндонуклеазы G в ядре. Авторы считают, что аутофагия устраняет митохондрии с повышенной проницаемостью, вызванной повреждением митохондриальной ДНК, что предотвращает нестабильность генома, опосредованную эндонуклеазой G. Этими же авторами, было показано, что эндонуклеаза G поддерживает повреждения ядерной ДНК в клетках с дефектной аутофагией. Таким образом, аутофагия ограничивает выход эндонуклеазы G из митохондрий с поврежденной митохондриальной ДНК, чтобы поддержать целостность ядерного генома (Chao et al., 2021).

Однако для поддержания стабильности ДНК непосредственно в ядре, как уже говорилось выше, аутофагия имеет большое значение. Утрата аутофагии связана с повышенным повреждением ДНК, неправильной амплификацией геномных областей и аномальным числом хромосом (Feng et al., 2017). В недавней работе раскрывается механизм, посредством которого аутофагия регулирует убиквитинирование хроматина (Wang et al., 2016). В частности, рецептор аутофагии и субстрат SQSTM1/p62 ингибирует лигазу RNF168, что приводит к подавлению убиквитинирования гистонов в ответ на разрывы двухцепочечной ДНК. Нарушение регуляции этого процесса приводит к снижению способности к восстановлению ДНК и соответствующему повышению чувствительности клеток к радиационному повреждению (Wang et al., 2016; Feng et al., 2017).

Известно, что трансфекция клеток miPHK против SQSTM1/p62 приводит к возникновению обильных очагов ядерного конъюгированного убиквитина. Таким образом, нокдаун SQSTM1/p62 увеличивает полиубиквитинирование хроматина, а сверхэкспрессия

этого белка оказывает противоположный эффект. Поэтому считается, что SQSTM1/p62 является специфическим негативным регулятором убиквитинирования ДНК (Wang et al., 2016; Feng et al., 2017). Восстановление двухцепочечных разрывов обычно включает гомологичную рекомбинацию или нехомологичное воссоединение концов ДНК. Авторы обнаружили, что сниженная эффективность гомологичной рекомбинации, возникающая в результате ингибирования аутофагии, восстанавливается нокдауном *SQSTM1/p62*. Кроме того, последующее привлечение факторов репарации, включая BRCA1, RAP80 и Rad51 нарушается при сверхэкспрессии SQSTM1/p62 и ингибировании аутофагии, но снова может быть восстановлено путем нокдауна SQSTM1/p62. Данные, полученные авторами, свидетельствуют о том, что дефицит аутофагии в результате делеции *Atg3* приводит к нарушению рекрутирования факторов репарации ДНК в зависимости от SQSTM1/p62 (Wang et al., 2016; Feng et al., 2017). Убиквитинирование гистонов изменяет способность ДНК к репарации, приводя к образованию структур хроматина, способствующих сборке комплексов репарации на поврежденной ДНК. Убиквитинирование гистонов происходит вблизи двухцепочечных разрывов ДНК, что является ключевой стадией привлечения факторов репарации к месту повреждения. Рецептор-субстрат аутофагии SQSTM1/p62 деградирует, если аутофагия активна, и накапливается, если аутофагия подавлена.

Интересные результаты получены при изучении аутофагии на протоковой аденокарциноме поджелудочной железы (PDAC). Ингибирование аутофагии с помощью хлорокина приводило к значительному подавлению роста этих опухолевых клеток *in vivo* (ксенотрансплантация клеток PDAC под кожу голых мышей) (Yang et al., 2011). Авторы считают, что антипролиферативный эффект хлорокина был следствием угнетения аутофагии и увеличения повреждений ДНК. Ингибирование аутофагии с использованием siPHK к *Atg5* значительно увеличивало количество двухцепочечных разрывов ДНК, измеренное по количеству фокусов 53BP1. По данным исследования комет, количество DSB также возрастало после обработки клеток PDAC хлорокином (Yang et al., 2011). Аутофагия играет решающую роль в патогенезе PDAC, клетки которой проявляют повышенную конститутивную аутофагию. Результаты исследования показывают, что активная аутофагия обеспечивает рост PDAC, поддерживая окислительное фосфорилирование и стабильность ДНК (Yang et al., 2011).

Киназа ATM играет центральную роль в DDR и определяет баланс между старением и апоптозом. Активированная ATM способствует аутофагии, в частности поддерживает лизосомно-митохондриальную ось, которая, в свою очередь, активирует старение и ингибирует апоптоз. Следовательно, ATM является ключевым фактором, который позволяет клеткам избежать апоптоза, вступая в старение, посредством модуляции аутофагии (Stagni et al., 2021).

Прежде всего, необходимо отметить, что аутофагия снижает уровень свободных радикалов, избавляя клетку от поврежденных митохондрий. Кроме того, повышается антиоксидантная защита в результате продукции Nrf2 при деградации KEAP1 в результате аутофагии (Hewitt, Korolchuk, 2017). Необходимо иметь в виду, что аутофагия влияет непосредственно на репарацию DSB. Нарушения аутофагии могут ингибировать репарацию через подавление гомологичной рекомбинации, либо усиливая протеосомную деградацию CHK1, либо увеличивая уровень SQSTM1/p62 в ядре. Ядерный SQSTM1/p62 нарушает гомологичную рекомбинацию, ингибируя убиквитинирование хроматина (Hewitt, Korolchuk, 2017).

Связующим звеном между шаперонами и аутофагией является BAG3. Это многофункциональный кошаперон Hsp70 и антиапоптотический белок, который взаимодействует с АТФазным доменом Hsp70 и играет ключевую физиологическую роль в клеточном протеостазе. Функционально взаимодействуя с Hsp70 и LC3, BAG3 доставляет полиубиквитинированные белки на путь аутофагии. Этот кошаперон обеспечивает одновременно устойчивость к апоптозу и аутофагическую активность. Одновременно BAG3 регулирует ключевые физиологические функции, включая адгезию, метастазирование и ангиогенез (Kogel et al., 2000).

Белки теплового шока также стабилизируют генном. Киназа CHK1 — первый фактор репарации ДНК, который связан с Hsp90. Взаимодействие между CHK1 и Hsp90 продемонстрировано иммунопреципитацией. Ингибирование Hsp90 запускает деградацию CHK1 по протеосомному пути. Клетки, обработанные ингибитором Hsp90 и собранные в разное время после облучения, имеют более длинные хвосты комет, чем просто облученные клетки. Это свидетельствует о том, что ингибирование Hsp90 не только замедляет сборку факторов репарации, но и угнетает сам процесс репарации ДНК (Sottile, Nadin, 2018). Белок Hsp90 необходим для поддержания фокусов γH2X и эффективной репарации повреждений ДНК после радиации. Нокаут по *Hsp90* усиливает чувствительность к радиации: облучение крысиных фибробластов, утративших HSF1, приводит к снижению фокусов p53BP в сайте поврежденной ДНК и снижает способность к репарации DSB по сравнению с клетками дикого типа (Sottile, Nadin, 2018).

Белки Hsp70 и Hsp27 ассоциируются с ферментами восстановления целостности ДНК после удаления азотистого основания, такими как AP-эндонуклеаза человека и ДНК-гликозилаза урацила (Mendez et al., 2000). Это наблюдение предполагает значительную роль белков теплового шока в механизмах репарации ДНК. Способность DDR реагировать на повреждение ДНК контролируется балансом между синтезом и деградацией клиентских белков, которое регулируется Hsp. Hsp90, в

частности, связывается с белками DDR и предотвращает их убиквитинирование и деградацию. Эти белки включают CHK1, MLN1, MLN2, APE1 и другие (Ikwegbue et al., 2019). Повреждение ДНК запускает сложный сигнальный каскад, включающий множество событий поэтапного фосфорилирования белков. Обнаружено, что остаток треонина 7 в белке Hsp90 фосфорилируется сразу после повреждения ДНК. Фосфорилированный Hsp90 затем накапливается в местах двухцепочечных разрывов и образует очаги репарации с медленной кинетикой, соответствующей кинетике сложного повреждения ДНК (Quanz et al., 2012).

Фосфорилирование Hsp90a зависит от фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), включая ДНК-ПК. ДНК-ПК играет важную роль в восстановлении разрывов двухцепочечной ДНК путем нехомологичного воссоединения концов и передаче сигналов о повреждении ДНК (Quanz et al., 2012). С Hsp90 взаимодействует ядерный опухолевый супрессор BRCA1, который связан с репарацией двунитевых разрывов ДНК и принимает участие в гомологичной рекомбинации. Поскольку опухолевые клетки, экспрессирующие высокие уровни BRCA1 устойчивы к радиации и несколькими классами химиотерапевтических агентов, снижение экспрессии BRCA1 с помощью ингибиторов Hsp90 может восстановить чувствительность к противоопухолевым агентам (Pennisi et al., 2015). Восстановление стабильности ДНК после проведения химио- и радиотерапии позволяет опухоли выжить и вновь начать пролиферировать, что может иметь значение для последующего рецидива.

СИСТЕМА ПРОТЕОСТАЗА И АПОПТОЗ

Взаимосвязь между аутофагией и апоптозом активно изучается в последние годы. Нокдаун *Beclin1* или *Atg5* увеличивают чувствительность множественной миеломы к апоптозу, вызванному доксорубином. *Beclin1* формирует комплекс с PI3K III и стимулирует образование аутофагосом, активируя PI3K III. В то же время *Bcl2* непосредственно связывает *Beclin1* и блокирует его способность к индукции аутофагии (Pan et al., 2011). Существуют исследования, показывающие, что ингибирование аутофагии индуцирует апоптоз. Было показано, что нокдаун *DEPTOR*, который является ингибитором обоих комплексов mTOR, индуцирует апоптоз, увеличивает чувствительность к доксорубину, подавляет аутофагию и PI3K/Akt-сигналинг в клетках множественной миеломы (Zhang et al., 2013). Активная аутофагия в сочетании с дефектами апоптоза может способствовать злокачественной дифференцировке опухоли, что приводит к более злокачественному фенотипу опухолевых клеток и плохому прогнозу заболевания. Аутофагия поддерживает клеточный энергетический баланс и при ингибировании цитопротективной аутофагии может появиться шанс и для активации апоптоза. Так, известно, что увеличен-

ный уровень аутофагии в опухолевых клетках поджелудочной железы с низкой активностью гена *smad4* коррелировал со сниженной радиочувствительностью.

Процесс аутофагии может использоваться клетками для предотвращения или задержки апоптотической гибели в ответ на повреждение ДНК, поэтому ингибирование аутофагии может быть важным подходом для увеличения радиочувствительности опухолевых клеток (Wang et al., 2018). Считается, что опухолевые клетки имеют характерный метаболизм, в основном вызванный изменениями в сетях передачи сигналов, а не мутациями в генах, ответственных за метаболизм. Было установлено (Gremke et al., 2020), что некоторые опухолевые клетки с приобретенной лекарственной устойчивостью проявляют чувствительность к ингибиторам метаболизма.

За клеточный метаболизм во многом отвечает комплекс mTORC1. Именно он отвечает за метаболическую уязвимость опухолевых клеток. Он способствует устойчивости к химиотерапии и одновременно подавляет аутофагию (Gremke et al., 2020). Опосредованное mTORC1 подавление аутофагии необходимо и достаточно для создания метаболической уязвимости, приводящей к энергетическому кризису и апоптозу. Этими же авторами было установлено (Gremke et al., 2020), что конститутивная активация передачи сигналов от mTORC1 в опухолях с приобретенной устойчивостью к химиотерапии подавляет аутофагию и лишает клетки мощного механизма выживания за счет метаболических нарушений, вызванных различными соединениями, нацеленными на метаболизм. Аутофагия имеет решающее значение для выживания клеток в условиях энергетического стресса, вызванного нехваткой питательных веществ (Gremke et al., 2020).

Тройной негативный рак молочной железы очень трудно поддается лечению из-за приобретенной устойчивости к химиотерапии. Было показано, что BAG3 имеет повышенную экспрессию при химио-резистентном раке молочной железы. Снижение экспрессии BAG3 с помощью лентивирусной трансдукции siRNA увеличивает чувствительность опухолевых клеток молочной железы к терапии с помощью 5-фторурацила, доксорубина и доцетаксела. На опухолевых клетках молочной железы было показано, что повышенная устойчивость к апоптозу связана с усиленной цитопротективной аутофагией, повышенной экспрессией кошаперона BAG3, BAG3-зависимой стабилизацией белков Bcl-2, способствующих выживанию, и индукцией изменений, подобных эпителио-мезенхимному переходу в экспрессии генов (Das et al., 2018b).

Таким образом, процессы аутофагии часто являются причиной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, они стабилизируют геном и снижают способность к апоптозу. В то же время в терапевтических подходах к лечению рака молочной железы, о

котором говорилось выше, не все так однозначно. Наблюдения говорят о том, что нарушения пути PI3K/AKT/mTOR выявляется более, чем в 70% опухолей молочной железы (Ozates et al., 2021). Этими авторами было установлено действие препарата AZD3463 как антиканцерогенного агента, который одновременно индуцирует апоптоз и аутофагию. В результате экспериментов было показано, что рапамицин, подавляющий mTORC1-сигналинг и индуцирующий аутофагию, усиливает действие AZD3463. Внесение в культуру опухолевых клеток молочной железы препарата AZD3463 совместно с рапамицином значительно снижало выживаемость опухолевых клеток, при этом увеличивалась активность аутофагии, апоптоза и увеличивалась доля клеток на границе фаз G₀/G₁ (Ozates et al., 2021). Эти результаты показали, что индукция аутофагии снижала устойчивость опухолевых клеток к терапии и вызывала в них апоптоз (Ozates et al., 2021). Однако, несмотря на встречающиеся противоречивые данные, считается, что аутофагия промотирует лекарственную устойчивость.

В работах последних лет пристальное внимание уделяется оксидоредуктазе, содержащей домен WW; ей отводится решающая роль в индукции апоптоза и подавлении аутофагии в опухолях различного гистогенеза (Zhao et al., 2021). Трудность терапии эпителиального рака яичника паклитакселем заключается в высокой хеморезистентности этих раковых клеток. На клеточной линии карциномы яичника A2780 было установлено, что паклитаксел вызывал аутофагический флюкс в этих клетках, увеличивая экспрессию генов аутофагии, например, *Beclin1*, *LC3*, и снижая уровень субстрата аутофагии SQSTM1/p62 (Zhao et al., 2021). Данные конфокальной микроскопии подтверждали визуально отмеченное накопление аутофагосом. Эксперименты по трансфекции оксидоредуктазой, содержащей домен WW, показали, что этот фермент активирует mTORC1 и ингибирует аутофагию, он также увеличивает апоптоз в исследуемой клеточной линии, обработанной паклитакселем (Zhao et al., 2021).

Несмотря на очевидный прогресс в понимании взаимосвязи между апоптозом и аутофагией, основные регуляторы этих процессов остаются неизвестными. Роль N-концевого аргинилированного комплекса BIP (R-BIP)/Beclin1/p62 исследуется с целью установления роли этого комплекса в перекрестных взаимодействиях между апоптозом и аутофагией. На модели ксенотрансплантации голым мышам клеток колоректального рака была оценена противоопухолевая эффективность комбинированного лечения. Было показано, что бортезомиб в сочетании с митомицином C синергически индуцировал цитотоксичность и апоптоз. Эта комбинация лекарств инaktivировала киназу Akt и индуцировала дефосфорилирование Beclin1. Дефосфорилирование Beclin1 было причиной расщепления Beclin1 и разрушения комплекса (R-BIP)/Beclin1/p62, что приводило к пере-

ключению аутофагии на индукцию апоптоза. Эта комбинация лекарств значительно подавляла рост внутрибрюшинного ксенотрансплантата. Результаты показали, что BIP обладает анти-апоптотическими свойствами и действует как индуктор аутофагии. Таким образом, было установлено, что сочетанное воздействие митомицина C и бортезомиба индуцирует апоптоз, инактивирует Akt, разрушает BIP/Beclin1/p62 и снижает аутофагию (Song et al., 2018).

Молекулярный шаперон Hsp70 прямо или косвенно регулирует внутренние и внешние пути апоптоза. Нокдаун Hsp70 повышает чувствительность клеток к апоптозу. Hsp70 влияет на высвобождение цитохрома c, активность каспаз, образование активных форм кислорода и фрагментацию ДНК. Ингибируя активность каспаз, этот шаперон блокирует внешние и внутренние пути апоптоза. Кроме того, Hsp70 блокирует TNF- α опосредованный апоптоз, подавляя этим внешний путь апоптоза (Kumar et al., 2016).

Вызванная стрессом гибель клеток находится под контролем семейства регуляторов апоптоза Bcl-2. Клетки, подверженные стрессовым условиям, имеют повышенную экспрессию Hsp70. Этот молекулярный шаперон действует на нескольких уровнях для подавления индуцированных стрессом апоптотических сигналов некоторых членов семейства Bcl-2. Он восстанавливает и стабилизирует развернутые белки и индуцирует повторный синтез поврежденных белков. Поэтому синтез Hsp70 может считаться необходимым механизмом для восстановления, выживания клеток и их адаптации в летальных условиях (Roufayer, Kadry, 2019).

Белки протеостаза, обладающие шаперонной активностью, защищают клетки от резких изменений окружающей среды. Во время онкогенеза эти взаимодействия шаперонов интенсивно реконструируются таким образом, что становятся выгодны для трансформирующейся клетки. Они ускоряют эволюцию опухоли, приводя к химиорезистентности и снижая ее способность к апоптозу. Шапероны необходимы для выполнения белком p53 своей функции онкосупрессора, но эти же шапероны действуют иначе при мутации p53. Известно, что они “разматывают” мутантный белок p53, обнажая участки, склонные к агрегации. Это приводит к выключению других белков онкосупрессоров, что вызывает ингибирование апоптоза и химиорезистентность (Wawrzynow et al., 2018).

Система протеостаза, включающая, в частности, шапероны и аутофагию, формирует разветвленную сеть взаимодействий, позволяющую чувствовать малейшие изменения гомеостаза. Терапевтические воздействия включают интегральный клеточный ответ на стресс, приводящий к химио- и радиорезистентности опухолевых клеток. Последствием такого ответа может явиться стабилизация генома и снижение способности к апоптозу. Подавление систем

аутофагии и шаперонов позволит увеличить генетическую нестабильность опухолей, увеличить апоптоз, привести к сбою процессов синтеза и деградации белков. Таким образом, ингибирование систем протеостаза позволит модулировать клеточные процессы на клеточном и белковом уровне, а также на уровне ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате интегрированного ответа опухолевой клетки на стресс, который часто активирует проводимая терапия, клетка движется по определенным “рельсам”, приобретая все большую автономность и злокачественность. Это дает ей возможность прогрессировать гораздо быстрее, чем это позволили бы ей сделать случайные мутации. В числе прочих реакций на стресс активируются аутофагия и шапероны. Это позволяет клетке обрести все большую независимость от микроокружения, приобрести стволовые свойства и лекарственную устойчивость, избежать апоптоза, восстановить стабильность ДНК и в дальнейшем активно пролиферировать, приводя к рецидивам онкозаболеваний. По всей видимости, ответ на стресс сопровождается активацией адаптивных генов, способствующих выживанию, и приводит к определенному эволюционному упрощению, позволяющему клетке активно делиться. Понимание этих механизмов делает возможным разработку новых терапевтических подходов, основанных на нивелировании клеточного ответа на стресс.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20229; <https://rscf.ru/project/22-25-20229/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aggarwal S., Tsuruo T., Gupta S.J. 1997. Altered expression and function of P-glycoprotein (170 kDa), encoded by the MDR 1 gene, in T cell subsets from aging humans. *Clin. Immunol.* V. 17. P. 448.
<https://doi.org/10.1023/a:1027363525408>
- Albakova Z., Armeev G.A., Kanevski L.M., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. 2020. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells.* V. 9. P. 587.
<https://doi.org/10.3390/cells9030587>
- Anand S.K., Sharma A., Singh N., Kakkar P. 2020. Entrenching role of cell cycle checkpoints and autophagy for maintenance of genomic integrity. *DNA Repair (Amst).* V. 86. P. 102748.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102748>
- Apel A., Herr I., Schwarz H., Rodemann P., Mayer A. 2008. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res.* V. 68. P. 1485.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0562>
- Benassi B., Fanciulli M., Fiorentino F., Porrello A., Chiorino G., Loda M., Zupi G., Biroccio A. 2006. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol. Cell.* V. 21. P. 509.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.009>
- Bradley E., Bieberich E., Mivechi N.F., Tangpisuthipongsa D., Wang G. 2012. Regulation of embryonic stem cell pluripotency by heat shock protein 90. *Stem Cells.* V. 30. P. 1624.
<https://doi.org/10.1002/stem.1143>
- Büchler P., Reber H.A., Lavey R.S., Tomlinson J., Büchler M.W., Friess H., Hines O.J. 2004. Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J. Surg. Res.* V. 120. P. 295.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.02.014>
- Chakraborty C., Agoramoorthy G. 2012. Stem cells in the light of evolution. *Indian J. Med. Res.* V. 135. P. 813.
- Chao T., Shih H.T., Hsu S.C., Chen P.J., Fan Y.S., Jeng Y.M., Shen Z.Q., Tsai T.F., Chang Z.F. 2021. Autophagy restricts mitochondrial DNA damage-induced release of ENDOG (endonuclease G) to regulate genome stability. *Autophagy.* V. 17. P. 3444.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1874209>
- Chen N., Karantza-Wadsworth V. 2009. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1793. P. 1516.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.013>
- Condon K.J., Sabatini D.M. 2019. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J. Cell Sci.* V. 132. P. jcs222570.
<https://doi.org/10.1242/jcs.222570>
- Das C.K., Mandal M., Kögel D. 2018a. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev.* V. 37. P. 749.
<https://doi.org/10.1007/s10555-018-9727-z>
- Das C.K., Linder B., Bonn F., Rothweiler F., Dikic I., Michaelis M., Cinatl J., Mandal M., Kögel D. 2018b. BAG3 overexpression and cytoprotective autophagy mediate apoptosis resistance in chemoresistant breast cancer cells. *Neoplasia.* V. 20. P. 263.
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.01.001>
- Dinić J., Podolski-Renić A., Jovanović M., Musso L., Tsakovska I., Pajeva I., Dallavalle S., Pešić M. 2019. Novel heat shock protein 90 inhibitors suppress P-Glycoprotein activity and overcome multidrug resistance in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 4575.
<https://doi.org/10.3390/ijms20184575>
- Dubrez L., Causse S., Bonan N.B., Dumétier B., Garrido C. 2020. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. *Oncogene.* V. 39. P. 516.
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-1016-y>
- Erenpreisa J., Salmina K., Anatskaya O., Cragg M.S. 2022. Paradoxes of cancer: survival at the brink. *Semin. Cancer Biol.* V. 81. P. 119.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.12.009>

- Feng Y., Klionsky D.J. 2017. Autophagy regulates DNA repair through SQSTM1/p62. *Autophagy*. V. 13. P. 995. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1317427>
- Galati S., Boni C., Gerra M.C., Lazzaletti M., Buschini A. 2019. Autophagy: a player in response to oxidative stress and DNA damage. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2019. P. 5692958. <https://doi.org/10.1155/2019/5692958>
- Gomes L.R., Menck C.F.M., Leandro G.S. 2017. Autophagy roles in the modulation of DNA repair pathways. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18. P. 2351 <https://doi.org/10.3390/ijms18112351>
- Gremke N., Polo P., Dort A., Schneikert J., Elmshäuser S., Brehm C., Klingmüller U., Schmitt A., Reinhardt H.C., Timofeev O., Wanzel M., Stiewe T. 2020. mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability. *Nat. Commun.* V. 11. P. 4684. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18504-7>
- Hewitt G., Korolchuk V.I. 2017. Repair, reuse, recycle: The expanding role of autophagy in genome maintenance. *Trends Cell Biol.* V. 27. P. 340. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.011>
- Ikwegbue P.C., Masamba P., Mbatha L.S., Oyinloye B.E., Kap-po A.P. 2019. Interplay between heat shock proteins, inflammation and cancer: a potential cancer therapeutic target. *Am. J. Cancer Res.* V. 9. P. 242.
- Jewer M., Lee L., Leibovitch M., Zhang G., Liu J., Findlay S.D., Vincent K.M., Tandoc K., Dieters-Castator D., Quail D.F., Dutta I., Coatham M., Xu Z., Puri A., Guan B.J. et al. 2020. Translational control of breast cancer plasticity. *Nat. Commun.* V. 11. P. 2498. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16352-z>
- Juretschke T., Beli P. 2021. Causes and consequences of DNA damage-induced autophagy. *Matrix Biol.* V. 100–101. P. 39. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2021.02.004>
- Kametaka S., Okano T., Ohsumi M., Ohsumi Y. 1998. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* V. 273. P. 22284. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22284>
- Karabici M., Alptekin S., Firtina Karagonlar Z., Erdal E. 2021. Doxorubicin-induced senescence promotes stemness and tumorigenicity in EpCAM-/CD133- nonstem cell population in hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7. *Mol. Oncol.* V. 15. P. 2185. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12916>
- Kim H.B., Lee S.H., Um J.H., Oh W.K., Kim D.W., Kang C.D., Kim S.H. 2015a. Sensitization of multidrug-resistant human cancer cells to Hsp90 inhibitors by down-regulation of SIRT1. *Oncotarget*. V. 6. P. 36202. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5343>
- Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H., Lee T.H., Chang K.T., Hong Y. 2015b. Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* V. 16. P. 26880. <https://doi.org/10.3390/ijms161125991>
- Kögel D., Linder B., Brunschweiler A., Chines S., Behl C. 2020. At the crossroads of apoptosis and autophagy: multiple roles of the co-chaperone BAG3 in stress and therapy resistance of cancer. *Cells*. V. 9. P. 574. <https://doi.org/10.3390/cells9030574>
- Kumar S., Stokes J. 3rd, Singh U.P., Scisum Gunn K., Acharya A., Manne U., Mishra M. 2016. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* V. 374. P. 156. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>
- Li Y.J., Lei Y.H., Yao N., Wang C.R., Hu N., Ye W.C., Zhang D.M., Chen Z.S., Chin J. 2017. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Cancer*. V. 36. P. 52. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2>
- Liang B., Liu X., Liu Y., Kong D., Liu X., Zhong R., Ma S. 2016. Inhibition of autophagy sensitizes MDR-phenotype ovarian cancer SKVCR cells to chemotherapy. *Biomed. Pharmacother.* V. 82. P. 98. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.054>
- Lin F., Gao L., Su Z., Cao X., Zhan Y., Li Y., Zhang B. 2018. Knockdown of KPNA2 inhibits autophagy in oral squamous cell carcinoma cell lines by blocking p53 nuclear translocation. *Oncol. Rep.* V. 40. P. 179. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6451>
- Liu J., Chang B., Li Q., Xu L., Liu X., Wang G., Wang Z., Wang L. 2019. Redox-responsive dual drug delivery nanosystem suppresses cancer repopulation by abrogating doxorubicin-promoted cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Adv. Sci. (Weinh.)* V. 6. P. 1801987. <https://doi.org/10.1002/advs.201801987>
- Margulis B., Tsimokha A., Zubova S., Guzova I. 2020. Molecular chaperones and proteolytic machineries regulate protein homeostasis in aging cells. *Cells*. V. 9. P. 1308. <https://doi.org/10.3390/cells9051308>
- Mehta A.P., Supekova L., Chen J.H., Petonjamas K., Webster P., Ko Y., Henderson S.C., McDermott G., Supek F., Schullz P.G. 2018. Engineering yeast endosymbionts as a step toward the evolution of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 115. P. 11796–11801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813143115>
- Mendez F., Sandigursky M., Franklin W.A., Kenny M.K., Ku-reekattil R., Bases R. 2000. Heat-shock proteins associated with base excision repair enzymes in HeLa cells. *Radiat Res.* 153:186–195. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0186:hspawb\]-2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0186:hspawb]-2.0.co;2)
- Menendez J.A., Vellon L., Oliveras-Ferraro C., Cufí S., Vazquez-Martin A. 2011. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle*. V. 10. P. 3658. <https://doi.org/10.4161/cc.10.21.18128>
- Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* V. 21. P. 2861. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Ozates N.P., Soğutlu F., Lerminoglu F., Demir B., Gunduz C., Shademan B. 2021. Effects of rapamycin and AZD3463 combination on apoptosis, autophagy, and cell cycle for resistance control in breast cancer. *Life Sci.* V. 264. P. 118643. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118643>
- Pan Y., Gao Y., Chen L., Gao G., Dong H., Yang Y., Dong B., Chen X. 2011. Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antitumor activity of DNA-damaging chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* V. 17. P. 3248. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0890>

- Pandita T.K., Higashikubo R., Hunt C.R.* 2004. HSP70 and genomic stability. *Cell Cycle*. V. 3. P. 591.
<https://doi.org/10.4161/cc.3.5.863>
- Pani G., Galeotti T., Chiarugi P.* 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* V. 29. P. 351.
<https://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>
- Pennisi R., Ascenzi P., di Masi A.* 2015. Hsp90: a new player in DNA repair? *Biomolecules*. V. 5. P. 2589.
<https://doi.org/10.3390/biom5042589>
- Quanz M., Herbet A., Sayarath M., Koning L., Dubois T., Sun J.S., Dutreix M.* 2012. Heat shock protein 90 α (Hsp90 α) is phosphorylated in response to DNA damage and accumulates in repair foci. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 8803.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.320887>
- Roshani-Asl E., Mansori B., Mohammadi A., Najafi S., Danesh-Pouya F., Rasmi Y.* 2020. Interaction between DNA damage response and autophagy in colorectal cancer. *Gene*. V. 730. P. 144323.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144323>
- Roufayel R., Kadry S.* 2019. Molecular chaperone HSP70 and key regulators of apoptosis – A review. *Curr. Mol. Med.* V. 19. P. 315.
<https://doi.org/10.2174/1566524019666190326114720>
- Sannino S., Yates M.E., Schurdak M.E., Oesterreich S., Lee A.V., Wipf P., Brodsky J.L.* 2021. Unique integrated stress response sensors regulate cancer cell susceptibility when Hsp70 activity is compromised. *Elife*. V. 10. P. e64977.
<https://doi.org/10.7554/eLife.64977>
- Smith A.G., Macleod K.F.* 2019. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *J. Pathol.* V. 7. P. 708.
<https://doi.org/10.1002/path.5222>
- Song X., Lee D.H., Dilly A.K., Lee Y.S., Choudry H.A., Kwon Y.T., Bartlett D.L., Lee Y.J.* 2018. Crosstalk between apoptosis and autophagy is regulated by the arginylated BiP/Beclin-1/p62 complex. *Mol. Cancer Res.* V. 16. P. 1077.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0685>
- Sottile M.L., Nadin S.B.* 2018. Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. *Cell Stress Chaperones*. V. 23. P. 303.
<https://doi.org/10.1007/s12192-017-0843-4>
- Stagni V., Ferri A., Cirotti C., Barilà D.* 2021. ATM kinase-dependent regulation of autophagy: a key player in senescence? *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 599048.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599048>
- Sun W.L., Lan D., Gan T.Q., Cai Z.W.* 2015. Autophagy facilitates multidrug resistance development through inhibition of apoptosis in breast cancer cells. *Neoplasma*. V. 62. P. 199.
https://doi.org/10.4149/neo_2015_025
- Tabata M., Tsubaki M., Takeda T., Tateishi K., Maekawa S., Tsurushima K., Imano M., Satou T., Ishizaka T., Nishida S.* 2020. Inhibition of HSP90 overcomes melphalan resistance through downregulation of Src in multiple myeloma cells. *Clin. Exp. Med.* V. 20. P. 63.
<https://doi.org/10.1007/s10238-019-00587-2>
- Tian X., Zhang S., Zhou L., Seyhan A.A., Hernandez Borrero L., Zhang Y., El-Deiry W.S.* 2021. Targeting the integrated stress response in cancer therapy. *Front. Pharmacol.* V. 12. P. 747837.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.747837>
- Tian Z.C., Wang J.Q., Ge H.J.* 2019. Apatinib ameliorates doxorubicin-induced migration and cancer stemness of osteosarcoma cells by inhibiting Sox2 via STAT3 signalling. *Orthop. Translat.* V. 22. P. 132.
<https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.07.003>
- Trigos A.S., Pearson R.B., Papenfuss A.T., Goode D.L.* 2017. Altered interactions between unicellular and multicellular genes drive hallmarks of transformation in a diverse range of solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 114. P. 6406.
- Vilaboa N.E., Galán A., Troyano A., de Blas E., Aller P.* 2000. Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 24970.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M909136199>
- Vilas-Boas V., Silva R., Gaio A.R., Martins A.M., Lima S.C., Cordeiro-da-Silva A., Bastos M.L., Remião F.* 2011. P-glycoprotein activity in human Caucasian male lymphocytes does not follow its increased expression during aging. *Cytometry A*. V. 79. P. 912.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.21135>
- Wang R., Shao F., Liu Z., Zhang J., Wang S., Liu J., Liu H., Chen H., Liu K., Xia M., Wang Y.* 2013. The Hsp90 inhibitor SNX-2112, induces apoptosis in multidrug resistant K562/ADR cells through suppression of Akt/NF- κ B and disruption of mitochondria-dependent pathways. *Chem. Biol. Interact.* V. 205. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.007>
- Wang Y., Zhang N., Zhang L., Li R., Fu W., Ma K., Li X., Wang L., Wang J., Zhang H., Gu W., Zhu W.G., Zhao Y.* 2016. Autophagy regulates chromatin ubiquitination in DNA damage response through elimination of SQSTM1/p62. *Mol. Cell*. V. 63. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.027>
- Wang F., Xia X., Yang C., Shen J., Mai J., Kim H.C., Kirui D., Kang Y., Fleming J.B., Koay E.J., Mitra S., Ferrari M., Shen H.* 2018. SMAD4 Gene mutation renders pancreatic cancer resistance to radiotherapy through promotion of autophagy. *Clin. Cancer Res.* V. 24. P. 3176.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3435>
- Wawrzynow B., Zylicz A., Zylicz M.* 2018. Chaperoning the guardian of the genome. The two-faced role of molecular chaperones in p53 tumor suppressor action. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. V. 1869. P. 161.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.12.004>
- Yang S., Wang X., Contino G., Liesa M., Sahin E., Ying H., Bause A., Li Y., Stommel J.M., Dell'antonio G., Mautner J., Tonon G., Haigis M., Shiriha O.S., Doglioni C. et al.* 2011. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* V. 25. P. 717.
<https://doi.org/10.1101/gad.2016111>
- Zhang D., Tang B., Xie X., Xiao Y.F., Yang S.M., Zhang J.W.* 2015. The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* V. 16. P. 1005.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1046022>
- Zhang H., Chen J., Zeng Z., Que W., Zhou L.* 2013. Knockdown of DEPTOR induces apoptosis, increases chemosensitivity to doxorubicin and suppresses autophagy in RPMI-8226 human multiple myeloma cells *in vitro*. *Int. J. Mol. Med.* V. 31. P. 1127.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1299>

The Role of the Integrated Response of Tumor Cells to Stress, Autophagy, and Chaperones in the Origin of Recurrent Resistant Tumors

S. G. Zubova^{a, *} and O. O. Gnedina^a

^a*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: egretta_julia@mail.ru*

Chemotherapy and radiotherapy are a colossal stress factor for tumor cells. In response to therapy, the entire evolutionarily fixed response of cells to stress is activated. This happens at all levels of cell organization, namely at the protein level and the DNA level. This response involves the cell proteostasis system, DNA repair systems, tumor suppressor genes, and many other cell systems. We will consider the role of the main systems of proteostasis in these processes, namely, macroautophagy and chaperones, which are part of the integrated response of the cell to stress. As a result of the cell's response to stress, the tumor cell becomes even less differentiated, activating the genes and intracellular systems necessary for survival. Cells that have responded to stress in this way have a more aggressive phenotype that is significantly more resistant to therapy. Under the influence of stress, the cell evolutionarily simplifies, which gives it additional chances for survival. On the one hand, autophagy contributes to a decrease in tumor cell differentiation and its plasticity, and on the other hand, it maintains a certain stability, being responsible for the integrity of the genome and freeing the cell from damaged organelles and defective proteins. Both autophagy and chaperones contribute to the acquisition of multidrug resistance by the tumor, which further complicates therapy. Understanding these processes makes it possible to develop new therapeutic approaches, taking into account the multistage nature of carcinogenesis.

