

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc679977>

EDN: CCSROZ



Нокаут гена *Psme1* снижает пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мыши, не влияя на уровни активных форм кислорода

А.Д. Максимов, Д.В. Кригер, А.А. Кузьмин, Н.Д. Аксенов, А.Н. Томилин, А.С. Цимоха

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) представляют собой уникальные клетки, полученные из эпибласта ранних преимплантационных эмбрионов млекопитающих. Они обладают способностью к неограниченному делению в культуре и сохранению недифференцированного состояния. Потенциал к дифференцировке в любые клеточные типы делает ЭСК важным инструментом в регенеративной медицине. Кроме того, они используются при изучении механизмов эмбрионального развития и моделировании заболеваний. Поддержание плюрипотентности и направленной дифференцировки ЭСК зависит от строго регулируемых клеточных процессов, включая деградацию белков через убиквитин-протеасомную систему. Нарушения в работе убиквитин-протеасомной системы могут приводить к выходу ЭСК из состояния плюрипотентности или к апоптозу. Известно, что регуляторная частица протеасом PA28 $\alpha\beta$, состоящая из α - и β -субъединиц, кодируемых генами *Psme1* и *Psme2*, играет ключевую роль в этих процессах, особенно в условиях окислительного стресса. Показано, что на ранних этапах дифференцировки в ЭСК мыши происходит увеличение экспрессии PA28 $\alpha\beta$, а нокдаун α -субъединицы приводит к накоплению карбонилированных белков, что указывает на участие PA28 $\alpha\beta$ в ранних этапах дифференцировки ЭСК. Однако функции PA28 $\alpha\beta$ в поддержании плюрипотентности ЭСК остаются недостаточно изученными.

Цель. Определить влияние нокаута гена *Psme1*, кодирующего α -субъединицу регулятора протеасомы PA28 $\alpha\beta$, на пролиферацию ЭСК мыши и накопление активных форм кислорода (АФК).

Методы. В исследовании с помощью геномного редактирования была создана линия ЭСК мыши с нокаутом гена *Psme1*. Способность к дифференцировке *in vivo* оценивали методом тератомного анализа. Экспрессию маркёров плюрипотентности в ЭСК определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и иммуноблоттинга. Проведён также анализ клеточной пролиферации и продукции АФК с помощью проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Получена линия ЭСК мыши с нокаутом гена *Psme1*. Анализ экспрессии ключевых маркёров плюрипотентности не выявил статистически значимых различий между контрольными и мутантными ЭСК. Тератомный анализ подтвердил сохранение плюрипотентного статуса ЭСК с нокаутом гена *Psme1*, продемонстрировав их способность к дифференцировке в производные всех трёх зародышевых листков: эктодерму, мезодерму и энтодерму. При этом скорость пролиферации мутантных ЭСК была снижена по сравнению с контрольными клетками, тогда как уровень АФК оставался неизменным.

Заключение. ЭСК мыши с нокаутом гена *Psme1* сохраняют плюрипотентность и способность дифференцироваться в производные всех трёх зародышевых листков *in vivo*. Хотя нокаут гена α -субъединицы регулятора PA28 $\alpha\beta$ не изменяет уровень АФК, он приводит к снижению темпов пролиферации, что подчёркивает важную роль PA28 $\alpha\beta$ в поддержании пролиферативного потенциала ЭСК.

Ключевые слова: PA28 $\alpha\beta$; *Psme1*; протеасома; эмбриональные стволовые клетки мыши; дифференцировка; активные формы кислорода; пролиферация.

Как цитировать:

Максимов А.Д., Кригер Д.В., Кузьмин А.А., Аксенов Н.Д., Томилин А.Н., Цимоха А.С. Нокаут гена *Psme1* снижает пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мыши, не влияя на уровни активных форм кислорода // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 3. С. 251–263. DOI: 10.17816/gc679977 EDN: CCSROZ

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc679977>

EDN: CCSROZ

***Psme1* Gene Knockout Reduces Proliferation of Mouse Embryonic Stem Cells Without Affecting Reactive Oxygen Species Levels**

Aleksandr D. Maksimov, Daria V. Kriger, Andrey A. Kuzmin, Nikolay D. Aksenov, Alexey N. Tomilin, Anna S. Tsimokha

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Embryonic stem cells are a unique type of cells derived from the pre-implantation epiblast of mammalian embryos. These cells demonstrate the ability to undergo indefinite division and maintain an undifferentiated state. The potential for differentiation into any cell type renders embryonic stem cells a significant tool for regenerative medicine. Furthermore, they may be used in investigating the mechanisms of embryogenesis and disease modeling. The maintenance of pluripotency and the directed differentiation of embryonic stem cells rely on strictly regulated cell processes, including ubiquitin-proteasome-mediated protein degradation. Aberrant functions of the ubiquitin-proteasome pathway are linked to loss of embryonic stem cell pluripotency and apoptosis initiation. These processes are driven, particularly under oxidative stress, by the regulatory complex PA28 $\alpha\beta$, which consists of *Psme1*- and *Psme2*-encoded α - and β -subunits. The early stages of mouse embryonic stem cell differentiation are accompanied by an increase in the expression of PA28 $\alpha\beta$, and the knockdown of the α -subunit results in the accumulation of carbonylated proteins. This suggests that PA28 $\alpha\beta$ plays a role in the early stages of embryonic stem cell differentiation. However, the functions of PA28 $\alpha\beta$ in maintaining embryonic stem cell pluripotency remain insufficiently studied.

AIM: To determine the effects of knockout of the *Psme1* gene, which encodes the α -subunit of the PA28 $\alpha\beta$ regulator, on mouse embryonic stem cell proliferation and accumulation of reactive oxygen species (ROS).

METHODS: In the study, a *Psme1* knockout mouse embryonic stem cell line was generated through the use of genome editing. Teratoma assay was used to assess the ability to differentiate *in vivo*. The expression of pluripotency markers in embryonic stem cells was determined by real-time polymerase chain reaction and western blotting. The experimental stage also included flow cytometry to assess cell proliferation and production of ROS.

RESULTS: A *Psme1* knockout mouse embryonic stem cell line was successfully obtained. The analysis of the expression of key pluripotency markers did not show statistically significant differences between the control and mutant embryonic stem cells. The teratoma assay confirmed the maintenance of pluripotency in *Psme1* knockout embryonic stem cells, demonstrating their ability to differentiate into derivatives of all three germ layers (i.e., ectoderm, mesoderm, and endoderm). The mutant embryonic stem cells demonstrated a lower proliferation rate compared to the control cells, whereas the ROS level remained unchanged.

CONCLUSION: *Psme1* knockout mouse embryonic stem cells have been demonstrated to maintain pluripotency and the ability to differentiate into derivatives of all three germ layers *in vivo*. Although the ROS level remained unchanged, the knockout of the α -subunit of the PA28 $\alpha\beta$ regulator caused a reduction in the proliferation rate, thereby emphasizing the critical role of PA28 $\alpha\beta$ in maintaining the proliferative potential of embryonic stem cells.

Keywords: PA28 $\alpha\beta$; *Psme1*; proteasome; mouse embryonic stem cells; differentiation; reactive oxygen species; proliferation.

To cite this article:

Maksimov AD, Kriger DV, Kuzmin AA, Aksenov ND, Tomilin AN, Tsimokha AS. *Psme1* Gene Knockout Reduces Proliferation of Mouse Embryonic Stem Cells Without Affecting Reactive Oxygen Species Levels. *Genes & cells*. 2025;20(3):251–263. DOI: 10.17816/gc679977 EDN: CCSROZ

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) представляют собой плюрипотентные клетки, способные к неограниченному самовоспроизведению и дифференцировке во все типы соматических клеток, за исключением внезародышевых тканей. Они обладают высоким потенциалом для использования в регенеративной медицине и фундаментальных исследованиях благодаря способности дифференцироваться в различные типы клеток, формировать тканеподобные структуры и органоиды, моделирующие процессы развития и патогенеза заболеваний [1, 2]. Такие подходы открывают возможности для создания новых методов лечения и для изучения механизмов патогенеза множества болезней.

