

УДК 576.38:576.08

## НОКАУТ *PTEN* ВЫЗЫВАЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. П. С. Парфенова<sup>1</sup>, П. И. Дерябин<sup>1</sup>, Д. Ю. Поздняков<sup>1</sup>, А. В. Бородкина<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Группа механизмов клеточного старения Института цитологии РАН,

Санкт-Петербург, 194064, Россия

\* E-mail: borodkina618@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 07.10.2023 г.

Одним из защитных механизмов против неопластической трансформации клеток в ответ на онкогенные стимулы является клеточное старение. Однако способность клеток активировать данную защитную реакцию зависит от их природы и присуща не всем клеточным типам. В нашей работе мы исследовали реакцию эндометриальных стромальных клеток человека (эСК) на классический онкогенный стимул – инактивацию онкосупрессора *PTEN*. Используя технологию направленного редактирования генома CRISPR/Cas9, нам удалось получить линию эСК с нокаутом гена *PTEN*. Мы показали, что снижение экспрессии *PTEN* приводит к потере пролиферативной активности, гипертрофии, накоплению липофусцина и нарушению редокс-баланса клеток. Совокупность выявленных признаков свидетельствует в пользу индукции преждевременного старения в эСК, нокаутных по *PTEN*. При исследовании молекулярных механизмов мы установили ключевую роль PI3K/AKT сигнального пути в реализации программы старения эСК в условиях нокаута *PTEN*. Ингибирование этого сигнального пути при помощи вещества LY294002 предотвращало как фенотипические проявления преждевременного старения, так и арест клеточного цикла в нокаутных по *PTEN*-клетках. Таким образом, развитие преждевременного старения в условиях сниженной экспрессии онкосупрессора *PTEN* можно рассматривать как защитный механизм, препятствующий злокачественной трансформации эСК.

**Ключевые слова:** клеточное старение, эндометриальная стромальная клетка человека, туморсупрессор, *PTEN*, *PICS*

**Принятые сокращения:** АФК – активные формы кислорода; эСК – эндометриальные стромальные клетки человека; DCF и H<sub>2</sub>DCF-DA – дихлорофлуоресцеин и диацетат 2',7'-DCF соответственно; DHR123 – дигидрорадамин 123; LY – LY294002 (ингибитор киназы АКТ); PI – йодистый пропилий, *PICS* – клеточное старение, индуцированное потерей *PTEN*; PIP<sub>3</sub> – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; Rho123 – родамин 123; SA-β-Gal – бета-галактозидаза, ассоциированная со старением.

**DOI:** 10.31857/S0041377124020035, **EDN:** RKKFRV

Согласно современным представлениям, клеточное старение, наряду с апоптозом или некрозом, принято рассматривать как важнейшую физиологическую реакцию клеток на стресс (Campisi et al., 1996). Принципиальным отличием этой стресс-реакции является необратимая потеря пролиферации при сохранении жизнеспособности и метаболической активности клеток, что предотвращает распространение поврежденных клеток и, таким образом, препятствует их возможному злокачественному перерождению (Campisi et al., 1996).

За более чем полувековую историю изучения феномена старения клеток ученым удалось идентифицировать различные его формы, включая

репликативную, стресс-индуцированную и онкоген-индуцированную (Huang et al., 2022). Однако и по сей день появляются экспериментальные свидетельства существования новых индукторов и форм клеточного старения. Так, сравнительно недавно было обнаружено, что потеря экспрессии онкосупрессоров, в частности белка *PTEN*, может приводить к запуску старения в различных типах клеток (Alimonti et al., 2010; Parisotto et al., 2018a; Jung et al., 2019).

*PTEN* представляет собой фосфатазу с двойной субстратной специфичностью, основные биологические эффекты которой определяются способностью дефосфорилировать липидный субстрат – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат

(PIP<sub>3</sub>). Результатом дефосфорилирования PIP<sub>3</sub> является ингибирование сигнального пути PI3K/АКТ – основного пути роста и выживания клеток, что и опосредует онкосупрессорную активность PTEN (Chen Z. et al., 2005; Chen C. et al., 2018; Jung et al., 2019). Установлено, что мутации, приводящие к потере (снижению) экспрессии PTEN и соответственно к конститутивной гиперактивации сигнального пути PI3K/АКТ, способствуют онкогенезу и часто встречаются при различных видах рака (Li et al., 1997; Alimonti et al., 2010). Так, снижение экспрессии PTEN в результате мутаций обнаруживается в более чем половине случаев эндометриальных карцином (Kappes et al., 2001; Steelman et al., 2011).

Наряду с данными о последствиях сниженного уровня PTEN в прогрессии рака появляется все больше свидетельств того, что потеря экспрессии PTEN может приводить к преждевременному клеточному старению (Kim et al., 2007; Alimonti et al., 2010; Jung et al., 2019). Такой тип старения был выделен в отдельную форму и получил название клеточного старения, индуцированного потерей PTEN (PICS) (Chen et al., 2005; Alimonti et al., 2010). Считается, что PICS реализуется через p53-зависимый молекулярный механизм, но может возникать в клетках в отсутствие повреждений ДНК, что отличает эту форму старения от его классических форм (Alimonti et al., 2010). Сегодня индукцию старения в результате потери экспрессии PTEN рассматривают как один из важнейших противораковых механизмов, реализующихся на самых ранних этапах формирования опухоли (Bousset, Gil, 2022).