Keywords: autophagy, chaperones, DNA stability, MDR phenotype, aging, apoptosis, stemness

УДК 576.3

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК МИКРОГЛИИ ЛИНИИ SIM-A9 – НОВЫЕ ДАННЫЕ

© 2023 г. Д. А. Шапошникова¹, *, Е. Ю. Москалева¹, Ю. П. Сёмочкина¹,
О. В. Высоцкая¹, О. В. Комова², Е. А. Насонова², И. В. Кошлань²

¹НИИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, 141980 Россия

*E-mail: dasha-shap13@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2022 г.

После доработки 03.12.2022 г.

Принята к публикации 03.12.2022 г.

SIM-A9 – линия спонтанно иммортализованных клеток микроглии мыши, полученных из головного мозга новорожденных мышат линии C57BL/6. Цель настоящей работы – характеристика микроглии мыши линии SIM-A9 по соотношению клеток с фенотипом покоящейся и активированной микроглии в культуре, анализ экспрессии маркеров стволовых (прогениторных) клеток CD133 и нестина, рецепторов факторов роста CSF-1R и EGFR, а также анализ кариотипа этой линии. Используются методы световой микроскопии, иммуноцитохимии в сочетании с проточной цитометрией и ОТ-ПЦР для анализа морфологии, фенотипа и уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов и метод mFISH для анализа кариотипа. Впервые показано, что клетки линии SIM-A9 экспрессируют высокий уровень белка TSPO, маркеров CD68, CD11b и CD45^{high} на поверхностной мембране клеток, что соответствует фенотипу активированной микроглии. Несмотря на это, клетки линии отвечают дополнительной активацией в ответ на стимуляцию ЛПС, которая приводит к повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6 и образованию высокого уровня активных метаболитов кислорода и азота. Показано, что клетки линии SIM-A9 экспрессируют маркеры стволовых и прогениторных клеток CD133⁺ и нестин, что позволяет рассматривать их как ранние низко дифференцированные прогениторные клетки, несмотря на их фенотип, соответствующий активированной микроглии. Обнаружено также, что клетки линии SIM-A9 экспрессируют рецепторы двух факторов роста CSF-1 и EGF – CSF-1R и EGFR, что свидетельствует о возможности стимуляции пролиферации клеток SIM-A9 по двум альтернативным механизмам под действием соответствующих факторов. У клеток SIM-A9 установлен гипотетраплоидный кариотип с большим числом структурных и количественных аномалий хромосом.

Ключевые слова: микроглия, линия SIM-A9, кариотип, стволовые клетки, рецептор CSF-1, рецептор EGF, экспрессия генов, цитокины

DOI: 10.31857/S0041377123030082, **EDN:** VDTYOW

Клетки микроглии ЦНС человека и мыши образуются в период раннего эмбрионального развития из миелиодных клеток-предшественников костного мозга. Во взрослом организме пул микроглии поддерживается на постоянном уровне благодаря сбалансированным процессам пролиферации и гибели клеток путем апоптоза, и за время жизни организма микроглия обновляется целиком несколько раз (Askew et al., 2016). В процессе развития головного

мозга эмбриона микроглия участвует в ремоделировании синапсов и регуляции ангиогенеза, во взрослом организме – в устранении неактивных нейронов и синапсов, в регуляции нейрогенеза, в ремоделировании сосудистой сети ЦНС (например, при инсульте), в развитии реакций клеточного иммунитета и воспаления (Eyo et al., 2013).

В мозге микроглия может присутствовать в различных состояниях: выделяют покоящуюся и активированную микроглию. Клетки покоящейся микроглии имеют большое количество разветвленных отростков, экспрессируют маркеры CD11b, CD40, CD45^{low}, CD80, CD86, F4/80, Iba1, TMEM119, CXCR3, CCR9, CSF-1R, C5aR. При активации клетки приобретают амебоидную или округлую форму и фенотип CD11b⁺/CD45^{high} (Askew et al., 2016). В качестве еще одного маркера активированной микроглии и, в меньшей мере, активированных астроцитов, пред-

Принятые сокращения: АФА – активные формы азота; АФК – активные формы кислорода; АХр – хромосомные aberrации; ЛПС – липополисахарид; СК – стволовые клетки; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭГТА – этиленгликольди-(2-аминоэтил)-тетрауксусная кислота; ЦНС – центральная нервная система; CSF-1 – колониестимулирующий фактор-1 (colony stimulating factor-1); CSF-1R – рецептор CSF-1; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор EGF; mFISH – многоцветная флуоресцентная гибридизация *in situ*; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

лагают анализировать присутствие белка-транслоказы наружной мембраны митохондрий с молекулярной массой 18 кДа, получившего название TSPO (Bonsack et al., 2018). Активированные клетки микроглии секретируют активные формы азота (АФА) и кислорода (АФК), провоспалительные цитокины и хемокины, что приводит к развитию нейровоспаления и повреждению нейронов под действием факторов воспаления (Bachiller et al., 2018). Клетки активированной микроглии, кроме того, могут непосредственно повреждать нейроны с участием системы комплемента (Kalm et al., 2015). Хроническая активация микроглии под действием эндогенных факторов, сопровождающаяся длительным нейровоспалением, лежит в основе патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (Onyango et al., 2021).

В изучении ответа микроглии на действие разных стимулов и препаратов важную роль играет возможность использования культивируемых клеток. Описаны линии микроглии человека (НМО6) и мыши (ЕОС, НАР1, BV2, SIM-A9), полученные как при трансфекции определенных онкогенов (*v-myc* в случае НМО6, *v-raf/v-myc* в случае BV2), так и в результате спонтанной иммортализации (Blasi et al., 1990; Stansley et al., 2012; Nagamoto-Combs et al., 2014). Показано, что клетки этих линий сохраняли основные свойства первичной микроглии (Stansley et al., 2012; Nagamoto-Combs et al., 2014).

SIM-A9 — спонтанно иммортализованные клетки микроглии, получены из ткани коры головного мозга новорожденных мышат линии C57BL/6 и подробно охарактеризованы авторами (Nagamoto-Combs et al., 2014), которые показали, что эти клетки экспрессировали маркеры Iba1 и CD68, специфичные для макрофагов и микроглии; кроме того, они обладали фагоцитарной активностью, отвечали на стимуляцию липополисахаридом (ЛПС) и бета-амилоидом активацией сигнальных каскадов с участием тирозинпротеинкиназы и NFκB и секрецией TNFα, повышением активности индуцируемой синтазы оксида азота и циклооксигеназы-2. Стимуляция клеток IL-4 повышала уровень аргиназы-1. Таким образом, авторы показали, что клетки линии SIM-A9 способны отвечать на про- и противовоспалительные стимулы формированием фенотипа про- и противовоспалительной микроглии (Nagamoto-Combs et al., 2014). Эти свойства позволили рассматривать полученную линию SIM-A9 в качестве альтернативы первичной микроглии для исследования механизмов развития нейродегенеративных заболеваний и состояний, обусловленных развитием нейровоспаления, и изучения эффективности потенциальных терапевтических препаратов, способных регулировать про- и противовоспалительную активность микроглии. Однако кариотип полученной линии SIM-A9 изучен не был.

При анализе микроглии часто возникает необходимость оценивать соотношение покоящихся и активированных клеток. Линия SIM-A9 не была охарактеризована по этим параметрам, хотя высокий уровень CD68 и спонтанной секреции цитокина TNFα могут свидетельствовать о спонтанной активации части этих клеток. Кроме того, остается неисследованным вопрос об экспрессии маркеров стволовых (прогениторных клеток), таких как CD133 и нестин, и рецепторов таких ключевых факторов роста, как рецептор колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1R) и рецептор эпидермального фактора роста EGF (EGFR).

CSF-1R (CD115) локализован на поверхностной мембране клеток и относится к семейству рецепторов факторов роста CSF-1/тромбоцитарный фактор роста. Он распознает лиганды CSF-1 и IL-34 — цитокины, которые контролируют пролиферацию клеток микроглии и макрофагов. Они связываются с внеклеточным доменом CSF-1R, индуцируют димеризацию рецептора и его аутофосфорилирование рецепторной тирозинпротеинкиназой по остаткам тирозина. Этот процесс приводит к каскаду внутриклеточных сигналов, которые регулируют пролиферацию, выживание и функции клеток-мишеней. Связывание CSF-1 с CSF-1R активирует такие сигнальные пути, как JAK—STAT, PI3K—AKT, ERK1/2 (Han et al., 2022).

EGFR, как и CSF-1R, является членом семейства тирозинкиназных рецепторов плазматической мембраны, которые контролируют такие важные функции, как рост, дифференцировку, апоптоз, адгезию и миграцию (Jones, Rappoport, 2014). EGFR представлен на многих типах клеток в центральной и периферической нервной системе, связан с выполнением нейротрофических функций в ЦНС и участвует в регуляции активности глиальных клеток мозга (Douglas et al., 2009). В настоящее время этот рецептор привлекает большое внимание в качестве терапевтической мишени из-за его участия в активации микроглии (Yan et al., 2019; Mansour et al., 2022). Связывание EGFR с такими лигандами, как EGF и TNFα, вызывает активацию микроглии путем трансактивации митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и других нижестоящих сигнальных путей (Fischer et al., 2006), а ингибирование сигнального пути EGFR—MAPK подавляет воспалительную реакцию микроглии и связанное с ней вторичное повреждение нейронов после повреждения спинного мозга (Qu et al., 2012).

В связи с вышесказанным цель настоящей работы состояла в характеристике микроглии мыши линии SIM-A9 по соотношению к клеткам с фенотипом покоящейся и активированной микроглии в культуре, анализ экспрессии маркеров стволовых (прогениторных) клеток CD133 и нестина, рецепторов факторов роста CSF-1R и EGFR и анализ кариотипа этой линии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалы и реактивы. Культуральная среда DMEM/F12, сыворотка лошади, гентамицин (Gibco, США), фетальная сыворотка крупного рогатого скота (HyClone, США), сыворотка козы (Biosera, Франция), бычий сывороточный альбумин (Amresco, США), раствор Хенкса, фосфатно-солевой буфер (ПанЭко, Россия), пластиковая культуральная посуда (Corning, США), ЭДТА и ЭГТА (AppliChem, Германия), Triton X-100 (Fluka, США), ЛПС (Sigma-Aldrich, США), MitoSox-Red и 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (carboxy-H2DCFDA, C400) (Molecular Probes, США), 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин диацетат (DAF-FM, Thermo Fisher Scientific, США), параформальдегид (Panreac, EC), реактивы ExtractRNA, qPCRmix-HS SYBR и синтез праймеров для ПЦР (Евроген, Россия).

Использовали следующие антитела: к CD11b:PE, CD45:AlexaFluor488, CD115:AlexaFluor647, к нестину (Biolegend, США), к Iba1 и TMEM119 (Abcam, Великобритания), CD68 (BD Biosciences, США), TSPO 18 кДа:AlexaFluor488, CD133:PE (Miltenyi Biotec, Германия), EGFR:FITC (BD Biosciences, США); вторичные антитела козы к IgG кролика:AlexaFluor647 (Molecular Probes, США), вторичные антитела козы к IgG цыпленка:AlexaFluor568 (Invitrogen, США).

Культивирование клеток SIM-A9. Клетки микроглии мыши линии SIM-A9 культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% инактивированной фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 5% инактивированной лошадиной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, в пластиковых культуральных флаконах в CO₂-инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для пересева клетки линии SIM-A9 снимали с подложки с помощью фосфатного солевого буферного раствора (PBS), содержащего 1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л ЭГТА и 1 мг/мл глюкозы. Пересев клеток проводили 2 раза в неделю по достижении 80–90% конфлюэнтности.

Активация клеток SIM-A9 введением ЛПС. Клетки микроглии SIM-A9 активировали ЛПС, полученным из *Escherichia coli*. Маточный раствор (1 мг/мл в PBS) хранили при –20°C; рабочий раствор готовили в среде для культивирования после его размораживания непосредственно перед экспериментом.

Определение активных форм кислорода и азота. Маточные растворы флуоресцентных красителей готовили в ДМСО: 20 ммоль/л 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (carboxy-H2DCFDA, C400) для окрашивания всех АФК, 5 ммоль/л 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин диацетата (DAF-FM) для определения АФА (NO) и 5 ммоль/л MitoSox-Red для выявления супероксиданиона. Рабочие растворы красителей готовили в растворе Хенкса. Для определения общего содержания АФК и АФА живые клетки окрашивали в течение 40 мин при 37°C, для определения супероксиданиона – 10 мин при 37°C. После окрашивания клетки отмывали

вали в растворе PBS, осадок ресуспендировали в PBS и до измерений держали при 4°C. Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США), оснащенном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и диодным красным лазером с длиной волны 635 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии, НИЦ “Курчатовский институт”) с использованием программного обеспечения “CellQuest™” (BD Biosciences, США). В каждом образце анализировали 10 тыс. клеток.

Фенотипирование клеток линии SIM-A9. Для окрашивания поверхностных белков CD11b, CD45 и CD68 клетки отмывали PBS и окрашивали прямыми антителами к данным антигенам (табл. 1) в течение 30 мин при 4°C. Далее клетки отмывали PBS, фиксировали в растворе 2%-ного параформальдегида в PBS 10 мин при комнатной температуре, отмывали и ресуспендировали в PBS. Фактор CSF-1R идентифицировали в фиксированных клетках при окрашивании в течение 30 мин при 4°C. При окрашивании клеток антителами к внутриклеточным белкам Iba1, CD68, TSPO и нестину (табл. 1) клетки отмывали от среды культивирования, фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида 10 мин, отмывали, пермеабилизировали в течение 10 мин в PBS, содержащем 0.1% Тритона X-100 (Fluka, США) и 5% козьей сыворотки (Biosera, Франция) (при окрашивании Iba1, CD11b и нестина) или 1% бычьего сывороточного альбумина (в случае TSPO); затем добавляли антитела к белку Iba1 и к нестину и инкубировали 60 мин при комнатной температуре, далее отмывали от антител и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 647 для окрашивания Iba1 и с Alexa Fluor 568 для окрашивания нестина в течение 60 мин, после чего отмывали и ресуспендировали в PBS. Окрашивание клеток антителами к внутриклеточному белку CD68 производили прямыми антителами в течение 60 мин при комнатной температуре. Для оценки содержания белка TSPO клетки окрашивали прямыми антителами при комнатной температуре в течение 45 мин.

Антигены TMEM119, EGFR и CD133 идентифицировали на нефиксированных клетках SIM-A9. При анализе трансмембранного белка TMEM119 проводили непрямое окрашивание, а для определения белков EGFR и CD133 использовали прямые антитела. Все антитела использовали в разведении, рекомендованном фирмой-изготовителем. Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США), оснащенном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и диодным красным лазером с длиной волны 635 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии, НИЦ “Курчатовский институт”) с использованием программного обеспечения “CellQuest™” (BD Biosciences, США). В каждом образце анализировали 10 тыс. клеток.

Таблица 1. Антитела, использованные при иммуноцитохимическом окрашивании антигенов клеток линии SIM-A9

Антиген:краситель	Описание антигена	Вид (изотип)	Источник литературы
CD11b:PE	Мембранный белок, гликопротеин из надсемейства интегринов, продукт гена <i>ITGAM</i> , альфа-субъединица интегрина $\alpha M\beta 2$ (MAC-1)	Крыса/IgG2b, к	Jurga et al., 2020
CD45:AlexaFluor488	Пан-лейкоцитарный антиген; экспрессируется как на покоейшей (на низком уровне), так и на активированной (на высоком уровне) микроглии	Крыса/IgG2b, к	Becher et al., 1996
Iba1	Внутриклеточный Са-связывающий белок, связанный с реорганизацией актина – белка цитоскелета микроглии	Кролик/IgG	Sasaki et al., 2001
CD68:BV-421	Скавенджер-рецептор; связывает окисленные липопротеины	Крыса/IgG2a, к	Waller et al., 2019
CD68:AlexaFluor488	низкой плотности и участвует в элиминации дебриса, в фагоцитозе, в том числе миелина	Крыса/IgG2a	
PBR (TSPO 18кДа):AlexaFluor488	Транслоказа наружной мембраны митохондрий с мол. массой 18 кДа; ранее белок был известен как рецептор бензодиазепинов. Представлен на активированной микроглии и, в меньшей мере, на активированных астроцитах	Крыса/IgG	Liu et al., 2014
CD115:AlexaFluor647	Рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора – CSF-1R	Крыса/IgG2a, к	Stanley et al., 2014
TMEM119	Трансмембранный белок 119, маркер микроглии	Кролик/IgG	Bennett et al., 2016
CD133:PE	Проминин-1, трансмембранный гликопротеин, маркер стволовых клеток	Крыса/IgG2a, λ	Coskun et al., 2008
Нестин	Белок промежуточных филаментов VI типа, маркер прогениторных клеток, ранее считался маркером нейрональных стволовых клеток	Курица/IgY	Bernal, et al., 2018
EGFR:FITC	Рецептор эпидермального фактора роста	Мышь/IgG1	Jones et al., 2014
Иммуноглобулины кролика:AlexaFluor647	Вторичные антитела козы к иммуноглобулинам кролика	Коза/IgG	—
Иммуноглобулины цыпленка:AlexaFluor568	Вторичные антитела козы к иммуноглобулинам цыпленка	Коза/IgG	—

Анализ экспрессии мРНК генов цитокинов в клетках линии SIM-A9. Общую РНК из клеток выделяли фенол-хлороформным методом, используя реактив ExtractRNA в соответствии с инструкцией изготовителя (Евроген, Россия). Анализ относительной экспрессии мРНК исследуемых генов проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) как описано ранее (Москалева и др., 2022). Экспрессию мРНК генов цитокинов определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием красителя SYBR Green I на амплификаторе CFX96 TouchTM (Bio-Rad, США). ПЦР проводили в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR с конечным объемом 25 мкл, в реакцию вносили 2 мкл реакционной смеси после ревертирования, содержащую кДНК и 7.5 пкмоль каждого из пары праймеров: *mTNF α* : прямой 5'-aatggcctccctctcatc-3' и обратный 5'-tttgatgccatgccgttg-3'; *mIL-1 β* : прямой 5'-acctgttcttgaagttgacg-3' и обратный 5'-gaaaagaaggtgctcatgtcc-3';

mIL-6: прямой 5'-gaggcttaattacacatgttc-3' и обратный 5'-aggcaaatctcctggttatatccagtt-3'; *mGAPDH*: прямой 5'-cagcctcgctccgtagaca-3' и обратный 5'-ttccgttgatgaacagcttc-3'.

Временной и температурный режим ПЦР для *mIL-1 β* , *mIL-4*, *mTGF β* и *mGAPDH*: 95°C – 15 с (первый шаг – 5 мин), 62°C – 20 с, 72°C – 40 с, 45 циклов ПЦР; для *mTNF α* : 95°C – 15 с (первый шаг – 5 мин), 54°C – 15 с, 72°C – 45 с, 45 циклов ПЦР. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 72°C. Результаты анализировали с использованием программы Bio-Rad CFX Manager 2.0. Уровень экспрессии мРНК генов *mTNF α* , *mIL-1 β* и *mIL-6* в клетках микроглии SIM-A9 измеряли относительно экспрессии конститутивного гена *mGAPDH* и выражали как $2^{-\Delta Ct}$, где $\Delta Ct = Ct_{\text{цитокина}} - Ct_{\text{GAPDH}}$, Ct – пороговый уровень флуоресценции, соответствующий номеру цикла ПЦР исследуемого образца, в котором флуоресценция отличается от фоново-

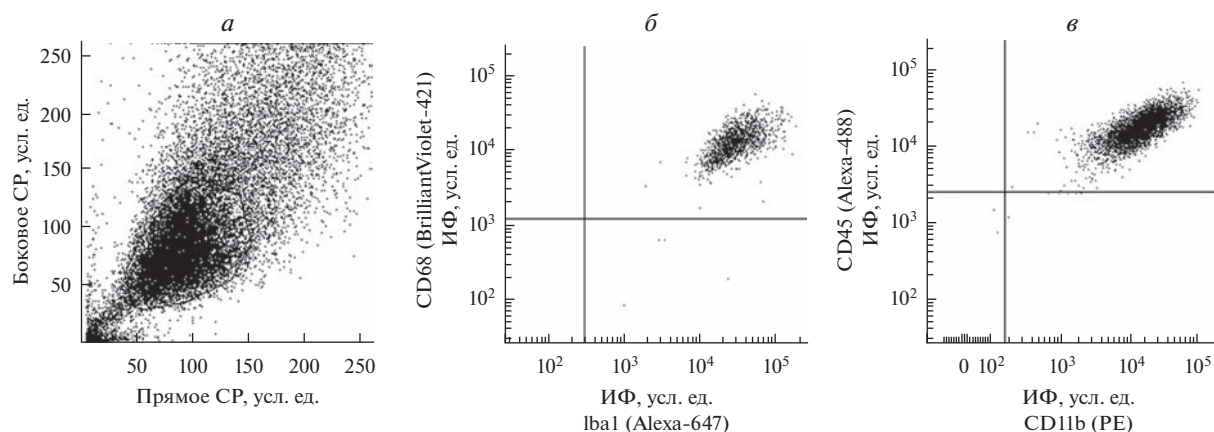


Рис. 1. Гистограммы прямого/бокового светорассеяния (CP) клеток микроглии мыши линии SIM-A9 (а) и уровня антигенов Iba1/CD68 (б) и CD11b/CD45 (в). Представлены данные проточной цитометрии с использованием соответствующих флуоресцентно меченных антител (Alexa, PE или Brilliant Violet). Приведены гистограммы одного из трех типичных экспериментов. ИФ – интенсивность флуоресценции здесь и на рис. 1–3, 6, 7.

го шума. Относительный уровень экспрессии генов в обработанных ЛПС клетках рассчитывали по отношению к среднему значению для контрольного образца, который принимали за единицу.

Анализ кариотипа клеток линии SIM-A9 с помощью метода многоцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (mFISH). Кариотип клеток анализировали, используя mFISH пробы 21XMouse (MetaSystems, Германия) для окраски полного генома. Окраску делящихся клеток на стадии метафазы проводили по методике производителя, хромосомы идентифицировали и анализировали с использованием программ ISIS/mFISH (MetaSystems, Германия), которые генерируют “псевдоцвета” на основании уникальных комбинаций 5 флуорохромов для идентификации каждой пары хромосом и структурных перестроек между ними. Структурные перестройки хромосом (абберации – AXp) классифицировали по системе mPAINT (Cornforth, 2001). AXp делили на простые разрывы хромосом (ацетрики и укороченные), простые обмены, происходящие из двух разрывов в двух хромосомах (дицентрики, транслокации, кольца, хроматидные обмены) и комплексные абберации, состоящие из трех и более разрывов в двух и более хромосомах. Для описания структурных и количественных аномалий хромосом было проанализировано 50 клеток SIM-A9.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы “Origin-Pro”. Все данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии маркеров покоящейся и активированной микроглии в клетках линии SIM-A9. Ранее

при иммуноцитохимическом окрашивании с использованием соответствующих антител и световой микроскопии (Nagamoto-Combs et al., 2014) было показано присутствие в клетках SIM-A9 внутриклеточных маркеров микроглии – белков Iba1 и CD68, которые экспрессируются как покоящимися, так и активированными клетками. Однако при этом наблюдали клетки с разной интенсивностью окрашивания этих антигенов. В то же время, высокий уровень экспрессии CD68 может свидетельствовать о присутствии в культуре активированных клеток микроглии.

Для анализа содержания покоящихся и активированных клеток в культуре микроглии SIM-A9 проводили их иммуноцитохимическое окрашивание флуоресцентно мечеными антителами к поверхностным маркерам CD11b и CD45 с последующей проточной цитометрией образцов. По данным светорассеяния показано, что культура представлена одной популяцией клеток (рис. 1а). При этом все клетки культуры экспрессировали не только молекулы Iba1 и CD68 (рис. 1б), но и CD11b и высокий уровень CD45 (рис. 1в), и имели, таким образом, фенотип CD11b/CD45^{high}, что соответствует активированной микроглии.

CD68 – трансмембранный белок, уровень которого повышается при воспалении и при активации микроглии ЛПС и IFN- γ , что показано для клеток микроглии мыши линии BV-2 (Wong et al., 2005). Известно, что в процессе активации макрофагов происходит передислокация основного пула молекул CD68 из внутриклеточных компартментов на поверхностную мембрану клеток (Ramprasad et al., 1996).

При окрашивании антигена CD68 на поверхностной мембране непроникаемых клеток SIM-A9 этот маркер обнаружен на мембране 72%

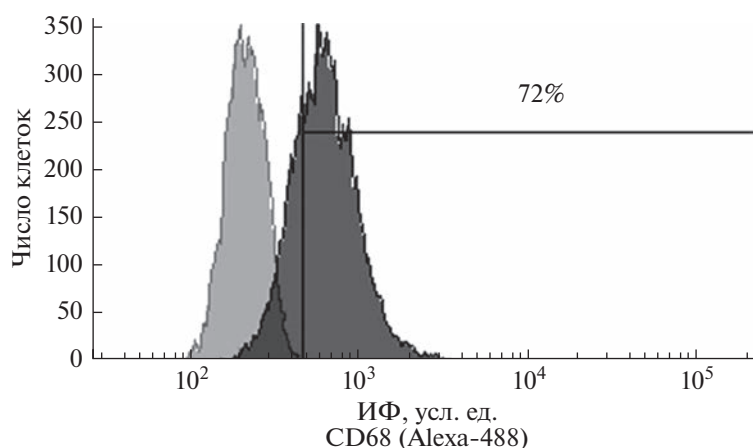


Рис. 2. Гистограмма уровня белка CD68 на поверхностной мембране клеток SIM-A9. Горизонтальной линией отмечена субпопуляция окрашенных CD68⁺ клеток, цифрами указано их количество. Левый пик — аутофлуоресценция, правый — окрашенные клетки. Приведены данные одного из трех типичных экспериментов.

клеток (рис. 2), что также соответствует фенотипу активированной микроглии.

Для подтверждения и дополнения полученных результатов клетки линии SIM-A9 были охарактеризованы с использованием еще одного маркера микроглии, белка TMEM119, и маркера активированной микроглии (макрофагов) белка TSPO. TMEM119 — специфический маркер микроглии, и в настоящее время *Tmem119* классифицируется как один из генов-маркеров фенотипа M0 микроглии мышей, который не экспрессируется нейральными клетками (Bohnert et al., 2020).

В отличие от TMEM119, белок-транслоказа TSPO, ранее известный как рецептор бензодиазепамина, используется в качестве маркера активированной по провоспалительному пути микроглии при нейровоспалении (Pannell et al., 2020). При анализе этих маркеров обнаружено, что все клетки микроглии линии SIM-A9 экспрессируют белки TMEM119 и TSPO

(рис. 3а, б соответственно), что соответствует активированной микроглии.

Таким образом, в результате проведенного исследования показан высокий уровень содержания таких маркеров активированной микроглии, как белок CD68 на поверхностной мембране клеток и внутриклеточный белок TSPO на наружной мембране митохондрий, а также соответствие клеток линии SIM-A9 фенотипу CD11b/CD45^{high}. Эти данные позволяют однозначно констатировать, что интактные клетки этой линии имеют фенотип активированной микроглии.

Характеристика активации клеток микроглии SIM-A9 под действием ЛПС. ЛПС является классическим индуктором провоспалительной активации микроглии, которая сопровождается усилением фагоцитоза, повышением секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов и АФК и АФА (Lively, Schlichter, 2018). В связи с тем, что ранее была показана актива-

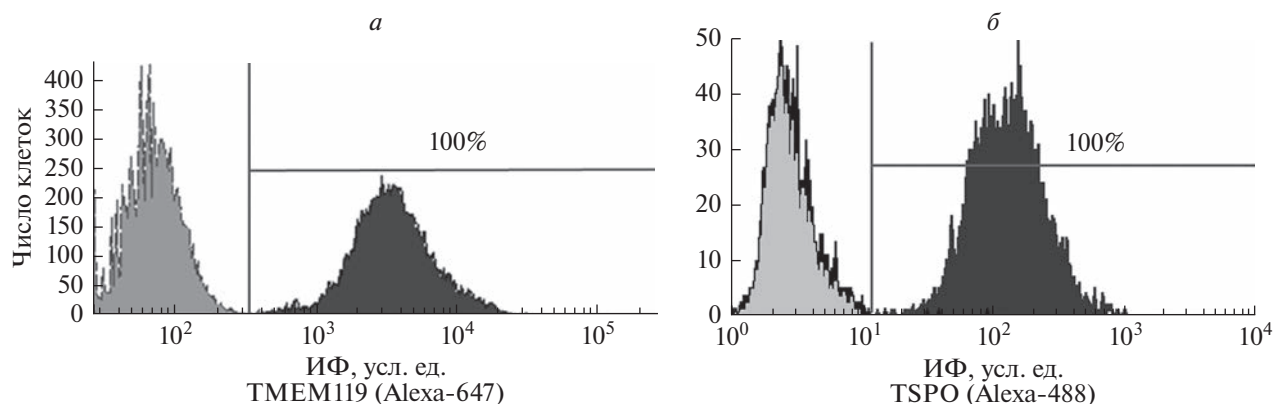


Рис. 3. Гистограммы уровня маркеров TMEM119 (а) и TSPO (б) в клетках линии SIM-A9. Горизонтальной линией отмечена субпопуляция окрашенных на TMEM119 (а) и TSPO (б) клеток, цифрами указано их количество. Левый пик — аутофлуоресценция, правый — окрашенные клетки. Приведены данные одного из трех типичных экспериментов.

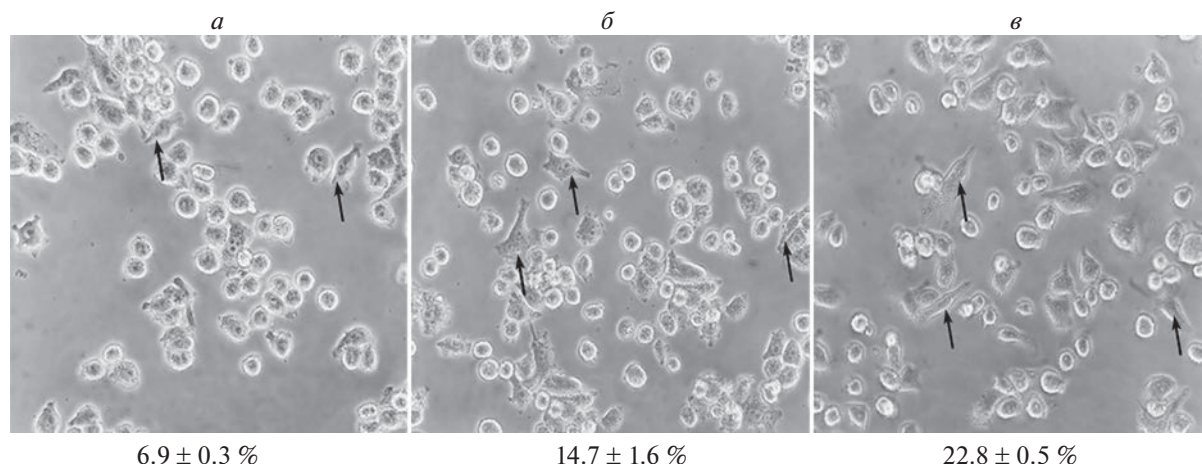


Рис. 4. Микрофотографии культуры клеток линии SIM-A9 в контроле (а) и через 24 ч после активации ЛПС в концентрации 5 (б) и 500 (в) нг/мл. Фазово-контрастная микроскопия. Цифрами указана доля клеток удлинённой формы с отростками (показаны стрелками). * — отличия доли клеток в культуре после действия ЛПС от контрольной культуры статистически значимы при $p < 0.05$. Увел. об.: 40×.

ция клеток микроглии линии SIM-A9 под действием ЛПС (Nagamoto-Combs et al., 2014), на следующем этапе работы мы исследовали воздействие этого агента на морфологию клеток SIM-A9, экспрессию генов провоспалительных цитокинов и уровень содержания АФК и АФА. При анализе экспрессии ряда маркеров, упомянутых выше, в клетках микроглии SIM-A9 через 24 ч после обработки 5 нг/мл ЛПС активированные клетки имели такой же фенотип, как и контрольные (см. рис. 1, 3), то есть, 100% клеток, обработанных ЛПС, были положительными по маркерам CD68, Iba1, CD11b, CD45, TSPO и TMEM119 (данные не показаны). Таким образом, 24-часовое воздействие ЛПС на клетки SIM-A9 не изменяет их фенотип.

При исследовании морфологии клеток SIM-A9 после активации ЛПС показано, что клетки контрольной культуры, не подвергавшиеся воздействию данного агента, имеют преимущественно округлую

форму и небольшое количество клеток удлинённой формы с отростками (рис. 4а). При культивировании клеток SIM-A9 в присутствии 5 и 500 нг/мл ЛПС доля клеток удлинённой формы с отростками возрастает за 24 ч до 14.7 ± 1.6 и $22.8 \pm 0.5\%$ соответственно против $6.9 \pm 0.3\%$ в контроле (рис. 4б, в). Таким образом, в присутствии ЛПС изменяется морфология части клеток линии SIM-A9, среди которых увеличивается доля удлинённых клеток с отростками.

