

## ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ И ПОДАВЛЕНИЯ БИОСИНТЕЗА NAD<sup>+</sup> НА ПОДДЕРЖАНИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© 2023 г. М. В. Антипова<sup>1</sup>, В. А. Куликова<sup>1,2</sup>, Л. В. Соловьева<sup>1</sup>, А. В. Кропотов<sup>1</sup>, М. П. Светлова<sup>1</sup>, А. П. Якимов<sup>1,3</sup>, К. Б. Неринский<sup>4</sup>, Е. И. Бахмет<sup>1</sup>, А. А. Никифоров<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

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

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

<sup>4</sup>Санкт-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<sup>+</sup>) играет ключевую роль в клеточном метаболизме и сигналинге. В последние годы появилось множество свидетельств того, что NAD<sup>+</sup>-зависимые процессы принимают участие в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих. Основным способом поддержания уровня NAD<sup>+</sup> в клетках млекопитающих является его биосинтез из различных форм витамина B3. В настоящей работе мы выяснили, как стимуляция и подавление биосинтеза NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> никотинамидрибозидом повышает уровень внутриклеточного NAD<sup>+</sup> на 20%, и это не влияет на поддержание плюрипотентности клеток E14. Более того, в условиях критического истощения внутриклеточного пула NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, ЯМР-спектроскопия, мышечные эмбриональные стволовые клетки E14 Tg2a, плюрипотентность, дифференцировка, Oct4

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

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup> является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, таких как деацетилазы белков сиртуины и поли(АДФ-рибозил)полимераза (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 – мышечные эмбриональные стволовые клетки; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; NAD<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид; NMN – никотинамидмононуклеотид; Nampt – никотинамидфосфорилрибозилтрансфераза; NR – никотинамидрибозид; PNP – пуридиннуклеозидфосфорилаза.

Во многих случаях NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>-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  $\text{NAD}^+$ -зависимые деацетилазы сиртуины регулируют поддержание плюрипотентности и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши и человека при помощи различных механизмов (Fang et al., 2019).

Успешная регуляция  $\text{NAD}^+$ -зависимых метаболических и сигнальных процессов зависит от того, насколько эффективно стволовой клетке удается поддерживать определенный уровень данного динуклеотида. Происходит это в основном благодаря синтезу  $\text{NAD}^+$  из никотинамида, известного как витамин В3, который образуется в результате расщепления  $\text{NAD}^+$  в различных регуляторных процессах или поступает в организм с пищей. Помимо этого,  $\text{NAD}^+$  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 $\alpha$  (клеток E14) мы выясняли, меняется ли концентрация внутриклеточного  $\text{NAD}^+$  при переходе клеток из плюрипотентного состояния в дифференцированное, и показали, как фармакологическая модуляция уровня  $\text{NAD}^+$  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 $\alpha$  (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  $\beta$ -меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 15% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), раствора незаменимых аминокислот (NEAA, Thermo Scientific, США) при 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . 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  $\text{MgCl}_2$ , 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 иммуноцитохимического 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 пермеабелизировали 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 иммуноблоттинг 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<sup>+</sup> в клетках E14.** Для стимуляции биосинтеза NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> в питательную среду на 1 или 2 сут добавляли ингибитор никотинамидфосфорибозилтрансферазы (Namt) вещество FK866 (Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкМ.

**ЯМР-метабономика.** Для количественного анализа NAD<sup>+</sup>, NR, глюкозы и лактата в экстрактах клеток E14 использовали метод <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии. Клетки выращивали на культуральных чашках 10 см, после достижения конfluence 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<sub>2</sub>O, содержащем NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O и Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (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