Как сказано ранее, мутации, приводящие к потере экспрессии PTEN, играют важную роль в патогенезе эндометриальных карцином, однако практически не встречаются в случаях эндометриальных сарком (рака стромального компартмента эндометрия) (Kappes et al., 2001; Lancaster et al., 2001; Steelman et al., 2011). Кроме того, согласно нашим предыдущим данным, преимущественным ответом эндометриальных стромальных клеток (эСК), являющихся основным структурным компонентом стромы эндометрия, на различные стрессы и экспрессию онкогена HRAS<sup>G12V</sup> является индукция старения (Borodkina et al., 2014; Тогоров et al., 2023). Совместно эти наблюдения позволяют предположить, что потеря экспрессии PTEN может приводить к запуску преждевременного старения в эСК и препятствовать онкогенезу, что, в свою очередь, может обуславливать отсут-

ствие связи между прогрессией эндометриальных сарком и мутациями в гене PTEN (Lancaster et al., 2001; Steelman et al., 2011). Таким образом, в рамках нашей работы мы исследовали возможность индукции преждевременного старения эСК в результате нокаута гена PTEN.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование и обработка клеток.** В нашей работе использовали эСК человека (линия 2804), полученные и охарактеризованные сотрудниками Института цитологии ранее (Земелько и др., 2011). ЭСК культивировали в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) и 1% глутамакса (Gibco, США), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Использовали эСК на ранних пассажах (с 6-го по 9-й). В экспериментах с использованием ингибитора киназы АКТ полную ростовую среду эСК дополняли веществом LY294002 (LY) в концентрации 5, 10 или 20 мкМ (Sigma, США). Ингибитор LY добавляли через 10 сут после трансдукции эСК; схема обработки описана нами ранее (Грюкова и др., 2017).

Для продукции рекомбинантных лентивирусных частиц использовали клетки HEK293T. Их культивировали на среде DMEM (“Биолот”, Россия) с 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Для наработки плазмид использовали бактерии *Escherichia coli* штамма Stbl3. Бактерии культивировали при 37 °С в питательной среде 2-YT следующего состава: 1.6% триптона (Amresco, США), 1% дрожжевого экстракта (Amresco, США), 0.5% NaCl при pH 7.0; для подготовки агаризованных чашек Петри питательную среду дополняли 2.5%-ным агаром (Amresco, США).

Все клеточные линии были получены из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Все клетки рутинно проверяли на протяжении исследования на заражение микоплазмой при помощи ПЦР.

**Разработка и клонирование генетически кодируемой системы для CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута PTEN.** 1. *Дизайн последовательностей гидРНК.* Последовательности гидРНК были разработаны при помощи веб-приложений CCTop-CRISPR/Cas9 и CRISPR-ERA в соответствии с общепринятыми рекомендациями, а именно: выбором кандидатных вариантов гидРНК, наиболее

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные последовательности гидРНК

| № гидРНК | Олигонуклеотидная последовательность | Состав последовательности    |
|----------|--------------------------------------|------------------------------|
| 1        | Прямая                               | caccgAAACAAAAGGAGATATCAAG    |
|          | Обратная                             | aaacCTTGATATCTCCTTTTGTTC     |
| 2        | Прямая                               | caacgGCTAACGATCTCTTTGATGA    |
|          | Обратная                             | aaacTCATCAAAGAGATCGTTAGCc    |
| 3        | Прямая                               | caccgAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGG |
|          | Обратная                             | caccgAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGG |

эффективно отжигающихся на целевую последовательность; выбором кандидатных вариантов гидРНК, обладающих минимальными нецелевыми эффектами (off-target активность); проектированием последовательностей гидРНК из 20 нуклеотидов соответственно структуре 5'-GN<sub>18</sub>G-3' при РАМ-мотиве NGG. Последовательности гидРНК подбирали к региону первого конститутивного экзона гена *PTEN*. Всего было подобрано три последовательности гидРНК. Последовательности олигонуклеотидов для клонирования гидРНК кодирующих фрагментов приведены в табл. 1. Синтез олигонуклеотидов был осуществлен в компании "Евроген" (Россия). В качестве контроля был использован исходный лентивектор, несущий бессмысловую гидРНК.

**2. Молекулярное клонирование.** Последовательности, кодирующие гидРНК, были клонированы в шаблонный лентивектор pCC\_01-hU6-BsmB1-sgRNA(E+F)-barcode-EFS-Cas9-NLS-2A-Puro-WPRE (139086; Addgene, США; с любезного позволения Dr. Neville, Sanjana, США) (Legut et al., 2020). Стратегия клонирования последовательностей, кодирующих гидРНК, в лентивирусную конструкцию, заключалась в выполнении следующих операций: рестрикции лентивектора; сборки фрагментов ДНК, кодирующих последовательности гидРНК; вставки собранных фрагментов в разрезанный лентивектор посредством лигирования.

Реакционная смесь для рестрикции содержала 2 мкл раствора лентивектора (1 мкг/мкл), 3 мкл 10-кратного буферного раствора, 0.4 мкл раствора DDT (100 мМ; Fermentas, США), 21.6 мкл ddH<sub>2</sub>O ("Евроген", Россия), и по 1.5 мкл растворов рестриктазы BsmB1 (Fermentas, США) и фосфатазы FastAP (Fermentas, США). Рестрикцию проводили при 37 °С в течение 1 ч. Полученные фрагменты ДНК очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и последующей очистки из геля при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Нидерланды) по протоколу производителя.

Сборку фрагментов ДНК, кодирующих последовательности гидРНК, осуществляли путем

попарного отжига комплементарных олигонуклеотидов друг на друга и фосфорилирования их свободных липких концов. Реакции проводили в течение 30 мин при 37 °С с последующей инактивацией ферментов при 95 °С в течение 5 мин. Реакционные смеси готовили следующим образом: 1 мкл 100 мкМ прямого олигонуклеотида, 1 мкл 100 мкМ обратного олигонуклеотида, 1 мкл 10-кратного буфера T4 (Ligation Buffer; NEB, США), 0.5 мкл 10 ед/мкл полинуклеотидкиназы T4 РНК (NEB, США) и 6.5 мкл ddH<sub>2</sub>O.