Поддержание плюрипотентности ЭСК и выход из неё в результате дифференцировки зависят от чётко скоординированной работы внутриклеточных систем, в том числе обеспечивающих протеостаз. Протеостаз — это динамическое равновесие белков в клетке, включающее контроль за их синтезом, сворачиванием, модификацией и деградацией. Такой баланс необходим для сохранения функционального состояния клетки. Одной из ключевых клеточных систем, регулирующих протеостаз, является убиквитин-протеасомная система (УПС). Она отвечает за деградацию короткоживущих регуляторных белков, а также неправильно свёрнутых, повреждённых или ненужных белков, что предотвращает их накопление и негативное влияние на жизнеспособность клеток. Функционирование УПС в клетках зависит от скоординированного взаимодействия многих компонентов. Белки, подлежащие деградации, маркируются убиквитиновыми цепочками с помощью каскада ферментов и направляются на деградацию в протеасому — мультисубъединичный белковый комплекс, состоящий из 20S-протеолитического ядра, связанного с одним или двумя 19S-регуляторными комплексами [3]. Такой путь деградации белков называется убиквитин-зависимым протеолизом. Протеасома существует в нескольких формах, отличающихся по составу и функциональной специфичности к субстратам. Эффективность работы УПС зависит от способности протеасомы распознавать и разрушать белковые субстраты, что определяется субъединичным составом 20S-протеасомы [4] и типом взаимодействующих с ней регуляторных частиц [5].

Ещё одной регуляторной частицей протеасомы является PA28 (или 11S). Семейство белков-активаторов PA28 включает три гомолога: PA28 α (кодируется геном *Psme1*), PA28 β (кодируется геном *Psme2*) и PA28 γ (кодируется геном *Psme3*). Белки PA28 α и PA28 β формируют гетерогептамерные комплексы PA28 $\alpha\beta$, играющие важнейшую роль в убиквитин-независимом протеасомном протеолизе [6]. Известно, что экспрессия PA28 $\alpha\beta$ усиливается под воздействием провоспалительных медиаторов, таких как интерферон-гамма,

что способствует формированию комплексов, состоящих из PA28-регулятора и специализированного типа 20S-протеасомы, называемой иммунопротеасомой [7]. Для такого протеасомного комплекса показана важная роль в антигенной презентации молекулами главного комплекса гистосовместимости типа I [8]. Известно также, что PA28 $\alpha\beta$ активируется в условиях окислительного стресса и играет важную роль в деградации повреждённых в результате окисления белков [9]. Так, например, в ЭСК мыши показаны высокие уровни карбонилированных белков [10]. Обнаружено также, что на ранних этапах дифференцировки ЭСК мыши наблюдается увеличение экспрессии генов регулятора PA28 $\alpha\beta$ и иммунопротеасомы [11]. С другой стороны, ранняя дифференцировка ЭСК сопровождается резким снижением количества белков, повреждённых в результате окисления. Предполагается, что это достигается, в частности, за счёт усиленной деградации дефектных белков (важно для поддержания клеточного гомеостаза). Это особенно критично в условиях активного клеточного деления и перестройки метаболических путей в процессе дифференцировки ЭСК [12]. Однако функциональная значимость регулятора PA28 $\alpha\beta$ в поддержании плюрипотентности и в дифференцировке ЭСК остаётся недостаточно изученной. Изучение роли PA28 $\alpha\beta$ в ЭСК может способствовать выявлению новых молекулярных механизмов, лежащих в основе вышеуказанных процессов, что позволит улучшить протоколы направленной дифференцировки ЭСК в биомедицинских исследованиях.

ЦЕЛЬ

Исследовать влияние нокаута гена *Psme1*, кодирующего α -субъединицу регулятора протеасомы PA28 $\alpha\beta$, на скорость пролиферации и продукцию активных форм кислорода (АФК) ЭСК мыши.

МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Культивирование клеток осуществляли при 37 °C в увлажнённой атмосфере с содержанием 5% CO₂ на адгезивном пластике, покрытом 0,1% раствором желатина (Sigma-Aldrich, Германия), в среде SLM, содержащей DMEM («ПанЭко», Россия), 15% фетальную бычью сыворотку (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин (Capricorn, Германия), 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Capricorn, Германия), 1× раствор аминокислот (NEEA; Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ β -меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, Германия) и 10 000 Ед./мл лейкоингибирующего фактора (Lif, ранее получен авторами в собственной лаборатории). В работе использовали ЭСК мыши линии E14 Tg2a (Bay Genomics, США).

Создание эмбриональных стволовых клеток
мыши с нокаутом гена *Psmc1*

Для получения клеток с нокаутом гена *Psmc1* использовали систему геномного редактирования CRISPR/Cas9. ЭСК мыши трансфицировали модифицированной плазмидой pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene #42230), кодирующей флуоресцентный маркер GFP (green fluorescent protein), Cas9 и направляющую РНК (guide ribonucleic acid, gRNA) 5'-GGAGGAGCGGAAGAAGCAAC-3', нацеленную на 4-й экзон гена *Psmc1*, последовательность которой была подобрана с использованием онлайн-инструмента Benchling (<https://www.benchling.com>). Через 3 сут после трансфекции GFP-положительные клетки отбирали с помощью клеточного сортера S3e (Bio-Rad, США). Аналогичным образом были получены три линии контрольных клеток Scr (scrambled), содержащих плазмиду с gRNA, последовательность которой не была комплементарна никакому участку генома мыши. Нокаут в отобранных клеточных линиях проверяли секвенированием области гена *Psmc1* по наличию мутаций в месте посадки gRNA и методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к α -субъединице регулятора PA28 α .

Выделение геномной ДНК и секвенирование

Геномную ДНК выделяли из клеток согласно протоколу, описанному ранее [13]. Целевые фрагменты, соответствующие участку редактирования системой CRISPR/Cas9, амплифицировали с образцов геномной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для амплификации использовали высокоточную полимеразу (Tersus Plus PCR kit; «Евроген», Россия) и праймеры, фланкирующие сайт редактирования на расстоянии не менее 100 п. о. в обе стороны (5'-ATGTGTCCGTGAAGACCTGT-3' и 5'-TGGAAGAGGGGAAAGCAGAACC-3'). Продукты ПЦР клонировали в составе вектора pAL-2T (Quick-TA ligase kit; «Евроген», Россия). Секвенирование осуществляли с помощью универсальных праймеров M13 в компании «Евроген» (Россия).

Поиск пяти наиболее вероятных нецелевых участков посадки gRNA (off-target) осуществили с помощью онлайн-инструмента Benchling. Геномные области, содержащие предполагаемые участки off-target, амплифицировали методом ПЦР с использованием специфичных праймеров (табл. 1) и анализировали секвенированием («Евроген», Россия).

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг проводили согласно описанному ранее протоколу [14]. Клетки лизировали в буфере, состоящем из 100 mM NaCl, 50 mM Na₂PO₄, pH 7,5, 10% глицерина, 5 mM аденозинтрифосфата, 1 mM дитиотреитола, 5 mM MgCl₂, 1× ингибиторов протеаз, 0,5% NP-40. Образцы лизатов (15–20 мкг белка) разделяли в 13% полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия и переносили

Таблица 1. Праймеры для проверки целостности off-target сайтов
Table 1. Primers used for the verification of off-target sites integrity

Номер off-target сайта	Направление	Последовательность (5'-3')
1	Прямой	CACCCACATCCCTTCTACC
	Обратный	GGAGAGTACGACACGATCCC
2	Прямой	GGACCACCATCATAGGATCACC
	Обратный	GCGAGGAGAACTAACTGGCAA
3	Прямой	TGCCAACTGCACTCCAAGAT
	Обратный	GATTCGCTTCTGGCTTCCCT
4	Прямой	TTCTGGGTGTTCACTGTTCCAGA
	Обратный	AGCATGGACTCCCACTTTTCT
5	Прямой	GTTGCGGTTTGCACATCAGA
	Обратный	GTTACTCCCAACAACGGGGA

на PVDF-мембрану (0,45 мкм; Bio-Rad, США). Мембрану блокировали в 5% обезжиренном молоке (Santa Cruz, США) в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline, PBS) («БиоЛот», Россия) с 0,1% Tween-20 (Amresco, США), после чего инкубировали со специфичными первичными антителами в течение ночи при 4 °C. Затем мембрану обрабатывали вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000; Jackson Laboratories, США), и визуализировали с использованием реагента SuperSignal (Thermo Fisher Scientific, США) при помощи ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США). В работе использовали следующие антитела в различных разведениях: anti-PA28 α (A5358; 1:500; ABclonal, Китай), anti-Oct4 (sc-5279; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, США), anti-Nanog (#8822; 1:500; Cell Signaling Technology, США), anti- α 7 (PW8110; 1:1000; Enzo Life Sciences, США), anti- β 2 (PW9300; 1:1000; Enzo Life Sciences, США), anti- β 1 (A4053; 1:1000; ABclonal, Китай), anti- β 5 (A303-847; 1:1000; Bethyl Laboratories, США), anti-Rpn1 (GB113525; 1:1000; ServiceBio, Китай), anti-Rpt2 (GB114427; 1:1000; ServiceBio, Китай), anti- β -actin (#3700; 1:5000; Cell Signaling Technology, США), anti- α -tubulin (T6074; 1:5000; Sigma-Aldrich, США).