Другие авторы ранее показали, что активация клеток SIM-A9 под действием 2.5 нг/мл ЛПС сопровождается увеличением секреции $\text{TNF}\alpha$ (Nagamoto-Combs et al., 2014). Мы провели исследование уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов в аналогичных условиях и показали, что ЛПС стимулирует повышение экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов в клетках линии SIM-A9 (рис. 5а–в). Культивирование клеток в присутствии этого агента приводило к увеличению экспрессии

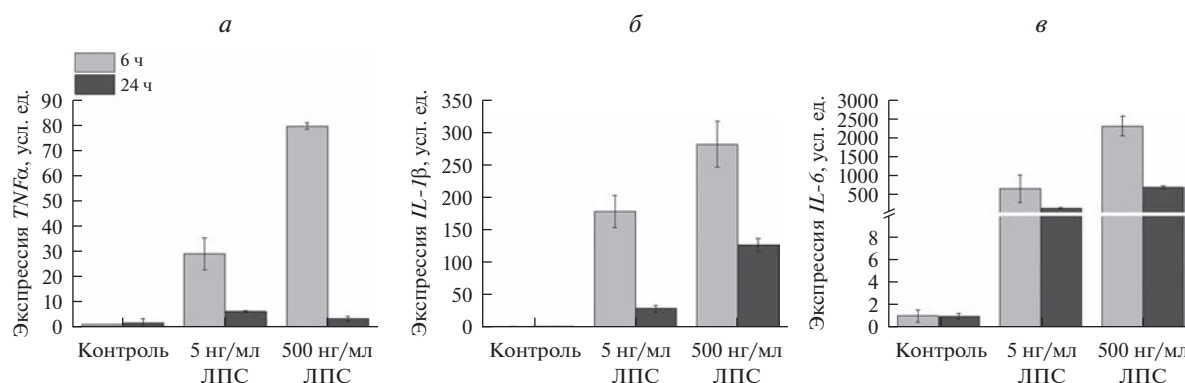


Рис. 5. Уровень экспрессии мРНК генов $\text{TNF}\alpha$ (а), $\text{IL-1}\beta$ (б) и IL-6 (в) в клетках микроглии линии SIM-A9 через 6 и 24 ч после стимуляции ЛПС в разной концентрации.

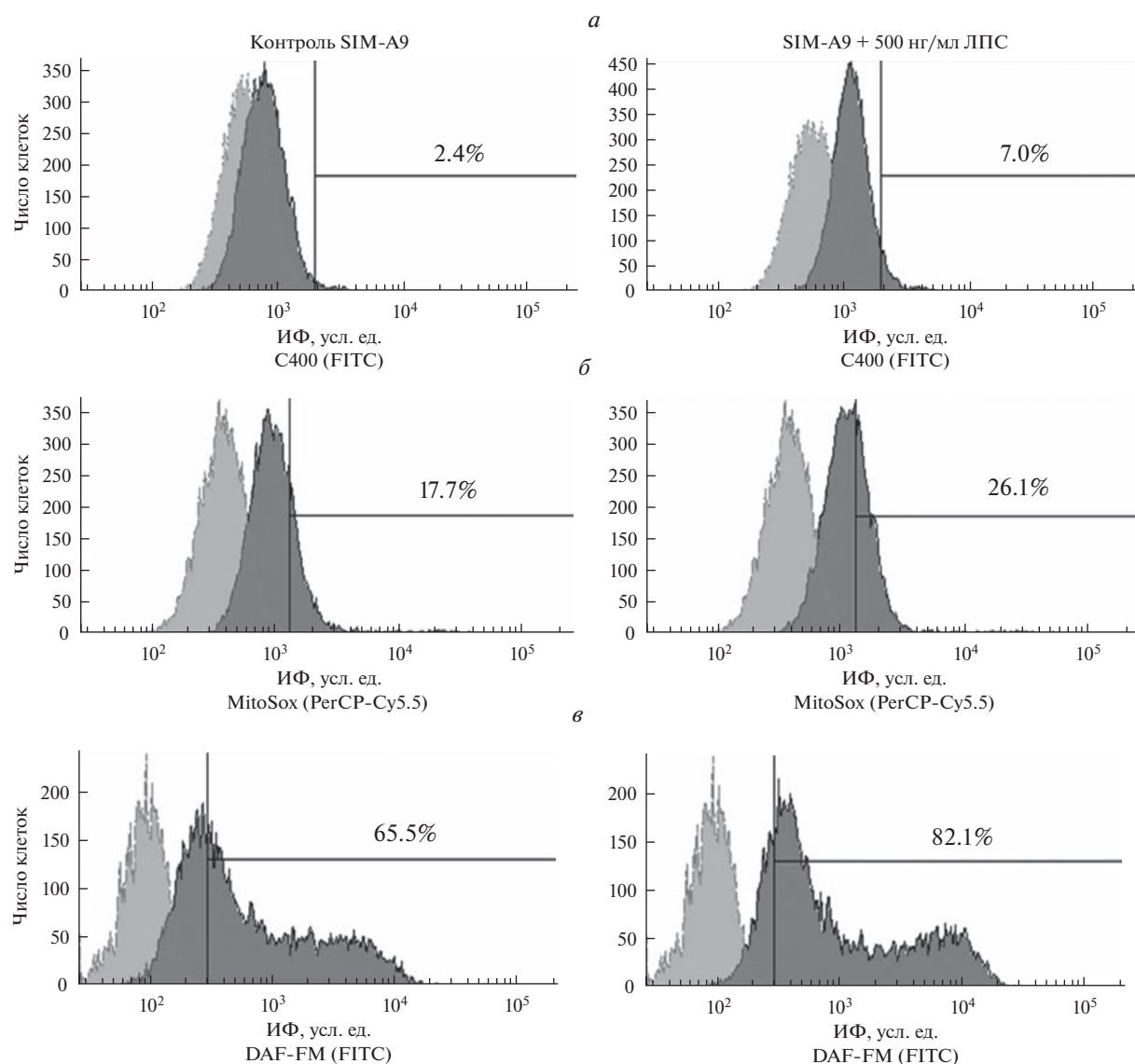


Рис. 6. Уровень активных форм кислорода (*а*), митохондриального супероксиданиона (*б*) и оксида азота (*в*) в контрольных клетках SIM-A9 (*левая колонка*) и обработанных 500 нг/мл ЛПС (*правая колонка*). Гистограммы получены с помощью проточной цитометрии после окрашивания клеток с флуоресцентными витальными красителями.

Горизонтальными линиями отмечены субпопуляции окрашенных на соответствующий маркер клеток, цифрами указано их количество. Левый пик — аутофлуоресценция, правый — окрашенные клетки. Приведены данные одного из трех типичных экспериментов.

мРНК *mTNFα* до 80 раз, *mIL-1β* — до 280 раз, *mIL-6* — до 2000 раз через 6 ч после воздействия ЛПС в дозе 500 нг/мл. При действии ЛПС в концентрации 5 нг/мл также обнаружено усиление экспрессии цитокинов, но в меньшей степени.

Через 24 ч культивирования в присутствии ЛПС уровень экспрессии мРНК *mTNFα*, *mIL-1β* и *mIL-6* снижался, но превышал уровень контроля в 20, 2,5 и 3 раза соответственно при концентрации ЛПС 500 нг/мл (рис. 5*а–в*). Аналогичное снижение экспрессии мРНК цитокинов через 24 ч наблюдали после добавления ЛПС в концентрации 5 нг/мл (рис. 5*а–в*).

Активация микроглии сопровождалась также и повышением продукции АФК и АФА. Так, показано (Nagamoto-Combs et al., 2014), что стимуляция клеток SIM-A9 ЛПС в дозе 2.5 нг/мл стимулирует продукцию оксида азота, активирует индуцибельную NO-синтазу и циклооксигеназу.

В настоящей работе мы исследовали способность клеток SIM-A9 отвечать на активацию ЛПС увеличением образования АФК и АФА при использовании красителей C400 (для анализа внутриклеточных АФК), MitoSox (для анализа митохондриального супероксид-аниона) и DAF-FM (для анализа оксида

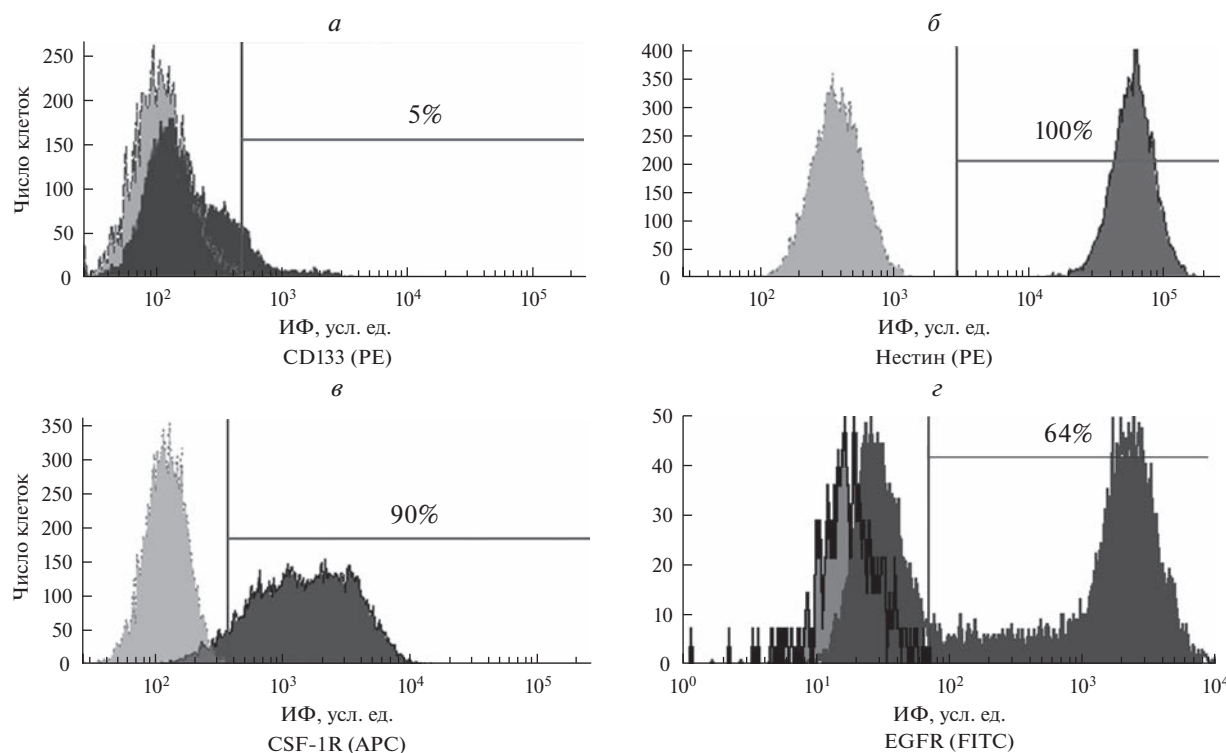


Рис. 7. Уровень CD133 (а), нестина (б), рецепторов CSF-1R (в) и EGFR (г) в клетках микроглии линии SIM-A9. Проточная цитометрия после окрашивания клеток с использованием соответствующих антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой (PE, APC или FITC). Горизонтальными линиями отмечены субпопуляции окрашенных на соответствующий маркер клеток, цифрами указано их количество. Левый пик – аутофлуоресценция, правый – окрашенные клетки. Приведены данные одного из трех типичных экспериментов.

азота) с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты представлены на рис. 6. Показано, что контрольные клетки характеризуются спонтанной продукцией АФК и АФА (рис. 6а–в). Активация клеток ЛПС приводила к увеличению образования всех исследованных метаболитов. Высокий уровень АФК и АФА, обнаруженный в контрольных клетках, коррелирует с фенотипом клеток SIM-A9, соответствующим активированной микроглии. При этом под воздействием ЛПС секреция этих метаболитов возрастала, что свидетельствует о дальнейшей функциональной активации клеток.

Генерация АФК и АФА происходит в норме в процессе жизнедеятельности клеток. Они имеют важное регуляторное значение: в зависимости от концентрации могут индуцировать или ингибировать процессы дифференцировки клеток, например, гемопоэтических и нейральных стволовых клеток, а также участвовать в регуляции апоптоза, синтеза цитокинов и влиять на пролиферацию этих клеток или индуцировать их гибель (Новиков и др., 2014). Поэтому можно полагать, что секреция АФК и АФА клетками микроглии, возрастающая при активации ЛПС, может оказывать воздействие на соседние клетки, эффект от которого будет зависеть от концентрации этих метаболитов.

Анализ экспрессии маркеров стволовых клеток и прогениторных клеток в культуре SIM-A9. Для определения количества стволовых клеток (СК), присутствующих в культуре SIM-A9, исследовали содержание CD133⁺-клеток. Трансмембранный гликопротеин CD133 – широко используемый маркер для идентификации СК из нормальных и опухолевых тканей. Показано (Prater et al., 2021), что CD133⁺-клетки из смешанной культуры коры головного мозга были способны продуцировать пул CD45⁺/CD11b⁺-микроглии *in vitro* и *in vivo*. При исследовании этого антигена в клетках линии SIM-A9 обнаружено, что размер субпопуляции клеток CD133⁺ составил $5.0 \pm 1.1\%$ (рис. 7а).

Присутствие клеток CD133⁺ в линии микроглии мыши позволяет полагать, что это СК, из которых образуются прогениторные активно пролиферирующие клетки микроглии.

Маркером СК, клеток-предшественников различных типов, в том числе нейронов, астроцитов и олигодендроцитов является нестин (Michalczyk et al., 2005). При исследовании содержания нестин⁺-клеток в культуре SIM-A9 показано, что 100% клеток линии экспрессируют этот маркер (рис. 7б). Это позволяет заключить, что культура клеток SIM-A9 представлена в основном прогениторными клетками.

Показано (Elmore et al., 2014; Huang et al., 2018), что восстановление пула резидентной микроглии в мозге мышей после ее истощения при действии ингибитора рецептора CSF-1 (препарата PLX5622) происходит в результате репопуляции и сопровождается появлением нестин⁺-клеток микроглии. При этом авторы убедительно доказали, что эти клетки происходят из сохранившихся после действия ингибитора клеток микроглии, а не из нестин⁺-нейральных СК, из которых образуются нейрональные клетки, астроциты и олигодендроциты. Действительно, нестин долгое время считался маркером только нейральных СК, из которых в процессе дифференцировки образуются нейроны, астроциты и олигодендроциты (Bernal, Arranz, 2018).

В настоящее время нестин обнаружен в культурах пролиферирующих СК разных типов и скорее является маркером пролиферирующих прогениторных клеток. Делящаяся микроглия мозга (Takamori et al., 2009; Askew et al., 2017) и сетчатки (Wohl et al., 2011) временно экспрессирует нестин во время репопуляции и развития воспалительной реакции. Известно, что фармакологические ингибиторы CSF-1R являются универсальным инструментом воздействия на пролиферацию микроглии (Green et al., 2020); ингибирование CSF-1R может снижать пролиферацию микроглии и модулировать ее фенотип при нейровоспалении, например, при прогрессирующем рассеянном склерозе (Hagan et al., 2020).

Специфичность таких ингибиторов не абсолютна. Так, показано (Lei et al., 2020), что PLX5622, наиболее эффективный из ингибиторов CSF-1R, влияет не только на микроглию, но также приводит к долгосрочным изменениям в миелоидных и лимфоидных компартментах костного мозга, селезенки и крови в результате подавления пролиферации соответствующих клеток-предшественников, экспрессирующих этот рецептор. Важно, что такие клеточные популяции, как правило, восстанавливаются после удаления агента, ингибирующего CSF-1R: в мозге репопуляция удаленной микроглии происходит в течение недели после прекращения действия ингибитора благодаря пролиферации сохранившихся клеток микроглии, которые экспрессируют нестин, а затем дифференцируются в микроглию, не содержащую нестин.

Таким образом, в клетках линии SIM-A9 обнаружено присутствие 5% CD133⁺-СК и высокий уровень экспрессии нестина во всех клетках. Это свидетельствует о том, что несмотря на фенотип активированных клеток микроглии, культура клеток линии SIM-A9 представлена низко дифференцированными прогениторными клетками микроглии.

Характеристика экспрессии рецепторов факторов роста на клетках микроглии линии SIM-A9. Пролiferация клеток микроглии может активироваться при связывании соответствующих лигандов с рецептором фактора CSF-1 (CSF-1R), CD115 и с рецептором

фактора EGF (EGFR). Поэтому было проведено исследование присутствия этих рецепторов на поверхностной мембране клеток линии SIM-A9.

При анализе экспрессии CSF-1R в клетках линии SIM-A9 мы обнаружили, что доля CSF-1R⁺-клеток составляет $93.0 \pm 2.4\%$ популяции (рис. 7е).

Рецептор EGF вовлечен в регуляцию пролиферации клеток многих типов. Кроме того, показана его роль и в процессе активации и миграции первичной микроглии мыши (Coniglio et al., 2012). Для определения уровня экспрессии EGFR на поверхностной мембране клеток микроглии SIM-A9 было проведено окрашивание клеток антителами к этому антигену. В культуре обнаружено две субпопуляции клеток: часть клеток не имела, или имела очень низкий уровень этого антигена, а субпопуляция клеток EGFR⁺ составляла $62.0 \pm 3.1\%$ (рис. 7з).

Ранее EGFR был обнаружен и в клетках микроглии мыши линии BV-2. Активация этих клеток морфином приводила к пропорциональному дозе и времени увеличению уровня экспрессии CD11b, уровня фосфорилирования EGFR и протеинкиназы ERK1/2, миграции клеток и продукции цитокинов IL-1 β и TNF α ; активация миграции и продукции провоспалительных цитокинов ингибировалась при блокировании сигнального пути EGFR под действием низкомолекулярного ингибитора этого рецептора AG1478 (Qu et al., 2012, 2015; Yang et al., 2021). Таким образом, в настоящее время накапливаются убедительные доказательства того, что ингибирование сигнального пути EGFR/ERK может представлять новый способ подавления активации микроглии, и присутствие EGFR на клетках линии SIM-A9, показанное в настоящей работе, позволяет использовать эти клетки для исследования эффективности таких ингибиторов.

Полученные нами результаты позволяют предположить существование, помимо классического пути стимуляции пролиферации клеток микроглии линии SIM-A9 через рецептор CSF-1R, и альтернативного механизма, связанного с активацией рецептора EGFR.

Анализ кариотипа клеток линии SIM-A9. Используемый в данной работе для анализа кариотипа метод mFISH позволяет точно идентифицировать каждую пару хромосом и воссоздать кариотип линии. На рис. 8а представлен нормальный кариотип мыши линии C57Bl/6 (21, XY), полученный при исследовании клеток костного мозга. Спонтанные АХр отсутствуют.

Типичные кариограммы клеток линии SIM-A9 показаны на рис. 8б. При цитогенетическом анализе клеток этой линии обнаружен сильно измененный кариотип с большим числом транслокаций и других перестроек хромосом, а также количественных аномалий. Обнаружен относительно стабильный гипотетраплоидный женский мышинный кариотип: число хромосом на метафазу варьировало от 50 до 61, выявлено

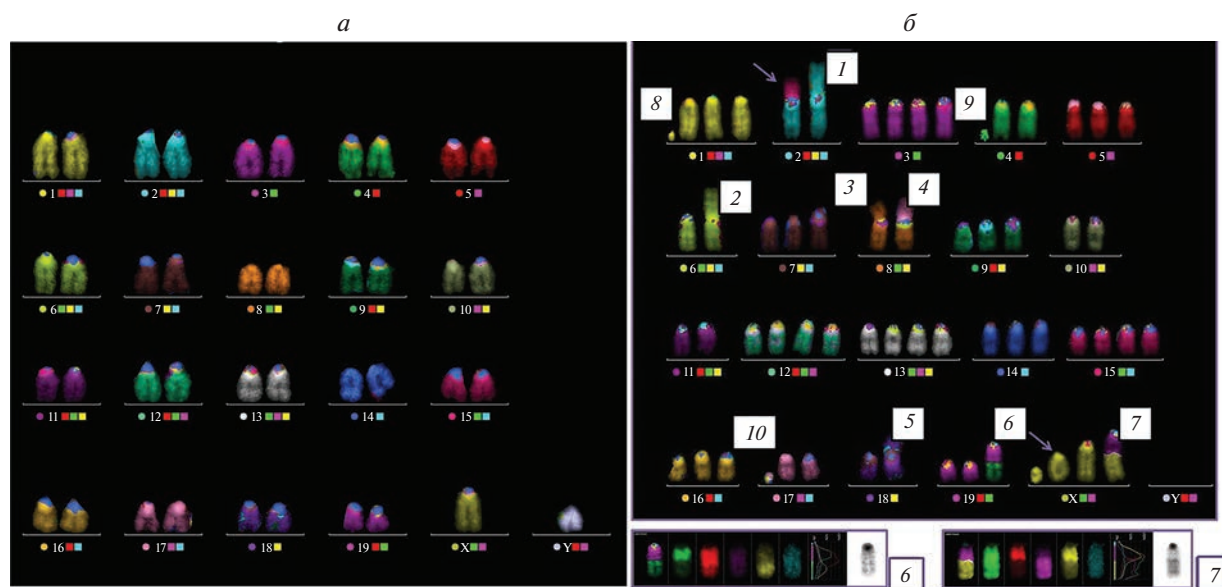


Рис. 8. Кариотип 21XY нормальных клеток костного мозга мыши линии C57Bl/6 (а) и типичная кариограмма клеток SIM (б; в данном случае содержится всего 60 хромосом). б – Цифрами 1–10 отмечены маркерные хромосомы; 1, 2, 3, 4, 5 – слияния по центромере двух хромосом номер 2, 6, 8, хромосом 8 и 17 и двух хромосом 18 соответственно; цифры 6 и 7 – транслокации 19*–4–9 и 11*–X (* означает часть хромосомы, несущую центромеру); 8 и 9 – сильно укороченные хромосомы 1 и 4; 10 – отдельная центромера; стрелками показаны дополнительные спонтанные АХр: слияние по центромере хромосом 2 и 15 и укороченная X-хромосома с ацентрическим фрагментом. На врезке внизу более детально представлены транслокации 6 и 7.

около 12 постоянных маркерных аномалий, таких как слияние хромосом по центромере (рис. 8б, хромосомы 1–5), транслокации (рис. 8б, хромосомы 6–7), включая комплексную мультитранслокацию (рис. 8б, см. цифру 6), возможно присутствие ацентрических мелких фрагментов или очень сильно редуцированных хромосом (рис. 8б, хромосомы 8–9), и отдельно лежащих центромер (рис. 8б, см. цифру 10). Число копий хромосом варьировало от 2 до 5. Более того, свыше 95% клеток имели неклональные структурные АХр, такие как хромосомные и хроматидные разрывы, транслокации и дицентрики (стрелки на рис. 8б).

В связи с тем, что все клетки линии SIM-A9 имеют структурные и количественные аномалии (такие как потеря и “лишние” копии хромосомы) и АХр, мы констатируем высокую хромосомную нестабильность линии. Значительные спонтанные хромосомные нарушения, выявленные в клетках линии SIM-A9, сходны с таковыми большинства immortalized клеточных линий и линий опухолевых клеток.

Итак, совокупность полученных результатов позволяет сделать следующее заключение. В настоящей работе впервые показано, что клетки линии SIM-A9 экспрессируют высокий уровень белка TSPO, маркеров CD68 и CD11b/CD45^{high} на поверхностной мембране клеток, что соответствует признакам активированной микроглии. Несмотря на это, клетки этой линии отвечают дополнительной активацией в ответ на стимуляцию ЛПС, которая приводит к повышению экспрессии генов провоспалительных ци-

токинов IL-1 β , TNF α , IL-6 и образованию высокого уровня АФК и АФА. Клетки линии SIM-A9 экспрессируют маркеры стволовых и прогениторных клеток CD133⁺ и нестин, что позволяет рассматривать клетки этой линии как ранние низко дифференцированные прогениторные клетки, несмотря на их фенотип, соответствующий активированной микроглии. Клетки линии SIM-A9 экспрессируют рецепторы двух факторов роста CSF-1 и EGF – CSF-1R и EGFR, что свидетельствует о возможности стимуляции пролиферации клеток SIM-A9 по двум альтернативным механизмам под действием соответствующих факторов. Кариотип клеток SIM-A9 характеризуется хромосомной нестабильностью, свойственной всем immortalized и опухолевым линиям. Выявленные структурные и количественные аномалии хромосом могут определять фенотипические и функциональные особенности этой линии.

Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать линию SIM-A9 в качестве альтернативы первичной микроглии для исследования механизмов развития нейродегенеративных заболеваний и состояний, обусловленных развитием нейровоспаления и изучения эффективности потенциальных терапевтических препаратов, способных регулировать про- и противовоспалительную активность микроглии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” и Объединенного института ядерных исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Москалева Е.Ю., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В. 2022. Анализ маркеров окислительного повреждения нейронов и нейровоспаления в отдаленный период после γ -облучения головы мышей в разных дозах Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 62 № 2. С. 171. (Moskaleva E.Yu., Rodina A.V., Semochkina Ju.P., Ysotskaya O.V. 2022. Analysis of neurons damage and level of neuroinflammation late after γ -irradiation of mice head at different doses. Radiacionnaja biologija. Radioekologija. V. 62 № 2. P. 171.) <https://doi.org/10.31857/S0869803122020059>
- Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. 2014. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Т. 12. № 4. С. 13. (Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova Y.V. 2014. Role of reactive oxygen species in cell physiology and pathology and their pharmacological regulation. Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther. Vol. 12. № 4. P. 13.) <https://doi.org/10.17816/RCF12413-21>
- Askew K., Li K., Olmos-Alonso A., Garcia-Moreno F., Liang Y., Richardson P., Tipton T., Chapman M.A., Riecken K., Becari S., Sierra A., Molnár Z., Cragg M.S., Garaschuk O., Perry V.H., Gomez-Nicola D. 2017. Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. Cell Rep. V. 18. P. 391. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041>
- Bachiller S., Jiménez-Ferrer I., Paulus A., Yang Y., Swanberg M., Deierborg T., Boza-Serrano A. 2018. Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response. Front. Cell Neurosci. V. 12. P. 488. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Becher B., Antel J.P. 1996. Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. Glia. V. 18. P. 1. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199609\)18:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199609)18:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-6)
- Bennett M.L., Bennett F.C., Liddel S.A., Ajami B., Zamanian J.L., Fernhoff N.B., Mulinyawe S.B., Bohlen C.J., Adil A., Tucker A., Weissman I.L., Chang E.F., Li G., Grant G.A., Hayden Gephart M.G., Barres B.A. 2016. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 113. P. 1738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Bernal A., Arranz L. 2018. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. Cell. Mol. Life Sci. V. 75. P. 2177. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>
- Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., Bistoni F. 1990. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J. Neuroimmunol. V. 27. P. 229. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V)
- Bohnert S., Seiffert A., Trella S., Bohnert M., Distel L., Ondruschka B., Monoranu C.M. 2020. TMEM119 as a specific marker of microglia reaction in traumatic brain injury in postmortem examination. Int. J. Legal Med. V. 134. P. 2167. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02384-z>
- Bonsack F., Sukumari-Ramesh S. 2018. TSPO: an evolutionarily conserved protein with elusive functions. Int. J. Mol. Sci. V. 19. P. 1694. <https://doi.org/10.3390/ijms19061694>
- Cornforth M.N. 2001. Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. Radiat. Res. V. 155. P. 643. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9432-8_15
- Coniglio S.J., Eugenin E., Dobrenis K., Stanley E.R., West B.L., Symons M.H., Segall J.E. 2012. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. Mol. Med. V. 18. P. 519. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00217>
- Coskun V., Wu H., Bianchi B., Tsao S., Kim K., Zhao J., Biancotti J.C., Hutnick L., Krueger R.C. Jr., Fan G., de Vellis J., Sun Y.E. 2008. CD133⁺ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 105. P. 1026. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710000105>
- Douglas M.R., Morrison K.C., Jacques S.J., Leadbeater W.E., Gonzalez A.M., Berry M., Logan A., Ahmed Z. 2009. Off-target effects of epidermal growth factor receptor antagonists mediate retinal ganglion cell disinhibited axon growth. Brain. V. 132. P. 3102. <https://doi.org/10.1093/brain/awp240>
- Elmore M.R., Najafi A.R., Koike M.A., Dagher N.N., Spangenberg E.E., Rice R.A., Kitazawa M., Matusow B., Nguyen H., West B.L., Green K.N. 2014. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. Neuron. V. 82. P. 380. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.040>
- Eyo U.B., Dailey M.E. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. 2013. J. Neuroimmune Pharmacol. V. 8. P. 494. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9434-z>
- Fischer O.M., Hart S., Ullrich A. 2006. Dissecting the epidermal growth factor receptor signal transactivation pathway. Methods Mol. Biol. V. 327. P. 85. <https://doi.org/10.1385/1-59745-012-X:85>
- Green K.N., Crapser J.D., Hohsfield L.A. 2020. To kill a microglia: A case for CSF1R inhibitors. Trends Immunol. V. 41. P. 771. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.001>
- Hagan N., Kane J.L., Grover D., Woodworth L., Madore C., Saleh J., Sancho J., Liu J., Li Y., Proto J., Zelic M., Mahan A., Kothe M., Scholte A.A., Fitzgerald M. 2020. CSF1R signaling is a regulator of pathogenesis in progressive MS. Cell Death Dis. V. 11. P. 904. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03084-7>
- Han J., Chitu V., Stanley E.R., Wszolek Z.K., Karrenbauer V.D., Harris R.A. 2022. Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) as a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases: opportunities and challenges.

- Cell. Mol. Life Sci. V. 79. P. 219.
https://doi.org/10.1007/s00018-022-04225-1
- Huang Y., Xu Z., Xiong S. 2018. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat. Neurosci.* V. 21. P. 530.
https://doi.org/10.1038/s41593-018-0090-8
- Jenkins S.J., Ruckerl D., Thomas G.D., Hewitson J.P., Duncan S., Brombacher F., Maizels R.M., Hume D.A., Allen J.E. 2013. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J. Exper. Med.* V. 210. P. 2477.
https://doi.org/10.1084/jem.20121999
- Jones S., Rappoport J.Z. 2014. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* V. 51. P. 23.
https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.014
- Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. 2020. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell Neurosci.* V. 14. P. 198.
https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198
- Kalm M., Andreasson U., Björk-Eriksson T., Zetterberg H., Pekny M., Blennow K., Pekna M., Blomgren K. 2016. C3 deficiency ameliorates the negative effects of irradiation of the young brain on hippocampal development and learning. *Oncotarget.* V. 7. P. 19382.
https://doi.org/10.18632/oncotarget.8400
- Lei F., Cui N., Zhou C., Chodosh J., Vavvas D.G., Paschalis E.I. 2020. CSF1R inhibition by a small-molecule inhibitor is not microglia specific; affecting hematopoiesis and the function of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 22. P. 23336.
https://doi.org/10.1073/pnas.1922788117
- Lively S., Schlichter L.C. 2018. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ + TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Front. Cell Neurosci.* V. 12. P. 215.
https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215
- Liu G.J., Middleton R.J., Hatty C.R., Kam W.W., Chan R., Pham T., Harrison-Brown M., Dodson E., Veale K., Banati R.B. 2014. The 18kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. *Brain Pathol.* V. 24. P. 631.
https://doi.org/10.1111/bpa.12196
- Mansour H.M., Fawzy H.M., El-Khatib A.S., Khattab M.M. 2022. Repurposed anti-cancer epidermal growth factor receptor inhibitors: mechanisms of neuroprotective effects in Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.* V. 17. P. 1913.
https://doi.org/10.4103/1673-5374.332132
- Michalczyk K., Ziman M. 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* V. 20. P. 665.
https://doi.org/10.14670/HH-20.665
- Muñoz-García J., Cochonneau D., Télétchéa S., Moranton E., Lanoe D., Brion R., Lézet F., Heymann M.F., Heymann D. 2021. The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics.* V. 11. P. 1568.
https://doi.org/10.7150/thno.50683
- Nagamoto-Combs K., Kulas J., Combs C.K. 2014. A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia. *J. Neurosci. Methods.* V. 15. P. 187.
https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.05.021
- Onyango I.G., Jauregui G.V., Čarná M., Bennett J.P. Jr., Stokin G.B. 2021. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Bio-medicines.* V. 9. P. 524.
https://doi.org/10.3390/biomedicines9050524
- Pannell M., Economopoulos V., Wilson T.C., Kersemans V., Isenegger P.G., Larkin J.R., Smart S., Gilchrist S., Gouverneur V., Sibson N.R. 2020. Imaging of translocator protein upregulation is selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia. *Glia.* V. 68. P. 280.
https://doi.org/10.1002/glia.23716
- Prater K.E., Aloï M.S., Pathan J.L., Winston C.N., Chernoff R.A., Davidson S., Sadgrove M., McDonough A., Zierath D., Su W., Weinstein J.R., Garden G.A. 2021. A Subpopulation of microglia generated in the adult mouse brain originates from Prominin-1-expressing progenitors. *J. Neurosci.* V. 41. P. 7942.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1893-20.2021
- Qu W.S., Liu J.L., Li C.Y., Li X., Xie M.J., Wang W., Tian D.S. 2015. Rapidly activated epidermal growth factor receptor mediates lipopolysaccharide-triggered migration of microglia. *Neurochem. Int.* V. 90. P. 85.
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.007
- Qu W.S., Tian D.S., Guo Z.B., Fang J., Zhang Q., Yu Z.Y., Xie M.J., Zhang H.Q., Lü J.G., Wang W. 2012. Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation.* V. 9. P. 178.
https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-178
- Ramprasad M.P., Terpstra V., Kondratenko N., Quehenberger O., Steinberg D. 1996. Cell surface expression of mouse macrophage and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93. P. 14833.
https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14833
- Sasaki Y., Ohsawa K., Kanazawa H., Kohsaka S., Imai Y. 2001. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 286. P. 292.
https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5388
- Stanley E.R., Chitu V. 2014. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* V. 6. P. a021857.
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021857
- Stansley B., Post J., Hensley K. 2012. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation.* V. 9. P. 115.
https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-115
- Takamori Y., Mori T., Wakabayashi T., Nagasaka Y., Matsuzaki T., Yamada H. 2009. Nestin-positive microglia in adult rat cerebral cortex. *Brain Res.* V. 1270. P. 10.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.014
- Waller R., Baxter L., Fillingham D.J., Coelho S., Pozo J.M., Mozumder M., Frangi A.F., Ince P.G., Simpson J.E., Highley J.R. 2019. Iba-1-/CD68⁺ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS One.* V. 25. P. e0210888.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210888
- Wohl S.G., Schmeer C.W., Friese T., Witte O.W., Isenmann S. 2011. In situ dividing and phagocytosing retinal microglia express nestin, vimentin, and NG2 in vivo. *PLoS One.*

- V. 6. P. e22408.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022408>
- Wong A.M., Patel N.V., Patel N.K., Wei M., Morgan T.E., de Beer M.C., de Villiers W.J., Finch C.E. 2005. Macrosialin increases during normal brain aging are attenuated by caloric restriction. *Neurosci. Lett.* V. 390. P. 76.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.07.058>
- Yan P., Wu X., Liu X., Cai Y., Shao C., Zhu G. 2019. A Causal relationship in spinal cord injury rat model between microglia activation and EGFR/MAPK detected by overexpression of microRNA-325-3p. *J. Mol. Neurosci.* V. 68. P. 181.
<https://doi.org/10.1007/s12031-019-01297-w>
- Yang Y., Sun Y., Hu R., Yan J., Wang Z., Li W., Jiang H. 2021. Morphine promotes microglial activation by upregulating the EGFR/ERK signaling pathway. *PLoS One.* V. 16 P. e0256870.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256870>

Microglia Cell Line SIM-A9 Features – New Data

D. A. Shaposhnikova^{a, *}, E. Yu. Moskaleva^a, Yu. P. Semochkina^a, O. V. Vysotskaya^a,
 O. V. Komova^b, E. A. Nasonova^b, and I. V. Koshlan^b

^aNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^bJoint Institute for Nuclear Research, Dubna, 141980 Russia

*e-mail: dasha-shap13@mail.ru

SIM-A9 is a line of spontaneously immortalized mouse microglia cells obtained from newborn C57BL/6 mice's cerebrum. The aim of this work is to characterize SIM-A9 line by the ratio of cells with the resting and activated microglia phenotype, to analyze the expression of stem/progenitor cell markers CD133 and nestin, growth factors receptors CSF-1R and EGFR, and the karyotype of this line. The light microscopy, immunocytochemistry, flow cytometry and RT/PCR were used to analyze the morphology, phenotype, and gene expression levels of pro-inflammatory cytokines, and the mFISH method was used to analyze the karyotype. It was shown for the first time that SIM-A9 cells express a high level of TSPO protein, CD68, CD11b and CD45 markers on the surface membrane of cells, which corresponds to the phenotype of activated microglia. Despite this, the cells of this line respond with additional activation to LPS stimulation, which leads to an increase in the pro-inflammatory cytokine genes IL-1 β , TNF α , IL-6 expression and a high level of active oxygen and nitrogen metabolites formation. It was shown that SIM-A9 cells express stem and progenitor cells markers, CD133⁺ and nestin, which allows us to consider the cells of this line as early poorly differentiated progenitor cells, despite their phenotype corresponding to activated microglia. It was also found that SIM-A9 cells express receptors of two growth factors CSF-1 and EGF, CSF-1R and EGFR, which indicates the possibility of SIM-A9 cells proliferation stimulation by two alternative mechanisms under the action of the corresponding factors. SIM-A9 cells have a hypotetraploid karyotype with a large number of structural and quantitative chromosome anomalies.