Лигирование фрагментов шаблонного лентивектора и фрагментов, кодирующих последовательности гидРНК, производили непосредственно перед трансформацией бактерий при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакционные смеси готовили следующим образом: 50 нг фрагмента BsmB1-разрезанного лентивектора, 1 мкл разведенных в 200 раз дуплексов олигонуклеотидов, 5 мкл 2-кратного буфера Quick Ligase Buffer (NEB, США), 1 мкл смеси лигаз Quick Ligase (NEB, США) и ddH<sub>2</sub>O ("Евроген", Россия) до общего объема 10 мкл.

**3. Амплификация лентивекторов в бактериях.** Амплификацию лентивирусных конструкций проводили в бактериях *E. coli* штамма Stb13. Трансформацию бактерий проводили классическим методом теплового шока, используя 5 мкл лигазных смесей. Для селекции трансформированных бактерий использовали ампициллин ("Биолот", Россия) в рабочей концентрации 100 мкг/мл. Амплифицированные плазмидные конструкции выделяли из биомассы бактерий, выращенной классическим щелочным методом, с последующей очисткой стандартной фенол-хлороформной экстракцией. Чистоту и концентрацию препаратов плазмидных конструкций определяли спектрофотометрически при помощи Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и гель-электрофореза ДНК. В качестве маркера длин ДНК использовали молекулярную лестницу GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, США). Для визуализации плазмидных конструкций агарозные

гели окрашивали 0.5 мкг/мл бромистого этидия в трис-ацетатном буфере и далее анализировали при помощи гель-документирующей системы Chemidock Touch BioRad (BioRad, США).

**Лентивирусная трансдукция эСК.** Доставку генетически-кодируемой системы для нокаута *P TEN* в эСК произвели путем лентивирусной трансдукции при нагрузке 20 частиц на клетку в присутствии 20 мкг/мл протаминсульфата (Sigma-Aldrich, США). Сборку лентивирусных частиц проводили посредством ко-трансфекции продуцирующей линии клеток НЕК293Т пакующим вектором psPAX2 (12260; Addgene, США), оболочечным вектором pMD2.G (12259; Addgene, США: оба вектора – с любезного позволения Dr. Didier, Трото, Италия) и смысловым вектором. Все операции культивирования и ко-трансфекции НЕК293Т, а также сборку, фильтрацию, концентрирование, подготовку стоков и флуоресцентного титрования вирусов проводили в соответствии с подробным описанием в нашей предыдущей работе (Deryabin et al., 2019). Селекцию клеток проводили спустя 5 сут после трансдукции добавлением в культуральную среду 2 мкг/мл пурамицина (Invitrogen, США) на 5 сут. Таким образом, анализ влияния нокаута *P TEN* на свойства эСК проводили через 10 сут после трансдукции.

**Проточная цитофлуориметрия.** Прикрепленные клетки промывали раствором PBS (“Биолот”, Россия), снимали смесь трипсин-Версена (0.05%; “Биолот”, Россия) и ресуспендировали в PBS. Для анализа жизнеспособных клеток образцы окрашивали йодистым пропидием (PI; 50 мкг/мл) и анализировали на цитофлуориметре CytoFlex или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Данные собирали и обрабатывали с помощью программы CytExpert (versions 1.2; 2.0).

*1. Анализ пролиферативной активности, размера и автофлуоресценции клеток.* Данные о количестве клеток собирали для жизнеспособных (PI-негативных) клеток. Изменение размера клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния (FS) живых клеток. Накопление липофусцина оценивали по среднему значению его автофлуоресценции в зеленом канале (лазер 488 нм, фильтр 525/40 нм).

*2. Оценка уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), уровня митохондриальных АФК и митохондриального мембранного потенциала.* Для детекции внутриклеточных АФК прикрепленные клетки промывали PBS и обрабатывали PBS с 5 мкМ цитоплазматического красителя диацетата 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H<sub>2</sub>DCF-DA

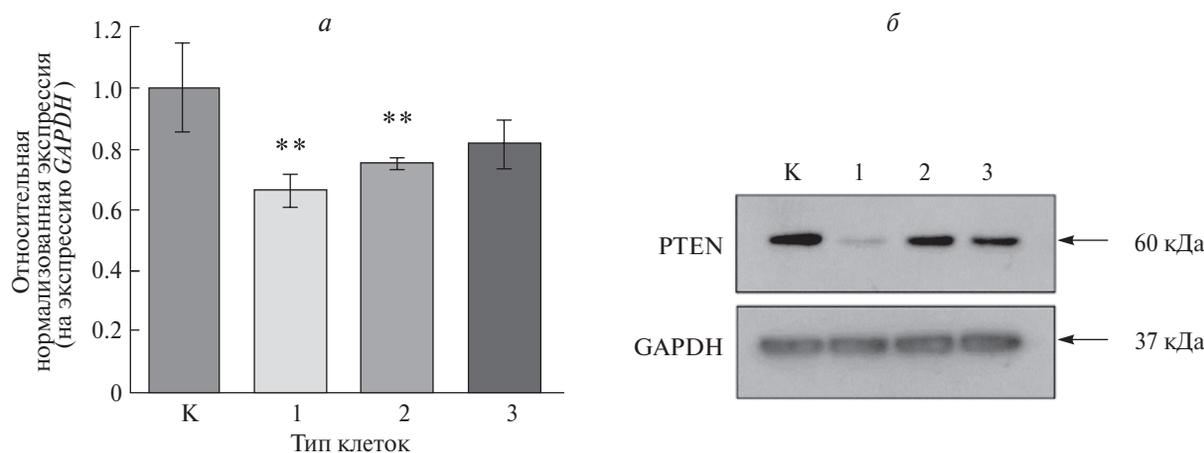
(Invitrogen, США) в течение 20 мин в темноте при 37 °С. Для измерения уровня митохондриальных АФК прикрепленные клетки промывали PBS и окрашивали в PBS, содержащем 30 мкМ митохондриального красителя дигидрородамина 123 (DHR123) (Invitrogen, США) в течение 30 мин в темноте при 37 °С. Флуоресценцию окисленных продуктов дихлорофлуоресцеина (DCF) и родамина 123 (Rho123) соответственно фиксировали в зеленом канале (лазер 488 нм, фильтр 525/40 нм). Для измерения мембранного потенциала митохондрий прикрепленные клетки промывали PBS и инкубировали в PBS с 5 мкМ красителя JC-1 (Thermo Scientific, США) в течение 30 мин при 37 °С. Потенциал-зависимое накопление агрегированного красителя в митохондриях регистрировали по радиометрическому показателю смещения эмиссии мономерной формы красителя в зеленой области спектра в пользу эмиссии агрегатов JC-1 в красной области (лазер 488 нм, фильтры 525/40 и 585/42 нм).