Тератомный анализ

Клетки с нокаутом и контрольные клетки (по 1,5 млн) имплантировали в задние конечности мышей линии Balb/c Nude (Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского). Образовавшиеся тератомы извлекали через 3–4 нед, фиксировали в растворе Буэна и заключали в парафин («Вектон», Россия). Срезы толщиной 7 мкм изготавливали на микротоме с шагом 200 мкм, депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). Обезвоженные срезы заключали в монтирующую среду («БиоВитрум», Россия) и накрывали покровным стеклом. Фотофиксация проводилась на микроскопе Evos FL Auto (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени

Тотальную РНК из клеток выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента RNA-Extract («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Комплементарную ДНК синтезировали из 2 мкг тотальной РНК с использованием гексамерных праймеров и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия). Реакции ПЦР в реальном времени выполняли с использованием смеси 5X qPCRmix-*HS* SYBR («Евроген», Россия) на термоциклере ABI 7500 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Для нормализации уровня экспрессии генов использовали уровень экспрессии гена *Gapdh*. Эксперименты были выполнены в трёх и более биологических повторностях. Информация о последовательностях праймеров и температуре отжига представлена в табл. 2.

Пролиферация и смертность клеток

Пролиферацию и смертность клеток оценивали методом проточной цитометрии. Клетки с нокаутом гена *Psme1* и контрольные клетки (Scr) культивировали в 24-луночных планшетах в трёх повторностях. За день до эксперимента клетки промывали PBS («ПанЭко», Россия) и сменяли среду на свежую для удаления мёртвых клеток. В день анализа клетки собирали после обработки 0,05% раствором трипсина (Thermo Fisher Scientific, США), добавляли раствор пропидия йодида в финальной

концентрации 50 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США) и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра Cytoflex (Beckman Coulter, США) для определения общего числа клеток и количества погибших клеток. Эксперименты были выполнены в трёх и более биологических повторностях.

Измерение уровней активных форм кислорода

Уровни АФК измеряли методом проточной цитометрии. Клетки с нокаутом гена *Psme1* и контрольные клетки (Scr) культивировали в 24-луночных планшетах в трёх повторностях. В анализе использовали флуоресцентный краситель 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H2DCFDA; Lumiprobe, Россия). Все работы проводили в темноте для предотвращения преждевременного возбуждения флуоресценции. Клетки промывали раствором PBS и инкубировали в 5 мкМ растворе H2DCFDA в бессывороточной среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 мин при 37 °C и 5% CO₂. После инкубации клетки промывали PBS, собирали после обработки 0,05% раствором трипсина и оценивали интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитофлуориметра Cytoflex (Beckman Coulter, США).

Измерение протеолитической активности протеасом

Протеолитическую активность протеасом измеряли согласно описанному ранее протоколу [15]. Цитозольные экстракты из клеток ЭСК с нокаутом гена *Psme1* и контрольных (Scr) готовили в условиях, благоприятных для сохранения комплексов 20S-протеасомы с 19S- или с PA28-регуляторами, лизируя клетки в буфере для 26S-протеасом (25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 20% глицерина, 5 мМ аденозинтрифосфата, 0,5 мМ дитиотреитола, 1× ингибиторов протеаз, 0,2% NP-40) и в буфере для комплексов PA28-20S (25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1× ингибиторов протеаз, 0,2% NP-40) соответственно. Химотрипсин-подобную пептидазную активность протеасом в клеточных экстрактах (~6 мкг) оценивали с использованием субстрата Suc-LLVY-AMC (сукцинил-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амино-4-метилкумарин; Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,25 мМ. Реакции для анализа активности 26S-, 20S- или PA28-20S протеасомных комплексов проводили в буферах для 26S-протеасом (25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 5 мМ аденозинтрифосфата, 0,5 мМ дитиотреитола), для 20S-протеасом (25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,02% додецил сульфата натрия, 0,5 мМ дитиотреитола) и для комплексов PA28-20S (25 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 мМ дитиотреитола) соответственно. После инкубации в течение 30 мин при 37 °C реакцию останавливали добавлением равного объёма 2% раствора додецил сульфата натрия. Активность протеасом определяли по уровню флуоресценции свободного 7-амино-4-метилкумарина (AMC) с использованием флуориметра VersaFluor (Bio-Rad, США) при длинах волн возбуждения 340–380 нм и эмиссии 455–465 нм.

Таблица 2. Праймеры для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени

Table 2. Primers used for real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Ген	Направление	Последовательность (5'-3')
<i>Gapdh</i>	Прямой	AGGTGGGTGTGAACGGATTG
	Обратный	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Nanog</i>	Прямой	AGGACAGGTTTCAGAACGAGA
	Обратный	CCATTGCTAGTCTTCAACCACTG
<i>Oct4</i>	Прямой	AGTGGAAGCAACTCAGAGG
	Обратный	AACTGTTCTAGCTCCTCTGC
<i>Psme1</i>	Прямой	GACATCCAGTACCCGATCCA
	Обратный	GTAGCTGCAACCAAGGTGTA
<i>Psme2</i>	Прямой	CTAAGTGTGGCTACCTCCCG
	Обратный	TCCATGTGATTACCAAGATGCAC
<i>Psmc3</i>	Прямой	AGTACCAACCATGTCACTCC
	Обратный	CTTCAAGGATCGCATCACACA
<i>Psmc4</i>	Прямой	TCCCTGTGAGCAGTTGGTTAC
	Обратный	GCTTATCCAGCCAATATACAGC
<i>Psmc5</i>	Прямой	CCACAGCAGGTGCTTATATTGC
	Обратный	GCTCATAGATTCCGACACTGCC

Полученные значения нормализовали путём вычитания фоновой флуоресценции, пересчитывали с учётом уравнивающего коэффициента (получен после определения концентрации белка в пробах), вычисляли среднее значение и стандартное отклонение. Эксперименты были выполнены в трёх и более биологических повторностях.

Статистическая обработка данных

Анализ экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США). Для оценки статистической значимости различий значений применяли *t*-критерий Стьюдента (при нормальном распределении) или критерий Манна–Уитни (для малых выборок и/или когда распределение отличается от нормального). Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$) или как медиана с интерквартильным размахом. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения линий ЭСК с нокаутом гена *Psme1* (*Psme1KO*), кодирующего α -субъединицу регулятора протеасомы PA28 $\alpha\beta$, использовали систему геномного редактирования CRISPR/Cas9. Плазмидную конструкцию, содержащую систему CRISPR/Cas9 и флуоресцентный маркер GFP, ввели в ЭСК методом трансфекции. Клетки, экспрессирующие конструкцию, были отобраны с помощью клеточного сортера. В результате было получено не менее 20 отдельных линий клеток, которые затем подвергались верификации нокаута. На первом этапе верификации полученные клоны анализировали методом иммуноблоттинга на предмет наличия целевого белка — PA28 α . Следующему этапу верификации нокаута гена *Psme1* в ЭСК подвергались лишь те клоны, в которых не обнаруживался белок PA28 α . При помощи секвенирования мы отобрали клоны *Psme1KO*, которые несли мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и, как следствие, отсутствию функционального продукта, транскрибируемого с гена *Psme1*. Результаты секвенирования представлены на рис. 1, а. Третий и заключительный этап верификации применимости отобранных линий *Psme1KO* для дальнейших исследований состоял в проверке целостности участков генома, выступающих в качестве возможных мест нецелевого связывания направляющей РНК (off-target). Мы проанализировали пять off-target сайтов геномной ДНК, которые с наибольшей вероятностью могут выступать в качестве нецелевых мишеней для выбранной направляющей РНК, предсказанных с помощью онлайн-инструмента Benchling. Секвенирование off-target участков двух отобранных клонов *Psme1KO* подтвердило отсутствие каких-либо изменений в пяти наиболее вероятных off-target сайтах. Однако у третьего клона *Psme1KO* (см. рис. 1, а) были выявлены нарушения

целостности генома в двух из пяти анализируемых off-target сайтов. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали только две линии *Psme1KO* (рис. 1, б, с).

С помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени мы проверили экспрессию генов ключевых факторов плюрипотентности, таких как Nanog и Oct4. Мы выявили снижение уровня экспрессии этих факторов в зависимости от уровня экспрессии гена *Psme1* (рис. 2, а). Однако результаты иммуноблоттинга не подтвердили заметного влияния потери белка PA28 α на содержание факторов Nanog и Oct4 (рис. 2, б). Для проверки сохранения плюрипотентности клеточных линий ЭСК мыши с нокаутом гена *Psme1* был проведён тест на образование тератом. Клетки двух линий *Psme1KO* и трёх контрольных линий (Scr) в двух повторностях для каждой трансплантировали мышам Balb/c nude. Через три недели тератомы извлекали, фиксировали и изготавливали гистологические препараты для последующего морфологического анализа. Гистологический анализ показал, что как контрольные, так и *Psme1KO*-клетки способны дифференцироваться *in vivo* в производные эктодермы, мезодермы и энтодермы (рис. 2, с).

Следующей задачей было проверить влияние нокаута гена *Psme1* на пролиферативный статус ЭСК мыши. Общее число клеток и доля погибших за сутки определялись по окрашиванию пропидием йодидом. В качестве контрольной группы выступали клеточные линии ЭСК мыши (Scr). Полученные данные проточной цитометрии демонстрируют существенное снижение скорости пролиферации клеток *Psme1KO* при сопоставимом уровне клеточной гибели у контрольных линий (рис. 3, а).

Известно, что АФК играют важную роль в пролиферации стволовых клеток [16]. Кроме того, показано, что нокаунт *Psme1* приводил к увеличению уровней АФК в клетках ЭСК мыши на ранних стадиях дифференцировки [11]. Исходя из предположения, что протеасомы в комплексе с регулятором PA28 $\alpha\beta$ важны для адаптации клетки к окислительному стрессу, мы оценили уровни АФК в *Psme1KO* и контрольных ЭСК мыши методом проточной цитофлуориметрии с использованием красителя H2DCFDA. Полученные данные не выявили увеличения продукции АФК в ЭСК с нокаутом гена *Psme1* (рис. 3, б).

Согласно литературным данным, 20S-протеасомы в комплексе с регулятором PA28 $\alpha\beta$ осуществляют убиквитин-независимый протеолиз и активно вовлечены в деградацию повреждённых окислением белков [17, 18], поэтому следствием нокаута гена *Psme1* может стать снижение удельной протеасомной активности в ЭСК и в результате — понижение их пролиферативного потенциала [19]. Пептидазную активность протеасом в цитозольных экстрактах определяли *in vitro* по гидролизу флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC, специфичного для химотрипсин-подобной активности. Учитывая, что стабильность комплексов 20S-протеасомы с регуляторами зависит от условий лизиса клеток, ранее был

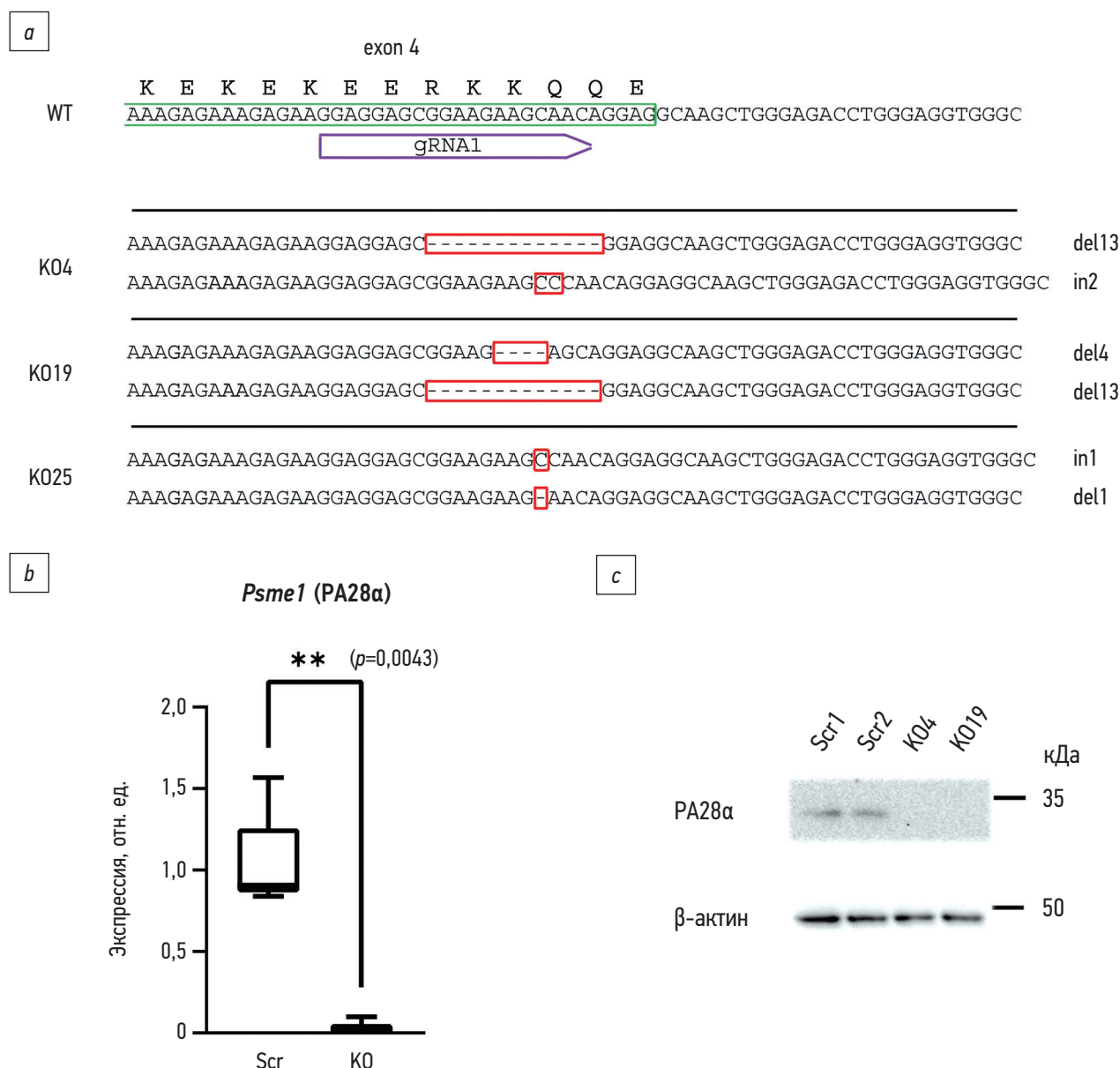


Рис. 1. Подтверждение нокаута гена *Psme1* в эмбриональных стволовых клетках мыши: *a* — результаты секвенирования трёх линий эмбриональных стволовых клеток мыши дикого типа (WT) и с нокаутом гена *Psme1* (K04, K019, K025). Индел-мутации выделены красными прямоугольниками, del — делеция, in — инсерция; *b* — анализ экспрессии гена *Psme1* в клетках с нокаутом гена *Psme1* (K0) относительно контрольных линий (Scr). Данные приведены как медиана с интерквартильным размахом ($n=3$); ** $p < 0,01$; *c* — оценка содержания белка PA28α методом иммуноблоттинга в клеточных экстрактах, полученных из *Psme1*KO и контрольных линий (Scr 1–2). β-актин использован как контроль нагрузки белка. Молекулярные массы белков-маркёров (в килодальтонах, кДа) указаны справа.