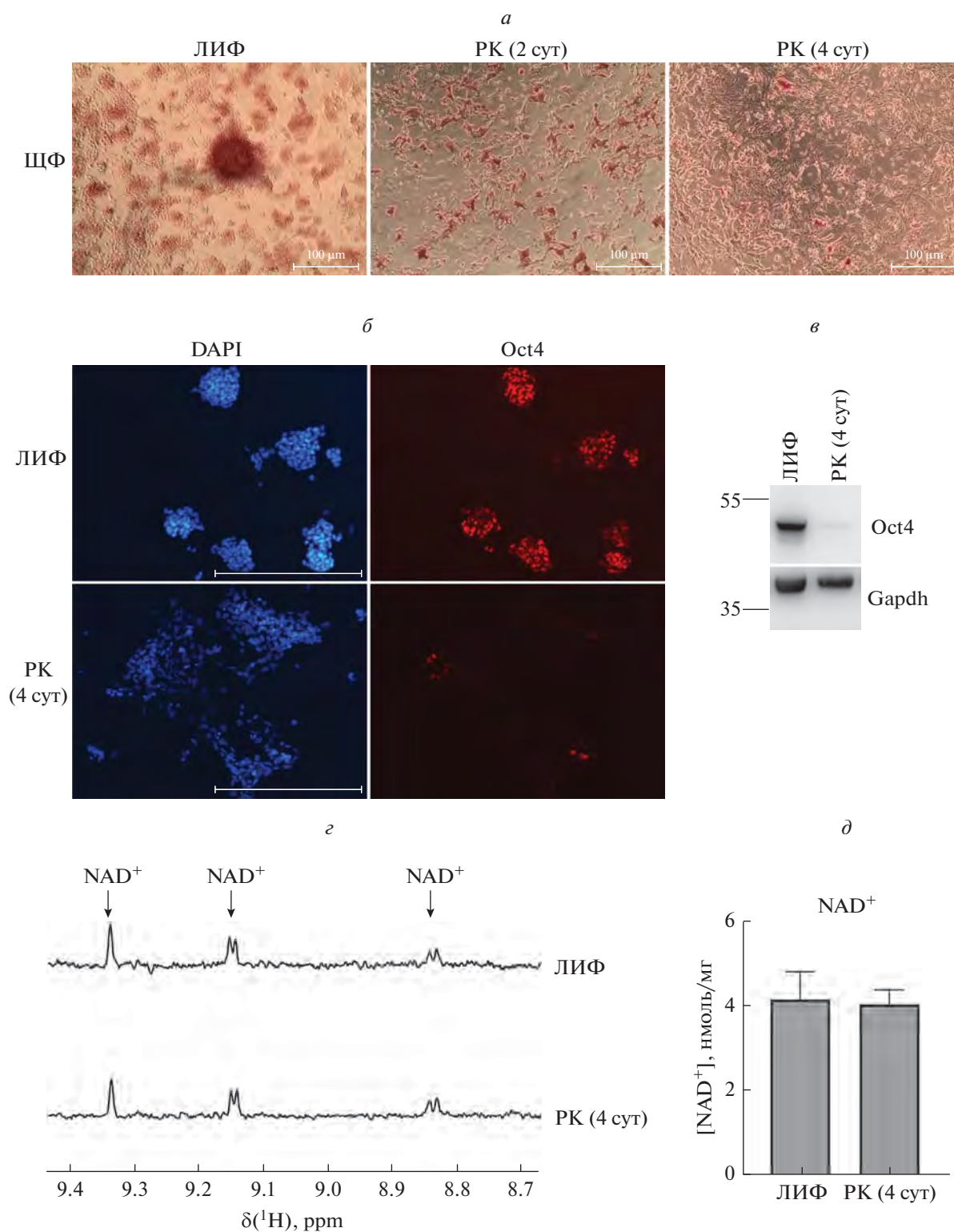
сравнениями по критерию Тьюки. Статистически значимыми считались различия при *p* < 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы оценить возможные изменения концентрации внутриклеточного NAD<sup>+</sup> 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 ретиноевой кислотой. Замена ЛИФ на ретиноевую 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 ретиноевой 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 ретиноевой 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 иммуноблоттинга мы показали, что фактор плюрипотентности Oct4 не экспрессируется в клетках E14 после их четырехсуточного культивирования с ретиноевой кислотой (рис. 1б, нижние панели и рис. 1в), что также подтверждает потерю клетками плюрипотентных свойств.