Keywords: microglia, cell line SIM-A9, karyotype, stem cells, CSF-1 receptor, EGF receptor, gene expression, cytokines

УДК 576.08:57.032

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ И ПОДАВЛЕНИЯ БИОСИНТЕЗА NAD^+ НА ПОДДЕРЖАНИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© 2023 г. М. В. Антипова¹, В. А. Куликова^{1,2}, Л. В. Соловьева¹, А. В. Кропотов¹, М. П. Светлова¹, А. П. Якимов^{1,3}, К. Б. Неринский⁴, Е. И. Бахмет¹, А. А. Никифоров^{1,*}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: andrey.nikiforov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 05.12.2022 г.

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) играет ключевую роль в клеточном метаболизме и сигналинге. В последние годы появилось множество свидетельств того, что NAD^+ -зависимые процессы принимают участие в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих. Основным способом поддержания уровня NAD^+ в клетках млекопитающих является его биосинтез из различных форм витамина B3. В настоящей работе мы выяснили, как стимуляция и подавление биосинтеза NAD^+ влияют на поддержание плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток мыши линии E14 Tg2a (клетки E14). Статус плюрипотентности клеток E14 оценивали при помощи иммуноцитохимического анализа и иммуноблоттинга с использованием антител к фактору плюрипотентности Oct4, а также окраски на щелочную фосфатазу. С помощью метода ЯМР-спектроскопии мы установили, что концентрация NAD^+ в плюрипотентных клетках E14, культивируемых в присутствии фактора ЛИФ, составляет около 4 нмоль/мг и остается неизменной после индукции дифференцировки ретиноевой кислотой. Также мы показали, что фармакологическая стимуляция биосинтеза NAD^+ никотинамидрибозидом повышает уровень внутриклеточного NAD^+ на 20%, и это не влияет на поддержание плюрипотентности клеток E14. Более того, в условиях критического истощения внутриклеточного пула NAD^+ при подавлении его синтеза из никотинамида ингибитором Nampt (FK866) клетки E14 сохраняли плюрипотентность, в то время как уровень белка Oct4 был понижен.

Ключевые слова: NAD^+ , ЯМР-спектроскопия, мышинные эмбриональные стволовые клетки E14 Tg2a, плюрипотентность, дифференцировка, Oct4

DOI: 10.31857/S0041377123030033, **EDN:** VBPSEK

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) играет ключевую роль в энергетическом метаболизме клетки, выполняя функцию переносчика электронов и водорода в окислительно-восстановительных реакциях центральных метаболических путей (Ying, 2008; Yang et al., 2016). Также NAD^+ является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, таких как деацетилазы белков сиртуины и поли(АДФ-рибозил)полимеразы (Yang et al., 2016; Kulikova et al., 2018).

Принятые сокращения: ЛИФ — лейкемия-ингибирующий фактор; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид; мЭСК — мышинные эмбриональные стволовые клетки; ЯМР — ядерный магнитный резонанс; NAD^+ — никотинамидадениндинуклеотид; NMN — никотинамидмононуклеотид; Nampt — никотинамидфосфорибозилтрансфераза; NR — никотинамидрибозид; PNP — пуриннуклеозидфосфорилаза.

Во многих случаях NAD^+ выступает как связующее звено между энергетическими процессами и сигнальной трансдукцией. Таким образом, этот динуклеотид может играть роль универсального посредника для регуляции и координации различных внутриклеточных процессов.

В последние годы появилось много свидетельств того, что NAD^+ -зависимые метаболические и сигнальные процессы являются важными факторами в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих. Было установлено, что высокий уровень аэробного гликолиза и отсутствие окислительного фосфорилирования являются определяющими признаками эмбриональных стволовых клеток человека и необходимы для поддержания их плюрипотентности (Gu et al.,

2016). Более того, было показано, что NAD^+ -зависимые деацетилазы сиртуины регулируют поддержание плюрипотентности и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши и человека при помощи различных механизмов (Fang et al., 2019).

Успешная регуляция NAD^+ -зависимых метаболических и сигнальных процессов зависит от того, насколько эффективно стволовой клетке удастся поддерживать определенный уровень данного динуклеотида. Происходит это в основном благодаря синтезу NAD^+ из никотинамида, известного как витамин В3, который образуется в результате расщепления NAD^+ в различных регуляторных процессах или поступает в организм с пищей. Помимо этого, NAD^+ может эффективно синтезироваться из других форм витамина В3, таких как никотиновая кислота и никотинамидрибозид (NR), а также образовываться *de novo* из триптофана (Yang et al., 2007; Nikiforov et al., 2015).

В настоящей работе на модели эмбриональных стволовых клеток мыши линии E14 Tg2 α (клеток E14) мы выясняли, меняется ли концентрация внутриклеточного NAD^+ при переходе клеток из плюрипотентного состояния в дифференцированное, и показали, как фармакологическая модуляция уровня NAD^+ путем подавления или стимуляции его биосинтеза может влиять на поддержание клеток в плюрипотентном состоянии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Антитела. В работе использовали кроличьи антитела к Oct4 (Abcam, Великобритания), мышинные антитела к Gapdh (Sigma, США), кроличьи антитела к IgG мыши и мышинные к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, США).

Культивирование клеток. Эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК) линии E14 Tg2 α (клетки E14) (Bay Genomics, США) выращивали на адгезивном пластике, обработанном 0.1%-ным раствором желатина (Sigma-Aldrich, США), в среде KnockOut DMEM (Thermo Scientific, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Thermo Scientific, США), 2 мМ L-глутамин (Thermo Scientific, США), 100 мкМ β -меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 15% инaktivированной эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), раствора незаменимых аминокислот (NEAA, Thermo Scientific, США) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Пересев клеток производили с использованием 0.05%-ного раствора трипсин/ЭДТА (Thermo Scientific, США). Метаболическую активность клеток оценивали при помощи теста на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тет-

разолиум бромида (МТТ) ("Росмедбио", Россия) согласно стандартному протоколу.

Для поддержания плюрипотентного состояния в среду для культивирования клеток добавляли лейкемия-ингибирующий фактор (ЛИФ) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 нг/мл. Для запуска дифференцировки клетки переводили на свежую питательную среду без ЛИФ, в которую добавляли ретиноевую кислоту (Sigma, США) в конечной концентрации 0.5 мкМ и культивировали в течение 4 сут со сменой среды на 2-ые сут. Степень плюрипотентности клеток оценивали с помощью иммуоцитохимического анализа и иммуноблоттинга с использованием кроличьих антител к транскрипционному фактору Oct4, а также окраски на щелочную фосфатазу. Для окраски плюрипотентных клеток на щелочную фосфатазу мЭСК фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) в течение 10 мин, инкубировали в 100 мМ трис-малеатном буфере (pH 9.0, Sigma, США), содержащем 4 мМ MgCl_2 , 0.2 мг/мл динатриевой соли 1-нафтил фосфата (Sigma, США), 0.5 мг/мл соли Fast Red TR (4-хлор-2-метилфенил, соль диазония) (Sigma, США). При появлении отчетливого красного окрашивания реакцию останавливали двукратной промывкой клеток фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ фосфатного буфера (VWR, США).

Имуноцитохимический анализ. Для иммуоцитохимического анализа клетки выращивали на 96 луночном планшете в присутствии ЛИФ или ретиноевой кислоты. Клетки фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего пермеабилizировали клеточную мембрану в течение 15 мин 0.1%-ным раствором Triton X-100 (Sigma, США), затем блокировали неспецифические сайты связывания 3%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (VWR, США) при комнатной температуре в течение 1 ч. Для специфической окраски на Oct4 клетки инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение 12 ч, и далее с раствором вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 568, при комнатной температуре в течение 1 ч. Ядра клеток окрашивали 0.05 мкг/мкл DAPI (Sigma, США). Окрашенные клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа The EVOS® FL Auto Imaging System (Life Technologies, США), оборудованного флуоресцентными фильтрами, подходящими для детекции Alexa Fluor 568 (531/40 нм при возбуждении, 593/40 нм при поглощении) и DAPI (357/44 нм при возбуждении, 447/60 нм при поглощении).

Определение концентрации белка, электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг. Для определения концентрации белка в экстрактах клеток E14 использовали ком-

мерческий набор Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), следуя протоколу производителя. Для подготовки проб к электрофоретическому разделению белков клетки лизировали в стандартном буфере Лэммли (Laemmli, 1970) при температуре 95°C в течение 10 мин. На дорожку наносили 10 мкг белка. Электрофорез и иммуноблотинг проводили по стандартному протоколу. Для детекции белков использовали специфические антитела к Oct4 и Gapdh, а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и реактивы для усиленной хемилюминесценции SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, США). Сигнал регистрировали и записывали при помощи Chemidoc Touch (Bio-Rad, США). Денситометрию полос, соответствующих Oct4 и Gapdh, проводили с использованием программы Image Lab (Bio-Rad, США). Для каждой экспериментальной точки анализировали три независимо приготовленных клеточных экстракта. Интенсивности полос Oct4 нормировали на интенсивности соответствующих полос Gapdh.

Фармакологическая модуляция уровня NAD^+ в клетках E14. Для стимуляции биосинтеза NAD^+ клетки E14 культивировали в течение 1 сут в присутствии 150 мкМ NR (любезно предоставлен проф. Мари Миго, Университет Южной Алабамы, США). Для ингибирования синтеза NAD^+ в питательную среду на 1 или 2 сут добавляли ингибитор никотинамид-фосфорибозилтрансферазы (Nampt) вещество FK866 (Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкМ.

ЯМР-метабономика. Для количественного анализа NAD^+ , NR, глюкозы и лактата в экстрактах клеток E14 использовали метод ^1H ЯМР-спектроскопии. Клетки выращивали на культуральных чашках 10 см, после достижения конфлюентности 80–90% клетки промывали 2 раза охлажденным до 4°C PBS и помещали на лед. Экстракцию метаболитов проводили на чашке 80%-ным метанолом в течение 30 мин при 4°C . Далее клетки соскребали с чашки и центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин при 4°C . Надосадочную жидкость лиофилизировали и ресуспендировали в буферном растворе на основе D_2O , содержащем $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и Na_2HPO_4 (pH 6.5) и 1 мМ сахарозу, которая используется в качестве внутреннего стандарта. Осадки использовали для количественного определения белка. Регистрацию и анализ ЯМР-спектров проводили в соответствии с протоколом, описанным в нашей предыдущей работе (Shabalin et al., 2018) с помощью DirectDrive NMR System 700 (^1H 700 MHz, Varian, США).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программы SigmaPlot 12.5. Для оценки различий между группами использовали t -тест, а также однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA) с апостериорными

сравнениями по критерию Тьюки. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы оценить возможные изменения концентрации внутриклеточного NAD^+ при переходе мЭСК из плюрипотентного состояния в дифференцированное, клетки E14 выращивали в стандартной питательной среде. Для поддержания плюрипотентного состояния клетки культивировали в присутствии ЛИФ (Wulansari et al., 2021), для запуска дифференцировки среду с ЛИФ убирали и добавляли питательную среду с ретиновой кислотой. Замена ЛИФ на ретиновую кислоту является стандартным способом получения клеток, лишенных плюрипотентных свойств, при котором дифференцировка мЭСК преимущественно направлена в производные эктодермы и клетки первичной энтодермы (Semrau et al., 2017). Степень плюрипотентности клеток E14 и клеток через 2 и 4 сут дифференцировки оценивали по морфологическим особенностям клеточной культуры, а также по наличию маркеров плюрипотентности — щелочной фосфатазы (Ginsburg et al., 1990) и транскрипционного фактора Oct4 (Kellner et al., 2010).

Как и ожидали, клетки E14, культивируемые в присутствии ЛИФ, образовывали характерные для плюрипотентных клеток шарообразные колонии, дающие положительную окраску на щелочную фосфатазу (рис. 1а, левая панель) и белок Oct4 (рис. 1б, верхние панели). Через 2 сут культивирования с ретиновой кислотой клетки перестают формировать шарообразные колонии, приобретают веретеновидные отростки и меньшее количество клеток красится на щелочную фосфатазу по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии ЛИФ (рис. 1а, средняя панель). После культивирования клеток с ретиновой кислотой в течение 4 сут, мы наблюдали только распластанные длинноотростчатые клетки, которые не окрашивались на щелочную фосфатазу (рис. 1а, правая панель). При помощи иммуноцитохимического анализа и иммуноблотинга мы показали, что фактор плюрипотентности Oct4 не экспрессируется в клетках E14 после их четырехсуточного культивирования с ретиновой кислотой (рис. 1б, нижние панели и рис. 1в), что также подтверждает потерю клетками плюрипотентных свойств.

Далее мы провели количественную оценку концентрации NAD^+ в клетках E14, находящихся в плюрипотентном состоянии, и через 4 сут после запуска их дифференцировки ретиновой кислотой. Для этого клетки лизировали 80%-ным метанолом и анализировали клеточные экстракты при помощи ЯМР-спектроскопии, как это описано в разделе “Материал и методика”. На рис. 1г представлены фрагменты ^1H ЯМР-спектров экстрактов клеток E14,

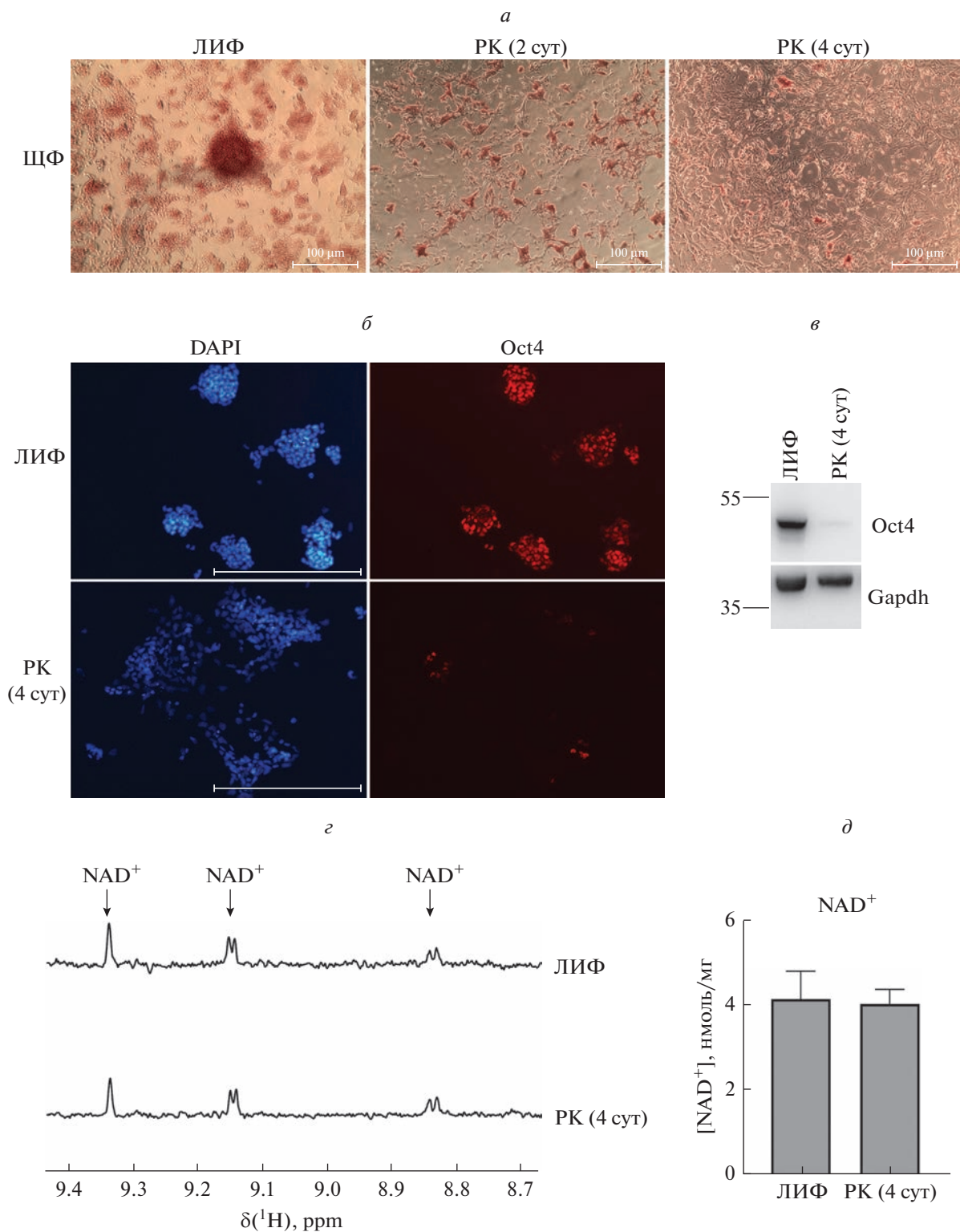


Рис. 1. Переход клеток E14 из плюрипотентного в дифференцированное состояние не влияет на концентрацию в них NAD⁺. Для поддержания плюрипотентного состояния клетки E14 культивировали в присутствии лейкемии ингибирующего фактора (ЛИФ), для запуска дифференцировки — в присутствии ретиноевой кислоты (РК) в течение 2 или 4 сут. *a* — Окраска клеток на щелочную фосфатазу (ЩФ); масштабный отрезок: 400 мкм. *б* — Иммуноцитохимический анализ с использованием антител к Oct4 (красный), ядра окрашены DAPI (синий); масштабный отрезок: 400 мкм. *в* — Анализ клеток методом иммуноблоттинга с использованием антител к Oct4 и Gapdh; слева указаны маркеры мол. массы, кДа. *г* — Фрагменты ¹H ЯМР-спектров экстрактов клеток E14, стрелками указаны пики, соответствующие NAD⁺. *д* — Количественная оценка уровня NAD⁺ в экстрактах клеток E14; данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения (*n* = 3).

содержащих пики, соответствующие NAD⁺. Количественный анализ данных спектров показал, что концентрация NAD⁺ в экстрактах, полученных из клеток E14, находящихся в плюрипотентном состоянии, составляет 4.170 ± 0.657 нмоль на 1 мг белка. При переходе клеток E14 из плюрипотентного в дифференцированное состояние уровень внутриклеточного NAD⁺ оставался неизменным (рис. 1д).

Далее нами была проведена оценка возможного влияния фармакологической модуляции уровня NAD⁺ на поддержание клеток E14 в плюрипотентном состоянии. Культивируемые клетки млекопитающих могут синтезировать NAD⁺ из содержащихся во всех стандартных питательных средах никотинамида и триптофана. Никотинамид конвертируется белком Nampt в никотинамидмононуклеотид (NMN), который в свою очередь аденилируется до NAD⁺ (Yang et al., 2016; Nikiforov et al., 2015).

Для стимуляции биосинтеза NAD⁺ мы использовали альтернативный эффективный предшественник NAD⁺ — NR (нуклеозидная форма витамина B3), который после попадания в клетку фосфорилируется до NMN никотинамидрибозидкиназой (Bieganski et al., 2004). К настоящему времени накопилось много подтверждений успешного использования NR в качестве агента, повышающего NAD⁺, в клетках млекопитающих различного происхождения (Cercillieux et al., 2022). В нашей экспериментальной модели культивирование клеток E14, находящихся в плюрипотентном состоянии, в присутствии 150 мкМ NR в течение 1 сут приводило к увеличению уровня внутриклеточного NAD⁺ на 20% по сравнению с контрольными клетками (рис. 2а, б).

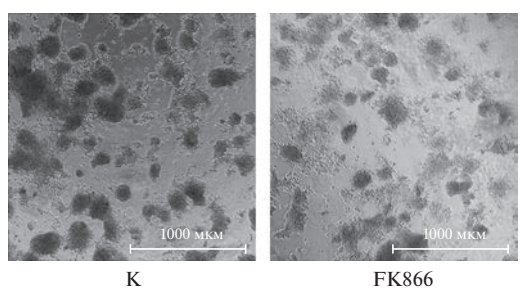
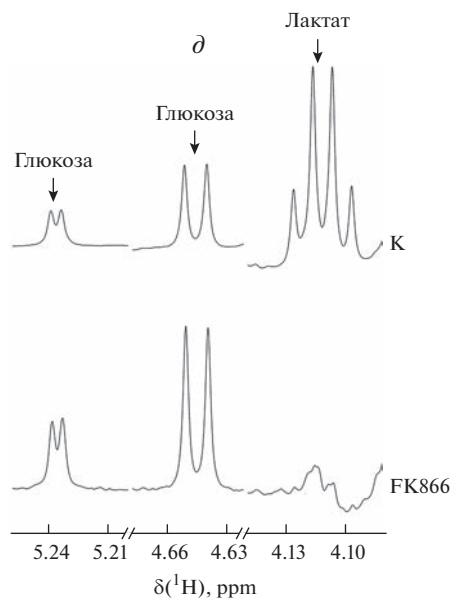
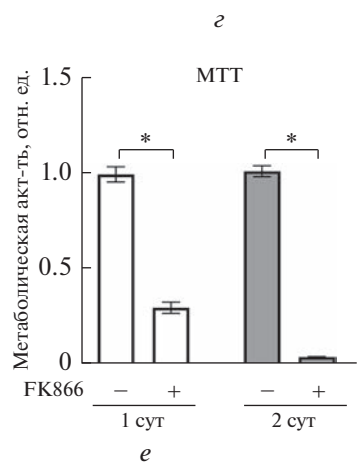
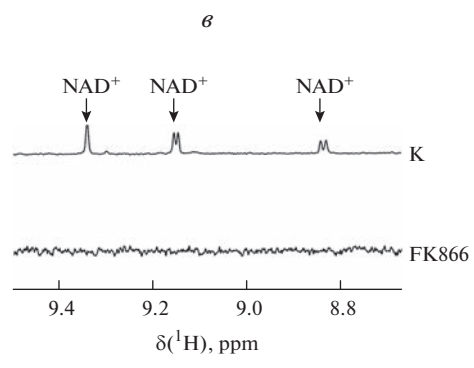
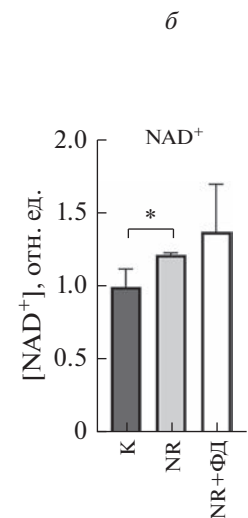
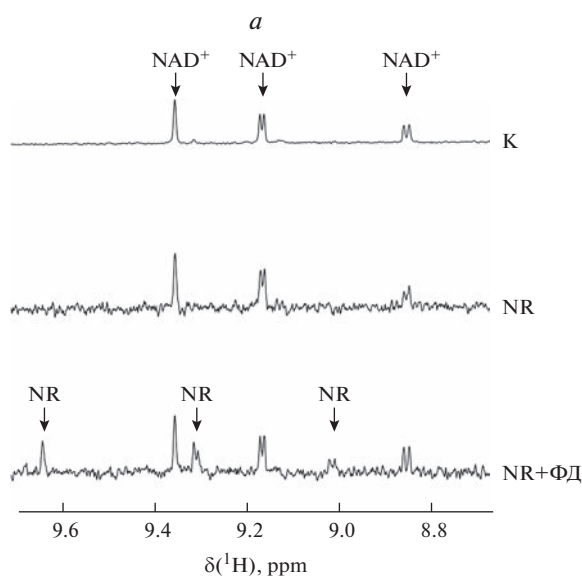
Ранее мы показали, что NR импортируется в культивируемые клетки человека представителями семейства уравнивающих переносчиков (Nikiforov et al., 2011; Kropotov et al., 2021), после чего помимо фосфорилирования до NMN этот нуклеозид интенсивно расщепляется до никотинамида цитозольной пуриннонуклеозидфосфорилазой (PNP) (Kropotov et al., 2022). Также мы продемонстрировали, что PNP-зависимое расщепление NR до никотинамида полностью подавляется специфическим ингибитором белка PNP фтородезином, в том числе в мЭСК линии E14 (Kropotov et al., 2022). Для того,

чтобы усилить действие нуклеозида NR в качестве предшественника NAD⁺, клетки E14 культивировали 1 сут в присутствии NR (150 мкМ) и 5 мкМ фтородезина. Подавление PNP-зависимого расщепления NR до никотинамида приводило к накоплению в клетках нуклеозида NR (рис. 2а, нижняя панель), однако уровень NAD⁺ менялся незначительно по сравнению с клетками, обработанными только NR (статистически значимых отличий не выявлено) (рис. 2б). Возможно, в данной экспериментальной модели NAD⁺ одинаково эффективно синтезируется как из NR напрямую, так и из никотинамида, генерируемого в результате расщепления NR, поэтому подавление внутриклеточной конвертации NR в никотинамид не приводило к повышению уровня NAD⁺. Поэтому для увеличения концентрации внутриклеточного NAD⁺ в последующих экспериментах мы культивировали клетки E14 с NR без дополнительной обработки фтородезином.

Далее мы оптимизировали условия получения жизнеспособной культуры плюрипотентных клеток E14 со значительно пониженным уровнем NAD⁺ при помощи фармакологического подавления биосинтеза NAD⁺ из никотинамида. Для этого клетки обрабатывали специфическим ингибитором Nampt веществом FK866 (Hassmann et al., 2003). Данные ЯМР-спектроскопии экстрактов мЭСК E14 указывают на то, что уже через 1 сут культивирования клеток в присутствии FK866 происходит полное истощение внутриклеточных запасов NAD⁺: уровень NAD⁺ в клеточных экстрактах находится ниже предела детекции (рис. 2в).

При помощи МТТ-теста мы также установили, что после культивирования в присутствии FK866 в течение 1 сут метаболическая активность клеток E14 падала на 70%, а через 2 сут понижалась до 4% по сравнению с контрольными клетками (рис. 2г). При этом, через 1 сут действия FK866 в клетках E14 наблюдали значительное снижение уровня лактата и увеличение концентрации глюкозы (рис. 2д), что также свидетельствует об общем снижении активности метаболических процессов в клетке, в частности гликолиза. Несмотря на критическое падение уровня внутриклеточного NAD⁺, а также снижение общей метаболической активности через 1 сут действия FK866, клетки E14 сохраняют жизнеспособ-

Рис. 2. Модуляция уровня NAD⁺ в клетках E14 в плюрипотентном состоянии. Для стимуляции биосинтеза NAD⁺ клетки культивировали в течение 1 сут в присутствии 150 мкМ никотинамидрибозида (NR) отдельно или совместно с 5 мкМ фтородезином (ФД); для подавления синтеза NAD⁺ клетки культивировали в присутствии 5 мкМ FK866. а, в, д — Фрагменты ¹H ЯМР-спектров экстрактов клеток E14; стрелками указаны пики, соответствующие NAD⁺, NR, глюкозе и лактату. б — Количественный анализ данных ¹H ЯМР-спектров, представленных на рис. 2а; даны средние значения и их стандартные отклонения ($n = 3$); среднее значение уровня NAD⁺ в контрольных клетках принимали за 1; * — разница с контролем достоверна при $p < 0.05$ (one-way ANOVA-анализ). г — Метаболическая активность клеток, отн. ед. (МТТ-тест); показаны средние значения и стандартные отклонения ($n = 3$), среднее значение метаболической активности в контрольных клетках принимали за 1; * — разница с контролем достоверна при $p < 0.05$ (парное сравнение, t -тест). е — Микрофотографии колоний клеток E14 до и после культивирования с FK866 в течение 1 сут, масштабный отрезок: 1000 мкм.



е

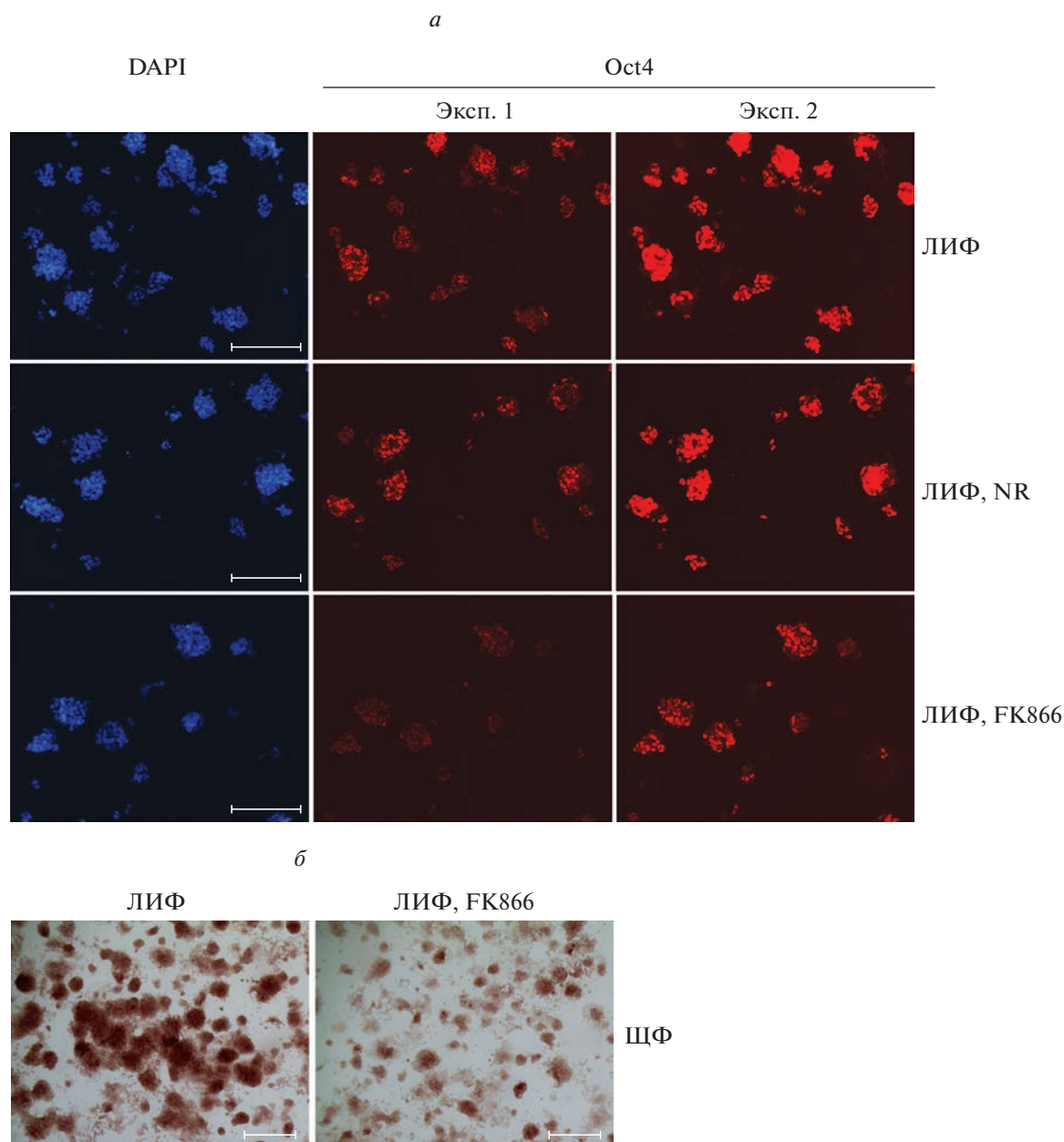


Рис. 3. Маркеры плюрипотентности в клетках E14 после стимуляции и подавления биосинтеза NAD^+ . Клетки выращивали в присутствии ЛИФ и обрабатывали NR (150 мкМ) или FK866 в течение 1 сут. *a* – Иммуноцитохимический анализ с использованием антител к Oct4 (красный); представлены изображения с меньшей (Эксп. 1) и большей (Эксп. 2) интенсивностью сигнала Oct4 для одного поля зрения; ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок: 200 мкм. *б* – Окрашка клеток на щелочную фосфатазу (ЩФ) до и после культивирования в присутствии FK866 в течение 1 сут; масштабный отрезок: 500 мкм.

ность и, более того, морфологию, характерную для плюрипотентных клеток (рис. 2е).