**Оценка активности β-галактозидазы (SA-β-Gal).**

Активность SA-β-Gal, ассоциированную со старением, выявляли с помощью фирменного набора Senescence-galactosidase staining kit (Cell Signaling, США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в β-галактозидазном растворе при 37 °С в течение ночи.

Об активности SA-β-Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток. Количественный анализ изображений проводили с использованием среды MatLab, согласно алгоритму, описанному в методологической статье (Shlush et al., 2011). Для каждой экспериментальной точки вручную отмечали и анализировали минимум 100 случайно выбранных клеток.

**Электрофорез и иммуноблоттинг.** Пробоподготовка, электрофорез и иммуноблоттинг проводили в соответствии с процедурой, подробно описанной в нашей предыдущей работе (Deryabin et al., 2019). Для специфического выявления белков использовали антитела против глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы GAPDH (clone 14C10, #2118, Cell Signaling, США); pp53 (Ser15) (клон 16G8) (#9286, Cell Signaling, США); p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (клон 12D1) (#2947, Cell Signaling, США); pRb (Ser807/811) (#8516, Cell Signaling, США); pAKT (Thr308) (#4056, Cell Signaling, США); pAKT (Ser473) (#4060, Cell



**Рис. 1.** Подтверждение эффективности работы системы нокаута гена *PTEN*. К – контрольные эСК с несмысловой гидРНК; 1–3 – эСК, несущие систему нокаута с тремя различными гидРНК; а – экспрессия мРНК гена *PTEN*; значения экспрессии *PTEN* нормированы на уровень экспрессии референсного гена *GAPDH*. Представлены средние значения и их стандартные отклонения ( $n=3$ ,  $n$  – число повторов реакции); \*\* – отличия от контроля достоверны при  $p < 0.01$  по сравнению с контролем, тест ANOVA с поправкой по Тьюки; б – уровни экспрессии белка *PTEN*, выявленные с помощью специфических антител; справа указаны мол. массы; в качестве контроля нагрузки использовали *GAPDH*.

Signaling, США). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика или мыши. Антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). В работе использовали неорганические соли производства фирмы Sigma (США).