Далее мы провели количественную оценку концентрации NAD<sup>+</sup> в клетках E14, находящихся в плюрипотентном состоянии, и через 4 сут после запуска их дифференцировки ретиноевой 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 <sup>1</sup>H ЯМР-спектров экстрактов клеток E14,



**Рис. 1.** Переход клеток E14 из плюрипотентного в дифференцированное состояние не влияет на концентрацию в них NAD<sup>+</sup>. Для поддержания плюрипотентного состояния клетки E14 культивировали в присутствии лейкоингибирующего фактора (ЛИФ), для запуска дифференцировки – в присутствии ретиноевой кислоты (РК) в течение 2 или 4 сут. *а* – 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 <sup>1</sup>H ЯМР-спектров экстрактов клеток E14, стрелками указаны пики, соответствующие NAD<sup>+</sup>. *д* – Количественная оценка уровня NAD<sup>+</sup> в экстрактах клеток E14; данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения ( $n = 3$ ).

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

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

Для стимуляции биосинтеза NAD<sup>+</sup> мы использовали альтернативный эффективный предшественник NAD<sup>+</sup> — 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<sup>+</sup>, 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 приводила к увеличению уровня внутриклеточного NAD<sup>+</sup> на 20% по сравнению с контрольными клетками (рис. 2*а, б*).

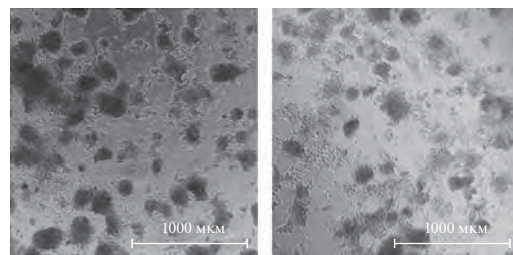
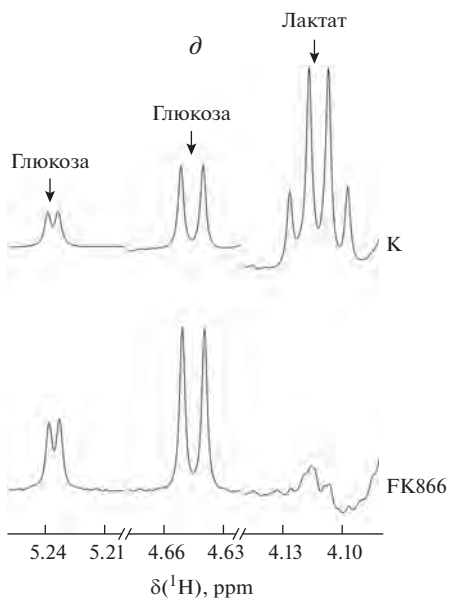
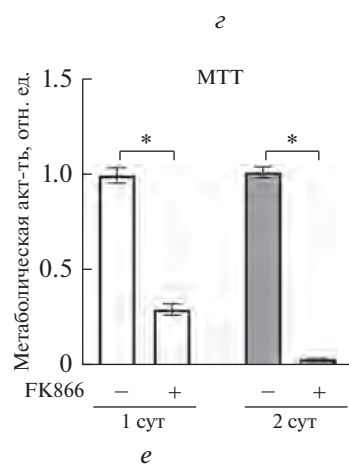
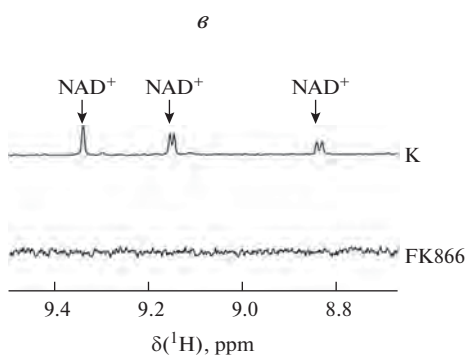
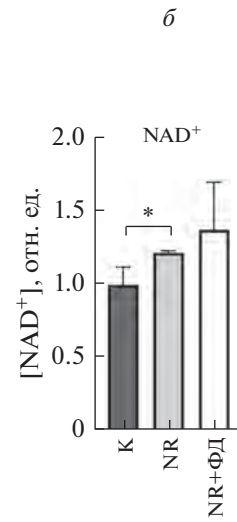
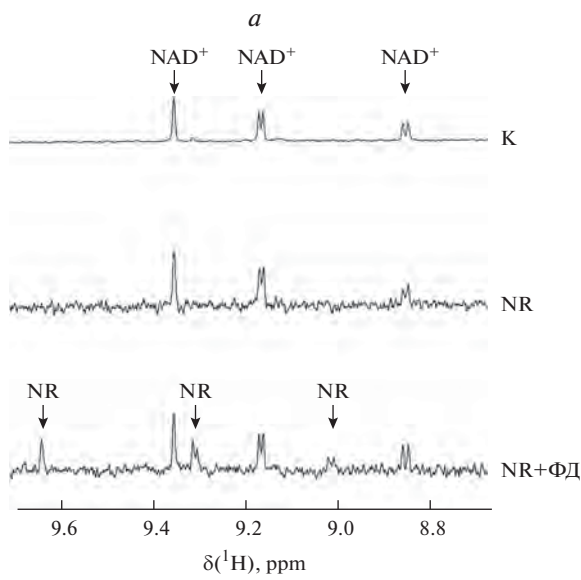
Ранее мы показали, что NR импортируется в культивируемые клетки человека представителями семейства уравнивающих переносчиков (Nikiforov et al., 2011; Kropotov et al., 2021), после чего помимо фосфорилирования до NMN этот нуклеозид интенсивно расщепляется до никотинамида цитозольной пуридиннуклеозидфосфорилазой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