Fig. 1. Confirmation of *Psme1* knockout in mouse embryonic stem cells: *a*, sequencing of three wild-type (WT) and *Psme1* knockout (K04, K019, K025) mouse embryonic stem cell lines. Indel mutations are indicated by red rectangles; del, deletion; in, insertion; *b*, *Psme1* expression in *Psme1* knockout (K0) cells compared to the control lines (Scr). The data are presented as medians and interquartile ranges ($n = 3$); **, $p < 0.01$; *c*, western blotting of *Psme1* KO and control (Scr 1–2) cell extracts for the determination of PA28α. β-actin was used as a protein load control. The molecular weights of the marker proteins (kDa) are shown on the right.

разработан подход, который позволял отдельно анализировать пептидазную активность разных протеасомных комплексов: 26S и PA28-20S [15]. На первом этапе подхода используются разные условия приготовления цитозольных экстрактов, при которых стабильнее сохраняется взаимодействие 20S-протеасомы или с регулятором 19S, или с PA28αβ. Далее эффективность гидролиза субстрата анализируется для каждого протеасомного комплекса

отдельно: 26S-, 20S-протеасом или комплекса PA28-20S. Нокаут гена *Psme1* ожидаемо привёл к значительному снижению активности протеасомных комплексов PA28-20S (рис. 3, *c*), при этом эффективность гидролиза 26S- и 20S-протеасомами значимо не отличалась в контрольных и *Psme1*KO-клетках.

Мы наблюдали тенденцию к снижению активности 26S-протеасом (см. рис. 3, *c*), что можно объяснить

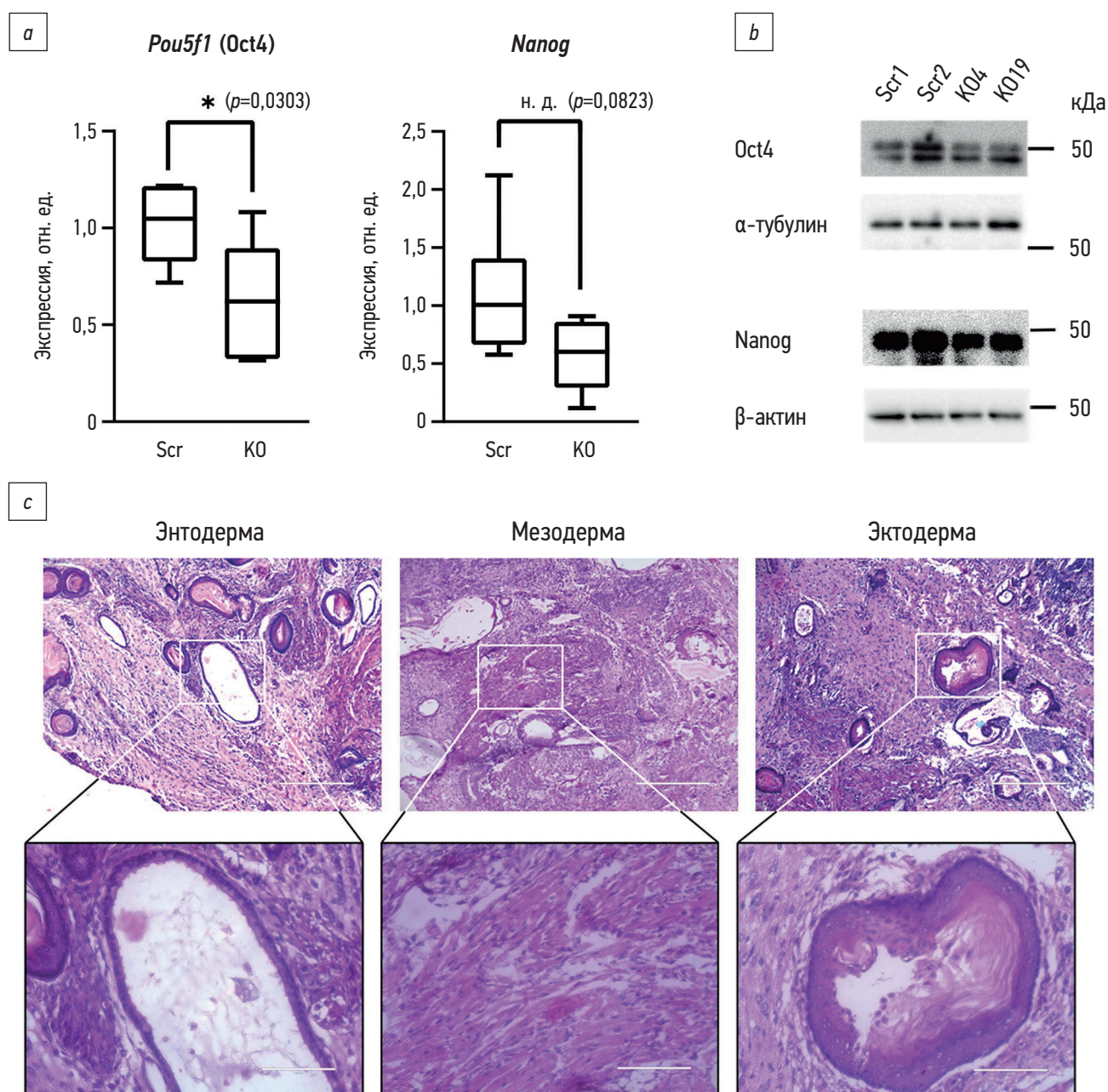


Рис. 2. Нокаут гена *Psme1* в эмбриональных стволовых клетках мыши не влияет на экспрессию маркёров плюрипотентности и дифференцировку *in vivo*: *a* — анализ экспрессии маркёров плюрипотентности Pou5f1 (Oct4) и Nanog в клетках с нокаутом гена *Psme1* (KO) относительно контрольных линий (Scr). Данные приведены как медиана с интерквартильным размахом ($n=3$); н. д. — статистически недостоверно; * $p < 0,05$; *b* — иммуноблоттинг клеточных экстрактов, полученных из эмбриональных стволовых клеток *Psme1*KO (K04, K019) и контрольных линий (Scr 1–2). В качестве контроля загрузки использованы β-актин и α-тубулин. Молекулярные массы белков-маркёров (в килодальтонах, кДа) указаны справа; *c* — репрезентативные изображения гистологического анализа тератом, сформированных эмбриональными стволовыми клетками с нокаутом гена *Psme1*. Во всех тератомах выявлены ткани, происходящие из трёх зародышевых листков: энтодерма (секреторный эпителий), мезодерма (мышечные волокна) и эктодерма (кератиновая жемчужина). Окрашивание гематоксилином и эозином. Бар 100 мкм.

Fig. 2. The *Psme1* knockout in mouse embryonic stem cells does not affect the expression of pluripotency markers and differentiation *in vivo*: *a*, expression of the pluripotency markers Pou5f1 (Oct4) and Nanog in *Psme1* (KO) knockout and control (Scr) cell lines. The data are presented as medians and interquartile ranges ($n = 3$); н. д., not statistically significant; *, $p < 0.05$; *b*, western blotting of *Psme1* KO (K04, K019) and control (Scr 1–2) cell extracts. β-actin and α-tubulin were used as load controls. The molecular weights of the marker proteins (kDa) are shown on the right; *c*, representative histology of teratomas formed by *Psme1* knockout embryonic stem cells. All teratomas contain tissues originating from three germ layers, i.e., endoderm (secretory epithelium), mesoderm (muscle fibers), and ectoderm (keratin pearl). Hematoxylin and eosin staining. Scale bar = 100 μm.