Итак, чтобы проверить, каким образом повышение или понижение концентрации внутриклеточного NAD^+ может повлиять на поддержание плюрипотентности мЭСК E14, клетки, культивируемые в присутствии ЛИФ, обрабатывали NR или FK866, как описано ранее. Как следует из данных иммуноцитохимического анализа, представленных на рис. 3а, стиму-

ляция синтеза NAD^+ введением NR не приводила к каким-либо заметным изменениям уровня Oct4. Удивительно, но даже в условиях критического снижения уровня внутриклеточного NAD^+ после действия FK866 (рис. 2в) мЭСК (E14) сохраняют маркеры плюрипотентности Oct4 (рис. 3а, *нижние панели*) и щелочную фосфатазу (рис. 3б). Тем не менее, мы наблюдали, что в клетках, обработанных FK866, интенсивность флуоресценции при окрашивании клеток на

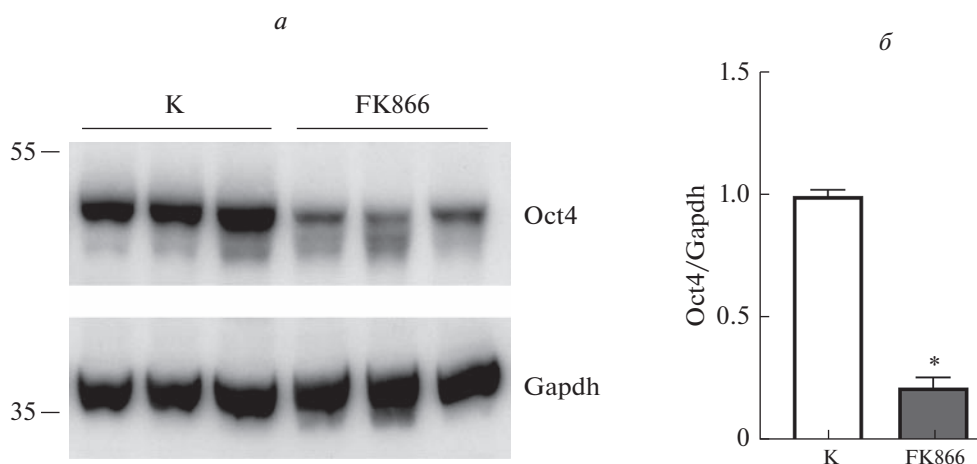


Рис. 4. Изменение уровня Oct4 в клетках E14 после подавления биосинтеза NAD^+ . Клетки выращивали в присутствии ЛИФ и обрабатывали FK866 в течение 1 сут. *a* — Иммуноблоты экстрактов клеток с использованием антител к белкам Oct4 и Gapdh; представлены результаты трех независимых экспериментов; слева указаны маркеры мол. массы, кДа. *б* — Результаты денситометрии полос иммуноблота; уровень Oct4 оценивали относительно уровня Gapdh, даны средние значения и стандартные отклонения ($n = 3$); отношение Oct4/Gapdh в контрольных клетках (К) принимали за 1; * — разница с контролем достоверна при $p < 0.05$ (парное сравнение, t -тест).

Oct4 и яркость хромогена Fast red после окрашивания клеток на щелочную фосфатазу меньше, чем в контрольных клетках (рис. 3а, нижние панели, 3б).

Для подтверждения этого наблюдения мы провели анализ клеток E14, обработанных FK866, при помощи иммуноблотинга с использованием антител к белкам Oct4 и Gapdh. Для этого денситометрировали полосы на иммуноблоте, соответствующие Oct4 и Gapdh (рис. 4а), после чего уровень Oct4 нормировали на Gapdh. Мы продемонстрировали, что содержание Oct4 в клетках, обработанных FK866, падает более чем на 80% по сравнению с контрольными клетками (рис. 4б).

Известно, что активность таких NAD^+ -зависимых ферментов как деацетилазы белков сиртуины (SIRT) и поли(АДФ-рибозил)полимеразы (PARP) может напрямую влиять на экспрессию различных факторов плюрипотентности. В частности, было показано, что белки Sirt1 и Parp1 стимулируют экспрессию гена, кодирующего белок Oct4 в эмбриональных стволовых клетках млекопитающих (Roper et al., 2014; Hwang et al., 2017). Возможно, наблюдаемый нами пониженный уровень Oct4 в клетках E14 в условиях критического снижения концентрации NAD^+ является результатом подавления активности белков Sirt и (или) Parp, которые используют этот динуклеотид в качестве субстрата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят проф. Мари Миго (Marie Mignaud) из Университета Южной Алабамы, США за любезно предоставленный никотинамидрибозид (NR). Работа бы-

ла выполнена с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбПУ”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00319). Эксперименты с фармакологическим подавлением активности пуриноклеозидфосфорилазы поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 19-34-60039).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bieganski P., Brenner C. 2004. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD^+ in fungi and humans. *Cell*. V. 117. P. 495.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00416-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00416-7)
- Cercillieux A., Ciarlo E., Canto C. 2022. Balancing $NAD(+)$ deficits with nicotinamide riboside: therapeutic possibilities and limitations. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 79 P. 463.
<https://doi.org/10.1007/s00018-022-04499-5>
- Fang Y., Tang S., Li X. 2019. Sirtuins in metabolic and epigenetic regulation of stem cells. *Trends Endocrin. Metabolism*. V. 30 P. 177.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.12.002>

- Ginsburg M., Snow M.H., McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* (Cambridge, England), V. 110. P. 521. <https://doi.org/10.1242/dev.110.2.521>
- Gu W., Gaeta X., Sahakyan A., Chan A.B., Hong C.S., Kim R., Braas D., Plath K., Lowry W.E., Christofk H.R. 2016. Glycolytic metabolism plays a functional role in regulating human pluripotent stem cell state. *Cell Stem Cell*. V. 19. P. 476. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.008>
- Hasmann M., Schemainda I. 2003. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*. V. 63 P. 7436.
- Hwang B., Madabushi A., Adhikary G., Kerr C., Lu A. 2017. Histone deacetylase SIRT1 facilitates Oct4 gene expression and generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Adv. Res. Ther.* V. P. J108. <https://doi.org/10.000008> <https://doi.org/10.29011/SCRT-108>
- Kellner S., Kikyo N. 2010. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol. Histochem.* V. 25 P. 405. <https://doi.org/10.14670/hh-25.405>
- Kropotov A., Kulikova V., Nerinovsky K., Yakimov A., Svetlova M., Solovjeva L., Sudnitsyna J., Migaud M.E., Khodorkovskiy M., Ziegler M., Nikiforov A. 2021. Equilibrative nucleoside transporters mediate the import of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside into human cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22 P. 1391. <https://doi.org/10.3390/ijms22031391>
- Kropotov A., Kulikova V., Solovjeva L., Yakimov A., Nerinovsky K., Svetlova M., Sudnitsyna J., Plusnina A., Antipova M., Khodorkovskiy M., Migaud M.E., Gambaryan S., Ziegler M., Nikiforov A. 2022. Purine nucleoside phosphorylase controls nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* V. 298 P. 102615. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102615>
- Kulikova V.A., Gromyko D.V., Nikiforov A.A. 2018. The regulatory role of NAD in human and animal cells. *Biochemistry. Biokhimiia*. V. 83 P. 800. <https://doi.org/10.1134/s0006297918070040>
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. V. 227 P. 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Nikiforov A., Dölle C., Niere M., Ziegler M. 2011. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J. Biol. Chem.* V. 286 P. 21767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213298>
- Nikiforov A., Kulikova V., Ziegler M. 2015. The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* V. 50 P. 284. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1028612>
- Roper S.J., Chrysanthou S., Senner C.E., Sienerth A., Gnan S., Murray A., Masutani M., Latos P., Hemberger M. 2014. ADP-ribosyltransferases Parp1 and Parp7 safeguard pluripotency of ES cells. *Nucleic Acids Res.* V. 42. P. 8914. <https://doi.org/10.1093/nar/gku591>
- Semrau S., Goldmann J.E., Soumillon M., Mikkelsen T.S., Jaenisch R., van Oudenaarden A. 2017. Dynamics of lineage commitment revealed by single-cell transcriptomics of differentiating embryonic stem cells. *Nature Commun.* V. 8. P. 1096. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01076-4>
- Shabalin K., Nerinovsky K., Yakimov A., Kulikova V., Svetlova M., Solovjeva L., Khodorkovskiy M., Gambaryan S., Cunningham R., Migaud M.E., Ziegler M., Nikiforov A. 2018. NAD Metabolome analysis in human cells using ¹H NMR spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 3906. <https://doi.org/10.3390/ijms19123906>
- Wulansari N., Sulistio Y.A., Darsono W.H.W., Kim C.H., Lee S.H. 2021. LIF maintains mouse embryonic stem cells pluripotency by modulating TET1 and JMJD2 activity in a JAK2-dependent manner. *Stem Cells*. V. 39 P. 750. <https://doi.org/10.1002/stem.3345>
- Yang T., Chan N.Y., Sauve A.A. 2007. Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. *J. Med. Chem.* V. 50 P. 6458. <https://doi.org/10.1021/jm701001c>
- Yang Y., Sauve A.A. 2016. NAD⁺ metabolism: bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim. Biophys. Acta. — Proteins and Proteomics*. V. 1864. P. 1787. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.014>
- Ying W. 2008. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants Redox Signal.* V. 10 P. 179. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>

Impact of the Stimulation and Inhibition of NAD⁺ Biosynthesis on the Maintenance of Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells

M. V. Antipova^a, V. A. Kulikova^{a, b}, L. V. Solovjeva^a, A. V. Kropotov^a, M. P. Svetlova^a, A. P. Yakimov^{a, c}, K. B. Nerinovsky^d, E. I. Bakhmet^a, and A. A. Nikiforov^{a, *}

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^bSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

^cPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

^dSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: andrey.nikiforov@gmail.com

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) plays a key role in cellular metabolism and signaling. In recent years, evidence has accumulated that NAD⁺-dependent processes are involved in the regulation of pluripotency and differentiation of mammalian embryonic stem cells. The major means to maintain NAD⁺ levels in mammalian cells is through its biosynthesis from various forms of vitamin B3. In this study, we examined how stimulation and inhibition

of NAD^+ biosynthesis affect the maintenance of the pluripotency of mouse embryonic stem cells E14 Tg2a (E14 cells). The pluripotency status of E14 cells was assessed by immunocytochemical and immunoblotting analysis using antibodies to the pluripotency factor Oct4, as well as by staining for alkaline phosphatase. Using NMR spectroscopy, we have found that the concentration of NAD^+ in pluripotent E14 cells cultured in the presence of LIF is about 4 nmol/mg, and it remains unchanged after induction of differentiation with retinoic acid. We have also demonstrated that pharmacological stimulation of NAD^+ biosynthesis by nicotinamide riboside increases the level of intracellular NAD^+ by 20%, but it does not affect the maintenance of pluripotency in E14 cells. Moreover, under conditions of critical depletion of NAD^+ pool by Nampt inhibition with FK866 E14 cells maintained pluripotency, though the expression level of Oct4 was decreased.

Keywords: NAD^+ , NMR spectroscopy, mouse embryonic stem cells Tg2a E14, pluripotency, differentiation, Oct4

УДК 57.085.23

НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ТИТАНА ПОДАВЛЯЮТ ЭНТОЗ В КУЛЬТУРЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MCF-7

© 2023 г. О. П. Кисурина-Евгеньева¹*, М. А. Савицкая¹, Д. С. Смешнова¹, Г. Е. Онищенко¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: evgengeva@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2022 г.

После доработки 09.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Наночастицы TiO_2 широко применяются в промышленности, фармакологии, медицине. В последнее время предлагается использовать наночастицы TiO_2 для адресной доставки химиотерапевтических препаратов, что может привести к увеличению локальной концентрации TiO_2 и оказать влияние на протекающие в опухоли процессы, в т.ч. на энтоз (внедрение одной опухолевой клетки в другую). В настоящей работе проведено исследование влияния наночастиц TiO_2 (частиц минерала анатаз размером менее 25 нм и частиц, состоящих из смеси анатаза и рутила, размером менее 75 нм в концентрации 1, 10 или 100 мкг/мл в течение 72 ч) на процесс энтоза в культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Культивирование клеток в присутствии разных типов наночастиц TiO_2 замедляет пролиферацию и вызывает уменьшение числа энтозов. Элементный анализ с помощью аналитической электронной микроскопии выявил присутствие TiO_2 в эндосомном компартменте, в цитозоле и во внеклеточном пространстве. Методом иммунохимического окрашивания показано, что оба типа наночастиц TiO_2 в концентрации 10 мкг/мл нарушают образование адгезивных контактов, в т.ч. и на ранних стадиях энтоза. Воздействие частиц анатаза индуцирует транслокацию белка p53 в ядра клеток. В целом, использованные в работе наночастицы TiO_2 ингибируют энтоз в клетках культуры MCF-7, нарушая адгезивные контакты и препятствуя процессу внедрения. Однако можно предположить, что нарушение адгезивных контактов способно усиливать подвижность опухолевых клеток и метастазирование.

Ключевые слова: адгезивные контакты, диоксид титана, наночастицы, p53, энтоз

DOI: 10.31857/S0041377123030045, **EDN:** VCHENQ

В настоящее время нанотехнологии являются одним из приоритетных направлений развития науки и техники. Наночастицы (от 1 до 100 нм) различного происхождения широко используются в медицине и в промышленности. К таким наночастицам относится диоксид титана (TiO_2), применяемый в фармакологии при изготовлении оболочек таблетированных препаратов, при изготовлении декоративной косметики, в производстве красок и т.д. (Fage et al., 2016). В природе TiO_2 существует в трех формах: рутил, анатаз и брукит (Rossi et al., 2010). Наиболее инертен среди них рутил. Анатаз, в отличие от всех остальных форм, является наиболее реакционно-способным из-за наличия фотокаталитических свойств (Nugum et al., 2005). Цитотоксичность наночастиц TiO_2 была показана на различных типах культивируемых клеток. Наночастицы TiO_2 вызывали генерацию активных форм кислорода и окислительный стресс (Sayes et al., 2006; Hanot-Roy et al., 2016), ацетилирование белков (Sund et al., 2014), изменение фосфопотеома белков, регулирующих процессы апоптоза, внутриклеточного транспорта, воспаления (Biola-Clier et al., 2020), повреждение ДНК и ак-

тивацию апоптоза (Lagopati et al., 2014; Wang et al., 2015; Trang et al., 2021), а также нарушение структуры адгезивных контактов (Setyawati et al., 2013).

Как было показано, при попадании наночастиц TiO_2 в организм при разных способах их введения они накапливаются в тканях почек, печени, легких, головного мозга. Наночастицы оказывали кратковременный токсический эффект, вызывая воспалительную реакцию в легких (Warheit et al., 2006), гистопатологические и функциональные нарушения в тканях печени и почек (Wang et al., 2007). Однако значимого токсического эффекта наночастиц TiO_2 *in vivo* обнаружено не было. В связи с этим, в последнее время разрабатываются способы клинического использования наночастиц TiO_2 в терапии опухолей (в т.ч. на модели клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7) для адресной доставки химиотерапевтических препаратов (Zeng et al., 2015; Ding et al., 2016). Побочным эффектом адресной доставки химиотерапевтических препаратов с использованием наночастиц TiO_2 может являться влияние собственно наночастиц на различные процессы, проходящие в опухолевых тканях, в т.ч. стимулирующих опухоле-

вую прогрессию. Одним из таких процессов является энтоз.

Энтоз представляет собой внедрение одной клетки эпителиального происхождения в другую клетку. Внедрение происходит за счет образования адгезивных контактов и работы актомиозиновой системы внедряющейся клетки. Внедрившаяся клетка может со временем покинуть энтозную вакуоль или подвергнуться лизосомно-опосредованной деградации, что приводит к уменьшению числа опухолевых клеток. С другой стороны, внедрившаяся клетка может служить источником питательных веществ для энтозной (наружной) клетки (Overholtzer et al., 2007; Garanina et al., 2017), способствуя ее выживанию. Кроме того, и наружная, и внедрившаяся клетка могут вступить в митоз (Krishna, Overholtzer, 2016; Кисурина-Евгеньева и др., 2018). Наличие крупной вакуоли нарушает нормальное завершение митоза энтозной клетки, что приводит к появлению полиплоидных клеток и повышению генетической нестабильности опухоли (Krajcovic et al., 2011; Garanina et al., 2017). Таким образом, энтоз может как способствовать, так и препятствовать развитию опухоли.

Целью работы является оценка влияния наночастиц диоксида титана (TiO_2) на протекание процесса энтоза в клетках культуры аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). При этом использовали два типа наночастиц: анатаз, ≤ 25 нм (далее A25) и смесь анатаза и рутила, ≤ 75 нм (далее AP75).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и наночастицы TiO_2 . Клетки культуры MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) получены из НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки выращивали в среде DMEM (ПанЭко Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (PAA Laboratories, Австрия) и 80 мг/мл гентамицина (ПанЭко) при 37°C и 5% CO_2 . Клетки высаживали в чашки Петри на покровные стекла в концентрации 200 тыс./мл. Через 24 ч к клеткам добавляли наночастицы TiO_2 в форме анатаза размером менее 25 нм (далее A25) (Sigma, 637254, США) или наночастицы, состоящие из смеси анатаза и рутила, с размером менее 75 нм (далее AP75) (Sigma, 13463-67-7, США). Культивирование клеток в присутствии наночастиц проводили в течение трех сут. Концентрация наночастиц TiO_2 составляла 1, 10 или 100 мкг/мл.

Морфологический анализ. Клетки фиксировали 96% этанолом (-20°C) и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. На полученных свето-микроскопических препаратах по морфологическим признакам считали число энтозов (энтотический индекс, в %), митозов (митотический индекс, в %) и апоптозов (апоптотический индекс, в %) ($n = 3000$ клеток в каждом из 3-х биологи-

ческих повторов эксперимента; на графиках указаны средние значения и их ошибка). На этих же препаратах (для концентрации наночастиц 10 мкг/мл) оценивали влияние наночастиц на увеличение числа клеток в процессе культивирования (до внесения наночастиц и через 3 сут после внесения). Число клеток считали, используя объектив с увеличением $40\times$ в 10 полях зрения (в 3-х биологических повторах, по 40 полей зрения в каждом, на графиках указаны значения среднего и ошибка среднего).

Иммуноцитохимия и обработка изображений. Для выявления белков β -катенина и p53 клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом (02194047-CF, MP Biochemicals, Франция), приготовленным на 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) pH 7.2, обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X100 (Sigma, США) и отмывали в 0.1 М PBS pH 7.2. Адгезивные контакты окрашивали мышинными моноклональными антителами против белка β -катенина (C7207; Sigma, США) в течение 30 мин при 37°C . Для выявления белка p53 клетки окрашивали мышинными моноклональными антителами против белка p53 (P5813; Sigma, США) 30 мин при 37°C . В качестве вторых антител использовали антитела против иммуноглобулина мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 (Invitrogen, США), окрашивали 30 мин при 37°C . Ядра клеток докрашивали красителем DAPI (0.1 мкг/мл) (Sigma, США) 10 мин при комнатной температуре и в темноте.

Препараты анализировали с помощью люминесцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия). Для Alexa Fluor-488 и DAPI использовали спектры возбуждения/испускания 496/519 и 358/460 соответственно. Для последующей статистической обработки использовали одинаковое время экспозиции в каждом эксперименте. Снимки обрабатывали с помощью программ Adobe Photoshop и ImageJ/Fiji. Измерение длины адгезивных контактов проводили с использованием программного оборудования Vision Bio® Analyze (Россия). На изображениях измеряли общий периметр клеток (P) и длину L межклеточного прикрепления по окрашиванию антителами против белка β -катенина, число измерений n в контроле и в эксперименте составляло 90 и 50 соответственно. Анализировали отношение периметра клетки к протяженности адгезивных контактов (P/L).

Интенсивность флуоресценции белка p53 в ядрах также измеряли с использованием программного оборудования (Vision Bio® Analyze, Россия). Оценивали интенсивность флуоресценции в ядре и в таком же объеме цитоплазмы (фон). Затем с помощью программы Excel вычитали фон, значения интенсивности флуоресценции ядер в усл. ед. ранжировали по возрастанию и делили на три группы: слабо-флуоресцирующие (0–30), средне-флуоресцирующие (30–60) и ярко-флуоресцирующие (60–90). Число проанализированных клеток в контроле — 1467 шт., в присутствии нано-

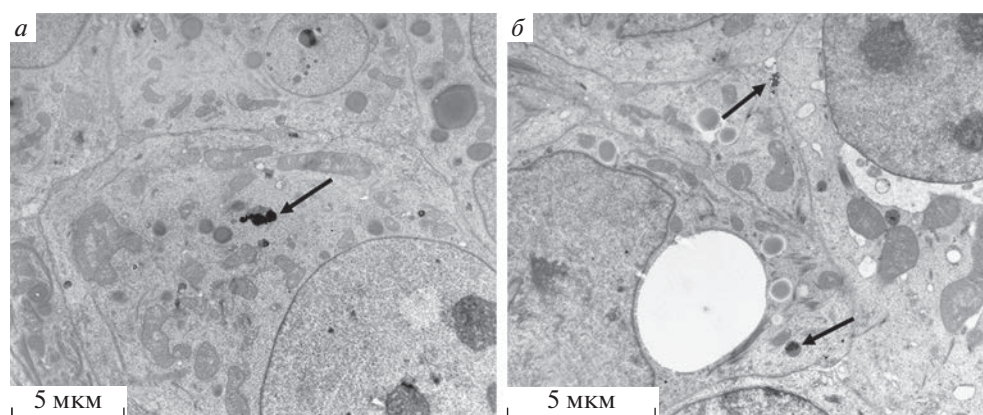


Рис. 1. Электронно-плотные частицы в клетках MCF-7, культивировавшихся в присутствии наночастиц TiO_2 A25 (а) и AP75 (б). Стрелки указывают на электронно-плотные частицы.

частиц A25 в концентрации 1 и 10 мкг/мл — 538 и 114 соответственно, в присутствии 1 и 10 мкг/мл AP — 184 и 143 соответственно.

Эксперименты по анализу длины адгезивных контактов и накоплению p53 в ядрах клеток проводили в двух биологических повторах, затем выборки объединяли. На графиках указывали среднее значение и стандартное отклонение.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Для ультраструктурного анализа клеток с помощью ТЭМ клетки культивировали в присутствии наночастиц TiO_2 (A25 или A75 в концентрации 10 мкг/мл 3 сут). Клетки фиксировали 2.5%-ным глutarовым альдегидом на 0.1 М буфере PBS pH 7.2 30 мин, обезвоживали и заключали в эпон 812 по стандартной методике. В процессе проводки клетки дофиксировали 1%-ным раствором осмия на 0.1 М буфере PBS pH 7.2 и контрастировали 1.5%-ным раствором уранилацетата в 70%-ном этаноле. Ультратонкие срезы толщиной 60 нм изготавливали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме LKB II (Швеция). Для лучшей визуализации наночастиц дополнительное контрастирование срезов не проводили. Полученные срезы анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) и аналитическом трансмиссионном электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония). Элементный анализ наночастиц проводили с использованием метода энерго-дисперсионной спектроскопии (ЭДС) характеристического рентгеновского излучения, основанном на регистрации рентгеновских фотонов, испускаемых образцами при их облучении пучком электронов, и измерении их энергий энерго-дисперсионным спектрометром (Oxford Instruments Inca X-Max 8 mm², Великобритания). Обработку результатов проводили с использованием программного оборудования Inca (Oxford Instruments, Великобритания).

Статистическая обработка. Построение графиков и гистограмм проводили в программе Microsoft Of-

fice Excel 2007. Для проверки гипотезы о различии средних в контроле и экспериментальной группе использовали критерий Манна–Уитни (для малых выборок) или *t*-критерий Стьюдента с подтверждением нормальности распределения. Различие считали статистически достоверным при $p \leq 0.05$. Поскольку энтоз представляет собой редкое явление, при статистической обработке данных, полученных при исследовании энтозных клеток, стандартное отклонение не определяли; при этом указывали число проанализированных энтозов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение наночастиц TiO_2 в клетках MCF-7.

Электронная микроскопия. Для того чтобы убедиться в накоплении наночастиц TiO_2 , как в форме A25, так и AP75, в клетках MCF-7, было проведено электронно-микроскопическое исследование. В клетках были обнаружены скопления электронно-плотных частиц (рис. 1). Элементный анализ показал, что выявленные электронно-плотные частицы содержали в своем составе титан (рис. 2). Наночастицы разной природы имели разную морфологию: наночастицы A25 выглядели как мелкие и равномерно распределенные электронно-плотные частицы, в то время как AP75 представляли собой гранулы разного размера (рис. 2).

Наночастицы A25 и AP75 формировали агрегаты как снаружи, так и внутри клеток (рис. 3). В клетках наночастицы обнаруживали чаще всего внутри везикул (рис. 3б), что указывает на проникновение их в клетку путем эндоцитоза. Везикулы на электронно-микроскопическом уровне характеризовались разной морфологией. Часть везикул с наночастицами TiO_2 имела однородное содержимое и, по-видимому, принадлежала к компартменту ранних эндосом (рис. 3б). Другая часть везикул содержала мембранные структуры, и, вероятно, принадлежала к компартменту поздних эндосом (мультивезикулярных

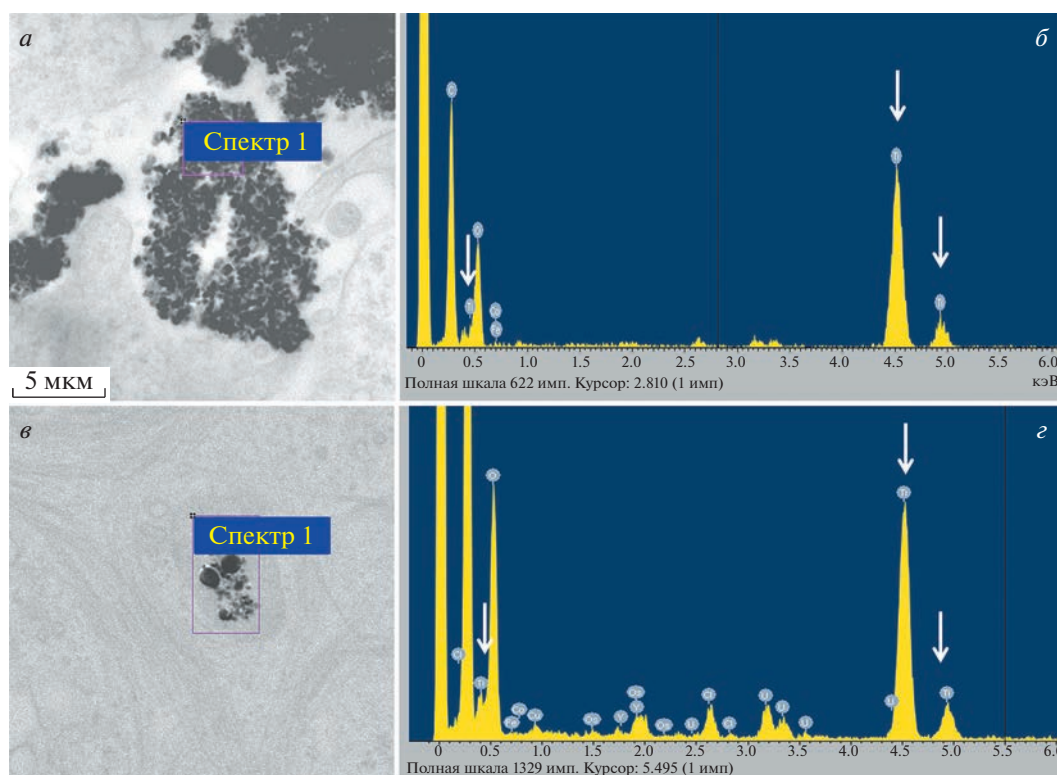


Рис. 2. Наночастицы TiO_2 (10 мкг/мл) А25 и АР75 в клетках культуры МСF-7 (элементный анализ). а, в — Электронно-микроскопическая фотография наночастиц TiO_2 в форме анатаза (25 нм) и анатаза с рутилом (75 нм) соответственно. б, з — Энергодисперсионный спектр области (спектр 1 и спектр 2 соответственно); по оси абсцисс — энергия рентгеновского излучения, кэВ, по оси ординат — интенсивность характеристического рентгеновского излучения; стрелками отмечены пики, характерные для TiO_2 , концентрация наночастиц — 10 мкг/мл.

телец) (рис. 3з). В некоторых случаях наночастицы располагались небольшими агрегатами свободно в цитоплазме (рис. 3в, д, е). Наночастицы присутствовали и в апоптотических клетках (рис. 3д). Кроме того, наночастицы, свободно лежащие в цитоплазме, были обнаружены в митотической клетке (рис. 3е).

Митотический, апоптотический и энтоотический индексы при воздействии наночастиц TiO_2 . Для оценки влияние наночастиц на культивируемые клетки МСF-7 были измерены митотический, апоптотический и энтоотический индексы на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 4а). Воздействие обеих форм наночастиц TiO_2 в концентрации 10 и 100 мкг/мл вызывало уменьшение митотического индекса и увеличение апоптотического индекса по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$ по Манну–Уитни). Апоптотический индекс в присутствии наночастиц А25, 100 мкг/мл был выше по сравнению с АР75 в той же концентрации ($p \leq 0.05$ по Манну–Уитни). Для оценки влияния наночастиц на рост культуры был проведен подсчет клеток на единицу площади (рис. 4б). Анализ проводили только для концентрации наночастиц 10 мкг/мл, т.к. именно в этих условиях апоптотический и митотический индексы изменяются достоверно. В контроле в течение 3-х сут

число клеток увеличивалось почти в три раза. В присутствии наночастиц (10 мкг/мл) это число возрастало менее чем в два раза. Таким образом, воздействие наночастиц TiO_2 , начиная с концентрации 10 мкг/мл, вызывает уменьшение митотического индекса, возрастание апоптотического индекса и, в целом, приводит к замедлению роста культуры. Хотя TiO_2 (100 мкг/мл) образует агрегаты на поверхности клеток (рис. 5), сохраняется митотическая активность и нет значительной гибели клеток.

Энтоотический индекс при добавлении в среду культивирования наночастиц А25 и АР75 дозозависимо уменьшался по сравнению с контролем (рис. 4а). В присутствии 100 мкг/мл наночастиц и одного, и другого типа встречались единичные картины “клетка-в-клетке”, что указывает на подавление процесса энтоза.

Влияние наночастиц TiO_2 на прохождение энтоза в клетках МСF-7. В клетках МСF-7 в контроле процесс энтоза можно подразделить на 5 стадий (Garanina et al., 2017) (рис. 6). На первой стадии внедряющаяся клетка плотно контактирует с внешней (энтозойной) клеткой. Признаки деградации внедрившейся клетки не выявляются. На второй стадии внедрившаяся клетка начинает терять контакты с мембраной энтозойной ваку-

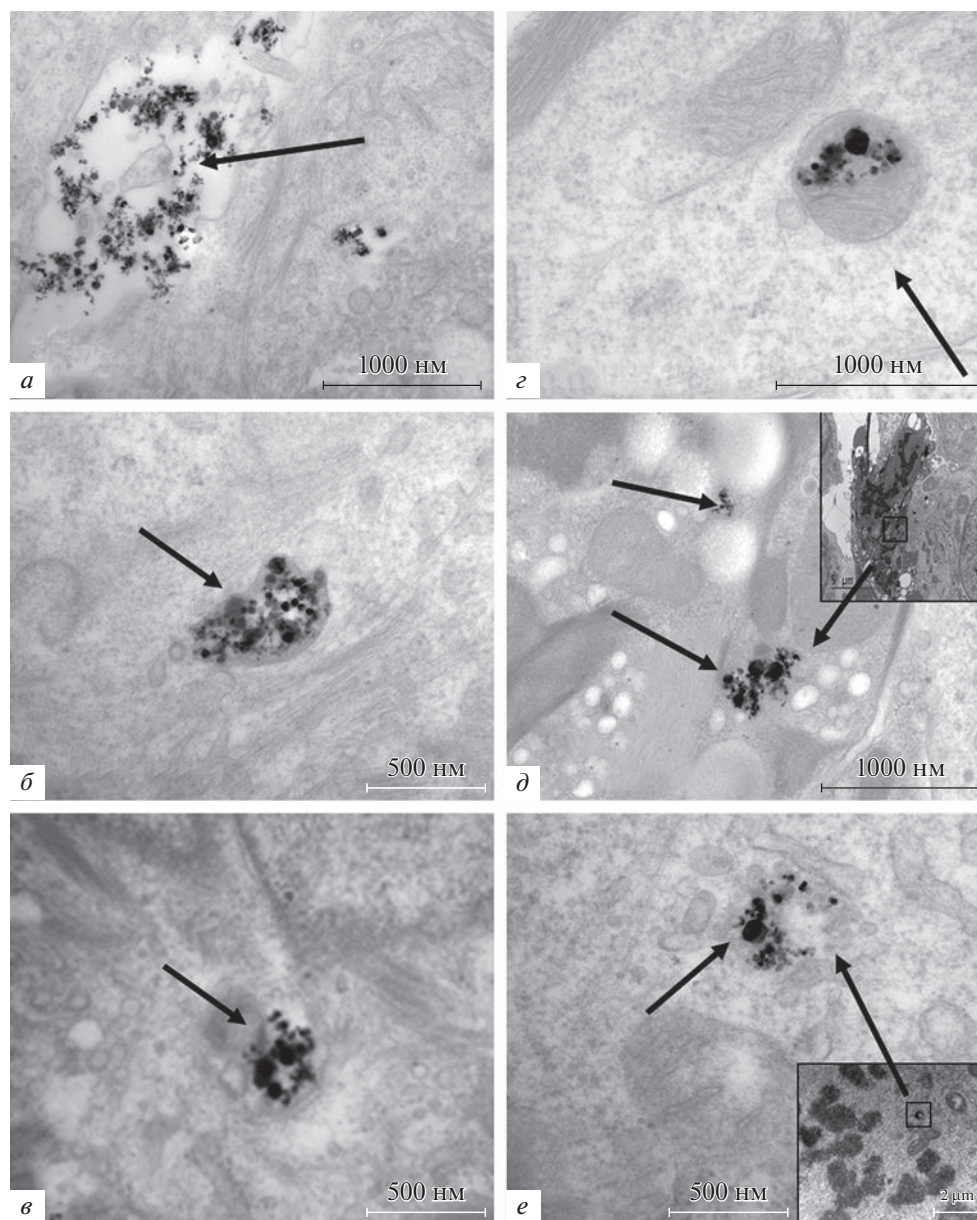


Рис. 3. Наночастицы TiO_2 в клетках культуры MCF-7, культивировавшихся 3 сут в присутствии частиц AP75 (10 мкг/мл). Трансмиссионная электронная микроскопия. Локализация наночастиц (стрелки): *а* – во внеклеточном пространстве, *б* – в ранней эндосоме, *в* – в цитоплазме, *г* – в поздней эндосоме, *д* – в цитоплазме апоптотической клетки, *е* – в цитоплазме митотической клетки; на врезках *д*, *е* представлено малое увеличение клетки.

оли. На третьей стадии свободное пространство внутри энтозной вакуоли четко выражено и внедрившаяся клетка более не имеет контактов с ее мембраной. Размер внедрившейся клетки уменьшается, хроматин начинает конденсироваться и ядро деформируется. На четвертой стадии ядро внедрившейся клетки значительно сжимается, клетка заметно уменьшается в размерах, ее содержимое деградирует. На пятой заключительной стадии внутри энтозной вакуоли выявляются полностью деградировавшие остатки внедрившейся клетки. В присутствии нано-

частиц TiO_2 морфология клеток на разных стадиях энтоза была сходна с контролем (рис. 6).

Подсчет числа энтозных клеток, находящихся на разных стадиях, показал (табл. 1), что в присутствии наночастиц TiO_2 (A25 и AP75) в концентрации 1 мкг/мл уменьшалась доля клеток на начальных этапах энтоза, что может указывать на нарушение процесса внедрения. Кроме того, увеличивалась доля клеток на III стадии, что может указывать на замедление деградации внедрившейся клетки. Необходимо отметить, что энтоз является редким событием, что дела-

ет невозможным полноценную статистическую обработку данных. При более высоких концентрациях наночастиц TiO_2 встречались единичные энтозы, что не позволило провести какой-либо анализ.

