

индуцированного старения и PICS в эСК, которая может заключаться в наличии или отсутствии повреждений ДНК. Действительно, в случае старения эСК, индуцированного окислительным стрессом, мы наблюдали персистентные фокусы повреждения ДНК и постоянную активность киназы ATM, что обуславливало конститутивную активацию сигнального пути p53/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>/Rb и стабильность ареста клеточного цикла (Borodkina et al., 2014). В случае PICS, согласно данным литературы, не детектируются ни фокусы повреждения ДНК, ни повышенная активность ATM (Alimonti et al., 2010). Более того, нокдаун ATM при помощи малой интерферирующей РНК не влияет на развитие PICS (Alimonti et al., 2010). Отсутствие конститутивного сигналинга от повреждений ДНК в случае PICS может обуславливать меньшую стабильность блока цикла и возможность его отменить.

Совершенно другие результаты описаны для линий эндометриальной карциномы с инактивированным *PTEN* – RL 95-2 и Ishikawa (St-Germain et al., 2004a, 2004b). Во-первых, в этих клеточных типах сниженная экспрессия *PTEN* и, как следствие, повышенная активность АКТ не сказываются на их пролиферативной активности и не вызывают преждевременного старения. Более того, ингибирование активности АКТ приводит к индукции апоптоза в этих клетках (St-Germain et al., 2004a, 2004b).

Существует несколько возможных объяснений того, как сниженная экспрессия *PTEN* может, с одной стороны, приводить к индукции преждевременного старения, а с другой стороны, способствовать неопластической трансформации клеток. Так, авторы одной из работ продемонстрировали, что инактивация *PTEN in vitro* и *in vivo* приводит к аресту клеточного цикла и старению (Chen et al., 2005). Однако в случае одновременного снижения экспрессии p53 авторы наблюдали трансформацию клеток и развитие высокоинвазивной летальной формы рака при трансплантации этих клеток животным. На основании этих результатов исследователи заключили, что для злокачественной трансформации *PTEN*-дефицитных клеток необходимо дополнительное подавление экспрессии опухолевого супрессора p53. Авторы другого изыскания нашли иное объяснение роли *PTEN* в индукции старения и канцерогенезе (Alimonti et al., 2010). Согласно их наблюдениям, полная потеря *PTEN* может приводить к запуску преждевременного старения в клетках, тогда как

гаплонедостаточность этого гена будет способствовать их трансформации.

Наши результаты хорошо согласуются с этим предположением. Использование системы CRISPR/Cas9 для нокаута приводит к полной потере *PTEN* в эСК, стабильно экспрессирующих Cas9, и, как видно из наших результатов, такие клетки демонтируют все признаки клеточного старения.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована Российским научным фондом (проект 19-74-10038).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Грюкова А.А., Шатрова А.Н., Дерябин П.И., Бородкина А.В., Князев Н.А., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2017. Модуляция фенотипических признаков старения стволовых эндометриальных клеток в условиях ингибирования mTOR и MAP-киназных сигнальных путей. Цитология. Т. 59. № 6. С. 410. (Grukova A.A., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Borodkina A.V., Knyazev N.A., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2017. Modulation of senescence phenotype of human endometrial stem cells under inhibition of mtor and map-kinase signaling pathways. Tsitologiya. V. 59. P. 410.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)
- Alimonti A., Nardella C., Chen Z., Clohessy J.G., Carracedo A., Trotman L.C., Cheng K., Varmeh S., Kozma S.C., Thomas G., Rosivatz E., Woscholski R., Cognetti F., Scher H.I., Pandolfi P.P. 2010. A novel type of cellular

- senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* V. 120. P. 681.
- Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E.* 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging.* V. 6. P. 481.
- Bousset L., Gil J.* 2022. Targeting senescence as an anticancer therapy. *Mol. Oncol.* V. 16. P. 3855.
- Campisi J., Dimri G., Hara E.* 1996. Handbook of the biology of aging. N.-Y., USA: Academic Press.
- Chen C.-Y., Chen J., He L., Stiles B.L.* 2018. PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. *Front. Endocrinol.* V. 9. P. 338.
- Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.-K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P.* 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN-deficient tumorigenesis. *Nature.* V. 436. P. 725.
- Deryabin P., Griukova A., Shatrova A., Petukhov A., Nikolsky N., Borodkina A.* 2019. Optimization of lentiviral transduction parameters and its application for CRISPR-based secretome modification of human endometrial mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.* V. 18. P. 742.
- Duan S., Yuan G., Liu X., Ren R., Li J., Zhang W., Wu J., Xu X., Fu L., Li Y., Yang J., Zhang W., Bai R., Yi F., Suzuki K., et al.*, 2015. PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. *Nature Commun.* V. 6. P. 10068.
- Huang W., Hickson L.J., Eirin A., Kirkland J.L., Lerman L.O.* 2022. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat. Rev. Nephrol.* V. 18. P. 611.
- Jung S.H., Hwang H.J., Kang D., Park H.A., Lee H.C., Jeong D., Lee K., Park H.J., Ko Y.G., Lee J.S.* 2019. mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53. *Oncogene.* V. 38. P. 1639.
- Kappes H., Goemann C., Bamberger A.M., Löning T., Milde-Langosch K.* 2001. PTEN expression in breast and endometrial cancer: correlation with steroid hormone receptor status. *Pathobiology.* V. 69. P. 136.
- Kim J.S., Lee C., Bonifant C.L., Ransom H., Waldman T.* 2007. Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Mol. Cell Biol.* V. 27. P. 662.
- Lancaster J.M., Risinger J.I., Carney M.E., Barrett J.C., Berchuck A.* 2001. Mutational analysis of the PTEN gene in human uterine sarcomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* V. 184. P. 1051.
- Legut M., Daniloski Z., Xue X., McKenzie D., Guo X., Wesels H.-H., Sanjana N.E.* 2020. High-Throughput Screens of PAM-Flexible Cas9 Variants for Gene Knockout and Transcriptional Modulation. *Cell reports.* V. 30. P. 2859.
- Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S.I., Puc J., Miliareis C., Rodgers L., McCombie R., Bigner S.H., Giovanella B.C., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M.H., Parsons R.* 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* V. 275. P. 1943.
- Parisotto M., Grelet E., El Bizri R., Metzger D.* 2018a. Senescence controls prostatic neoplasia driven by PTEN loss. *Mol. Cell Oncol.* V. 6. P. 1511205.
- Parisotto M., Grelet E., El Bizri R., Dai Y., Terzic J., Eckert D., Gargowitsch L., Bornert J.-M., Metzger D.* 2018b. PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo. *J. Exper. Med.* V. 215. P. 1749.
- Shlush L., Itzkovitz S., Cohen A., Rutenberg A., Berkovitz R., Yehezkel S., Shahar H., Selig S., Skorecki K.* 2011. Quantitative digital in situ senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay. *BMC Cell Biol.* V. 12. P. 16.
- St-Germain M.E., Gagnon V., Mathieu I., Parent S., Asselin E.* 2004a. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int. J. Oncol.* V. 24. P. 1311.
- St-Germain M.E., Gagnon V., Parent S., Asselin E.* 2004b. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol. Cancer.* V. 3. P. 7.
- Stelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazarino M.C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., et al.*, 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* V. 3. P. 192.
- Toropov A.L., Deryabin P.I., Shatrova A.N., Borodkina A.V.* 2023. Oncogene-induced senescence is crucial antitumor defense mechanism of human endometrial stromal cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 14089.

## ***PTEN* KNOCKOUT LEADS TO PREMATURE SENESCENCE OF HUMAN ENDOMETRIAL STROMAL CELLS**

**P. S. Parfenova<sup>1</sup>, P. I. Deryabin<sup>1</sup>, D. Y. Pozdnyakov<sup>1</sup>, A. V. Borodkina<sup>1, \*</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia*

\* *e-mail: borodkina618@gmail.com*

One of the defense mechanisms against neoplastic transformation of cells in response to oncogenic stimuli is cellular senescence. However, the ability of cells to activate this defense reaction depends on their nature and is not inherent in all cell types. Within the present study, we investigated reaction of human endometrial stromal cells (EnSC) towards classical oncogenic stimulus – *PTEN* inactivation. By using CRISPR/Cas9 genome editing technology, we generated EnSC line with *PTEN* knockout. We showed that reduced *PTEN* expression results in proliferation loss, cell hypertrophy, accumulation of lipofuscin and disturbed redox balance. Together these data favors senescence induction in *PTEN*-knockout EnSC. While studying the molecular mechanisms, we established the key role of the PI3K/AKT signaling pathway in the implementation of the EnSC senescence program under conditions of *PTEN* knockout. Inhibiting this signaling pathway by LY294002 prevented both the phenotypic manifestations of premature senescence and cell cycle arrest in *PTEN*-knockout EnSC. Thus, the development of premature senescence in response to reduced expression of the oncosuppressor *PTEN* can be considered as a protective mechanism that prevents malignant transformation of EnSC.

*Keywords:* cell senescence, human endometrial stromal cells, tumor suppressor, *PTEN*, *PICS*