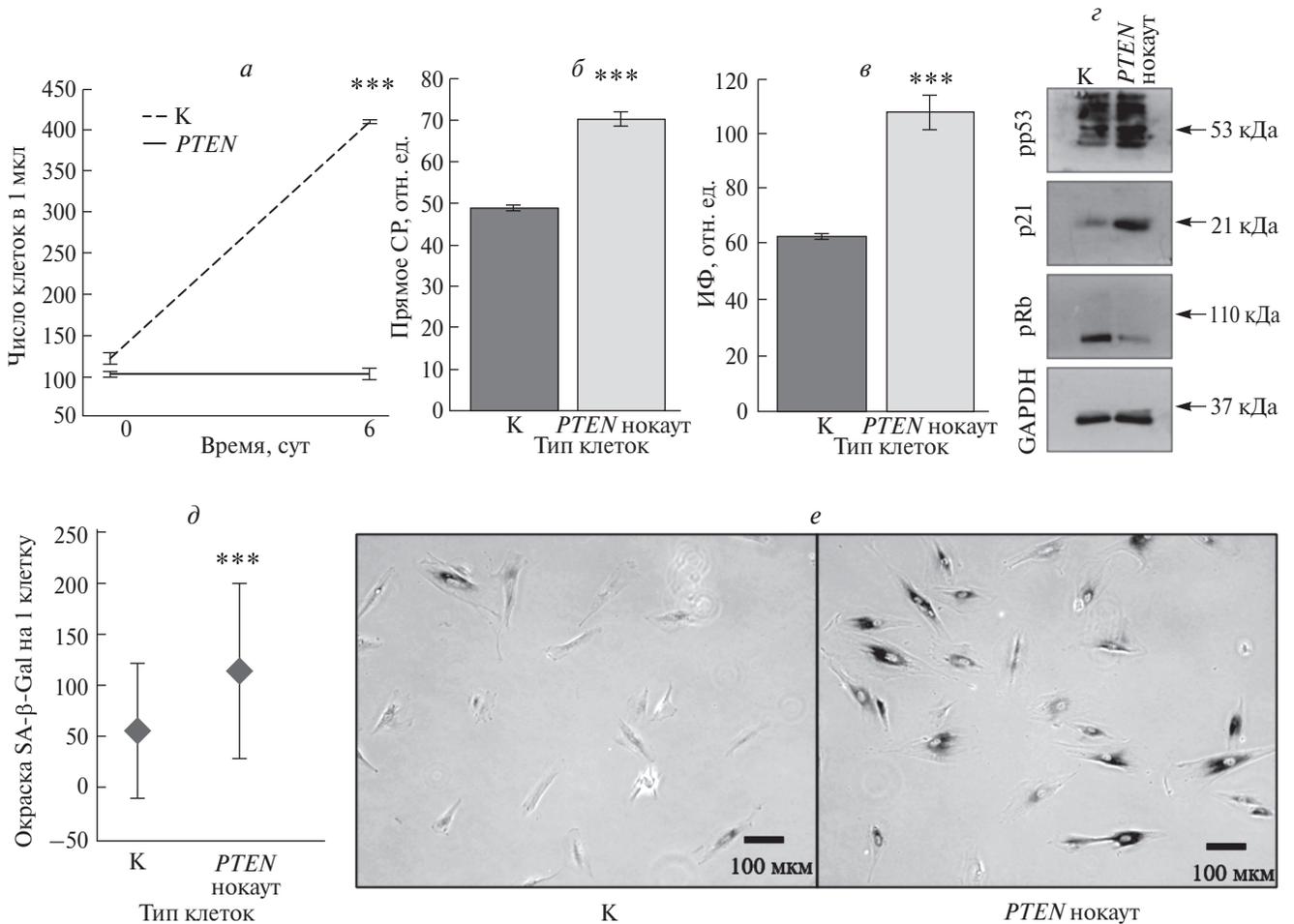
**Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.** Выделение РНК, обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени проводили в соответствии с процедурой, подробно описанной в нашей предыдущей работе (Тогоров et al., 2023). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали специфические олигонуклеотидные праймеры для *PTEN*: прямой 5'-TTGAAGACCATAACCCACCA-3' и обратный 5'-CACATAGCGCCTCTGACTG-3', температура отжига 58°C; в качестве референсного гена использовали *GAPDH* с праймерами: прямым 5'-GAGGTCAATGAAGGGGTCAT-3' и обратным 5'-AGTCAACGGATTTGGTCGTA-3', температура отжига 57°C. Все праймеры получены из фирмы "Евроген" (Россия).

**Статистическая обработка данных.** Анализ выполняли с использованием программных пакетов R-Studio (R-версия 4.2.0) и GraphPad Prism (версия 6.0). Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ( $n=3$ ). При установлении достоверности различий между двумя группами использовали *t*-тест Уэлча, для множественных сравнений между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Создание линии эСК с нокаутом *PTEN*.** Для подавления экспрессии гена *PTEN* в эСК мы воспользовались модифицированной версией системы CRISPR/Cas9, которая была разработана в 2020 г. (Legut et al., 2020). Основу этой версии составил классический лентивектор lentiCRISPR v2, несущий кодон-оптимизированный для человека Cas9 от *Streptococcus pyogenes*. Преимуществом модифицированной системы является наличие нуклеотидных замен в последовательности скаффолда для гидРНК, которые улучшают стабильность самого скаффолда и положительно влияют на его связывание с Cas9.

Три разработанные последовательности гидРНК, которые должны наводить Cas9 на область первого экзона гена *PTEN* и, таким образом, нарушать транскрипцию гена и последующее образование белкового продукта, были клонированы в шаблонный лентивектор. В качестве контроля был использован исходный лентивектор, несущий несмысловую гидРНК. Полученные в ходе молекулярного клонирования варианты лентивекторов использовали для получения вирусных частиц и последующей трансдукции эСК. Согласно результатам, представленным на рис. 1а, б, использование первой гидРНК приводило к наибольшему снижению уровня мРНК *PTEN* и практически полному отсутствию соответствующего белкового продукта. Таким образом, нам удалось получить линию эСК с нокаутом *PTEN*, которую мы использовали в дальнейших экспериментах.