Адгезивные контакты клеток в присутствии наночастиц TiO_2 . Падение энтотического индекса и уменьшение числа энтозов на I и II стадиях может указывать на нарушение процесса внедрения. По данным из литературы известно, что для успешного внедрения необходимо формирование адгезивных контактов между клетками (Overholtzer, Brugge, 2008; Sun et al., 2014). Для выявления влияния наночастиц TiO_2 на протяженность адгезивных контактов, было проведено иммуноцитохимическое окрашивание β -катенина.

В контроле адгезивные контакты выявлялись по всей периферии контактирующих клеток и имели четкие границы (рис. 7б). В присутствии наночастиц TiO_2 изменялся характер окрашивания антителами к β -катенину. В монослое клеток присутствовали участки, в которых окрашивание либо полностью отсутствовало, либо сохранялось на небольшом протяжении межклеточной границы (рис. 7в, г). Подобные нарушения были отмечены в присутствии наночастиц как A25, так и AP75, начиная с концентрации 1 мкг/мл. Для подтверждения данных иммуноцитохимии была измерена длина адгезивных контактов. Как видно из приведенной на рис. 7а гистограммы, воздействие наночастиц TiO_2 уменьшало протяженность межклеточных контактов, при этом наночасти-

цы AP75 оказывали большее повреждающее действие, чем наночастицы A25 при тех же концентрациях.

Анализ протяженности адгезивных контактов на I и II стадиях энтоза показал нарушение их формирования (рис. 7в, г, врезки) в присутствии наночастиц TiO_2 , в то время как в контроле адгезивные контакты на начальных стадиях энтоза выявляются на всем протяжении энтозной вакуоли (рис. 7б, врезка).

Распределение белка p53 при воздействии наночастиц TiO_2 в клетках MCF-7. Белок p53 является одним из основных регуляторов клеточного цикла. При различных повреждениях клеток он перемещается в ядро и работает в качестве фактора транскрипции генов, вызывающих остановку клеточного цикла и активацию либо систем репарации, либо апоптотической гибели клетки (Чумаков, 2007). Так как воздействие наночастиц TiO_2 вызывало уменьшение митотического индекса и возрастание апоптотического индекса, мы проанализировали распределение p53 в контроле и в присутствии наночастиц TiO_2 .

Иммуноцитохимическое окрашивание в контроле выявило небольшое количество слабо-флуоресцирующих ядер клеток (рис. 8б). При воздействии наночастиц A25 (10 мкг/мл) наблюдали увеличение доли ярко флуоресцирующих ядер (рис. 8в). В присутствии наночастиц AP75 (10 мкг/мл) картина распределения и интенсивности флуоресценции была сходна с контролем (рис. 8г).

Измерение интенсивности флуоресценции ядер клеток показало, что в контроле чаще встречались

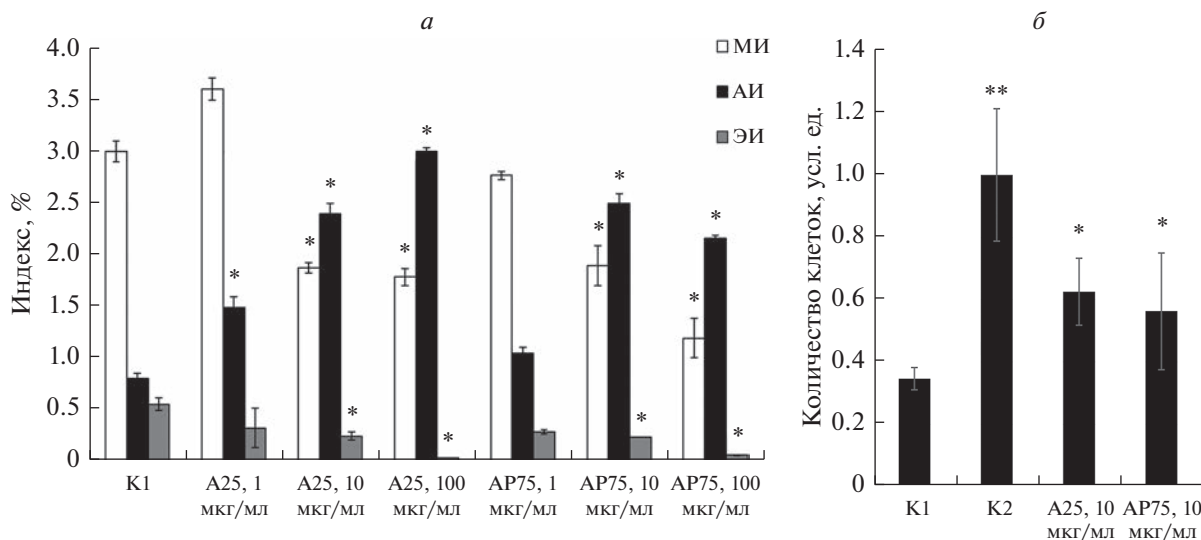


Рис. 4. Влияние наночастиц TiO_2 в разной концентрации в течении 3 сут на пролиферативную активность, выживаемость и энтозы клеток MCF-7. *а* — Изменение митотического (МИ), апоптотического (АИ) и энтотического (ЭИ) индексов в клетках; A25 — наночастицы анатаза размером 25 нм, AP75 — смесь наночастиц анатаза и рутила размером 75 нм; (*) — различия относительно K1 достоверны при $p \leq 0.05$ (критерий Манн–Уитни); *б* — изменение числа клеток при культивировании в присутствии наночастиц TiO_2 (10 мкг/мл); K1 и K2 — количество клеток через 24 ч культивирования перед добавлением наночастиц и через 3 сут культивирования соответственно; по вертикали указано количество клеток в усл. ед. относительно K2; (*) — различия относительно K1 достоверны при $p \leq 0.05$ (критерий Манн–Уитни); (**) — различия относительно K1 и эксперимента достоверны при $p \leq 0.05$ (критерий Манн–Уитни); указаны значения среднего и его ошибки ($n = 3$).

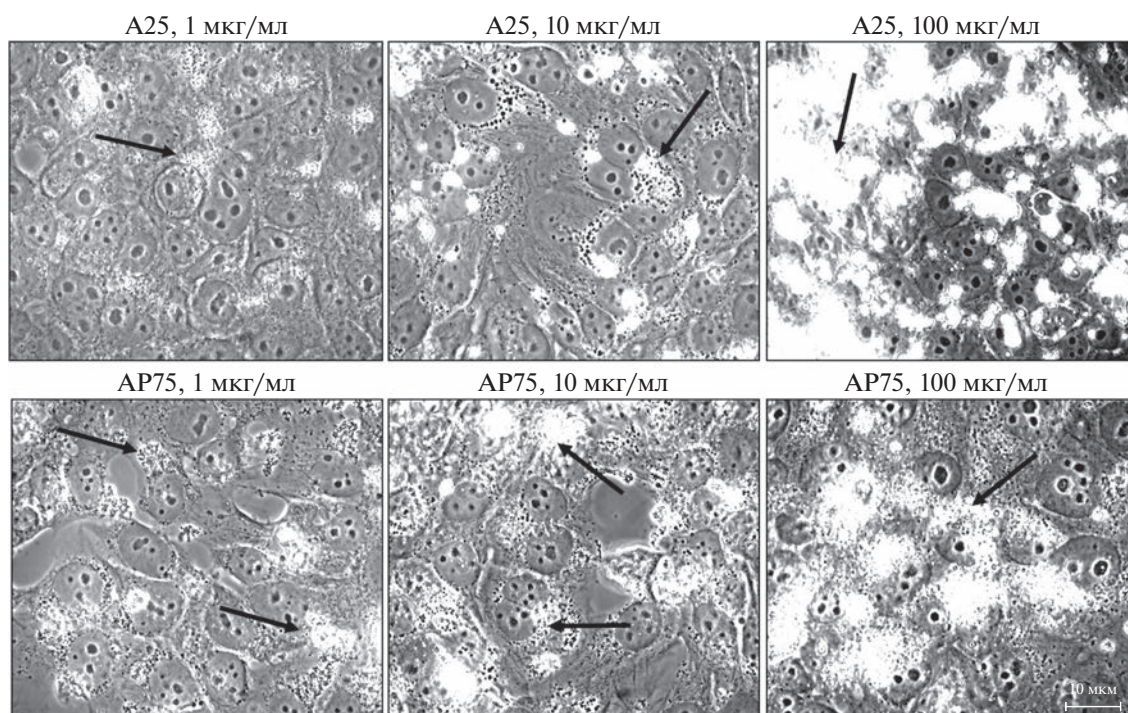


Рис. 5. Общий вид клеток MCF7 в присутствии наночастиц TiO_2 (A25 и AP75) в разных концентрациях. Фазовый контраст. Стрелки указывают на агрегаты наночастиц. Масштабный отрезок: 10 мкм.

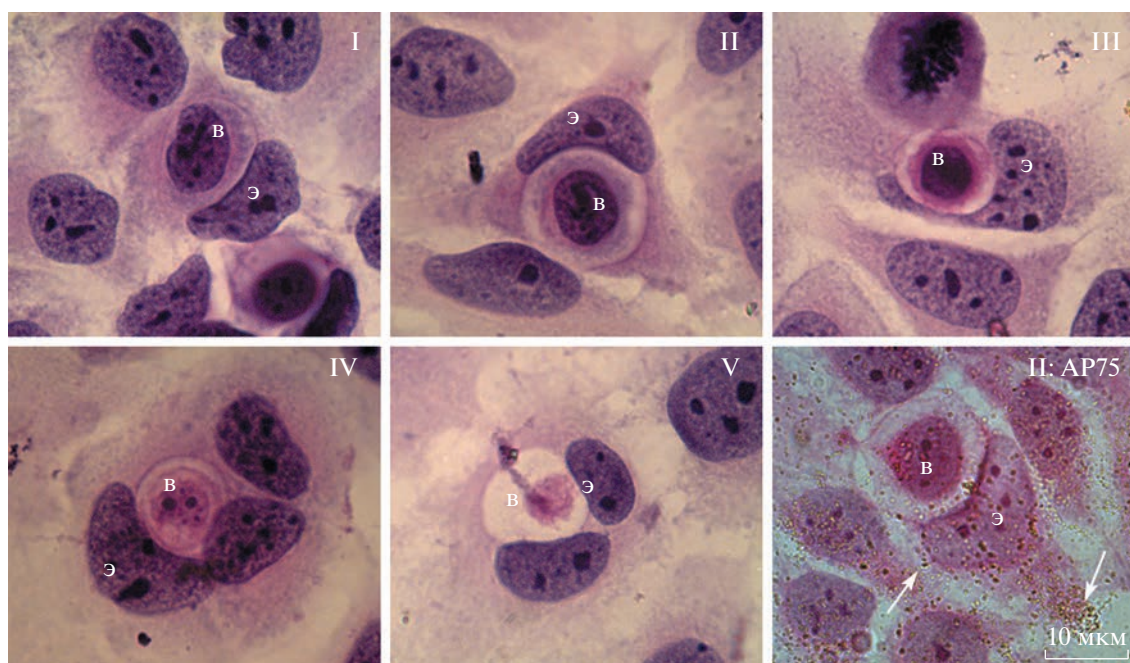


Рис. 6. Стадии энтоза I–V в контрольных клетках MCF-7 и в присутствии 10 мкг/мл AP75 на стадии II (II: AP75). Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином. Э – энтозная клетка, В – внедрившаяся клетка. Стрелка указывает на наночастицы.

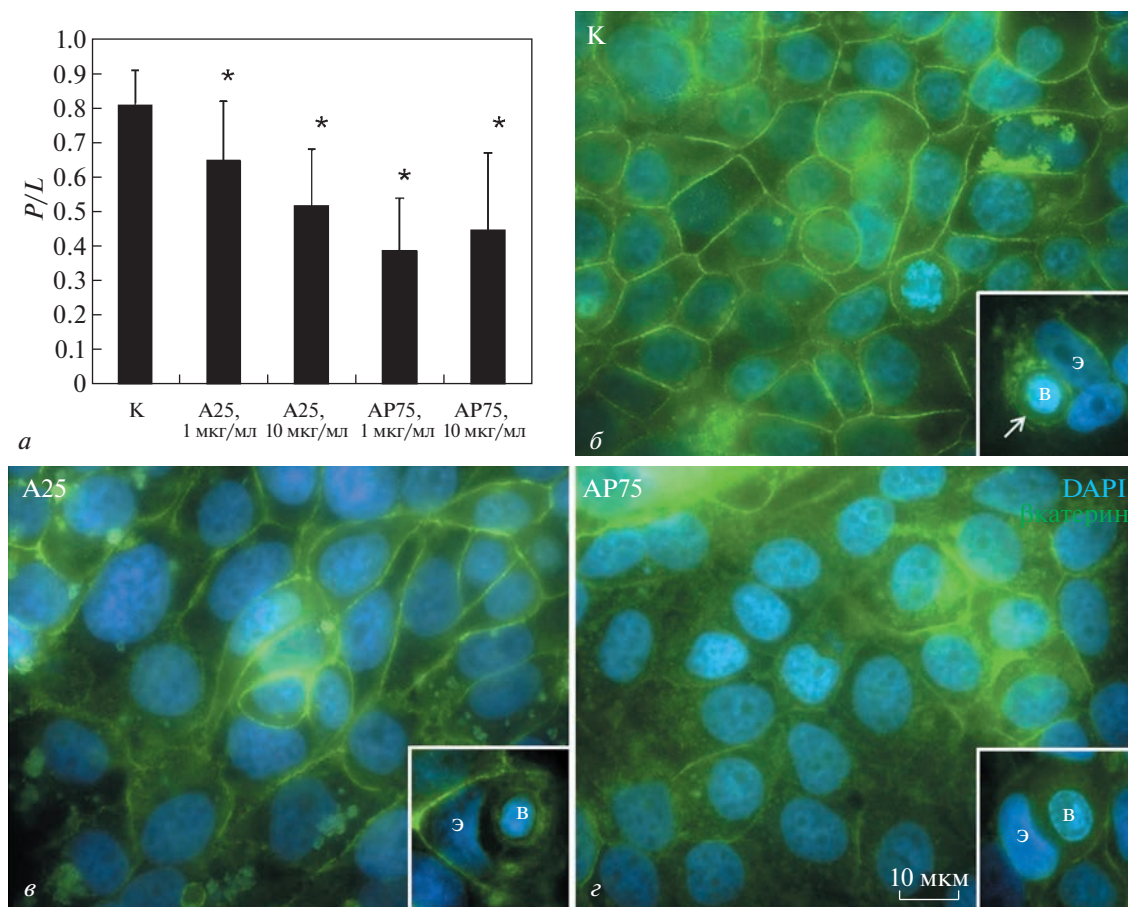


Рис. 7. Адгезивные контакты клеток MCF-7 в присутствии 10 мкг/мл наночастиц TiO_2 (A25 или AP75). *а* – Изменение протяженности адгезивных контактов клеток при воздействии наночастиц в разной концентрации; по оси ординат – отношение протяженности P периметра клетки к протяженности межклеточного контакта L (P/L); указаны среднее значение и стандартное отклонение выборки ($n = 90$ и $n = 50$ соответственно в контроле и эксперименте); (*) – различия относительно контроля достоверны при $p \leq 0.05$ (по t -критерию Стьюдента). *б, в, г* – Иммуноцитохимическое выявление β -катенина (зеленый сигнал); энтозы представлены в отдельных врезках, Э – энтозная клетка, В – внедрившаяся клетка, стрелка указывает на адгезивный контакт между энтозной и внедрившейся клетками; *б* – контроль, *в, г* – воздействие 10 мкг/мл наночастиц TiO_2 (A25 или AP75), ядра клеток докрашены DAPI (синий сигнал).

Таблица 1. Частота встречаемости различных стадий энтоза в клетках MCF-7 в контроле и в присутствии 1 мкг/мл наночастиц TiO_2 (A25 и AP75) в течение 3 сут

Воздействие наночастиц	Доля клеток на стадии энтоза, %				
	I	II	III	IV	V
Нет, контроль ($n = 100$)	12	25	36	14	13
A25 ($n = 68$)	1.5	12	54.5	15	18
AP75 ($n = 86$)	3.5	10.5	50	22	14

Примечание. n – число проанализированных энтозов (100%); жирным шрифтом выделены наиболее часто встречающиеся стадии энтоза.

слабо-флуоресцирующие ядра (рис. 8а). В присутствии AP75 увеличивалась доля слабо-флуоресцирующих ядер. В то же время при воздействии наночастиц A25 в концентрации 1 и 10 мкг/мл было обнаружено значительное увеличение доли ярко- и средне-флуоресцирующих ядер по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$ по t -критерию). Таким образом, только наночастицы A25 вызывают перемещение фактора транскрипции p53 в ядра клеток, что может приводить к остановке клеточного цикла и активации программы апоптоза.

В процессе энтоза p53 обнаруживается как в ядрах энтозных клеток, так и в ядрах внедрившихся клеток. В контроле меньше половины ядер энтозных клеток содержали p53 (12 из 34). Среди ядер внедрившихся клеток (на I, II и III стадиях), наоборот, преобладали p53-содержащие (16 из 25). В присутствии титановых наночастиц встречаются p53 положительные ядра как энтозных, так и внедрившихся

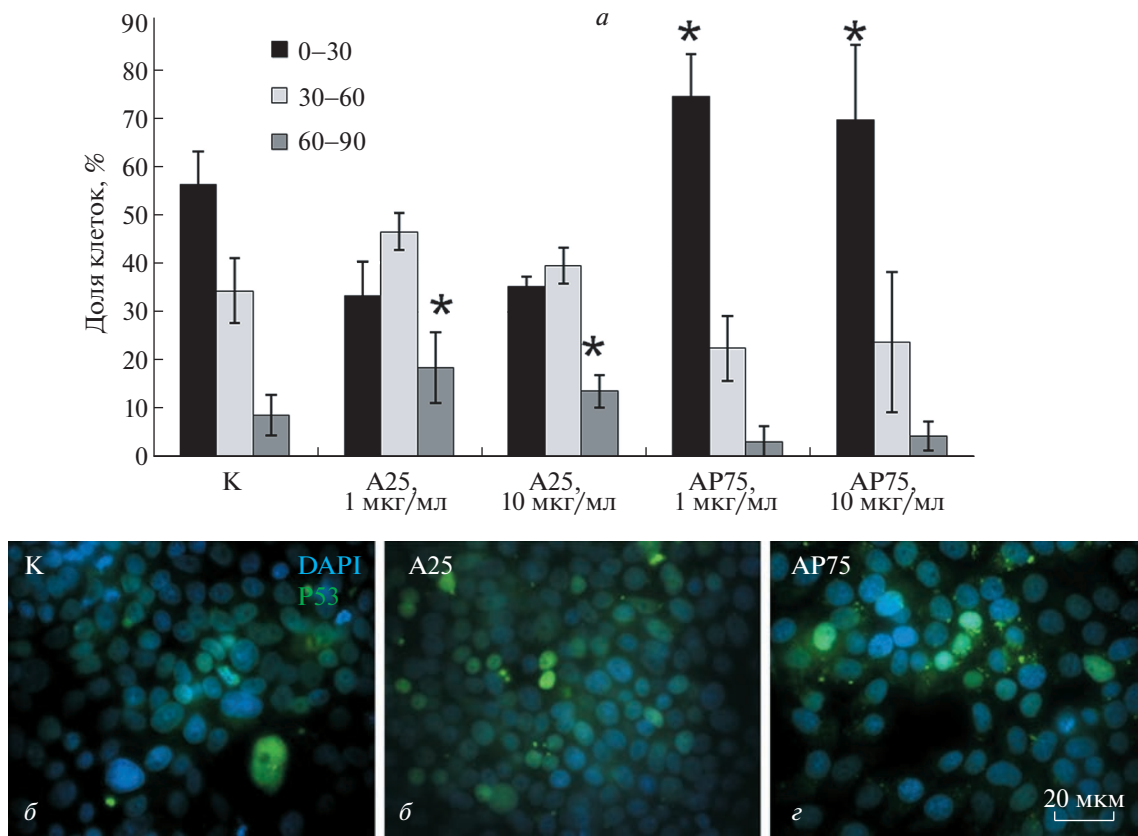


Рис. 8. Распределение белка p53 в ядрах клеток MCF-7 в контроле (К) и в присутствии 10 мкг/мл наночастиц TiO₂ (A25 и AP75). *а* – Распределение клеток по интенсивности флуоресценции (ИФ, усл. ед.) антител против белка p53; показаны три группы клеток с ИФ 0–30, 30–60 и 60–90; указаны среднее значение и стандартное отклонение выборки; (*) – различие с К достоверно при $p \leq 0.05$ (*t*-критерий Стьюдента). *б, в, з* – Иммуноцитохимическое выявление белка p53 (зеленый цвет) в клетках MCF-7, ядра клеток докрашены DAPI (синий сигнал).

клеток. В связи с небольшим количеством проанализированных клеток выделить какую-либо закономерность распределения p53 не представляется возможным (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенная работа показала, что в присутствии наночастиц TiO₂ в культуре клеток МСФ7 происходит незначительное увеличение апоптотического индекса и падение митотического индекса. Начиная с концентрации 10 мкг/мл, апоптотический индекс превышает митотический, что приводит к замедлению роста культуры. Увеличение апоптотического индекса может быть опосредовано выходом поглощенных клеткой наночастиц из везикул эндосомного компартмента в цитозоль. Электронно-микроскопические данные подтверждают наличие наночастиц в цитозоле. Выход из эндосомного компартмента по данным из литературы может быть связан со способностью наночастиц TiO₂ окислять липиды и нарушать целостность мембран (Sydor et al., 2020). По другим данным наночастицы TiO₂ увеличивают pH внутри ли-

Таблица 2. Наличие белка p53 в ядрах энтозных (Э) и внедрившихся (В) клеток в присутствии наночастиц TiO₂

Наночастицы TiO ₂	Э-клетки (I и II стадии)		В-клетки	
	p53 ⁺	p53 [–]	p53 ⁺	p53 [–]
Нет, контроль (<i>n</i> = 34)	12	22	16	9
A25, 1 мкг/мл (<i>n</i> = 5)	4	1	3	1
A25, 10 мкг/мл (<i>n</i> = 5)	2	3	2	2
AP75, 1 мкг/мл (<i>n</i> = 9)	1	8	0	4
AP75, 10 мкг/мл (<i>n</i> = 5)	0	4	3	1

Примечание. *n* – Число проанализированных клеток; p53⁺ и p53[–] – соответственно p53, содержащийся и не содержащийся в ядрах.

зосомы, что приводит к разрыву мембраны в результате осмотического набухания лизосом (Frohlich, 2013). В дальнейшем такие наночастицы могут перемещаться в ядро, где они оказывают повреждающее воздействие на ДНК (Sayes et al., 2006).

Мы предполагаем, что свободно лежащие наночастицы, выявляемые нами на электронно-микроскопических изображениях, могут быть случайно захвачены в состав ядра при формировании ядерной оболочки в процессе митоза, или пассивно проходить через ядерные поры. Наночастицы анатаза обладают меньшими размерами (<25 нм) по сравнению с наночастицами анатаз-рутил (<75 нм), облегчающими их проникновение через ядерную пору, что может объяснять больший апоптотический индекс, наблюдаемый в нашем исследовании. Кроме того, перемещение p53 в ядра клеток также наблюдается именно в присутствии наночастиц анатаза.

В ядре p53 может активировать транскрипцию проапоптотических генов, вызывая увеличение апоптотического индекса, или генов ингибиторов клеточного цикла, что приводит к падению митотического индекса (Чумаков, 2007). Более крупные наночастицы AP75 возможно не способны проникать через ядерную пору и повреждать ДНК, поэтому мы не наблюдаем перемещения p53 в ядро. Тем не менее, в присутствии этих наночастиц также происходит увеличение апоптотического индекса и падение митотического индекса. Возможно, механизм активации апоптоза и замедления клеточного цикла в данном случае не связаны с работой p53. В целом первая часть работы показала, что частицы A25 обладают большей повреждающей способностью, чем AP75. Повышенное (по сравнению с контролем) накопление p53 в ядрах клеток при воздействии анатазных наночастиц может являться механизмом активации клеточной гибели.

Воздействие наночастиц TiO_2 , как A25, так и AP75, приводит к значительному уменьшению числа энтозов в клетках MCF-7. Наиболее вероятной причиной является нарушение начальных этапов внедрения клеток, о чем свидетельствует уменьшение числа энтозов, находящихся на I стадии. В литературе имеются данные, что наночастицы TiO_2 связываются с внеклеточными доменами кадгеринов, вследствие чего кадгерины удаляются с мембраны путем эндоцитоза (Setyawati et al., 2013), и адгезивные контакты разрушаются. Таким образом, внедряющаяся клетка оказывается неспособной взаимодействовать с энтозной клеткой. Однако если рассматривать действие наночастиц TiO_2 на опухолевую ткань в целом, то повреждение адгезивных контактов может приводить к нарушению контактов между клетками, усилению их подвижности и росту метастазирования.

Уменьшение числа энтозов может быть также связано с падением митотического индекса. Показано, что клетки, закончившие митоз, обладают повышенной способностью к внедрению (Кисурина-Ев-

геньева и др., 2018; Durgan et al., 2018). Так как TiO_2 снижает митотическую активность клеток, число таких событий уменьшается.

Увеличение содержания в популяции энтозов на III стадии может указывать на замедление деградации внедрившейся клетки в присутствии наночастиц TiO_2 . Длительное сохранение энтозной вакуоли увеличивает вероятность вступления наружной клетки в митоз, проходящий с нарушением цитокинеза и заканчивающийся образованием полиплоидной клетки (Krajcovic et al., 2011). Снижение митотической активности в присутствии TiO_2 может нивелировать этот эффект. При этом важную роль может играть p53, регулирующий прохождение клеток по клеточному циклу. Ранее нами было показано, что в культуре клеток MCF-7 фактор p53 обнаруживается чаще в ядрах энтозных и внедрившихся клеток, чем в культуре в целом. При этом позитивно окрашены были ядра у 26% энтозных клеток и у 22% внедрившихся клеток (Кисурина и др., 2018). В настоящей работе в контроле p53 чаще выявлялся в ядрах внедрившихся клеток, чем в ядрах энтозных клеток. Повышенная частота встречаемости p53-положительных ядер среди внедрившихся клеток может быть связана с тем, что (по последним данным из литературы) клетки с повреждениями ДНК чаще внедряются, инициируя процесс энтоза (Liang et al., 2021). В присутствии A25, по сравнению с AP75, чаще встречаются p53-положительные ядра как среди энтозных, так и среди внедрившихся клеток, что может указывать на повреждающий эффект этих наночастиц.

Таким образом, можно заключить, что воздействие наночастиц TiO_2 на культуру опухолевых клеток молочной железы приводит к подавлению энтоза. Так как наличие энтозов может приводить к полиплоидизации клеток (Krajcovic et al., 2011), наночастицы TiO_2 оказывают положительное влияние на генетическую стабильность в популяции. Кроме того, в присутствии наночастиц TiO_2 , замедляется пролиферация опухолевых клеток. В целом, полученные результаты демонстрируют, что наночастицы TiO_2 могут быть использованы в адресной доставке химиотерапевтических препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по плановой теме “Механизмы выживания и гибели клеток” (121032300098-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кисурина-Евгеньева О.П., Хашба Л.А., Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. 2018. Энтоз и клеточный цикл в культуре опухолевых клеток. Цитология. Т. 60. № 9. С. 693. (Kisurina-Evgenieva O.P., Khashba L.A., Mamichev I.A., Savitskaya M.A., Onishchenko G.E. 2019. Entosis and cell cycle in tumor cell culture. Cell. Tissue Biol. V. 13. P. 8.). <https://doi.org/10.1134/S1990519X19010073>
- Чумаков П.М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биол. химии. Т. 47. С. 3. (Chumakov P. M. 2007. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. Biochemistry (Mosc). V. 72. № 13. P.1399.) <https://doi.org/10.1134/s0006297907130019>
- Biola-Clier M., Gaillard J.-C., Rabilloud T., Armengaud J., Carriere M. 2020. Titanium dioxide nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells. Nanomaterials. V. 10. P. 185. <https://doi.org/10.3390/nano10020185>
- Ding L., Li J., Huang R., Liu Z., Li C., Yao S., Wang J., Qi D., Li N., Pi J. 2016. Salvianolic acid B protects against myocardial damage caused by nanocarrier TiO₂; and synergistic anti-breast carcinoma effect with curcumin via codelivery system of folic acid-targeted and polyethylene glycol-modified TiO₂ nanoparticles. Int. J. Nanomedicine. V. 11. P. 5709. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107767>
- Durgan J., Tseng Y.Y., Hamann J.C., Domart M.C., Collinson L., Hall A., Overholtzer M., Florey O. 2017. Mitosis can drive cell cannibalism through entosis. Elife. V. 6. P. e27134. <https://doi.org/10.7554/eLife.27134>
- Fage S.W., Muris J., Jakobsen S. S., Thyssen J.P. 2016. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. Contact Dermatitis. V. 74. P. 323. <https://doi.org/10.1111/cod.12565>
- Frohlich E. 2013. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. Curr. Drug Metab. V. 14. P. 976. <https://doi.org/10.2174/1389200211314090004>
- Garanina A.S., Kisurina-Evgenieva O.P., Erokhina M.V., Smirnova E.A., Factor V.M., Onishchenko G.E. 2017. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells. Sci. Rep. V. 7. P. 12555. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12867-6>
- Hanot-Roy M., Tubeuf E., Guilbert A., Bado-Nilles A., Vigneron P., Trouiller B., Braun A., Lacroix G. 2016. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolar capillary barrier *in vitro*. Toxicol. In Vitro. V. 33. P. 125. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.013>
- Hurum D.C., Gray K.A., Rajh T., Thurnauer M.C. 2005. Recombination pathways in the degussa P25 formulation of TiO₂: surface versus lattice mechanisms. J. Phys. Chem. V. 109. P. 977. <https://doi.org/10.1021/jp045395d>
- Krajcovic M., Johnson N.B., Sun Q., Normand G., Hoover N., Yao E., Richardson A.L., King R.W., Cibas E.S., Schnitt S.J., Brugge J.S., Overholtzer M. 2011. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. Nat. Cell Biol. V. 13. P. 324. <https://doi.org/10.1038/ncb2174>
- Krishna S., Overholtzer M. 2016. Mechanisms and consequences of entosis. Cell Mol. Life Sci. V. 73. P. 2379. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2207-0>
- Lagopati N., Tsilibary E.-P., Falaras P., Papazafiri P., Pavlatou E.A., Kotsopoulou E., Kitsiou I. P. 2014. Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. Int. J. Nanomedicine. V. 9. P. 3219. <https://doi.org/10.2147/IJN.S62972>
- Liang J., Niu Z., Zhang B., Yu X., Zheng Y., Wang C., Ren H., Wang M., Ruan B., Qin H., Zhang X., Gu S., Sai X., Tai Y., Gao L., et al. 2021. p53-dependent elimination of aneuploid mitotic offspring by entosis. Cell Death. Differ. V. 28. P. 799. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00645-3>
- Overholtzer M., Brugge J.S. 2008. The cell biology of cell-in-cell structures. Nature Rev. Mol. Cell Biol. V. 9. P. 796. <https://doi.org/10.1038/nrm2504>
- Overholtzer M., Mailleux A.A., Mounie G., Normand G., Schnitt S.J., King R.W., Cibas E.S., Brugge J.S. 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. Cell. V. 131. P. 966. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>
- Rossi E.M., Pytkänen L., Koivisto A.J., Vippola M., Jensen K.A., Miettinen M., Sirola K., Nykäsenoja H., Karisola P., Stjernvall T., Vanhala E., Kiilunen M., Pasanen P., Mäkinen M., Hämeri K., et al. 2010. Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. Toxicol. Sci. V. 113. P. 422. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp254>
- Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol. Sci. V. 92. P. 174. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFJ197>
- Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol. Sci. V. 92. P. 174. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj197>
- Setyawati M.I., Tay C.Y., Chia S.L., Goh S.L., Fang W., Neo M.J., Chong H.C., Tan S. M., Loo S. C.J., Ng K.W., Xie J.P., Ong C.N., Tan N.S., Leong D.T. 2013. Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. Nat. Commun. V. 4. P. 1673. <https://doi.org/10.1038/ncomms2655>
- Sun Q., Cibas E.S., Huang H., Hodgson L., Overholtzer M. 2014. Induction of entosis by epithelial cadherin expression. Cell Res. V. 24. P. 1288. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.137>
- Sund J., Palomäki J., Ahonen N., Savolainen K., Alenius H., Puustinen A. 2014. Phagocytosis of nano-sized titanium dioxide triggers changes in protein acetylation. J. Proteomics. V. 108. P. 469. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.011>
- Sydor M.J., Anderson D.S., Steele H.B.B., Ross J.B.A., Holian A. 2020. Effects of titanium dioxide and zinc oxide nano-

- terials on lipid order in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* V. 1862. P. 183313.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183313>
- Trang N.T.K., Dong V.P., Hoon Y. 2021. Cellular effects of ultra-violet-radiated reduced-titanium dioxide nanoparticles on human hypopharyngeal adenocarcinoma cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* V. 21. P. 3656.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19172>
- Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia C., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Fang Jiao, Zhao Y., Chai Z. 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* V. 168. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>
- Wang Y., Cui H., Zhou J., Li F., Wang J., Chen M., Liu Q. 2015. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* V. 22. P. 5519.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3717-7>
- Warheit D.B., Webb T.R., Sayes C.M., Colvin V.L., Reed K.L. 2006. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol. Sci.* V. 91. P. 227.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj140>
- Zeng L., Pan Y., Tian Y., Wang X., Ren W., Wang S., Lu G., Wu A. 2015. Doxorubicin-loaded NaYF₄: Yb/Tm–TiO₂ inorganic photosensitizers for NIR-triggered photodynamic therapy and enhanced chemotherapy in drug-resistant breast cancers. *Biomaterials.* V. 57. P. 93.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.006>

Titanium Dioxide Nanoparticles Inhibits Entosis in the Human Breast Adenocarcinoma Cell Line

O. P. Kisurina-Evgenieva^{a,*}, M. A. Savitskaya^a, D. S. Smeshnova^a, and G. E. Onishchenko^a

^a*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: evgenieva@mail.ru*

TiO₂ is widely used in industry and cosmetics and medicines production. In recent years, to achieve tumor-specific delivery of anticancer agents, TiO₂ nanoparticles have been used in chemo/photodynamic therapy, which may cause local increase of the TiO₂ concentration in tumors. The TiO₂ nanoparticles can affect various processes in tumors. One of such process is entosis. During entosis one tumor cell invades another tumor cell. The aim of this work was to study the effect of TiO₂ nanoparticles (anatase <25 nm and rutil/anatase <75 nm; 1, 10 and 100 µg/mL, 72 hours) on the entosis in the human breast adenocarcinoma cell line (MCF7). Cultivation of cells in the presence of nanoparticles lead to a slowdown in proliferation and reduced in the entosis number. These effects were dose-dependent. Elemental analysis (analytical electron microscopy) showed presence TiO₂ nanoparticles in the cell vacuoles, in the cytosol and in the extracellular space. TiO₂ nanoparticles (10 µg/mL) significantly disrupted adhesive junctions in entotic cells and in cell culture in general (immunocytochemistry staining). The anatase nanoparticles induced p53 translocation into the nucleus. Thus, the obtained data showed that the TiO₂ nanoparticles inhibited entosis in MCF-7 cells by means of disrupting the adhesive junction formation and preventing cell invasion. However, failure of adhesive contacts can facilitate tumor metastasis.