как вкладом гибридных протеасом 19S-20S-PA28 в контрольных клетках, так и снижением экспрессии протеасом в клетках *Psme1*KO. В связи с этим следующим этапом стало определение уровня экспрессии генов субъединиц

протеасом методом количественной ПЦР. Интересно, что тенденция к снижению экспрессии генов, кодирующих маркёры плюрипотентности, сохранилась и для генов протеасом: как структурных субъединиц Rpt5 (19S-регулятор)

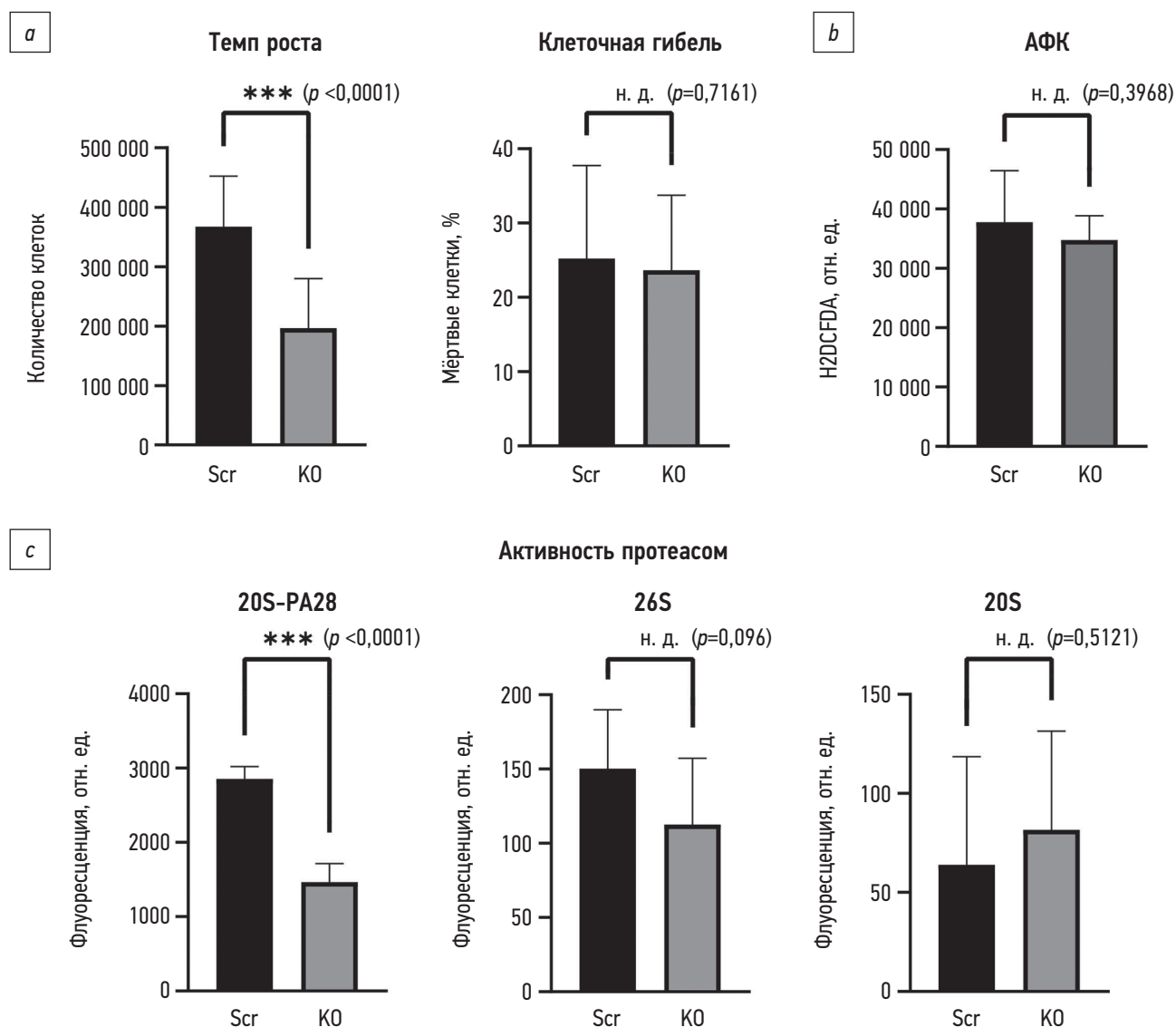


Рис. 3. Инактивация гена *Psme1* вызывает снижение пролиферативных характеристик эмбриональных стволовых клеток мыши, уменьшая пептидазную активность протеасом, но не влияя на уровни продукции активных форм кислорода (АФК); *a* — оценка пролиферативного потенциала линий *Psme1*KO в сравнении с контрольными клетками (Scr). Анализ клеточной гибели проводили с использованием окрашивания пропидием йодидом; *b* — оценка уровня продукции АФК с помощью окрашивания клеток красителем H2DCFDA; *c* — сравнение химотрипсин-подобной активности 20S-, 26S-протеасом и 20S-PA28 протеасомных комплексов в цитозольных экстрактах, полученных из эмбриональных стволовых клеток *Psme1*KO и контрольных линий (Scr). Активность протеасом оценивали по уровню флуоресценции 7-амино-4-метилкумарина (АМК). Данные приведены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$); н. д. — статистически недостоверно; *** $p < 0,0001$.

Fig. 3. *Psme1* knockout causes a decrease in the proliferative properties of mouse embryonic stem cells, reducing the peptidase activity of proteasomes, but without affecting the production of reactive oxygen species; *a*, proliferative potential of *Psme1* KO and control (Scr) cell lines. Cell death was assayed using propidium iodide staining; *b*, reactive oxygen species production by H2DCFDA staining; *c* — сравнение химотрипсин-подобной активности 20S-, 26S-протеасом и 20S-PA28 протеасомных комплексов в цитозольных экстрактах, полученных из эмбриональных стволовых клеток *Psme1*KO и контрольных линий (Scr). The proteasome activity was evaluated by 7-amino-4-methylcoumarin fluorescence. The data are presented as means $\pm$ standard deviations ($n = 3$); н. д., not statistically significant; *** $p < 0.0001$.

и $\alpha 3$ (20S-протеасома), так и каталитической $\beta 5$ (рис. 4, *a*). Однако на уровне белка мы не выявили значимых различий в *Psme1*KO-клетках по сравнению с контрольными (рис. 4, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важных объектов исследований в современной биомедицине являются плюрипотентные стволовые клетки, что обусловлено широкими возможностями их

применения в клеточной терапии, а также при моделировании заболеваний человека и поиске эффективных терапевтических средств *in vitro*. Понимание молекулярных механизмов, задействованных в поддержании клеточной плюрипотентности и обуславливающих приверженность к определённому пути дифференцировки, позволяет управлять этими процессами, минимизируя возможность появления осложнений при использовании плюрипотентных стволовых клеток в биомедицине. Известно, что сохранение протеостаза является одним из ключевых

