



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 Migaud) 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

- Bieganowski 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/10.100008>
<https://doi.org/10.29011/SCRT-108>
- Kellner S., Kikyo N. 2010. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol. Histochemol.* V. 25 P. 405. <https://doi.org/10.14670/hh-25.405>
- Kropotov A., Kulikova V., Nerinovski 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., Nerinovski 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., Nerinovski 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. Nerinovski^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