Keywords: adherens junctions, nanoparticles, titanium dioxide, p53, entosis

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9 В ЗИГОТАХ МЫШЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДУПЛИКАЦИЙ, ДЕЛЕЦИЙ И ИНВЕРСИЙ ВЛИЯЕТ НА СТАБИЛЬНОСТЬ КАРИОТИПА

© 2023 г. Ю. М. Минина¹ *, А. Б. Сорока², Т. В. Карамышева¹, Н. А. Сердюкова³, О. Л. Серов¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия

³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: minina_jul@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 26.12.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

В современной молекулярной и клеточной биологии CRISPR/Cas9 технология получила широкое применение для адресной модификации геномов человека и животных. В настоящей работе с помощью методов молекулярной цитогенетики был проведен анализ кариотипа в 18 линиях фибробластов мыши (ФМ), в геноме которых ген *Cntn6* был отредактирован с помощью CRISPR/Cas9. Модификации гена *Cntn6* представляли собой дупликации размером 2374 т.п.о., делеции 1137 т.п.о. и инверсии сходного размера. Кроме того, был проведен цитогенетический анализ для контрольных 5 линий эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ), несущих интактный аллель гена *Cntn6*. Проведенное исследование показало наличие высокого уровня полиплоидии для гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6* и гомозиготных и гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6* линий ФМ (20–46%), а также наличие моносомии (1–9%) и трисомии по хромосоме 6 (1–8%). Важно отметить, что в 4 линиях ЭФМ, несущих делецию и дупликацию гена *Cntn6* в компаунде, трисомии обнаружено не было, а доля полиплоидных клеток была минимальна (1.5–5.7%). Таким образом, полученные данные указывают на дестабилизацию кариотипа клеточных линий, претерпевших редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, дупликация, делеция, анеуплоидия, трисомия, *Cntn6*

DOI: 10.31857/S0041377123030057, **EDN:** VDNBOE

CRISPR/Cas9 (the clustered regularly interspaced repeat associated protein 9) технология является одной из самых эффективных систем для адресной модификации геномов соматических клеток и зигот разных видов. Технология позволяет создавать двунитевой разрыв ДНК в заданном участке генома для замены, включения или вырезания последовательности ДНК. Высокая эффективность CRISPR/Cas9 обусловлена слаженной работой двух компонентов системы: так называемой направляющей РНК, которая с высокой точностью узнает целевой участок ДНК, и белка Cas9, который создает разрыв в этом участке (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Hussain et al., 2019). Несомненным преимуществом CRISPR/Cas9 техно-

логии является ценовая доступность и простота в исполнении, поэтому она широко используется во многих исследованиях, связанных с изучением функции генов, а также при создании моделей различных заболеваний с использованием экспериментальных животных (Hsu et al., 2014; Cai et al., 2016). В клинической медицине с помощью CRISPR/Cas9 активно осваиваются новые подходы в лечении многих тяжелых моногенных заболеваний, таких как гемофилия, дефициты ферментов, комбинированные иммунодефициты (Cox et al., 2015; Cai et al., 2016; Pankowicz et al., 2016), а также некоторых видов рака (Mollanoori et al., 2018) и вирусных заболеваний (Lin et al., 2014; Zhen et al., 2014; Sakuma et al., 2016).

Несмотря на высокую эффективность редактирования CRISPR/Cas9 заданного участка ДНК, появляется все больше данных о возникающих спонтанных мутациях генов не только вдали от участка редактирования генома, но и вблизи него. Так, в исследованиях с использованием парных направляющих РНК для индуцирования целевых делеций сообщалось о возникновении инверсий, эндогенных и

Принятые сокращения: BSA (bovine serum albumin) — бычий сывороточный альбумин; CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) — короткие палиндромные кластерные повторы/ассоциированный с CRISPR белок 9; FISH (fluorescent *in situ* hybridization) — флуоресцентная *in situ* гибридизация; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЭФМ — эмбриональные фибробласты мыши; ФМ — фибробласты мыши.

экзогенных вставок ДНК и более крупных, чем ожидалось, делеций (Zhang et al., 2015; Boroviak et al., 2016; Hara et al., 2016; Korablev et al., 2017; Kosicki et al., 2018). В настоящий момент имеются лишь ограниченные данные о непредсказуемых изменениях ДНК и дальнейшей судьбе удаленных фрагментов ДНК (Fujii et al., 2013; Kraft et al., 2015; Zhang et al., 2015; Canver et al., 2017). Проблемой применения CRISPR/Cas9 в зиготах может стать мозаичность распределения хромосомных модификаций в соматических клетках животного-основателя, поскольку CRISPR/Cas9 может “сработать” на более поздних стадиях развития, когда уже произошло одно или более деление зиготы (Mehra et al., 2018).

Ранее, с применением технологии CRISPR/Cas9 на зиготах в качестве экспериментальной модели для изучения вариаций числа копий (CNV) гена *CNTN6* нами были получены мыши, несущие дупликации около 2374 т.п.о., делеции размером 1137 т.п.о. и инверсии сходного размера, затрагивающие единственный ген *Cntn6* (кодирует контактин-6) в хромосоме 6 (Korablev et al., 2017). При изучении эффектов адресных модификаций гена после CRISPR/Cas9 с помощью FISH была замечена трисомия по хромосоме 6 в 3.5–4.3% фибробластов, полученных от двух взрослых мышей-основателей (№ 1 и № 20). Интересным явился тот факт, что трисомия затрагивала именно ту хромосому, в которой производилась модификация ДНК. Фаундеры № 1 и № 20 являлись мозаиками по перестройке, наряду с делецией у них была обнаружена дупликация гена *Cntn6* (Pristyazhnyuk et al., 2019). При FISH анализе невозможно было различить дикий тип и дублированные аллели, поэтому происхождение каждого гомолога в этих трисомных клетках не определялось. Среди немногочисленных данных о дальнейшей судьбе удаленных фрагментов ДНК или изменениях ДНК, сопровождающих перестройки при использовании технологии CRISPR/Cas9 (Fujii et al., 2013; Canver et al., 2017; Kraft et al., 2015; Zhang et al., 2015) ни разу не упоминалось о возникновении трисомии. Учитывая, что это первое описание феномена трисомии в соматических клетках животных с CRISPR/Cas9 индуцированными хромосомными перестройками, мы предположили, что возможным фактором, провоцирующим возникновение трисомии, явилась гетерозиготная масштабная дупликация гена *Cntn6* в геноме. Было показано, что неправильная репарация разрывов в ДНК и неправильная репликация могут приводить к анеупloidии (Janssen et al., 2011; Thompson, Compton, 2011; Crasta et al., 2012). Возможно, разница в “размере” генного материала на гомологах хромосомы 6 мышей, несущих дупликацию гена *Cntn6* в гетерозиготном состоянии, могла способствовать асинхронности или/и неправильной репликации гомологов в районе встройки и, как следствие, возникновению трисомии. С другой стороны, было показано, что асинхронность репликации имеет место у носителей трисомий. Например, в гибридах эмбриональных стволовых и соматических

клеток мышей при увеличении копий индивидуальных хромосом (1, 3 и 6) происходила асинхронность их репликации в 46–57% клеток (Podryadchikova et al., 2008).

Целью данного исследования было изучить, как наследуется трисомия у потомков основателей № 1 и № 20, несущих дупликацию гена *Cntn6*, сравнить стабильность кариотипов в гомозиготных и гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6* линиях ЭФМ. Кроме того, мы включили в исследование две линии фибробластов (№ 21 и № 2), полученные из кожи взрослых мышей-основателей, несущих гетерозиготную инверсию *Cntn6*, полученную при геномном редактировании в зиготе технологией CRISPR/Cas9.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение клеточных линий. Все процедуры были проведены в соответствии с постановлением совета ЕС (24 ноября 1966, 86/609/ЕЕС) и одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики (разрешение № 24 от 24.10.2014).

Линии ЭФМ были получены из индивидуальных 13–15 дневных эмбрионов. Эмбрионов освобождали от окружающих тканей, промывали PBS и затем измельчали тела в отдельных чашках Петри в 0.25%-ном растворе трипсина. После инкубирования суспензий 30 мин при 37°C действие трипсина инактивировали добавлением 3 мл культуральной среды DMEM с 10% телячьей сывороткой и 50 мг/мл пенициллина/стрептомицина. Далее образцы центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин, аккуратно сливали супернатант, а осадок переносили в культуральные матрасы со средой. Генотипирование каждой линии проводили с помощью ПЦР-анализа ДНК, выделенной из головы каждого эмбриона (Korablev et al., 2017). Для линии № 1 было выбрано 4 гетерозиготных, 3 гомозиготных по дупликации *Cntn6* линии и 3 линии с интактным аллелем *Cntn6* для дальнейшего культивирования и получения клеточных суспензий. Для линии № 20 для анализа было выбрано 4 гетерозиготных, 2 гомозиготных по дупликации *Cntn6* линий и 2 линии с интактным аллелем *Cntn6*. Кроме того, для исследования было отобрано четыре линии ЭФМ, полученных от компаундных эмбрионов, несущих дупликацию и делецию *Cntn6* в одном геноме и две линии фибробластов: № 2 и № 21, несущих инверсию гена *Cntn6*, полученные из кожи взрослых мышей-основателей. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% телячьей сыворотки и 50 мг/мл пенициллина/стрептомицина в CO₂ инкубаторе при pH 7.4 и 37°C. По достижении монослоя клетки снимали с поверхности культурального матраса смесью 0.25%-ного трипсина и 0.1 М ЭДТА (10 : 1) и переносили в нужном разведении в новый культуральный сосуд, содержащий ростовую среду.

Получение суспензий фиксированных метафазных клеток. Суспензии фиксированных клеток получали

на 2–4 пассаже по протоколу, описанному ранее (Minina et al., 2010), с некоторыми модификациями. Кратко: к клеточным культурам добавляли коллечник в концентрации 0.5 мкг/мл и выдерживали 2.5 ч в CO₂-инкубаторе при pH 7.4 и 37°C. Затем клетки снимали трипсином (0.25% в 0.1 М ЭДТА) в пробирки с последующим центрифугированием 5 мин при 1300 об./мин. Гипотоническую обработку проводили раствором 0.075 М KCl в течение 20 мин при 37°C, затем добавляли раствор Карнуа (3 части метанола, 1 часть ледяной уксусной кислоты) для предфиксации, аккуратно перемешивали и центрифугировали 5 мин при 1300 об./мин. Осадок растворяли в охлажденном растворе Карнуа. Для получения препаратов с метафазными клетками 70–80 мкл клеточной суспензии раскапывали на охлажденное влажное предметное стекло с высоты 15–20 см.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация. FISH проводили по протоколу, описанному ранее (Pristyazhnyuk et al., 2019) с небольшими модификациями. Кратко: препараты инкубировали 50 мин в растворе РНКазы А (100 мкг/мл) при 37°C, промывали в буфере 2×SSC и выдерживали в растворе пепсина (0.02% в 10 mM HCl) в течение 5 мин при 37°C. Затем препараты фиксировали в 1%-ном формальдегиде в PBS 10 мин и денатурировали в 70%-ном формамиде в 2×SSC 2 мин при 75°C. Зонд, специфичный для хромосомы 6 мыши, был любезно предоставлен Сердюковой Н.А. Зонд был получен путем сортировки и амплификации хромосомы 6 с помощью DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR) (Telenius et al., 1992; Yang et al., 2000). Затем библиотека хромосомы 6 мыши была реамплифицирована с помощью ПЦР. Хромосомоспецифичный зонд денатурировали при 95°C в течение 5 мин с последующей предгибридизацией в присутствии Cot1 ДНК в течение 50 мин при 37°C. Гибридизация длилась 24 ч во влажной камере при 37°C. После этого препараты отмывали трижды по 5 мин в растворе 50%-ного формамида (в 2×SSC), затем трижды в 2×SSC при 37°C и один раз в 0.1×SSC при 65°C. Меченый дигоксигенином хромосомоспецифичный зонд выявляли с помощью мышиных антител против дигоксигенина, конъюгированных с Cy3 (красный флуорохром) (1 : 100), и усиливали сигнал специфичными к мышиным антителам антителами овцы, конъюгированными с Cy3 (1 : 100). Хромосомы окрашивали раствором DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндол).

Анализ данных. Анализ и съемку результатов гибридизации проводили на микроскопе Axioplan 2 (Zeiss, Germany), оснащенном камерой CV-M300 CCD (JAI Corporation, Япония) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН. Обработку результатов проводили с помощью программы для обработки изображения “ISIS 5” (MetaSystemsGroup, Inc., США). Для каждой линии было проанализировано как минимум по 100 метафазных пластинок. Для оценки различий

между независимыми выборками использовали тест Манна–Уитни и программное обеспечение STATISTICA 10.

Использованные реактивы: 4,6-диамино-2-фенилиндол (DAPI), антифейд (Vector, США); PBS (Медиген, Россия), коллечник, пепсин, пенициллин/стрептомицин и полиоксиэтиленсорбитан монолаурат (Tween 20), РНКазы А, формальдегид и деионизованный формамид, NaCl, цитрат натрия C₆H₅Na₃O₇, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma, США); конъюгированные с Cy3 антитела мыши к дигоксигенину и конъюгированные с Cy3 антитела овцы к мыши (Jackson ImmunoResearch, Англия); культуральная среда DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, США); метанол 100% (Химмед, Россия); уксусная кислота (Реахим, Россия); трипсин (Thermo Fisher Scientific Inc, США); хлорид калия KCl (Biochem, Франция); хлорид магния MgCl₂ (Amresco, США); эмбриональная сыворотка (Hyclone, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

FISH-анализ гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6* линий ЭФМ. С помощью FISH было проанализировано 8 линий ЭФМ, гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6*: 4 линии ЭФ, несущих дупликацию гена *Cntn6* основателя № 1 и 4 линии с дупликацией гена *Cntn6* от основателя № 20. Поскольку мы использовали ДНК зонд, окрашивающий всю хромосому 6 мыши, то могли легко идентифицировать эти хромосомы на метафазных пластинках (рис. 1а). Трисомия хромосомы 6 в этих линиях была выявлена с разной частотой, от 1 до 8% (табл. 1). В одной линии (Л20№ 2) трисомии хромосомы 6 выявлено не было. Наряду с оценкой уровня трисомии мы исследовали уровень моносомии по этой хромосоме и долю полиплоидных клеток. Моносомия в гетерозиготных по дупликации *Cntn6* линиях выявлена в 1–9% клеток, а полиплоидные клетки составляли 21–44% (табл. 1).

FISH-анализ гомозиготных по дупликации гена *Cntn6* линий ЭФМ. Для оценки уровня трисомии хромосомы 6 в гомозиготных по дупликации *Cntn6* клетках было проанализировано 5 линий ЭФМ: 3 линии, несущих дупликацию гена *Cntn6* основателя № 1, и 2 линии с дупликацией гена *Cntn6* основателя № 20. Трисомия хромосомы 6 в этих линиях ЭФМ встречалась в 2–6% клеток (табл. 2, рис. 1б). При этом моносомия по хромосоме 6 выявлена в 1–3% клеток. Доля полиплоидных клеток составляла 36–46%.

FISH-анализ линий ЭФМ с интактным аллелем *Cntn6*. В качестве контроля были проанализированы 4 линии ЭФМ, несущие интактный (дикий) аллель гена *Cntn6* и полученные из эмбрионов одного помёта с исследуемыми гетерозиготными и гомозиготными по дупликации гена *Cntn6* эмбрионами. В контрольных линиях трисомия, как и моносомия хромосомы 6 была выявлена в 1–2% клеток (табл. 3, рис. 1в). Доля полиплоидных клеток в контрольных линиях

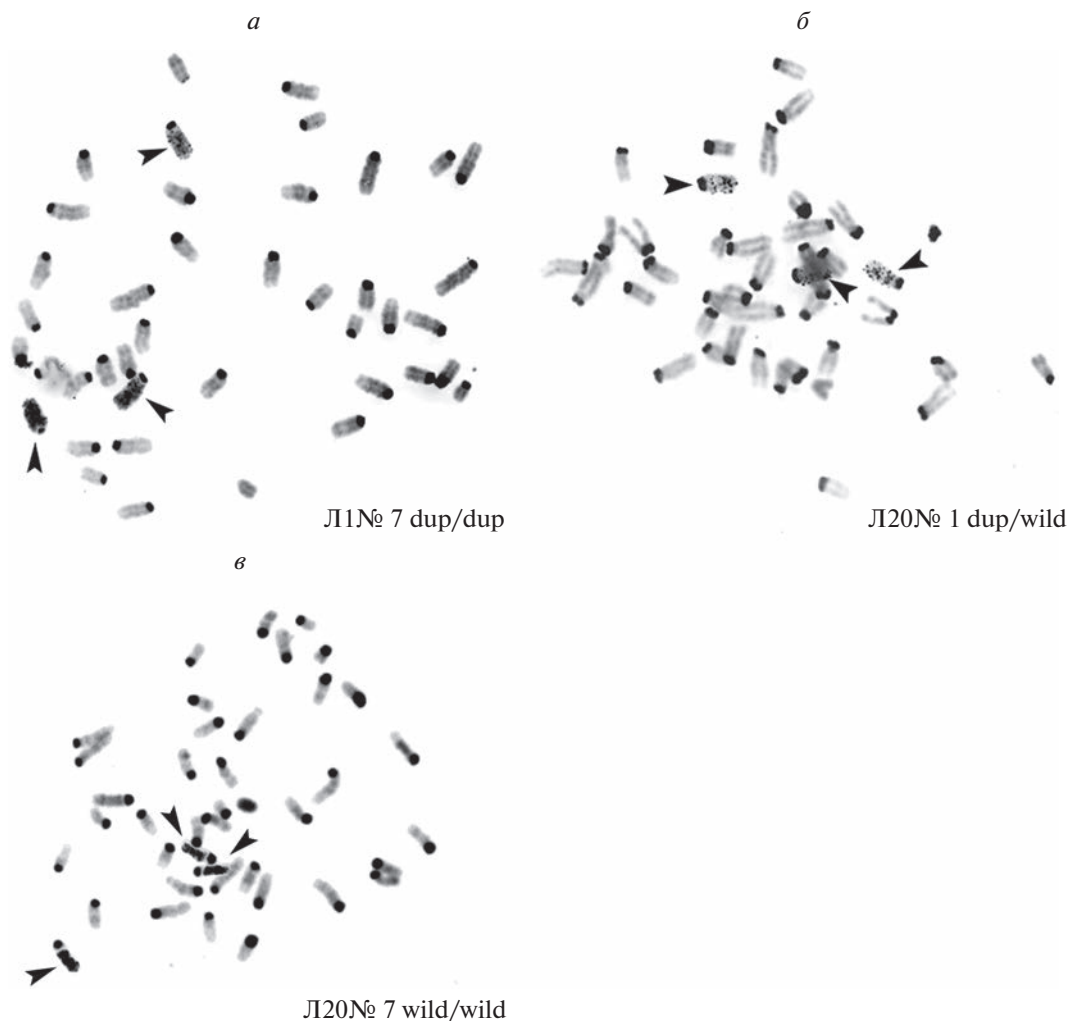


Рис. 1. Метафазные хромосомы после FISH с хромосомоспецифичной пробой, окрашивающей всю хромосому 6 мыши, в гомозиготных по дупликации *Cntn6* ЭФМ (а), гетерозиготных по дупликации *Cntn6* ЭФМ (б) и в ЭФМ с интактным геном *Cntn6* (в). Стрелки указывают на хромосомы 6. Увел. об.: 100×.

ЭФМ была значительно меньше, чем в гетеро- и гомозиготных по дупликации *Cntn6* линиях, и составляла 18–26%.

FISH-анализ линий ЭФМ, несущих дупликацию и делецию гена *Cntn6* в одном геноме. FISH-анализ в четырех линиях ЭФМ, гетерозиготных по дупликации и делеции *Cntn6* в одном геноме (Л44 № 1, Л44 № 5, Л44 № 8 и Л44 № 10), не выявил трисомии по хромосоме 6. Все четыре линии ЭФ демонстрировали устойчивый кариотип, с незначительной долей анеуплоидных (3.8–6.1%) и полиплоидных (1.5–5.4%) клеток (табл. 4). Причем, анеуплоидия клеток представляла собой в основном потерю одной половой хромосомы.

FISH-анализ гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6* линий ФМ. Был проведен цитогенетический анализ двух линий фибробластов, кожи взрослых мышей-основателей, № 1 и № 2, гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6*, полученной при геномном ре-

дактировании в зиготе технологией CRISPR/Cas9 (Korablev et al., 2017). В обеих линиях была выявлена трисомия хромосомы 6 в 2% клеток, что сопоставимо с уровнем трисомии по этой хромосоме в контрольных линиях ЭФМ с интактным аллелем *Cntn6*. Доля полиплоидных клеток составляла 20 и 26%, а анеуплоидных 40 и 43% в исследованных линиях № 21 и № 2 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что уровень трисомии по хромосоме 6 в гетерозиготных и гомозиготных по дупликации гена *Cntn6* линиях ЭФМ оказался в среднем одинаковым (1–8 и 2–6% соответственно, статистически достоверных различий найдено не было), уровень трисомии среди линий ЭФМ внутри каждой выборки варьировал значительно. По всей видимости, это обусловлено внутренними свойствами каж-

Таблица 1. Результаты FISH-анализа ЭФМ, гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6*

Линия ЭФМ, гетерозиготная по дупликации гена <i>Cntn6</i>	Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в %	Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в %	Количество полиплоидных клеток, в %	Число проанализированных метафаз
Л1№ 4	8	4	44	100
Л1№ 8	3	0	40	100
Л1№ 7-2м	4	0	20	100
Л1№ 3-2м	1	1	28	100
Л20№ 1	4	9	34	100
Л20№ 2	0	0	21	100
Л20№ 5	3	1	34	100
Л20№ 6	3	2	25	100

Таблица 2. Результаты FISH-анализа ЭФМ, гомозиготных по дупликации гена *Cntn6*

Линия ЭФМ, гомозиготная по дупликации гена <i>Cntn6</i>	Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в %	Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в %	Количество полиплоидных клеток, в %	Число проанализированных метафаз
Л1№ 5	4	2	40	100
Л1№ 7	6	1	40	100
Л1№ 9	2	1	36	100
Л20№ 3	6	1	37	100
Л20№ 4	2	3	46	100

дой отдельной линии. Ранее была показана зависимость скорости полиплоидизации, возникновения моносомий, трисомий по отдельным хромосомам и других хромосомных перестроек от индивидуальных свойств линий и условий культивирования (Liu et al., 1997). С другой стороны, для клеток со сложными анеуплоидными кариотипами характерно раннее старение, при котором они вырабатывают провоспалительные сигналы, приводящие к их элиминации естественными клетками-киллерами *in vitro* (Santaguida et al., 2017). Надо отметить, что в нашем исследовании некоторые линии ЭФМ, гетерозиготные и гомозиготные по дупликации гена *Cntn6*, останавливали свое деление уже после 2–4 пассажа. Поскольку условия культивирования в нашем исследовании у всех линий ЭФМ были идентичны, и анализ проводили в клетках на ранних пассажах, то высо-

кий уровень полиплоидии и анеуплоидии отражает, вероятно, проблемы в работе митотического аппарата клеток. В другом исследовании было отмечено появление тетраплоидных клеток (от 24 до 43%) в предшественниках нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с LRRK2-ассоциированной формой паркинсонизма после процедуры редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9. Кроме того, в некоторых клетках были обнаружены разрывы хромосом и транслокации (Vetchinova et al., 2018).

Трисомия хромосомы 6 в линиях ФМ, гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6*, как и в контрольных линиях ЭФМ, несущих интактный аллель гена *Cntn6*, по всей видимости, возникла спонтанно в единичных культивируемых клетках. В исследовании Мензорова с соавторами (Menzorov et al., 2016)

Таблица 3. Результаты FISH-анализа контрольных линий ЭФМ с интактным аллелем *Cntn6*

Линия ЭФМ с интактным аллелем гена <i>Cntn6</i>	Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в %	Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в %	Количество полиплоидных клеток, в %	Число проанализированных метафаз
Л1№ 1	0	2	26	100
Л1№ 1-2м	2	0	22	100
Л20№ 7	2	1	29	100
Л20№ 8	1	1	18	100

Таблица 4. Результаты FISH-анализа ЭФМ, гетерозиготных по дупликации и делеции гена *Cntn6* в одном геноме

Линия ЭФМ, гетерозиготная по дупликации и делеции <i>Cntn6</i>	Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в %	Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в %	Количество полиплоидных клеток, в %	Количество анеуплоидных клеток, в %	Число проанализированных метафаз
Л44№ 1	0	0.77	5.4	6.1	130
Л44№ 10	0	0	1.5	3.8	130
Л44№ 5	0	0	5.7	3.5	140
Л44№ 8	0	0	2.5	5.8	118

при изучении стабильности кариотипов на ранних пассажах в 32 эмбриональных стволовых (ЭС) линиях мыши, полученных из внутренней клеточной массы бластоцист, было обнаружено спонтанное возникновение трисомии по хромосомам 1, 6, 9, 11, 13, 14, 18 и 19 в некоторых клетках многих ЭС линий, а также моносомия по различным хромосомам в небольшой доле клеток разных ЭС линий.

Возможным объяснением отсутствия трисомии в ЭФМ, несущих дупликацию и делецию гена *Cntn6* в компаунде, является то, что доза гена *Cntn6* в геноме оказалась близкой к норме, в отличие от линий, в которых дупликация *Cntn6* была в гетеро- или гомозиготе. Таким образом, дупликация *Cntn6* и делеция *Cntn6* на разных гомологах в одном геноме оказались более стабильными для генома модификациями, чем когда доза гена *Cntn6* в геноме была выше в 1.5 или 2 раза.

Не исключено, что в клетках исследованных линий ФМ, несущих редактированный ген *Cntn6*, трисомия по хромосоме 6 возникает на более высоком уровне, но сопровождается быстрой элиминацией анеуплоидных клеток в раннем развитии эмбриона. Было показано, что, начиная с предимплантационного периода, анеуплоидные клетки элиминируются по мере развития эмбриона путем апоптоза. Эуплоидно-анеуплоидные мозаики, содержащие достаточное количество нормальных диплоидных клеток, имеют полный потенциал развития (Bolton et al., 2016). Недавнее исследование (Singla et al., 2020) подтверждает, что анеуплоидные клетки элиминируются на ранних этапах развития эмбриона путем апоптоза, а нормальные диплоидные клетки увеличивают скорость пролиферации, чтобы компенсировать недостаток в размере эмбриона из-за элиминированных клеток. Также возможно, что дупликация *Cntn6* в гетерозиготе может повышать вероятность трисомии, но не гарантировать ее появление. Так, среди факторов, влияющих на возникновение анеуплоидии, помимо изменений в центромерных районах и динамики митотического веретена выделяют дупликации и изменения хромосомной конденсации и когезии (Goepfert et al., 2000; Cleveland et al., 2003; Kalitsis et al., 2005).

Проведенное исследование показало, что полученные в ходе редактирования генома в зиготе мышей с помощью CRISPR/Cas9 делеция, инверсия и

дупликация гена *Cntn6* приводят к дестабилизации кариотипа. Это выражается в повышенном уровне полиплоидии и анеуплоидии, в частности в появлении трисомии хромосомы 6 в некоторых исследованных линиях ЭФМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-04-00463А) и бюджетного проекта № FWNR-2022-0019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры были проведены в соответствии с постановлением совета ЕС (24 ноября 1966, 86/609/ЕЕС) и одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики (разрешение № 24 от 24.10.2014).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bolton H., Graham S.J.L., Niels V.D.A., Kumar P., Theunis K., Gallardo E.F., Voet T., Zernicka-Goetz M. 2016. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat. Commun.* V. 7. P. 11165.
- Boroviak K., Doe B., Banerjee R., Yang F., Bradley A. 2016. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis.* V. 54. P. 78.
- Ca L., Fisher A.L., Huang H., Xie Z. 2016. CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes & Diseases.* V. 3. P. 244.
- Canver M.C., Bauer D.E., Dass A., Yien Y.Y., Chung J., Masuda T., Maeda T., Paw B.H., Orkin S.H. 2017. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* V. 292. P. 2556.
- Cleveland D.W., Mao Y., Sullivan K.F. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* V. 112. P. 407.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. 2013. Multiplex

- genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. V. 339. P. 819.
- Cox D.B.T., Platt R.D., Zhang F. 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Rev.* V. 21. P. 121.
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., Nezi L., Protopopov A., Chowdhury D., Pellman D. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*. V. 482. P. 53.
- Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K., Naito K. 2013. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and Cas9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* V. 41: e187.
- Goepfert T.M., McCarthy M., Kittrell F.S., Stephens C., Ullrich R.L., Brinkley B.R., Medina D. 2000. Progesterone facilitates chromosome instability (aneuploidy) in p53 null normal mammary epithelial cells. *FASEB J.* V. 14. P. 2221.
- Hara S., Kato T., Goto Y., Kubota S., Tamano M., Terao M., Takada S. 2016. Microinjection-based generation of mutant mice with a double mutation and a 0.5 Mb deletion in their genome by the CRISPR/Cas9 system. *J Reprod Dev.* V. 62. P. 531.
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. V. 157. P. 1262.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* V. 31. P. 827.
- Hussain W., Mahmood T., Hussain J., Alid N., Shahe T., Qayyum S., Khang I. 2019. CRISPR/Cas system: A game changing genome editing technology, to treat human genetic diseases. *Gene*. V. 685. P. 70.
- Janssen A., van der Burg M., Szuhai K., Kops G.J., Medema R.H. 2011. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science*. V. 333. P. 1895.
- Kalitsis P., Fowler K.J., Griffiths B., Earle E., Chow C.W., Jamson K., Choo K.H.A. 2005. Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice. *Genes Chromosomes Cancer*. V. 44. P. 29.
- Korablev A.N., Serova I.A., Serov O.L. 2017. Generation of megabase-scale deletions, inversions and duplications involving the Contactin-6 gene in mice by CRISPR/Cas9 technology. *BMC Genet.* V. 18. P. 112.
- Kosicki M., Tomberg K., Bradley R. 2018. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* V. 36. P. 765.
- Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W.L., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragestein B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupianez D.G., Andrey G. 2015. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep.* V. 10. P. 833.
- Lin S.R., Yang H.C., Kuo Y.T., Sung K.C., Lin Y.Y., Wang H.Y., Wang C.C., Shen Y.C., Wu F.Y., Kao J.H., Chen D.S., Chen P.J. 2014. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. V. 3: e186.
- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Distech C.M., Bornstein P., Jaenisch R. 1997. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.* V. 209. P. 85.
- Mehrvavar M., Shirazi A., Nazari M., Banan M. 2019. Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Development. Biology*. V. 445. P. 156.
- Menzorov A., Pristiyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O.L. 2016. Cytogenetic analysis and Dlk1-Dio3 locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages. *Cyto-technology*. V. 68. P. 61.
- Minina Yu.M., Zhdanova N.S., Shilov A.G., Tolkunova E.N., Liskovych M.A., Tomilin A.N. 2010. Chromosomal instability of mouse pluripotent cells cultured *in vitro*. *Cell and Tissue Biology*. V. 4. P. 223.
- Mollanoori H., Shahraki H., Rahmati Y., Teimourian S. 2018. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human Immunology*. V. 79. P. 876.
- Pankowicz F.P., Barzi M., Legras X., Hubert L., Mi T., Tomolonis J.A., Ravishankar M., Sun Q., Yang D., Borowiak M., Sumazin P., Elsea S.H., Bissig-Choisat B., Bissig K.D. 2016. Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat. Commun.* V. 7. P. 1.
- Podryadchikova O.L., Pristiyazhnyuk I.E., Matveeva N.M., Serov O.L. 2009. FISH analysis of regional replication of homologous chromosomes in hybrid cells obtained by fusion of embryonic stem cells with somatic cells. *Tsitologiya*. V. 51. P. 500.
- Pristiyazhnyuk I.E., Minina J., Korablev A., Serova I., Fishman V., Gridina M., Rozhdestvensky T.S., Gubar L., Skryabin B.V., Serov O.L. 2019. Time origin and structural analysis of the induced CRISPR/cas9 megabase-sized deletions and duplications involving the Cntn6 gene in mice. *Sci. Rep.* V. 9. P. 14161.
- Sakuma T., Masaki K., Abe-Chayama H., Mochida K., Yamamoto T., Chayama K. 2016. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*. V. 21. P. 1253.
- Santaguida S., Richardson A., Iyer D.R., M'Saad O., Zasadil L., Knouse K.A., Wong Y.L., Rhind N., Desai A., Amon A. 2017. Chromosome mis-segregation generates cell cycle-arrested cells with complex karyotypes that are eliminated by the immune system. *Dev Cell*. V. 41. P. 638.
- Singla S., Iwamoto-Stohl L.K., Zhu M., Zernicka-Goetz M. 2020. Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism. *Nat. Commun.* V. 11. P. 2958.
- Telenius H., Pelmeur A.H., Tunnacliffe A., Carter N.P., Behmel A., Ferguson-Smith M.A., Nordenskjold M., Pfragner R., Ponder B.A. 1992. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*. V. 4. P. 226.
- Thompson S.L., Compton D.A. 2011. Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res.* V. 19. P. 433.
- Vetchinova A.S., Simonova V.V., Novosadova E.V., Manuilova E.S., Nenasheva V.V., Tarantul V.Z., Grivennikov I.A., Khaspekov L.G., Illarioshkin S.N. 2018. Cytogenetic analysis of the results of genome editing on the cell model of Parkinson's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 165. P. 355.

- Yang E., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A. 2000. Comparative chromosome map of the laboratory mouse and chinese hamster defined by reciprocal chromosome painting. *Chromosome Res.* V. 8. P. 219.
- Zhen S., Lu J.J., Wang L.J., Sun X.M., Zhang J.Q., Li X., Luo W.J., Zhao L. 2016. In vitro and in vivo synergistic therapeutic effect of cisplatin with human papillomavirus16 E6/E7 CRISPR/Cas9 on cervical cancer cell line. *Transl. Oncology.* V. 9. P. 498.
- Zhang L., Jia R., Palange N.J., Satheka A.C., Togo J., An Y., Humphrey M., Ban L., Ji Y., Jin H., Feng X., Zheng Y. 2015.