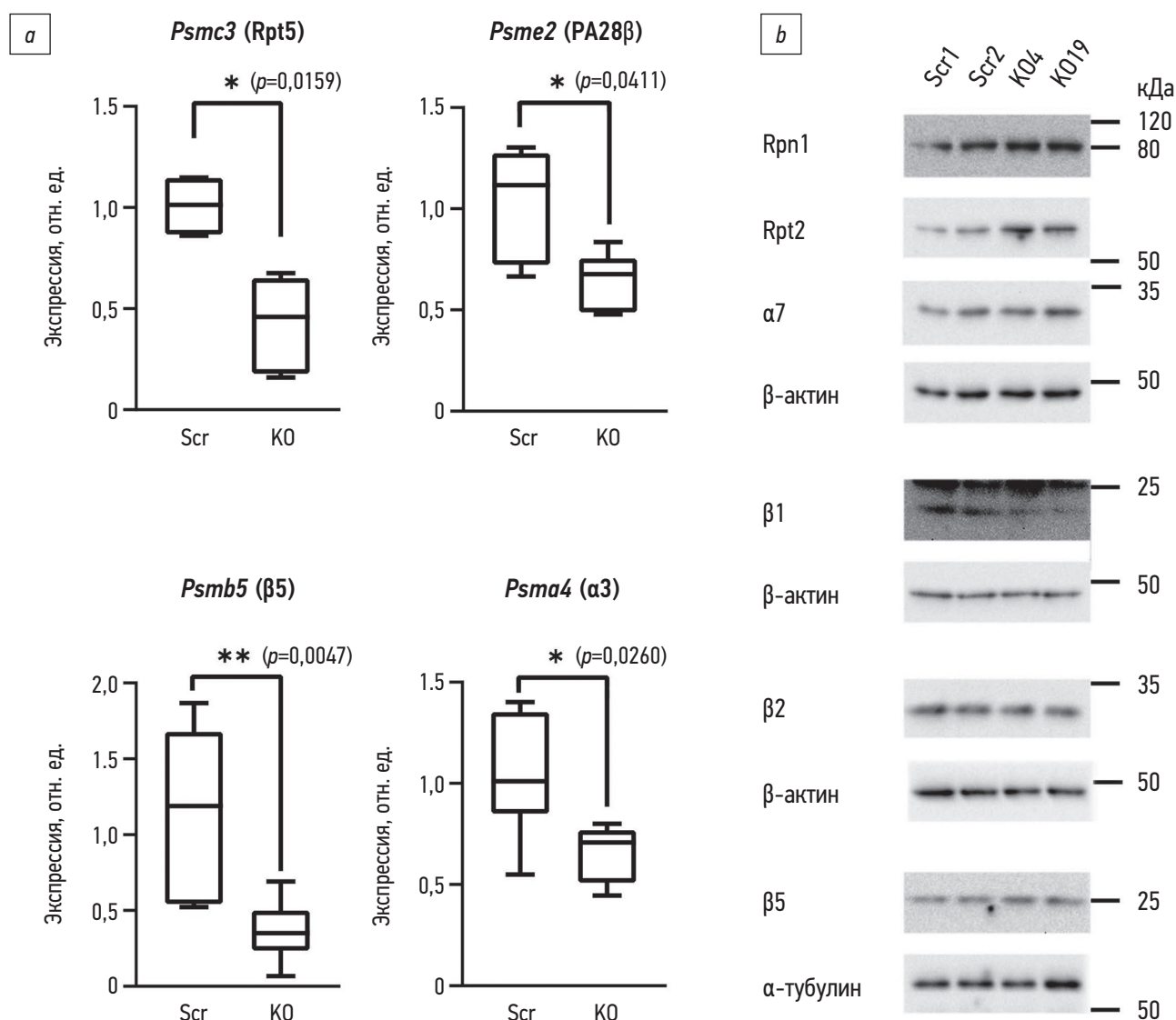


Рис. 4. Анализ экспрессии субъединиц протеасом в клетках с нокаутом гена *Psme1* (KO) эмбриональных стволовых клеток мыши: *a* — анализ экспрессии субъединиц 20S-протеасомы (α3 и β5), 19S-регулятора (Rpt5) и β-субъединицы PA28αβ-регулятора в клетках *Psme1*KO относительно контрольных линий (Scr). Данные приведены как медиана с интерквартильным размахом ($n=3$); н. д. — статистически недостоверно; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *b* — оценка уровней субъединиц 20S-протеасомы (α7, β1, β2 и β5) и 19S-регулятора (Rpn1 и Rpt2) с помощью иммуноблоттинга клеточных экстрактов, полученных из эмбриональных стволовых клеток *Psme1*KO (KO4, KO19) и контрольных линий (Scr 1–2). В качестве контроля загрузки использованы β-актин и α-тубулин. Молекулярные массы белков-маркёров (в килодальтонах, кДа) указаны справа.

Fig. 4. Expression of proteasome subunits in *Psme1* (KO) knockout mouse embryonic stem cells: *a*, expression of the 20S proteasome subunits (α3 and β5), 19S regulator (Rpt5), and β-subunit of the PA28αβ regulator in *Psme1* KO and control (Scr) cell lines. The data are presented as medians and interquartile ranges ($n = 3$); н. д., not statistically significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *b*, western blotting of *Psme1* KO (KO4, KO19) and control (Scr 1–2) cell extracts to determine 20S proteasome subunits (α7, β1, β2, and β5) and 19S regulator (Rpn1, and Rpt2). β-actin and α-tubulin were used as load controls. The molecular weights of the marker proteins (kDa) are shown on the right.

факторов в поддержании плюрипотентности и в определении дальнейшей судьбы плюрипотентных стволовых клеток. Всё больше данных свидетельствуют, что УПС играет важную роль как в плюрипотентности, так и в выходе из неё в процессе дифференцировки [20].

В работе с использованием технологии CRISPR/Cas9 создана клеточная модель ЭСК мыши с нокаутом гена *Psme1*, кодирующего α-субъединицу регулятора протеасомы PA28αβ. У полученных линий ЭСК не наблюдалось заметных изменений в экспрессии ключевых маркёров плюрипотентности Oct4 и Nanog по сравнению

с контрольными линиями и была сохранена способность дифференцироваться в составе тератом в производные трёх зародышевых листков, что подтверждает сохранение плюрипотентных свойств этих клеток. Отсутствие экспрессии гена *Psme1* в ЭСК не вызывало также изменений в уровне белков тестируемых нами субъединиц 20S-протеасомы: как структурной α7, так и трёх каталитических β1, β2 и β5, а также двух субъединиц 19S-регулятора: Rpn1 и Rpt2.

Полученные линии ЭСК с нокаутом гена *Psme1* продемонстрировали нарушения в скорости роста. Из литературы

известна связь между уровнями АФК и пролиферацией, причем данная связь является сложной и может быть двухфазной [21]. Это означает, что низкие уровни АФК могут стимулировать пролиферацию, в то время как высокие — ингибировать. На примере раковых клеток показано, что накопление АФК может нарушать способность клеток синтезировать нуклеотиды и аденозинтрифосфат, необходимые для деления клеток [22]. Сообщалось также, что накопление АФК ингибирует гликолиз, вызывая энергетический кризис [23]. Известно, что в условиях окислительного стресса происходит активация регулятора PA28αβ. Показана его важная роль в деградации повреждённых в результате окисления белков [9]. Кроме того, нокдаун гена *Psme1* в клетках ЭСК мыши вызывал некоторое увеличение уровней АФК в ранней дифференцировке [11]. Однако мы не наблюдали повышения уровня АФК в ЭСК с ноккаутом гена *Psme1*.

Известно, что сниженная пролиферация клеток может быть связана с пониженной активностью протеасом [24], поскольку дефекты в системе деградации белков ведут к их накоплению, дестабилизируя клеточный цикл и препятствуя дальнейшему делению. Мы проверили активность различных субпопуляций протеасомных комплексов и ожидаемо обнаружили значительное снижение активности протеасом формата 20S-PA28. Поскольку активность ни свободных 20S-протеасом, ни комплексов 26S не была нарушена в ЭСК с ноккаутом гена *Psme1*, это не вызывало нарушений в регуляции ключевых факторов плюрипотентности, таких как Oct4, Sox2, Nanog и c-Myc, что, как следствие, не нарушало самообновление ЭСК и способность к дифференцировке. Тем не менее, для регулятора PA28αβ показана роль в деградации неправильно свёрнутых и окисленных белков, а также в удалении белковых агрегатов в клетке [9, 25–27]. Возможно, что дефицит этого регулятора в ЭСК приводит к накоплению белковых агрегатов в таких клетках, что в конечном итоге обуславливает снижение пролиферативной активности ноккаутных линий клеток.

Полученные данные позволяют предположить важную роль регулятора PA28αβ в поддержании гомеостаза стволовых клеток. Дальнейшее исследование влияния дефицита PA28αβ на гомеостаз ЭСК мыши в условиях клеточного стресса будет иметь большое значение для понимания его роли в поддержании плюрипотентности и процессе дифференцировки. Эти знания могут стать основой для разработки новых подходов в регенеративной медицине, а также для создания более эффективных терапевтических стратегий, направленных на восстановление повреждённых тканей и органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа демонстрирует, что отсутствие белка PA28α в ЭСК мыши не оказывает влияния на их способность поддерживать плюрипотентное состояние

in vitro и дифференцироваться *in vivo*. Однако нарушение работы регулятора PA28αβ, вызванное ноккаутом гена *Psme1*, приводит к снижению пролиферации ЭСК, не оказывая влияния на продукцию АФК. Результаты данной работы позволяют предположить, что одной из причин снижения пролиферации стало общее снижение активности протеасом в ЭСК мыши с ноккаутом гена *Psme1*. Дальнейшие исследования позволят более подробно изучить роль PA28αβ в поддержании плюрипотентности ЭСК и их дифференцировке, а также определить влияние этого регулятора на процессы эмбрионального развития в условиях стресса.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. А.Д. Максимов — экспериментальные процедуры, написание текста статьи; Д.В. Кригер — экспериментальные процедуры, подготовка и написание текста статьи; А.А. Кузьмин — экспериментальные процедуры; Н.Д. Аксенов — экспериментальные процедуры; А.Н. Томилин — редактирование статьи; А.С. Цимоха — экспериментальные процедуры, написание текста статьи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Все исследования соответствуют принципам биомедицинской этики, изложенным в Хельсинкской декларации (2024), а также одобрены Комиссией по биологической безопасности и биотехнике Института цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург) согласно протоколу № 02/24 от 06.06.2024.