чтобы усилить действие нуклеозида NR в качестве предшественника NAD<sup>+</sup>, клетки E14 культивировали 1 сут в присутствии NR (150 мкМ) и 5 мкМ фородезина. Подавление PNP-зависимого расщепления NR до никотинамида приводило к накоплению в клетках нуклеозида NR (рис. 2*а, нижняя панель*), однако уровень NAD<sup>+</sup> менялся незначительно по сравнению с клетками, обработанными только NR (статистически значимых отличий не выявлено) (рис. 2*б*). Возможно, в данной экспериментальной модели NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>. Поэтому для увеличения концентрации внутриклеточного NAD<sup>+</sup> в последующих экспериментах мы культивировали клетки E14 с NR без дополнительной обработки фородезином.

Далее мы оптимизировали условия получения жизнеспособной культуры плюрипотентных клеток E14 со значительно пониженным уровнем NAD<sup>+</sup> при помощи фармакологического подавления биосинтеза NAD<sup>+</sup> из никотинамида. Для этого клетки обрабатывали специфическим ингибитором Nampt веществом FK866 (Hasmann 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<sup>+</sup>: уровень NAD<sup>+</sup> в клеточных экстрактах находится ниже предела детекции (рис. 2*в*).

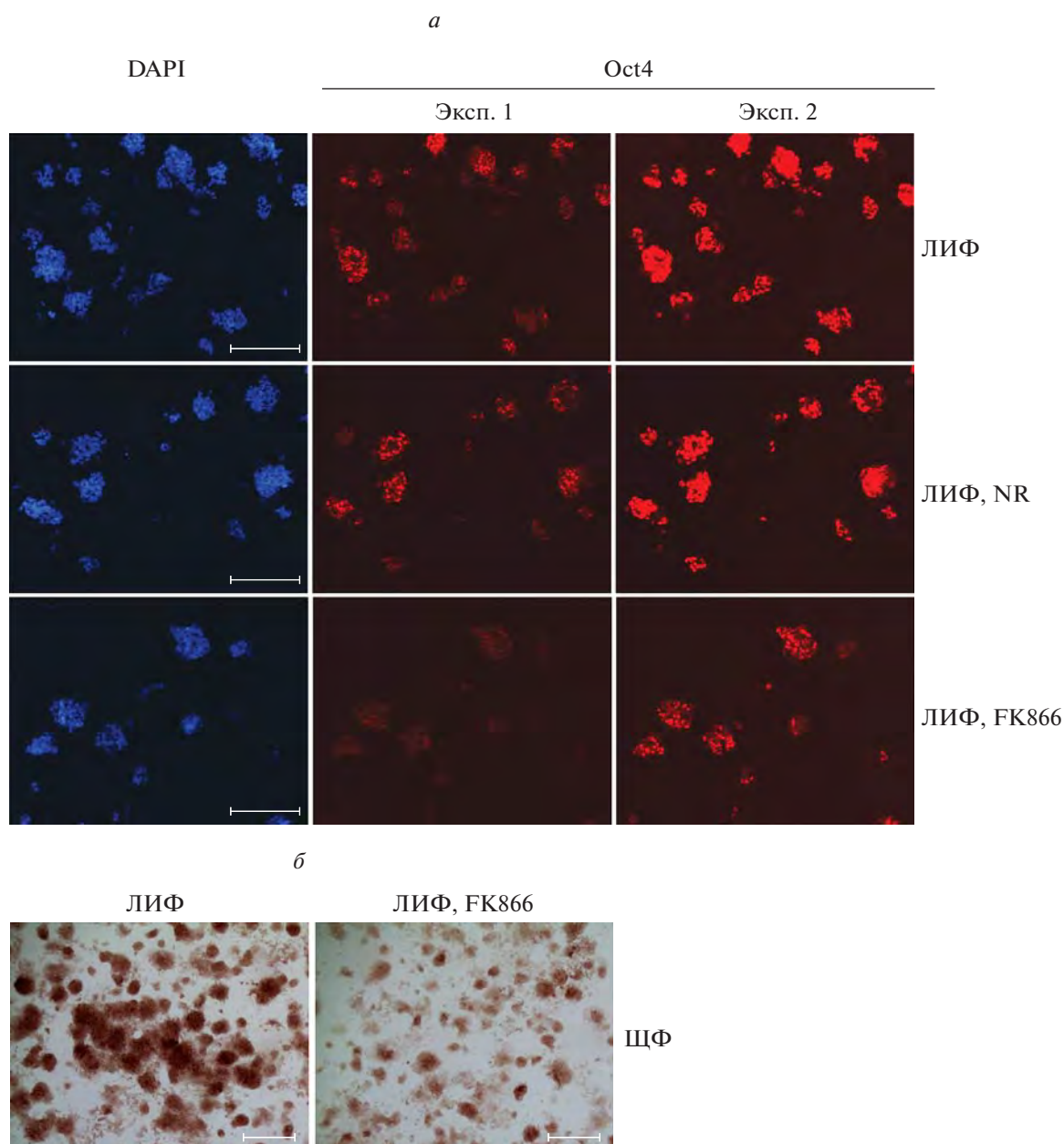