CRISPR/Cas9 Induced Duplications, Deletions and Inversions in Mouse Zygotes Lead to Karyotype Instability

J. M. Minina^{a, *}, A. B. Soroka^b, T. V. Karamysheva^a, N. A. Serdyukova^c, and O. L. Serov^a

^a*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia*

^c*Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: minina_jul@mail.ru

CRISPR/Cas9 technology has been widely used for targeted modification of the mammalian genomes. We have analyzed the karyotype of 18 mouse fibroblast cell lines with *Cntn6* gene rearrangements introduced by CRISPR/Cas9. We have produced cell lines with 2374 kb *Cntn6* gene duplications, 1137 kb deletions and inversions of similar size. In addition, we have performed cytogenetic analysis for five control mouse embryonic fibroblasts with the intact *Cntn6* gene alleles. The cell lines heterozygous for *Cntn6* gene inversion and homozygous and heterozygous for *Cntn6* gene duplication had a high level of polyploidy (20–46%), as well as chromosome 6 monosomy (1–9%) and trisomy (1–8%). No trisomy was detected in the four cell lines with the deletion and duplication of the *Cntn6* gene in the compound, and the proportion of polyploid cells was minimal (1.5–5.7%). Thus, we have shown the karyotype destabilization in the cell lines that have undergone genome editing using CRISPR/Cas9 system.

Keywords: CRISPR/Cas9, duplication, deletion, aneuploidy, trisomy, *Cntn6*

УДК 579.23

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК *Escherichia coli* В СОСТОЯНИИ SOS-ОТВЕТА ПРИ ПОМОЩИ ЭКСПАНСИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. Н. А. Румянцева¹, Д. М. Голофеева¹, И. Е. Вишняков^{2, *}, А. Д. Ведякин¹

¹Научно-исследовательский комплекс “Нанобиотехнологии” Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: innvish@incras.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 21.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

Экспансионная микроскопия (Expansion microscopy, ExM) — метод пробоподготовки, позволяющий добиться улучшенной визуализации структур за счет физического расширения образца. Этот метод используется в сочетании с традиционной световой микроскопией и позволяет без применения сложных технических устройств, характерных для методов сверхразрешающей микроскопии (super-resolution microscopy), добиться визуализации биологических структур с более высоким разрешением. В отличие от методов сверхразрешающей микроскопии, экспансионная микроскопия не позволяет преодолеть дифракционный предел, однако наблюдаемый эффект можно считать эквивалентным увеличению пространственного разрешения. Относительная простота метода и нетребовательность к используемому микроскопу сделали экспансионную микроскопию довольно популярным методом для визуализации различных биологических структур. В настоящей работе описано использование экспансионной микроскопии для визуализации в клетках *Escherichia coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа, ДНК и структур, формируемых белком FtsZ. Результаты работы подтверждают полученные ранее данные о том, что белок FtsZ в клетках, находящихся в состоянии SOS-ответа, распределен неравномерно. Используемый в работе протокол визуализации клеток *E. coli*, предварительно закрепленных на поверхности стекла, с помощью метода экспансионной микроскопии может быть использован в будущем для изучения внутренних структур других клеток — как бактериальных, так и эукариотических.

Ключевые слова: экспансионная микроскопия, белок FtsZ, SOS-ответ, бактериальное деление

DOI: 10.31857/S0041377123030070, **EDN:** VDSBHA

Хорошо известно, что световая микроскопия и, в особенности, ее разновидность — флуоресцентная микроскопия — обладает множеством достоинств, которые определяют ее широкое применение при изучении биологических объектов (Sanderson et al., 2014). Наряду с достоинствами, световая микроскопия имеет и недостатки, среди которых одним из наиболее существенных является сравнительно низкое пространственное разрешение, которое ограничено дифракционным пределом на уровне примерно половины длины волны используемого светового излучения (Renz, 2013). Дифракционный предел — фундаментальное явление и следствие волновой природы света; фактически, это минимальное расстояние, на котором могут находиться 2 точечных объекта и при этом быть отличимыми друг от друга (разрешимыми). Кроме длины волны, дифракционный предел зависит от числовой апертуры, что делает предпочтительным использование объективов с высокой числовой апертурой (например, с масляной иммерсией). Для световых микроскопов предел раз-

решения обычно оценивают на уровне 200–300 нм (в фокальной плоскости).

В настоящее время описано несколько подходов, позволяющих преодолеть дифракционный предел и добиться улучшения разрешения вплоть до единиц нанометров. Принципы таких методов, собирательно называемых методами сверхразрешающей микроскопии (или микроскопии сверхвысокого разрешения), существенно отличаются, однако общая идея может быть сформулирована следующим образом: выигрыш в пространственном разрешении достигается за счет ухудшения временного разрешения и (или) применения достаточно сложных технических дополнений к световому микроскопу. Такие технические дополнения являются дорогостоящими и могут включать лазерное освещение с высокой плотностью мощности, сложные схемы сканирования образца, создание структурированной засветки образца, использование двух оппозитных объективов и др. Кроме сложных технических решений, эти методы обычно требуют продвинутого и трудного в

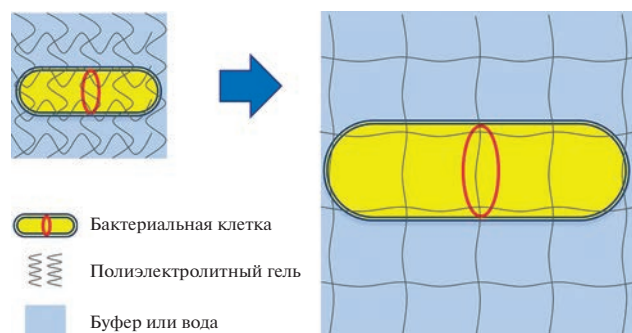


Рис. 1. Общий принцип экспансионной микроскопии на примере бактериальной клетки, заключенной в полиэлектролитный гель. Клетка обозначена желтым, красным отмечено Z-кольцо, серые линии — полимеры матрицы геля. Слева — гель с заключенной в него клеткой до расширения (в солевом буфере), справа — после расширения (в воде). Полимеризация геля осуществляется в солевом буфере, в котором заряженные молекулы, формирующие гель, экранированы и практически не взаимодействуют друг с другом, в результате чего формируются слабо упорядоченные полимеры, составляющие матрицу геля. В бессолевой среде взаимное отталкивание одноименно заряженных мономеров полиэлектролитного геля вызывает его значительное изотропное расширение. При этом полимеры геля распрямляются, а образец, заключенный в гель, увеличивается.

обращении программного обеспечения, что дополнительно увеличивает стоимость и снижает их доступность для исследователей (Клементьева и др., 2016; Feng et al., 2018).

В 2015 г. был предложен новый метод пробоподготовки, который предполагает заключение образца в гель и его последующее расширение в несколько раз. Метод получил название экспансионной микроскопии (Chen et al., 2015). Общий принцип экспансионной микроскопии на примере работы с бактериальной клеткой представлен на рис. 1. Ключевая идея метода — заключить образец в гель таким образом, чтобы внутриклеточные структуры оказались сшиты с матрицей геля, а затем осуществить расширение геля, в ходе которого связанная с гелем клетка также расширяется (Wassie et al., 2019).

Протоколы экспансионной микроскопии в опубликованных работах различаются; тем не менее их основные этапы схожи между собой. Вначале образец подвергают фиксации и пермеабиллизации, после чего в рамках некоторых протоколов (например, см.: Tillberg et al., 2016) осуществляют иммунофлуоресцентное окрашивание. К сожалению, непосредственное окрашивание объекта интереса антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, на данном этапе пробоподготовки затруднено, так как в ходе дальнейшей пробоподготовки осуществляется расщепление белков, что зачастую приводит к разрушению антител и, соответственно, удалению флуоресцентной метки.

Для флуоресцентного мечения вначале был предложен подход, использующий олигонуклеотиды, которые связывают флуорофор с матрицей геля. Вторичные антитела, используемые для окрашивания, сшиты с олигонуклеотидом, который затем гибридизуется с модифицированным олигонуклеотидом (добавлены флуоресцентный краситель и группа, реагирующая с матрицей геля). Использование олигонуклеотидов позволяет сохранить положение флуоресцентных меток в геле в ходе дальнейшего протеолиза. Вместо использования антител на этом этапе пробоподготовки возможно также использование флуоресцентных белков (основано на их устойчивости ко многим протеазам) (Chozinski et al., 2016). Кроме того, в некоторых протоколах данный этап мечения пропускают, а флуоресцентное окрашивание (обычно антителами) осуществляют после протеолиза (Chozinski et al., 2016).

Далее образец подвергают дополнительной модификации (функционализации), что обеспечивает добавление к определенным молекулам образца (например, аминокислотам) реакционно-способных групп, которые в дальнейшем позволяют сшить образец с матрицей геля. Пример функционализации образца — использование реагента Acryloyl-X (Tillberg et al., 2016). Затем функционализированный образец заключают в полиакриламидный гель, при этом полимеризацию осуществляют в растворе с высокой ионной силой, что приводит к экранированию заряженных мономеров матрицы геля и обеспечивает формирование слабо упорядоченных полимеров. В дальнейшем, после основных этапов пробоподготовки, расширение геля происходит в результате электростатического отталкивания молекул, составляющих матрицу геля, при помещении геля в раствор с низкой ионной силой (например, в деионизованную воду). При этом неупорядоченные полимеры матрицы геля распрямляются — именно этим ограничена степень расширения геля (обычно примерно в 4 раза в каждом направлении, хотя некоторые протоколы позволяют добиться большей степени расширения (Li et al., 2022)).

Однако расширение образца непосредственно после его заключения в гель затруднено, так как биологические молекулы (в основном белки и их комплексы) обладают высокой прочностью и препятствуют расширению. Поэтому после заключения в гель осуществляют расщепление белковых структур образца (в основном, путем протеолиза, например, протеиназой К), а в ряде случаев — нуклеиновых кислот и клеточной стенки (у бактерий). Для расщепления белков можно использовать также нагрев. Следует отметить, что расщепление белковых структур часто приводит к уничтожению эпитопов, что делает невозможным иммунофлуоресцентное мечение образца после его обработки. Для такого мечения используют ограниченный протеолиз, одновременно сохраняющий эпитопы и делающий возможным расширение образца.

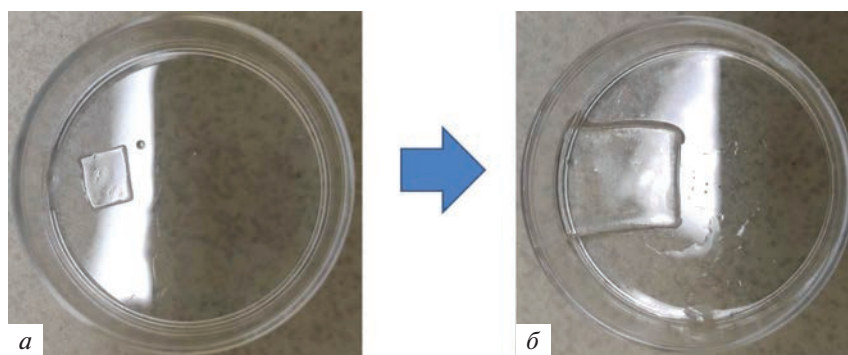


Рис. 2. Расширение полиэлектrolитного геля. Исходно фрагмент геля находится в солевом растворе (а), а затем переносится в деионизованную воду, где происходит его расширение в несколько раз (б).

После расщепления иногда проводят иммунофлуоресцентное окрашивание образца (зависит от протокола подготовки), а также окрашивание ДНК и (или) других структур соответствующими красителями. После этого гель с заключенным в него образцом переносят в раствор с низкой ионной силой (например, деионизованную воду), где происходит его изотропное расширение в несколько раз (см. рис. 2). Затем образец визуализируют.

Основное преимущество метода экспансионной микроскопии — возможность визуализации образца с четырехкратным выигрышем в разрешении структур с использованием стандартного флуоресцентного микроскопа, что эквивалентно использованию методов сверхразрешающей микроскопии. Более того, в результате применения некоторых протоколов удается получить и более высокую степень расширения, например, за счет последовательного перезаключения образца в гель (Chang et al., 2017). Другое важное преимущество метода экспансионной микроскопии заключается в том, что в ходе расширения образца увеличивается доступность структур для окрашивания, в том числе белковых эпитопов, поэтому экспансионная микроскопия может существенно помочь в изучении локализации компонентов в сложных белковых комплексах.

Наряду с достоинствами, метод экспансионной микроскопии обладает и недостатками. В частности, в случае недорасщепления структур расширение образца может оказаться недостаточным или неоднородным (последнее приводит к искажению исследуемых структур). Напротив, чрезмерное расщепление, как уже отмечено выше, уничтожает эпитопы белков, что препятствует иммунофлуоресцентному мечению структур после расщепления образца и даже может полностью разрушить структуру образца, что делает невозможным его визуализацию. Поэтому оптимизация протокола расщепления образца является одним из важнейших условий успешной реализации всего метода. Другой недостаток связан с тем, что в процессе полимеризации геля может происходить обесцвечивание флуоресцентных мо-

лекул (Tillberg et al., 2016). Это ограничивает флуоресцентное мечение структур до заключения образца в гель. Для преодоления такого недостатка необходимо использовать только совместимые с методом флуоресцентные красители. Кроме того, можно метить структуры уже после расщепления образца.

В русскоязычной литературе нам удалось найти несколько работ, посвященных использованию экспансионной микроскопии для исследования тканей. Например, в одной из статей авторы продемонстрировали использование метода экспансионной микроскопии для изучения тканей головного мозга (Деревцова и др., 2021). Работы, использующие этот метод для изучения одиночных клеток, нам не удалось найти.

В настоящей работе метод экспансионной микроскопии был использован для визуализации одиночных клеток *Escherichia coli*, предварительно закрепленных на поверхности стекла. Использование метода позволило показать, что в состоянии SOS-ответа белок FtsZ неравномерно распределен по клетке, что свидетельствует о неполной разборке полимеров, формируемых данным белком. Кроме того, было охарактеризовано распределение ДНК в бактериальной клетке в состоянии SOS-ответа. Протокол пробоподготовки, используемый в настоящей работе, может быть использован в будущем для визуализации иных объектов, например, адгезивных культур клеток эукариот, а также бактерий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бактерии. Использовали бактерии *Escherichia coli* штамма BW27783 с геном белка слияния FtsZ:mNeon-Green (Moore et al., 2013). Культуру выращивали в жидкой среде LB при 37°C в термошейкере до величин оптической плотности среды (OD_{600}) 0.2, затем активировали (при необходимости) SOS-ответ облучением ультрафиолетовым светом в течение 1 мин в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat Infinity-1500/36M). Через 30 мин или 1 ч после активации SOS-ответа

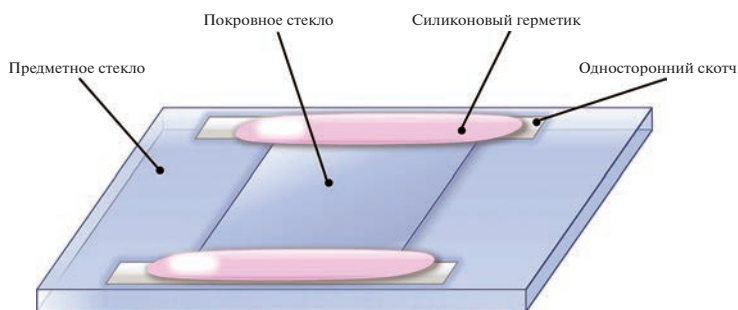


Рис. 3. Слайд, используемый для закрепления бактериальных клеток на поверхности покровного стекла. Слайд состоит из предметного и покровного стекла, разделенных слоем одностороннего скотча (скотч обращен липкой стороной к предметному стеклу). Силиконовый герметик обеспечивает быстрое и надежное крепление стекол и при этом позволяет легко разбирать слайд в ходе дальнейшей работы. Бактерии закрепляются на внутренней поверхности покровного стекла, для улучшения закрепления стекло покрыто поли-*L*-лизинем.

отбирали образцы для дальнейшей пробоподготовки. В качестве контроля брали культуру, не подвергавшуюся облучению ультрафиолетом.

Пробоподготовка. Клетки подготавливали согласно протоколу (Basic protocol 1; Asano et al., 2018) с небольшими изменениями. Фиксацию осуществляли добавлением в среду формальдегида до конечной концентрации 2.6%, глутаральдегида — 0.04% и натрий-фосфатного буфера (pH 7.5) — 32 мМ. Затем клетки инкубировали 10 мин на льду и 50 мин при комнатной температуре. Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), каждый раз центрифугируя образцы при 6000 g в течение 2 мин. После этого клетки помещали в промываемую камеру, полученную из предметного и покровного стекла, которые разделены скотчем (рис. 3). По-

кровные стекла для камеры подвергали плазменной очистке. Камеру предварительно обрабатывали поли-*L*-лизинем в течение 10 мин для лучшего закрепления бактерий на поверхности стекла.

Далее камеру переворачивали и оставляли на 30 мин для закрепления бактерий на покровном стекле. Дальнейшие операции выполняли путем смены растворов в полученной промываемой камере. Для разрушения клеточной стенки клетки инкубировали при 37°C в течение ночи в растворе лизоцима в PBS в концентрации 2 мг/мл. На следующий день клетки трижды промывали PBS. Далее действовали согласно протоколу (Asano et al., 2018). В частности, раствор Acryloyl-X SE (10 мг/мл в DMSO) разводили в PBS до конечной концентрации 0.1 мг/мл. Далее клетки инкубировали в полученном растворе в течение 2–3 ч при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали PBS.

Заклучение бактериальных клеток в гель осуществляли с использованием специальной камеры для заливки геля (рис. 4). Алгоритм заливки схематично изображен на рис. 5. Вначале удаляли силиконовый герметик, соединяющий покровное стекло с другими частями промываемой камеры. Затем покровное стекло с закрепленными на нем клетками отделяли и накрывали им камеру для заливки геля с налитым в нее раствором для полимеризации геля. Для заливки геля использовали раствор Stock X (86 г/л акрилата натрия, 25 г/л акриламида, 1.5 г/л N,N-метиленбисакриламида, 117 г/л NaCl; в качестве основы использовали PBS), воду, 10%-ный TEMED (объем/объем) и 10%-ный PSA (вес/объем), которые смешивали в соотношении 47 : 1 : 1 : 1. Затем камеру оставляли при 37°C на 1 ч для полимеризации геля.

После этого покровное стекло отделяли и переносили гель в 6-луночный планшет, где осуществляли расщепление протеиназой K, окрашивание ДНК и расширение геля. Протеолиз проводили в буфере (0.5%-ный Triton X-100, 1 мМ EDTA, 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 46.7 г/л NaCl) с добавлением протеиназы K до концентрации 8 ед./мл. Гель инкубировали в рас-

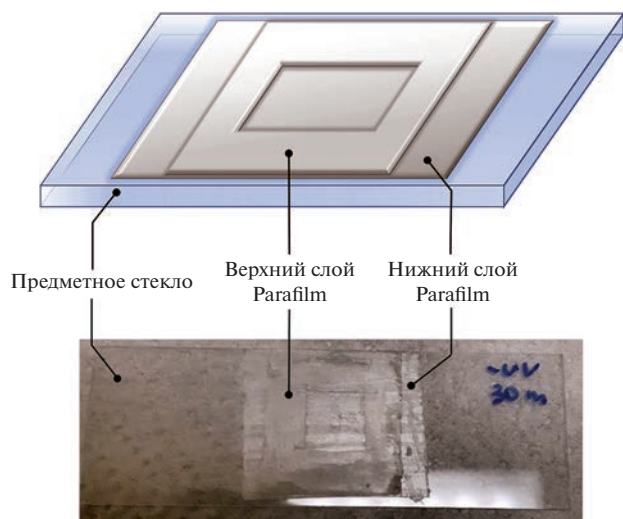


Рис. 4. Слайд, используемый для заливки геля. Данный слайд состоит из предметного стекла и двух слоев пленки Parafilm: нижний слой сплошной, играет роль нижней границы камеры; верхний слой имеет прямоугольный вырез посередине с размерами примерно 7 × 7 мм и играет роль боковых границ камеры.

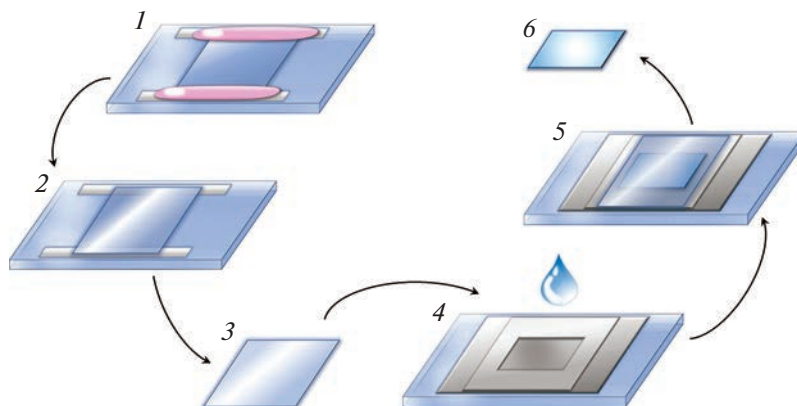


Рис. 5. Алгоритм заключения бактериальных клеток в полиэлектrolитный гель. 1 – Вначале собирают слайд, описанный на рисунке 3а; бактериальные клетки помещают в слайд для их закрепления на поверхности покровного стекла; далее с ними осуществляют подготовительные операции, такие как химическая фиксация, пермеабилзация, функционализация аминогрупп и т.д. 2 – Слайд разбирают, для этого удаляют силиконовый герметик. 3 – Покровное стекло с бактериальными клетками снимают, сохраняя его ориентацию. 4 – В слайд для заливки геля помещают раствор компонентов для геля. 5 – Слайд для заливки накрывают покровным стеклом (клетками в сторону геля) и инкубируют в течение необходимого времени с целью полимеризации геля. 6 – Полученный брусочек полиэлектrolитного геля с заключенными в него бактериальными клетками отделяют от заливочной формы и осуществляют дальнейшие этапы пробоподготовки.

творе в течение ночи в темноте при комнатной температуре. После раствор с протеиназой удаляли, гель промывали PBS. Для расширения гель инкубировали в дистиллированной воде в течение 1 ч, каждые 20 мин заменяя воду на свежую. Окрашивание ДНК проводили в течение 5 мин красителем DAPI в концентрации 100 нМ после расширения.

Микроскопия. Для наблюдения под микроскопом использовали фрагмент полученного расширенного геля, помещая его между покровным и предметным стеклом с использованием разделителя между стеклами, соответствующего толщине геля. Для предотвращения высыхания геля полученный слайд герметизировали валапом (смесь вазелина, ланолина и парафина).

Для съемки использовали инвертированный микроскоп Nikon Ti-E (Япония) с иммерсионным объективом Nikon CFI Plan Apochromat VC 100x H (N.A.1.40, W.D.0.13 mm), с камерой sCMOS Andor Zyla 4.2 и с набором фильтров Semrock YFP-2427B. Обработку изображений (настройка яркости и контраста, конвертирование формата и т.д.) проводили в программе ImageJ.

Реактивы. В работе использовали среду LB, фосфатно-солевой буфер (PBS), акриламид и N,N-метиленбисакриламид (Amresco, США); формальдегид, глутаральдегид, поли-L-лизин, DMSO и акрилат натрия (Sigma Aldrich, США); лизоцим, тетраметилэтилендиамин (TEMED), персульфат аммония (PSA) и Triton X-100 (Хеликон, Россия); Acryloyl-X SE и DAPI (Thermo Fisher Scientific, США); протеиназу К (Евроген, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В состоянии SOS-ответа в клетках *E. coli* Z-кольца отсутствуют, при этом распределение белка FtsZ является неравномерным. Полученные при использовании экспансионной микроскопии результаты демонстрируют, что в контрольном образце (клетки *E. coli* без обработки ультрафиолетом) видны Z-кольца, то есть бактерии находятся в процессе деления. У клеток в SOS-ответе (после обработки ультрафиолетом) деление остановлено и Z-колец не наблюдается (рис. 6). Однако на рисунке видно, что даже при заблокированном делении при отсутствии Z-колец белок FtsZ не распределяется по цитоплазме клетки равномерно. Видны некоторые скопления белка и неоднородности, вероятно, связанные с тем, что полимеры FtsZ разбираются не до конца и продолжают формировать некие структуры, отличные от Z-колец.

Аналогичные результаты были получены ранее при использовании метода локализационной микроскопии (Vedyaykin et al., 2014, 2020): в SOS-ответе при этом также наблюдали неравномерное распределение белка FtsZ по клетке *E. coli*.

ДНК, как в контрольных *E. coli*, так и в состоянии SOS-ответа, распределена по клетке неравномерно. Визуализация ДНК в клетках *E. coli* с использованием экспансионной микроскопии позволила показать, что как в состоянии нормального деления, так и в состоянии SOS-ответа ДНК распределена неравномерно (рис. 7), что согласуется с данными, полученными при помощи традиционной флуоресцентной микроскопии. Однако все же в состоянии SOS-ответа такое распределение представляется несколько более однородным.

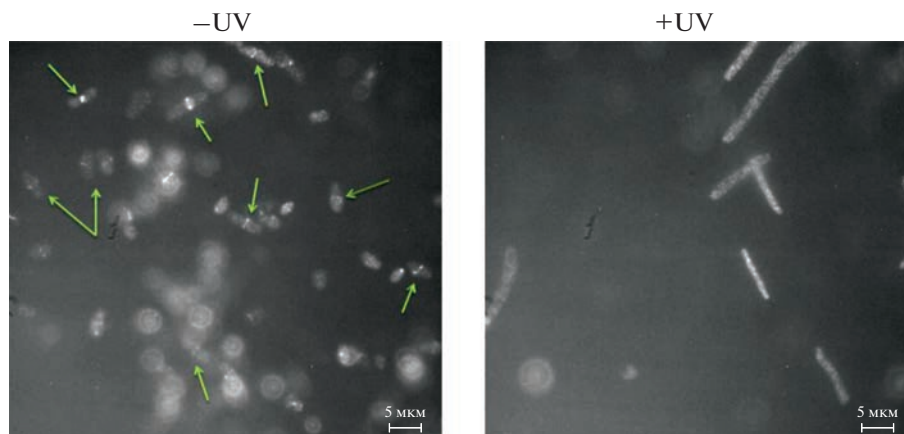


Рис. 6. Распределение FtsZ в клетках во время нормального деления (–UV) и после облучения ультрафиолетом во время SOS-ответа (+UV). Стрелками на рисунке слева обозначены Z-кольца.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе метод экспансионной микроскопии был использован для визуализации структур, формируемых белком FtsZ и ДНК в состоянии SOS-ответа с более высоким разрешением. Результаты сравнили с данными, полученными для клеток, находящихся в состоянии нормального деления. Это позволило наглядно показать, что активация SOS-ответа не приводит к полной разборке структур, формируемых белком FtsZ. При этом ДНК в состоянии SOS-ответа распределена по клетке более однородно, чем в контрольном образце.

Полученные данные о неравномерном распределении FtsZ по клетке *E. coli* в состоянии SOS-ответа согласуются с оценкой концентрации Sula, достаточной для остановки клеточного деления (Vedyay-

kin et al., 2020). Для его блокирования достаточно присутствия белка Sula в концентрации, в несколько раз более низкой, чем концентрация FtsZ, при этом полной разборки полимеров FtsZ не происходит. Таким образом, новые данные о неполной разборке полимеров FtsZ в клетках *E. coli* в состоянии SOS-ответа находятся в согласии с полученными нами ранее данными. В то же время, они также противоречат модели секвестрации мономеров FtsZ в состоянии SOS-ответа (Chen et al., 2012).

Визуализация ДНК показала, что при нормальном делении нуклеоид представлен в клетке в виде тяжей, протяженных филаментов и других неоднородных структур, а во время SOS-ответа распределение ДНК по клетке является более однородным, при этом происходит некоторая компактизация ДНК ближе к середине клетки. Визуализация ДНК с большим разрешением может быть востребована в будущем для исследования пространственной организации ДНК в бактериальной клетке (Verma et al., 2019).

Таким образом, описанный в настоящей работе протокол экспансионной микроскопии представляется авторам хорошо подходящим для изучения клеток, которые могут быть закреплены на поверхности покровного стекла или на другой плоской поверхности, например, адгезивных клеток эукариот в культуре, бактерий, способных к закреплению на поверхности, и других одиночных клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр нано- и биотехнологий “СПбПУ” на базе Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (ФГАОУ ВО “СПбПУ”).

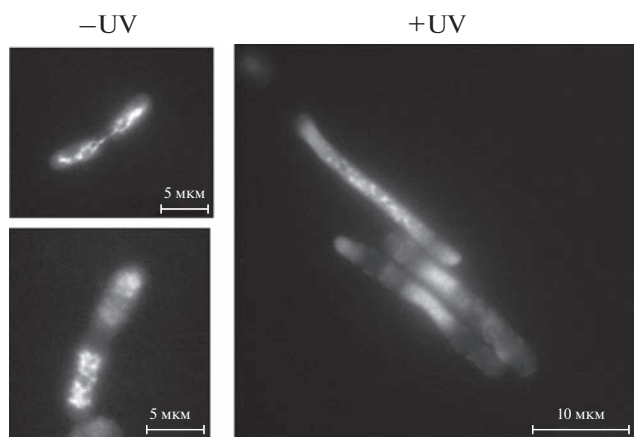


Рис. 7. Распределение ДНК в клетках во время нормального деления (–UV) и SOS-ответа после облучения ультрафиолетом (+UV). При нормальном делении ДНК распределяется по будущим дочерним клеткам, тогда как в состоянии SOS-ответа хромосомы пространственно не разделены и локализуются ближе к середине клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Президента РФ; проект № МК-1345.2022.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деревцова К.З., Пичицкая Е.И., Раковская А.В., Безпрозванный И.Б. 2021. Применение метода экспансионной микроскопии в нейробиологии. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. Т. 107. № 4–5. С. 568. (Derevtsova K.Z., Pchitskaya E.I., Rakovskaya A.V., Bezprozanny I.B. 2021. Applying the expansion microscopy method in neurobiology. Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. V. 107. № 4–5. P. 568.)
- Клементьева Н.В., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А., Мишин А.С. 2016. Принципы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (обзор). Современные технологии в медицине. Т. 8. С. 130. (Klementieva N.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. 2016. The Principles of super-resolution fluorescence microscopy (review). Sovremennye tehnologii v medicine. V. 8. P. 130.)
- Asano S.M., Gao R., Wassie A.T., Tillberg P.W., Chen F., Boyden E.S. 2018. Expansion microscopy: protocols for imaging proteins and RNA in cells and tissues. Curr. Prot. Cell Biol. V. 80. P. e56. <https://doi.org/10.1002/cpcb.56>
- Chang J.-B., Chen F., Yoon Y.-G., Jung E.E., Babcock H., Kang J.S., Asano S., Suk H.-J., Pak N., Tillberg P.W., Wassie A.T., Cai D., Boyden E.S. 2017. Iterative expansion microscopy. Nat. Methods. V. 14. P. 593.
- Chen F., Tillberg P.W., Boyden E.S. 2015. Expansion microscopy. Science. V. 347. P. 543.
- Chen Y., Milam S.L., Erickson H.P. 2012. Sula inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. Biochemistry. V. 51. P. 3100.
- Chozinski T.J., Halpern A.R., Okawa H., Kim H.-J., Tremel G.J., Wong R.O.L., Vaughan J.C. 2016. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. Nat. Methods. V. 13. P. 485.
- Feng H., Wang X., Xu Z., Zhang X., Gao Y. 2018. Super-resolution fluorescence microscopy for single cell imaging. In: Single cell biomedicine. Singapore: Springer Singapore. P. 59.
- Li H., Warden A.R., He J., Shen G., Ding X. 2022. Expansion microscopy with ninefold swelling (NIFS) hydrogel permits cellular ultrastructure imaging on conventional microscope. Science Advances. V. 8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm4006>
- Moore D.A., Whatley Z.N., Joshi C.P., Osawa M., Erickson H.P. 2017. Probing for binding regions of the FtsZ protein surface through site-directed insertions: discovery of fully functional FtsZ-fluorescent proteins. J. Bacteriol. V. 199. P. e00553-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00553-16>
- Renz M. 2013. Fluorescence microscopy – a historical and technical perspective. Cytometry Part A. V. 83. P. 767.
- Sanderson M.J., Smith I., Parker I., Bootman M.D. 2014. Fluorescence microscopy. Cold Spring Harbor Protocols. V. 2014. P. pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Tillberg P.W., Chen F., Piatkevich K.D., Zhao Y., Yu C.-C., English B.P., Gao L., Martorell A., Suk H.-J., Yoshida F., DeGennaro E.M., Roossien D.H., Gong G., Seneviratne U., Tannenbaum S.R., et al. 2016. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. Nat. Biotech. V. 34. P. 987.
- Vedyaykin A., Rumyantseva N., Khodorkovskii M., Vishnyakov I. 2020. Sula is able to block cell division in *Escherichia coli* by a mechanism different from sequestration. Biochim. Biophys. Res. Commun. V. 525. P. 948.
- Vedyaykin A.D., Sabantsev A.V., Vishnyakov I.E., Borchsenius S.N., Fedorova Y.V., Melnikov A.S., Serdobintsev P.Y., Khodorkovskii M.A. 2014. Localization microscopy study of FtsZ structures in *E. coli* cells during SOS-response. J. Phys. Conf. Ser. V. 541. P. 012036. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/541/1/012036>
- Verma S.C., Qian Z., Adhya S.L. 2019. Architecture of the *Escherichia coli* nucleoid. PLoS Genet. V. 15. P. e1008456. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008456>
- Wassie A.T., Zhao Y., Boyden E.S. 2019. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. Nat. Methods. V. 16. P. 33.

Visualization of *Escherichia coli* Single Cells in the State of SOS Response Using Expansion Microscopy

N. A. Rumyantseva^a, D. M. Golofeeva^a, I. E. Vishnyakov^{b, *}, and A. D. Vedyaykin^a

^aPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, NIK “Nanobiotechnologies”, St. Petersburg, 195251 Russia

^bInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: innvish@incras.ru

Expansion microscopy (ExM) is a sample preparation method that allows to achieve improved visualization of structures due to the physical expansion of the sample. This method is used in combination with traditional light microscopy and allows, without the use of complex technical devices typical for super-resolution microscopy, to achieve visualization of biological structures with higher resolution. Unlike the methods of super-resolution micros-

copy, expansion microscopy does not make it possible to overcome the diffraction limit; however, the observed effect can be considered equivalent to an increase in the spatial resolution. The relative simplicity of the method and the undemanding nature of the microscope used have made expansion microscopy a fairly popular method to visualize various biological structures last time. This paper describes the use of expansion microscopy to visualize DNA and structures formed by the FtsZ protein in *Escherichia coli* cells during the SOS response. The results of the work confirm the previously obtained data that the FtsZ protein in cells in the state of the SOS response is unevenly distributed. The protocol used in this work for visualization of *E. coli* cells preliminarily fixed on the glass surface using the expansion microscopy method can be used in the future to study the internal structures of other cells, both bacterial and eukaryotic.

Keywords: expansion microscopy, FtsZ, SOS response, bacterial division