

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

*Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки
Специальность 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология*

ПОРТФОЛИО АСПИРАНТА

Рябов Владимир Михайлович

Санкт-Петербург
2020

1. Общие сведения

Лаборатория: Группа клеточной биологии соматических стволовых клеток в составе Лаборатории внутриклеточной сигнализации.

Тема диссертационной работы: Белки семейства pRb в качестве факторов, тормозящих репрограммирование, повышение пластичности, и агрессивность аденокарциномы предстательной железы

Научный руководитель: Попов Борис Валентинович, д.б.н., ведущий научный сотрудник.

Год поступления в аспирантуру: 2019

2. Дополнительная информация:

1. Участие в научных конференциях, симпозиумах, семинарах, выставках с момента поступления в аспирантуру:

Докладчик на конференции «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий - 2019» (постерный доклад).

Докладчик на конференции «IV Национальный конгресс по регенеративной медицине 2019» (постерный доклад).

2. Курсы:

School of Life Sciences at the Utrecht University: **Fundamentals of Biofabrication.**

Result : 6.7.

Period : November 18th, 2019 – February 2nd, 2020

3. Публикации с момента поступления в аспирантуру:

Статьи:

1. В.М. Рябов, Е.Н. Петрова, Б.В. Попов Изменения уровня деубиквитиназы USP28 в клеточном цикле клеток аденокарциномы кишечника HCT116 свидетельствуют о её функциональной роли в регуляции перехода G1/S / ЦИТОЛОГИЯ // Том 62, № 3 С. 181-188. 2020г. DOI: 10.31857/S0041377120030050

Тезисы конференций:

1. Б.В. Попов, Е.Н. Петрова, В.М. Рябов Уровень CDC25a, формирующей контрольную точку R1, стабилизируется в клетках аденокарциномы кишечника HCT116 деубиквитиназой USP28 / Гены и Клетки // Том XIV, № 3, 2019 /// С. 114
2. В.М.Рябов, О.В. Жидкова, Б.В.Попов Новая популяция мезенхимных стволовых клеток из сердца плодов мышей GFP для моделирования регенерации сердца /Гены и клетки // Том XIV, Приложение /// С.201



Utrecht University



UMC Utrecht

Certificate

The undersigned declares that:

Vladimir Ryabov

has successfully completed the online master course

Fundamentals of Biofabrication

Fundamentals of Biofabrication is a course within the Graduate School of Life Sciences at the Utrecht University.

Period : November 18th, 2019 – February 2nd, 2020
Total credits : 3 EC
Result : 6.7

Utrecht, February 24th, 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'G. Dilaver'.

G. Dilaver, PhD
*Degree coordinator of Biomedical Sciences
Student Affairs of the Faculty of Medicine
Utrecht University, The Netherlands*

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ДЕУБИКВИТИНАЗЫ Usp28 В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА НСТ116 СВИДЕТЕЛЬСТВУЮТ О ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕХОДА G₁/S

© 2020 г. В. М. Рябов¹, Е. Н. Петрова¹, Б. В. Попов¹ *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: borisvp478@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 05.12.2019 г.

Usp28 является деубиквитирующим ферментом, удаляющим убиквитин из его конъюгатов с субстратами, что предотвращает их деградацию в протеасомах. Современные публикации показывают, что Usp28 и убиквитиновая лигаза Fbw7 создают функциональную пару белков, которая контролирует опосредованную убиквитином деградацию ключевых регуляторов клеточных функций, включая Muc, Jun, Ncd, Hif1. В этой паре белков Usp28 противодействует деструктивной активности Fbw7 и играет роль фактора, способствующего опухолевому росту. Поскольку установленными мишенями Usp28 являются белки Muc и Jun, связанные с клеточным циклом, мы предположили, что Usp28 регулирует деление клеток, и ее уровень может изменяться в ходе клеточного цикла. Целью настоящей работы была оценка изменений уровня Usp28 в ходе клеточного цикла в клетках карциномы кишечника человека НСТ116. Клетки НСТ116 синхронизировали путем 72-часового культивирования в ростовой среде с низким содержанием сыворотки. В асинхронно делящихся клетках уровень Usp28 был невысоким и его локализация выявлялась как ядерно-цитоплазматическая. Общий уровень Usp28 и степень его ядерной локализации возрастали в клетках от состояния асинхронного роста к поздней фазе G₁ с последующим снижением и обратным перераспределением белка из ядра в цитоплазму после завершения фазы G₁. По данным иммуноблоттинга колебания уровней Usp28 и фосфатазы Cdc25A в синхронизированных клетках НСТ116 в клеточном цикле совпадали. Данные иммунофлюоресценции прямо соответствовали результатам иммуноблоттинга. Полученные результаты дают возможность предположить, что Usp28 может регулировать уровень и функциональную активность белка Cdc25A, контролирующего вход клетки в фазу репликации ДНК.