При помощи МТТ-теста мы также установили, что после культивирования в присутствии FK866 в течение 1 сут метаболическая активность клеток E14 падала на 70%, а через 2 сут понижалась до 4% по сравнению с контрольными клетками (рис. 2*г*). При этом, через 1 сут действия FK866 в клетках E14 наблюдали значительное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

**Рис. 2.** Модуляция уровня NAD<sup>+</sup> в клетках E14 в плюрипотентном состоянии. Для стимуляции биосинтеза NAD<sup>+</sup> клетки культивировали в течение 1 сут в присутствии 150 мкМ никотинамидрибозид (NR) отдельно или совместно с 5 мкМ фородезином (ФД); для подавления синтеза NAD<sup>+</sup> клетки культивировали в присутствии 5 мкМ FK866. *а, в, д* — Фрагменты <sup>1</sup>H ЯМР-спектров экстрактов клеток E14; стрелками указаны пики, соответствующие NAD<sup>+</sup>, NR, глюкозе и лактату. *б* — Количественный анализ данных <sup>1</sup>H ЯМР-спектров, представленных на рис. 2*а*; даны средние значения и их стандартные отклонения ( $n = 3$ ); среднее значение уровня NAD<sup>+</sup> 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 метаболической активности контрольных клеток и клеток, культивируемых в присутствии FK866, 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.