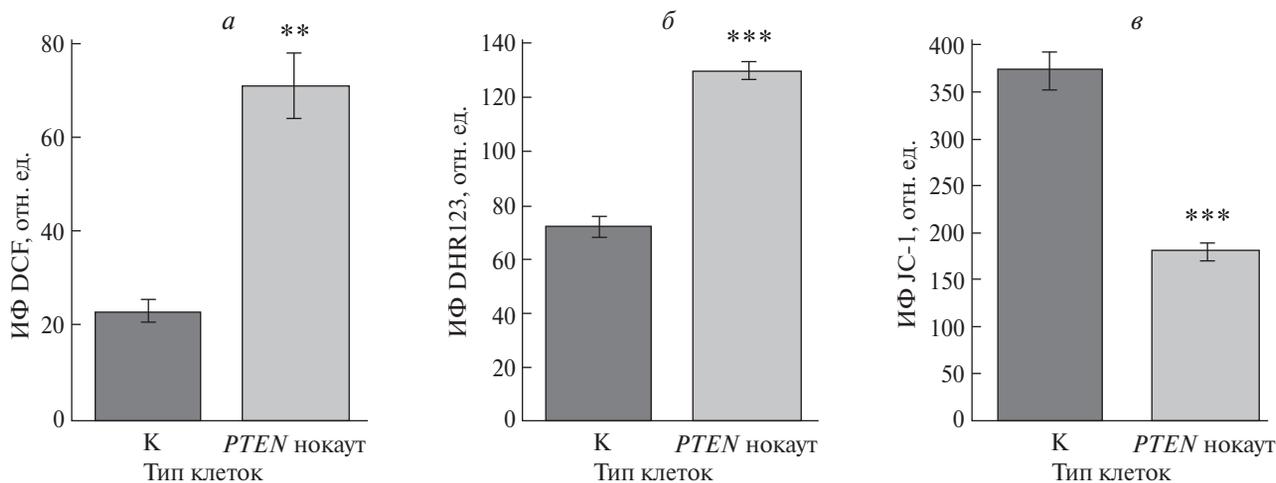


**Рис. 2.** Снижение экспрессии *PTEN* приводит к запуску преждевременного старения в ЭСК. К – контрольные ЭСК с несмысловой гидРНК; *a* – кривые роста; *б* – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию (СР); *в* – интенсивность автофлуоресценции (ИФ) клеток, отражающей накопление липофусциновых гранул; *г* – уровни фосфорилирования белков p53 (pp53) и Rb (pRb), а также экспрессии белка p21Waf1/Cip1 (p21), выявленные с помощью специфических антител; справа указаны молекулярные массы; в качестве контроля нагрузки использовали GAPDH; *д*, *е* – соответственно количественная оценка цитохимической окраски SA-β-Gal и микрофотографии; *a–в* – представлены средние значения и стандартные отклонения из трех повторов измерения; *д* – оценивали окраску 100 клеток; \*\*\* – отличия от контроля достоверны при  $p < 0.001$  (*t*-тест Уэлча).

**Анализ маркеров преждевременного старения в линии ЭСК с нокаутом *PTEN*.** Получив линию ЭСК со сниженной экспрессией *PTEN*, мы далее проверили наше предположение о развитии преждевременного старения в модифицированных ЭСК. Одним из ключевых признаков клеточного старения является остановка пролиферации (Campisi et al., 1996; Huang et al., 2022). Действительно, ЭСК со сниженной экспрессией *PTEN* демонстрировали практически полное отсутствие пролиферативной активности (рис. 2*a*). На молекулярном уровне остановка пролиферации в стареющих клетках в большинстве случаев реализуется через сигнальный путь p53/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>/Rb (Campisi et al., 1996; Huang et al., 2022). Подавление экспрессии *PTEN* в ЭСК ожидаемо приводило к фосфорили-

рованию p53, повышению экспрессии p21<sup>Waf1/Cip1</sup> и гипофосфорилированию Rb (рис. 2*г*).

Помимо необратимого блока цикла клеточное старение характеризуется рядом других типичных признаков, включая гипертрофию, накопление поврежденных белков и других макромолекул, повышение активности SA-β-Gal и нарушения функционирования митохондрий (Campisi et al., 1996; Borodkina et al., 2014; Huang et al., 2022). Анализ размера клеток, проведенный при помощи проточной цитофлуориметрии, выявил стабильное увеличение размера ЭСК, нокаутных по *PTEN*, по сравнению с контрольными клетками (рис. 2*б*). Обнаружено также заметное повышение автофлуоресценции модифицированных клеток, что отражает накопление липофусциновых агрегатов, состоящих из



**Рис. 3.** Изменения редокс-баланса и функционирования митохондрий в контрольных эСК с бессмысловой гид-РНК (К) и в эСК при нокауте гена *PTEN*; *a* – уровни внутриклеточных АФК, определенные по интенсивности флуоресценции (ИФ) красителя DCF; *б* – уровни митохондриальных АФК, установленные по ИФ красителя DHR123; *в* – изменение митохондриального мембранного потенциала, определенное по ИФ красителя JC-1. Представлены средние значения и их стандартные отклонения из трех повторов измерения; отличия от контроля достоверны при  $p < 0.001$  (\*\*\*) или  $p < 0.01$  (\*\*); *t*-тест Уэлча.

поврежденных макромолекул (рис. 2в). Кроме того, эСК с нокаутом по гену *PTEN* характеризовались существенным увеличением активности SA- $\beta$ -Gal (рис. 2д, е). Наконец, с помощью набора флуоресцентных красителей в эСК с нокаутом *PTEN* был детектирован рост уровней внутриклеточных и митохондриальных АФК и одновременное снижение мембранного потенциала митохондрий (рис. 3а–в). Эти результаты свидетельствуют о нарушениях в работе митохондрий в эСК в условиях пониженной экспрессии *PTEN*.