Согласие на публикацию. Неприменимо.

Источник финансирования. Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00390).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, один член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: A.D. Maksimov: investigation, writing—original draft; D.V. Kriger: investigation, writing—original draft; A.A. Kuzmin: investigation; N.D. Aksenov: investigation; A.N. Tomilin: writing—review & editing; A.S. Tsimokha: investigation, writing—original draft. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: All experiments comply with the principles of biomedical ethics outlined in the Declaration of Helsinki (2024), and have been

approved by the Commission on Biosafety and Bioethics of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St. Petersburg) in accordance with Protocol No. 02/24 of June 6, 2024.

Consent for publication: Not applicable.

Funding sources: This study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 22-14-00390).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

Data availability statement: All data generated during this study are available in the article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved two external reviewers, one member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Toyooka Y. Pluripotent stem cells in the research for extraembryonic cell differentiation. *Dev Growth Differ.* 2021;63(2):127–139. doi: 10.1111/dgd.12716 EDN: RQKIUJ
2. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy — promise and challenges. *Cell Stem Cell.* 2020;27(4):523–531. doi: 10.1016/j.stem.2020.09.014 EDN: YLWOVQ
3. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome structure and assembly. *J Mol Biol.* 2017;429(22):3500–3524. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.027 EDN: YGLNKQ
4. Abi Habib J, De Plaen E, Stroobant V, et al. Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. *Sci Rep.* 2020;10(1):15765. doi: 10.1038/s41598-020-71550-5 EDN: GVBKKX
5. Kors S, Geijtenbeek K, Reits E, Schipper-Krom S. Regulation of proteasome activity by (post-)transcriptional mechanisms. *Front Mol Biosci.* 2019;6:48. doi: 10.3389/fmolb.2019.00048 EDN: VMRQEL
6. Chen J, Wang Y, Xu C, et al. Cryo-EM of mammalian PA28αβ-iCP immunoproteasome reveals a distinct mechanism of proteasome activation by PA28αβ. *Nat Commun.* 2021;12(1):739. doi: 10.1038/s41467-021-21028-3 EDN: OWRSON
7. Schwarz K, Eggers M, Soza A, et al. The proteasome regulator PA28αβ can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur J Immunol.* 2000;30(12):3672–3679. doi: 10.1002/1521-4141(200012)30:12<3672::AID-IMMU3672>3.0.CO;2-B
8. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2005;15(1):27–33. doi: 10.1016/j.tcb.2004.11.003
9. Li J, Powell SR, Wang X. Enhancement of proteasome function by PA28α overexpression protects against oxidative stress. *FASEB J.* 2011;25(3):883–893. doi: 10.1096/fj.10-160895
10. Hernebring M, Brölén G, Aguilaniu H, et al. Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7700–7705. doi: 10.1073/pnas.0510944103
11. Hernebring M, Fredriksson Å, Liljevald M, et al. Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28. *Sci Rep.* 2013;3:1381. doi: 10.1038/srep01381
12. Kojima Y, Tam OH, Tam PP. Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;34:65–75. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.06.010
13. Bakhmet E, Ponomartsev S, Nazarov IB, et al. Derivation and characterization of Pcbp1-deficient mouse embryonic stem cells. *Cell Tissue Biol.* 2020;14:413–418. doi: 10.1134/S1990519X20060036 EDN: UJNYVC
14. Kriger D, Podenkova UI, Bakhmet EI, et al. Evidence of immunoproteasome expression onset in the formative state of pluripotency in mouse cells. *Cells.* 2024;13(16):1362. doi: 10.3390/cells13161362 EDN: LUGZFY
15. Hernebring M. 26S and PA28-20S proteasome activity in cytosolic extracts from embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1341:359–367. doi: 10.1007/978-1-4939-9216-1_216
16. Ivanova JS, Pugovkina NA, Neganova IE, et al. Cell cycle-coupled changes in the level of reactive oxygen species support the proliferation of human pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2021;39(12):1671–1687. doi: 10.1002/stem.3450 EDN: VJPLCT
17. Thomas T, Salcedo-Tacuma D, Smith DM. Structure, function, and allosteric regulation of the 20S proteasome by the 11S/PA28 family of proteasome activators. *Biomolecules.* 2023;13(9):1326. doi: 10.3390/biom13091326 EDN: GFEGFJ
18. Pickering AM, Linder RA, Zhang H, et al. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28αβ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10021–10031. doi: 10.1074/jbc.M111.277145
19. Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;267:59–124. doi: 10.1016/S1937-6448(08)00602-3 EDN: MNQBDT
20. Podenkova UI, Zubarev IV, Tomilin AN, Tsimokha AS. Ubiquitin–proteasome system in cell pluripotency and differentiation. *Tsitologiya.* 2023;65(3):232–245. doi: 10.31857/s0041377123030069 EDN: VDOROR
21. Huang R, Chen H, Liang J, et al. Dual role of reactive oxygen species and their application in cancer therapy. *J Cancer.* 2021;12(18):5543–5561. doi: 10.7150/jca.54699 EDN: BAQWQU
22. Dey P, Baddour J, Muller F, et al. Genomic deletion of malic enzyme 2 confers collateral lethality in pancreatic cancer. *Nature.* 2017;542(7639):119–123. doi: 10.1038/nature21052
23. Yun J, Mullarky E, Lu C, et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science.* 2015;350(6266):1391–1396. doi: 10.1126/science.aaa5004
24. Zhao Y, Liu X, He Z, et al. Essential role of proteasomes in maintaining self-renewal in neural progenitor cells. *Sci Rep.* 2016;6:19752. doi: 10.1038/srep19752
25. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell.* 2010;142(4):613–624. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.036
26. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, et al. The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28αβ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J.* 2010;432(3):585–594. doi: 10.1042/BJ20100878 EDN: OACNGJ
27. Wu DG, Wang YN, Zhou Y, et al. Inhibition of the Proteasome regulator PA28 aggravates oxidized protein overload in the diabetic rat brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2023;43(6):2857–2869. doi: 10.1007/s10571-023-01322-y EDN: YDPYZG

ОБ АВТОРАХ

* Цимоха Анна Сергеевна, канд. биол. наук;

адрес: 194064, Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-кт, д. 4;

ORCID: 0000-0002-8261-2750;

eLibrary SPIN: 6058-4316;

e-mail: atsimokha@incras.ru

AUTHORS' INFO

* Anna S. Tsimokha, Cand. Sci. (Biology);

address: 4 Tikhoretsky ave, Saint Petersburg, Russia, 194064;

ORCID: 0000-0002-8261-2750;

eLibrary SPIN: 6058-4316;

e-mail: atsimokha@incras.ru

Максимов Александр Денисович;

ORCID: 0009-0009-8348-3610;

e-mail: lumeex1337@gmail.com

Кригер Дарья Владимировна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-7147-1884;

eLibrary SPIN: 9821-8543;

e-mail: daryamalikova@gmail.com

Кузьмин Андрей Анатольевич, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-8629-2045;

e-mail: a.kuzmin@incras.ru

Аксенов Николай Дмитриевич, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-2549-9149;

eLibrary SPIN: 4406-6766;

e-mail: aksenovn@gmail.com

Томилин Алексей Николаевич, д-р биол. наук,

член-корреспондент РАН;

ORCID: 0000-0002-1137-7167;

eLibrary SPIN: 8079-5581;

e-mail: a.tomilin@incras.ru

Aleksandr D. Maksimov;

ORCID: 0009-0009-8348-3610;

e-mail: lumeex1337@gmail.com

Daria V. Kriger, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-7147-1884;

eLibrary SPIN: 9821-8543;

e-mail: daryamalikova@gmail.com

Andrey A. Kuzmin, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-8629-2045;

e-mail: a.kuzmin@incras.ru

Nikolay D. Aksenov, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-2549-9149;

eLibrary SPIN: 4406-6766;

e-mail: aksenovn@gmail.com

Alexey N. Tomilin, Dr. Sci. (Biology),

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences;

ORCID: 0000-0002-1137-7167;

eLibrary SPIN: 8079-5581;

e-mail: a.tomilin@incras.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author