Ключевые слова: аденокарцинома кишечника, деубиквитиназа Usp28, клеточный цикл, регуляция перехода G₁/S

DOI: 10.31857/S0041377120030050

Usp28 является белком с мол. массой 140 кДа, который принадлежит к семейству деубиквитирующих ферментов, удаляющих убиквитин с субстратов и отменяющих активность убиквитиновой лигазы и последующую деградацию субстратов в протеасомах (Amerik et al., 2004). Современные исследования показывают, что Usp28 и убиквитиновая лигаза Fbw7 формируют функциональную пару белков, которая контролирует опосредованную убиквитином деградацию нескольких ключевых регуляторов клеточных функций, включая Muc, Jun, Ncd, Hif1. Деградация этих субстратов с помощью Fbw7 предотвращается деубиквитиной Usp28 (Popov et al., 2007; Flugel et al., 2012; Diefenbacher et al., 2014). В нормальных

условиях Usp28 формирует комплекс с Fbw7 и препятствует убиквитинованию субстратов. В этой паре Usp28 противодействует деструктивной активности Fbw7 и играет роль фактора, способствующего росту опухоли (Popov et al., 2007; Diefenbacher et al., 2014, 2015).

Белковая протеаза Usp28 была открыта при анализе состава комплексов, формирующихся путем физического взаимодействия с p53-связывающим белком (53BP) в ходе ответа на повреждение, вызванного двойными разрывами ДНК (Zhang et al., 2006). Usp28 опосредует стабилизацию Chk2, 53BP и индукцию апоптоза в клетках карциномы человека линии H-460 и мышинных В-клетках с индуцированным ответом на повреждение ДНК. Потеря Usp28 повышает устойчивость клеток к апоптозу, вызванному ультрафиолетовым или рентгеновским облучением, и делает их похожими на мышинные клетки, которые не экспрессируют Chk2 и p53 (Zhang et al.,

Принятые сокращения: Fbw7 – убиквитиновая лигаза 7 (F-box/WD repeat-containing protein 7); Hif1 α – фактор, чувствительный к гипоксии 1-альфа; Usp28 – убиквитин-специфическая протеаза.

Н.В. Пономарцев¹, А. Кеткар³,
А.И. Бричкина^{2,3}, Н.И. Енукашвили^{1*}

**ТРАНСКРИПЦИЯ ПЕРИЦЕНТРОМЕРНОЙ
САТЕЛЛИТНОЙ ДНК ПРИ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКИХ
ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Немецкий исследовательский центр заболеваний легких, Германия

³ Институт Молекулярной Онкологии, Марбургский Университет Филиппа, Марбург, Германия

N.V. Ponomartsev¹, A. Ketkar³,
A. Brichkina^{2,3}, N.I. Eukashvily^{1*}

**PERICENTROMERIC SATELLITE DNA
TRANSCRIPTION IN MOUSE AND HUMAN
LUNG CANCER**

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² German Center for Lung Research (DZL), Germany

³ Institute of Molecular Oncology, Philipps University of Marburg, Marburg, Germany

*nie@newmail.ru

Для успешного лечения онкозаболеваний необходимо сочетание методов химиотерапии, действующих на делящиеся опухолевые клетки, и подходов, предотвращающих поддержку роста опухоли клетками стромы (иммунные клетки, клетки сосудов, фибробласты). Мы затронули малоизученную область исследований — роль транскрипции некодирующей ДНК в развитии рака легкого, с целью поиска перспективных антираковых мишеней. Основная часть генома состоит из некодирующих рассеянных и диспергированных повторов. Большие тандемные повторы (TR, сателлитная ДНК) расположены в центромерных и прицентромерных участках хромосом. В некоторых опухолях обнаружены транскрипты ДНК TR. Однако неясно, какие клетки транскрибируют эти последовательности.

Цель работы: анализ транскрипции перичентромерной ДНК мыши и человека в опухолевых и стромальных клетках при аденокарциноме легкого.