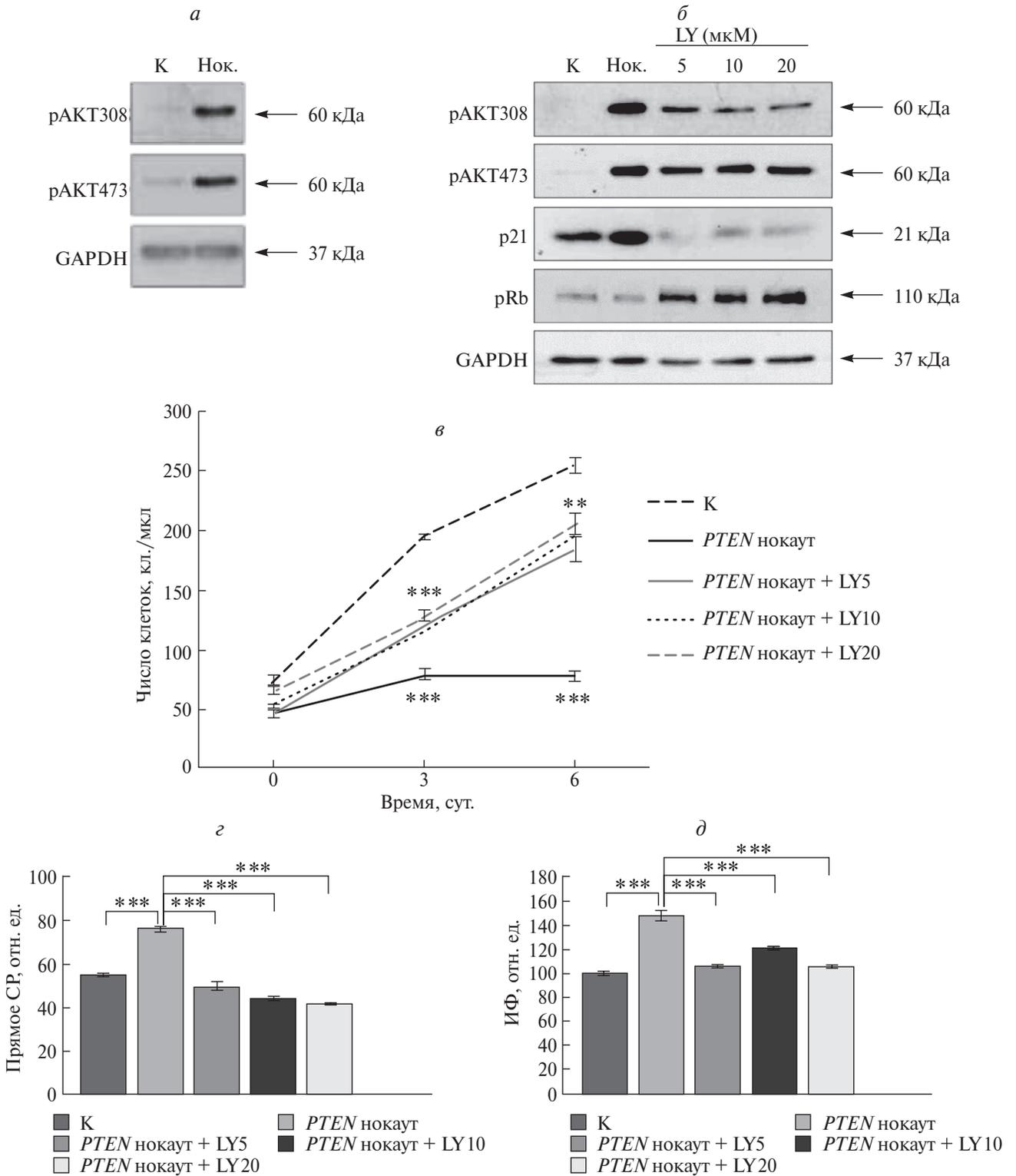
Суммируя данные, представленные в этом разделе, можно заключить, что снижение экспрессии *PTEN* приводит к запуску преждевременного старения в эСК.

**Молекулярный механизм PICS в эСК.** Согласно данным литературы, функциональная активность *PTEN* реализуется преимущественно за счет ингибирования сигнального пути PI3K/AKT (Chen et al., 2005; Chen et al., 2018; Jung et al., 2019). Логично предположить, что нокаут гена *PTEN* должен приводить к активации участников этого сигнального каскада. Было предсказуемо, что эСК, нокаутные по *PTEN*, характеризовались усилением фосфорилирования киназы АКТ по обоим активационным сайтам (Ser308 и Ser473) (рис. 4а). Эти данные свидетельствуют в пользу вовлеченности сигнального каскада PI3K/AKT в реализацию программы старения в эСК в условиях сниженной экспрессии *PTEN*.

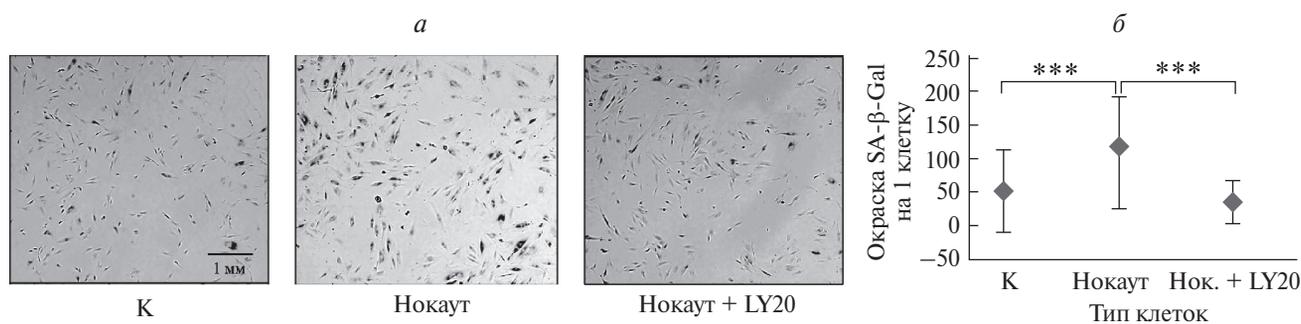
В большинстве случаев стабильность состояния клеточного старения поддерживается сразу

несколькими дублирующими молекулярными механизмами. Зачастую подавление активности одного из сигнальных путей является недостаточным для преодоления старения (Грюкова и др., 2017). В связи с этим для подтверждения роли сигнального каскада PI3K/AKT в реализации PICS в эСК далее мы использовали специфический ингибитор киназы АКТ (LY). Интересно, что подавление активности АКТ в *PTEN*-нокаутных клетках приводило к снижению экспрессии p21<sup>Waf1/Cip1</sup> и восстановлению фосфорилирования Rb (рис. 4а). Принимая во внимание эти результаты, а также учитывая ключевую роль сигнального пути p21<sup>Waf1/Cip1</sup>/Rb в установлении ареста клеточного цикла в стареющих клетках, можно было ожидать, что ингибирование АКТ будет способствовать восстановлению пролиферации *PTEN*-нокаутных эСК. Действительно, *PTEN*-нокаутные эСК характеризовались заметным улучшением пролиферации в присутствии ингибитора LY (рис. 4б). Более того, добавление ингибитора позволило предотвратить увеличение размера, автофлуоресценции и активности SA- $\beta$ -Gal (рис. 4в, г, рис. 5). Полученные результаты демонстрируют ключевую роль киназы АКТ в инициации и прогрессии PICS в эСК.