К

FK866

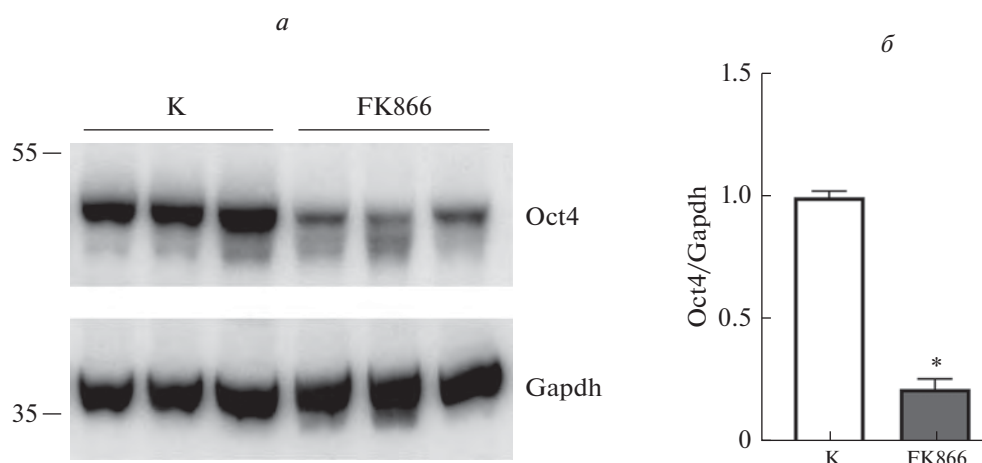


**Рис. 3.** Маркеры плюрипотентности в клетках E14 после стимуляции и подавления биосинтеза NAD<sup>+</sup>. Клетки выращивали в присутствии ЛИФ и обрабатывали NR (150 мкМ) или FK866 в течение 1 сут. *a* – Иммуноцитохимический анализ с использованием антител к Oct4 (красный); представлены изображения с меньшей (Эксп. 1) и большей (Эксп. 2) интенсивностью сигнала Oct4 для одного поля зрения; ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок: 200 мкм. *b* – Окраска 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> введением NR не приводила к каким-либо заметным изменениям уровня Oct4. Удивительно, но даже в условиях критического снижения уровня внутриклеточного NAD<sup>+</sup> 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 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 <sup>1</sup>H 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/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<sup>+</sup> Biosynthesis on the Maintenance of Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells

M. V. Antipova<sup>a</sup>, V. A. Kulikova<sup>a, b</sup>, L. V. Solovjeva<sup>a</sup>, A. V. Kropotov<sup>a</sup>, M. P. Svetlova<sup>a</sup>, A. P. Yakimov<sup>a, c</sup>, K. B. Nerinovski<sup>d</sup>, E. I. Bakhmet<sup>a</sup>, and A. A. Nikiforov<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

<sup>b</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

<sup>c</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

<sup>d</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

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

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) plays a key role in cellular metabolism and signaling. In recent years, evidence has accumulated that NAD<sup>+</sup>-dependent processes are involved in the regulation of pluripotency and differentiation of mammalian embryonic stem cells. The major means to maintain NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> biosynthesis by nicotinamide riboside increases the level of intracellular NAD<sup>+</sup> by 20%, but it does not affect the maintenance of pluripotency in E14 cells. Moreover, under conditions of critical depletion of NAD<sup>+</sup> pool by Nampt inhibition with FK866 E14 cells maintained pluripotency, though the expression level of Oct4 was decreased.

**Keywords:** NAD<sup>+</sup>, NMR spectroscopy, mouse embryonic stem cells Tg2a E14, pluripotency, differentiation, Oct4