В работе использовали модель K-ras^{G12D}-индуцированного рака легких мыши и опухолевый материал пациентов с аденокарциномой легких. Для оценки уровня транскрипции TR ДНК HS3 человека и мажорного сателлита (MaSat) мыши в опухолевых клетках, опухолеассоциированных макрофагах (TAM) и опухолеассоциированных фибробластах (CAF) использовали методы qPCR, RNA-DNA FISH, иммуногистохимии.

Количество транскриптов TR ДНК в опухоли было ниже, чем в прилегающей ткани, как у человека, так и у мыши по данным qPCR и иммуногистохимии. В культурах клеток опухолевого эпителия уровень транскрипции был ниже, чем в CAF. В культурах здоровых фибробластов уровень транскрипции ДНК TR увеличивался при индуцировании CAF фенотипа. Также транскрипция индуцировалась в ответ на обработку цитостатиками — блеомицина и цисплатина. На гистологических срезах, в опухолевом микроокружении транскрипты выявлены только в CAF. TAM и клетки опухолевого эпителия в подавляющем большинстве их не содержат. В здоровой части легкого транскрипты обнаружены в пневмоцитах и некоторых макрофагах. При *in vitro* активации макрофагов человека и мыши по обоим типам (M1 и M2) уровень транскрипции TR снижался. В клетках мыши транскрипты обнаружены преимущественно в ядре,

за пределами хромоцентров. В клетках человека — как в ядре, так и в цитоплазме. В некоторых клетках показана колокализация транскрипта и CD63-позитивных везикул у поверхности клеток.

Таким образом, при немелкоклеточном раке легкого транскрипция перичентромерных TR ДНК наблюдается в CAF, но не в TAM или клетках опухолевого эпителия. Данные позволяют предположить возможность секреции транскриптов, что может быть элементом взаимодействия опухолевых клеток и их микроокружения.

Работа поддержана грантом РФФ 19-74-20102.

**Б.В. Попов*, Е.Н. Петрова, В.М. Рябов
УРОВЕНЬ CDC25A, ФОРМИРУЮЩЕЙ
КОНТРОЛЬНУЮ ТОЧКУ R1,
СТАБИЛИЗИРУЕТСЯ В КЛЕТКАХ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА
HCT116 ДЕУБИКВИТИНАЗОЙ USP28**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

B.V. Popov*, E.N. Petrova, V.M. Ryabov

**THE LEVEL OF CDC25A THAT FORMS
R1 CHECK POINT IS STABILIZED IN THE
HCT116 HUMAN ADENOCARCINOMA CELL
LINE BY DEUBIQUITINASE USP28**

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

*borisvp478@gmail.com

Usp28 относится к деубиквитирующим ферментам, которые удаляют убиквитин с субстратов и препятствуют их деградации в протеасомах. Usp28 противодействует деструктивной активности убиквитиновой лигазы Fbw7 и способствует росту опухолей. Цель настоящей работы заключалась в оценке взаимодействия Usp28 и Cdc25A в ходе клеточного цикла. Используя ретровирус, который содержит специфическую миРНК против USP28, мы приготовили клеточную линию HCT116 с минимальной продукцией РНК и белка Usp28. Мы нашли, что супрессия USP28 связана со снижением экспрессии CDC25A. Уровень Usp28 в клетках HCT116 изменяется в переходе G1/S подобно таковому Cdc25A. Эти изменения модифицируются в клетках с инактивированной Usp28 и сочетаются с дерегуляцией перехода G1/S. Наши результаты дают основание предположить, что в клетках аденокарциномы человека HCT116 деубиквитириназа Usp28 регулируется в клеточном цикле, эта регуляция связана с изменением уровня Cdc25A и способствует переходу G1/S.

Работа поддержана грантом № 14-50-00068 РФФ и грантом № 14-50-00068 РФФИ.

НОВАЯ ПОПУЛЯЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ СЕРДЦА ПЛОДОВ МЫШЕЙ GFP ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕРДЦА

Владимир Михайлович Рябов,
Ольга Владимировна Жидкова,
Борис Валентинович Попов

Лаборатория внутриклеточной сигнализации,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

voldemryabov@yandex.ru

Текущие публикации свидетельствуют о возможности трансдифференцировки МСК в кардиомиоциты. Для изучения такой возможности мы получили и охарактеризовали МСК из ткани сердца 19 дневных плодов мышей GFP. Для получения ткани сердца одну беременную мышью GFP умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Брюшную полость вскрывали в стерильных условиях, плоды в матке переносили в культуральную чашку, содержащую 10 мл PBS. Сердца плодов извлекали, переносили в стерильную культуральную чашку и измельчали ножницами до кусочков размером 1–2 мм. Полученные эксплантаты помещали в 60 мм культуральные чашки со средой DMEM, содержащей 20% ФБС, и культивировали в течение 2 недель в CO₂ инкубаторе при 5% CO₂ и 20% кислорода. Смену ростовой среды производили каждые 5–7 сут. Клетки, мигрирующие из эксплантатов, пассировали до 20 пассажа с последующей криоконсервацией в жидком азоте. В культуре МСК сердца плодов выявляли фибробласто-подобную морфологию и продуцировали зеленый флюоресцирующий белок (GFP), видимый в ультрафиолетовом свете. Для определения уровня клоногенности и спонтанной жировой дифференцировки 400 клеток сердца плодов на 8 пассаже высевали на 60 мм чашки и культивировали в среде DMEM в течение двух недель с последующей окраской красителем масляным красным. Клоногенность МСК сердца плодов составляла 8%, а уровень спонтанной жировой дифференцировки — 30%. В отличие от МСК костного мозга, которые служили позитивным контролем и дифференцировались в жировые и костные клетки, МСК сердца плодов были индуцибельны к жировой, но не костной дифференцировке. Для иммунофенотипирования из МСК сердца плодов экстрагировали тотальную РНК для амплификации мезенхимных и тканеспецифических маркеров с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. МСК сердца плодов экспрессировали мезенхимные маркеры, включая CD29, CD44, CD49D, CD49F, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, но не кроветворный маркер CD45. В отличие от ткани сердца плодов, в которой высоко экспрессировались тканеспецифические транскрипционные факторы Flk1, NKX2.5 и маркеры зрелых кардиомиоцитов SmMHC, TnTt, в недифференцированных МСК сердца плодов выявлялась на низком уровне только продукция Flk1 и TnTt. Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности использования МСК сердца плодов GFP в условиях кардиогенной дифференцировки для моделирования регенерации ткани сердца после экспериментального инфаркта миокарда.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института цитологии РАН № 0124-2019-0004.

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

Сергей Иванович Рябов¹, Владимир Александрович Смирнов², Марина Александровна Звягинцева¹, Михаил Яковлевич Ядгаров¹, Сергей Александрович Базанович¹, Владимир Николаевич Смирнов¹

¹ ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Институт экспериментальной кардиологии, Москва, Россия;

² ГБУЗ НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

sir1601@mail.ru

Травма спинного мозга (ТСМ) является актуальной и не решенной проблемой современной медицины. В связи с постоянным ростом числа пострадавших, высоким уровнем смертности и инвалидизации, нужно проводить поиск эффективных методов лечения ТСМ. Клеточная терапия с применением мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПКЧ) может быть перспективной при лечении этой тяжелой патологии. Криво консервированные мононуклеарные клетки крови человека широко доступны и безопасны для применения в клинической практике.

Моделировали тяжелую спинную травму у крыс. Для клеточной терапии использовали криво консервированные МКПКЧ из криобанка, со сроком хранения от 1 года и больше, взятые у разных доноров. Клетки вводили однократно в хвостовую вену и в область повреждения. 2 млн клеток в 1 мл физиологического раствора внутривенно и такое же количество клеток внутриспинально в 10 мкл физиологического раствора. Оба способа введения клеток в период до 5 дней после травмы обеспечивали увеличение восстановления двигательной функции у крыс до 50% от уровня «самовосстановления» через 6 недель наблюдения. Восстановление функции происходило до 4–5 недели и далее стабилизировалось. Влияние введения клеток достоверно начинало обнаруживаться на 3 неделе. Клеточная терапия снижала объем травматического повреждения нервной ткани спинного мозга 2 раза через 6 недель после травмы, а достоверно разница обнаруживается на 2 неделе. Смертность крыс после травмы в контрольной группе «самовосстановления» составляла 19%, после введения клеток в 1 день после травмы составляла 16%, в 5 дня — 14%. Введение гентамицина снижало смертность до 10% в контроле. На фоне ежедневного введения гентамицина в течение 5 дней после травмы, введение клеток на 1 день и на 5 день после травмы снижало смертность до 4% и 1,5% соответственно.

Использование криво консервированные МКПКЧ показало себя достаточно эффективным средством клеточной терапии травматического повреждения спинного мозга в эксперименте.