Согласно полученным в нашей работе данным, можно заключить, что в эСК подавление экспрессии онкосупрессора *PTEN* приводит к запуску преждевременного старения через активацию АКТ-зависимого сигнального пути.



**Рис. 4.** Активность сигнального пути PI3K/AKT в PTEN-регулируемой индукции старения ЭСК и его модуляция ингибитором LY в контрольных ЭСК с несмысловой гидРНК (К) и в ЭСК с нокаутом гена *PTEN* (Нок.). Клетки с нокаутом гена *PTEN* обрабатывали LY в концентрациях 5 мкМ (LY 5), 10 мкМ (LY 10) или 20 мкМ (LY 20) в течение 6 сут; *а* – уровни фосфорилирования АКТ и Rb, а также и экспрессии белка p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (p21), выявленные с помощью специфических антител; справа указаны молекулярные массы; в качестве контроля нагрузки использовали GAPDH; *б* – кривые роста; *в* – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию (СР); *г* – интенсивность автофлуоресценции (ИФ) клеток, отражающая накопление липофусциновых гранул. Представлены средние значения и их стандартные отклонения из трех повторов измерения; отличия от контроля достоверны при  $p < 0.001$  (\*\*\*) или  $p < 0.01$  (\*\*), тест ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки.



**Рис. 5.** Ингибирование АКТ предотвращает повышение активности SA-β-Gal в эСК нокаутом гена *PTEN*. Показаны контрольные эСК с несмысловой гидРНК (К), эСК с нокаутом гена *PTEN* (Нок.) и эСК с нокаутом гена *PTEN*, обработанные 20 мкМ LY (Нок. + LY20); а, б – соответственно микрофотографии эСК и количественная оценка цитохимической окраски SA-β-Gal; 6 сут после добавления ингибитора. Представлены средние значения и их стандартные отклонения (оценивали окраску 100 клеток); отличия от контроля достоверны при  $p < 0.001$  (\*\*\*) ; тест ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя термин PICS впервые упоминался в литературе только в 2010 г., наблюдения о взаимосвязи сниженной экспрессии *PTEN* с клеточным старением появились значительно раньше. Так, в одной из ранних работ было установлено, что инактивация *PTEN* вызывает p53-зависимый арест цикла и старение в клетках рака простаты (Chen et al., 2005). Чуть позже появились данные о том, что стабильное подавление экспрессии *PTEN* приводит к повышению экспрессии p53 и аресту пролиферации в нормальных нетрансформированных фибробластах и эпителиальных клетках человека (Kim et al., 2007). Стоит отметить, что вплоть до 2010 г. считалось, что старение, развивающееся в ответ на подавление экспрессии *PTEN*, можно классифицировать как один из частных случаев онкоген-индуцированного старения. Однако в работе 2010 г. на мышинных эмбриональных фибробластах было экспериментально установлено, что старение в результате потери *PTEN* не сопровождается гиперрепликацией и повреждениями ДНК в отличие от онкоген-индуцированной формы старения, в соответствии с чем его стали классифицировать как отдельный независимый тип, получивший название PICS (Alimonti et al., 2010).

С того времени количество публикаций, освещающих феномен PICS и молекулярные механизмы его развития в различных типах клеток, значительно увеличилось. Так, установлено, что индукция клеточного старения в результате утраты экспрессии *PTEN* характерна для клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, мезенхимных клеток человека и клеток рака простаты (Alimonti et al., 2010; Duan et al., 2015; Parisotto et al., 2018a, 2018b; Jung et al., 2019). Одновременно с этим

индукцию преждевременного старения в ответ на инактивацию *PTEN* все же нельзя рассматривать как универсальную защитную реакцию, присущую всем клеточным типам. Например, нокаут *PTEN* в культуре нервных стволовых клеток приводит к их ускоренному росту, морфологическим изменениям, усилению миграционной активности и устойчивости к апоптозу, что свидетельствует о развитии неопластического потенциала (Duan et al., 2015). Более того, введение таких клеток в полосатое тело мозга мыши приводит к образованию внутричерепных опухолей (Duan et al., 2015).

Мы обнаружили, что эСК в ответ на потерю *PTEN* развивают фенотип старения со всеми характерными признаками, включая потерю пролиферации, увеличение размера, автофлуоресценции и активности SA-β-Gal, а также нарушения работы митохондрий. Аналогично другим клеточным типам, для которых показана индукция старения в ответ на подавление экспрессии *PTEN*, в случае эСК с нокаутом *PTEN* старение развивалось преимущественно через сигнальный путь PI3K/АКТ (Alimonti et al., 2010; Duan et al., 2015; Parisotto et al., 2018a, 2018b; Jung et al., 2019).

Важно, что подавление активности этого молекулярного пути практически полностью предотвращало развитие преждевременного старения в эСК. В отличие от этих данных, в наших предыдущих исследованиях, посвященных изучению механизмов преждевременного старения эСК, индуцированного окислительным стрессом, ингибирование пути PI3K/АКТ не приводило к восстановлению пролиферации клеток, а лишь предотвращало фенотипические проявления старения (Грюкова и др., 2017).

Выявленная разница свидетельствует об отличиях в сигнальной регуляции программ стресс-

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 SENEESCENCE 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*