

тканей человека: Вартонова студня пупочного канатика двух доноров (MSCWJ-1, MSCWJ-2), пульпы молочного зуба ребенка (MSC-DP), ткани десны (MSC-GNG), эпикардальной жировой ткани (ADH-MSC). Цитогенетический анализ с помощью окрашивания хромосом на G-диски выполнен на ранних (6-й, 7-й) и поздних (13-й, MSCWJ-2; 18-й, MSC-GNG; 25-й, MSC-DP; 28-й, MSCWJ-1) пассажах культивирования клеток за исключением линии ADH-MSC, кариотип которой анализировали на 8, 12 и 16 пассажах. Кариотипировали 100 метафазных пластинок каждой линии на каждом пассаже. Сроки анализа разных линий МСК на поздних пассажах определяли на основании появления признаков старения: снижения пролиферативной активности и увеличения доли клеток с выраженной активностью β -галактозидазы.

Показано, что клеточные линии MSCWJ-1, MSCWJ-2, MSC-DP, MSC-GNG сохраняли диплоидное число хромосом, равное 46, в течение всего срока культивирования. Только в линии MSC-DP на пассаже 25 в 11% клеток число хромосом составляло 45 вследствие образования дигцентрических хромосом. Доля полиплоидных клеток в популяции снижалась в процессе культивирования во всех клеточных линиях, за исключением MSCWJ-2.

Клональные и неклональные хромосомные перестройки в разных клеточных линиях, а также на ранних и поздних пассажах культивирования, отличались по типу, частоте встречаемости и составу вовлеченных хромосом. Так, на ранних пассажах обнаружены следующие клональные перестройки: транслокация хромосом 1 и 9 в 4% клеток MSCWJ-1, дупликация короткого плеча хромосомы 7 в 39% клеток MSCWJ-2, инверсия длинного плеча хромосомы 10 в 50% клеток MSC-GNG. В клетках MSC-DP выявлены неклональные перестройки хромосом X, 3, 5, 6 и 12. На поздних пассажах клональная перестройка сохранилась только в линии MSC-GNG (22% клеток). В остальных линиях структурные перестройки на поздних пассажах были представлены, в основном, дигцентрическими хромосомами.

Особый интерес представляла клональная эволюция кариотипа в линии ADH-MSC. На пассаже 8 нормальный диплоидный кариотип обнаружен в 97% клеток, а в 3% клеток этой линии была выявлена трисомия по хромосоме 2. К 12 пассажию доля клеток с кариотипом 47, XY, +2 достигла 50%, при этом как в клетках с дисомией, так и с трисомией хромосомы 2 наблюдали неклональные изменения хромосом. К 16 пассажию кариотипическая гетерогенность нарастала. Нормальный диплоидный кариотип обнаружен только в 6% клеток. В 29% клеток единственной аномалией кариотипа была трисомия хромосомы 2. В остальных 65% клеток как с дисомией (39% клеток), так и с трисомией хромосомы 2 (26% клеток) выявлены клональные и неклональные структурные перестройки преимущественно с вовлечением одного из гомологов хромосомы 21, локус 21p13. Результаты анализа линии ADH-MSC свидетельствуют о необходимости кариотипирования, по меньшей мере, 100 клеток для выявления потенциально «опасных» перестроек хромосом.

Таким образом, хромосомная нестабильность МСК, по-видимому, определяется особенностями генома донора и имеет индивидуальный характер. Появление клональных и неклональных перестроек хромосом в изученных линиях МСК не предотвращает репликативного старения и гибели клеток.

Работа выполнена по государственному заданию № 0124-2018-0003 (рег. ЦИТиС № АААА-А17-117032350035-4).

А.В. Якушева^{1*}, А.А. Никифоров², В.А. Куликова^{1,2}
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПИРОФOSФАТАЗЫ
ЧЕЛОВЕКА NUDT13 В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ
NAD В МИТОХОНДРИИ

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

A.V. Yakusheva^{1*}, A.A. Nikiforov², V.A. Kulikova^{1,2}

STUDY OF THE ROLE OF HUMAN
PYROPHOSPHATASE NUDT13 IN REGULATION
OF THE NAD LEVEL IN MITOCHONDRIA

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

* alena_yakusheva@outlook.com

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) является основным коферментом в окислительно-восстановительных реакциях центральных метаболических путей. Также NAD является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, контролирующих важнейшие механизмы жизнедеятельности клетки. На данный момент неизвестно, каким образом регулируется митохондриальный пул NAD, который необходим для осуществления таких ключевых метаболических процессов, как цикл трикарбоновых кислот, окисление жирных кислот и синтез АТФ.

В рамках данного исследования мы проверяем возможность регуляции митохондриального NAD за счет его расщепления пирофосфатазой NUDT13. К настоящему моменту функции NUDT13 в клетках человека не установлены.

Прежде всего, нами была подтверждена митохондриальная локализация рекомбинантного FLAG-слитого белка NUDT13 после сверхэкспрессии в клетках человека.

Далее для оценки изменения уровня митохондриального NAD мы использовали клеточную модель, которая представляет собой сверхэкспрессию каталитического домена поли-АДФ-рибозилполимеразы PARP1 в митохондриальном матриксе (Mito-PARP). В присутствии NAD Mito-PARP авто-поли-АДФ-рибозилируется, при этом, чем выше концентрация NAD в митохондрии, тем больше образуется полимеров АДФ-рибозы (PAR). Уровень PAR оценивается методом иммуноблоттинга. Ко-экспрессия Mito-PARP с белком NUDT13 приводит к значительному снижению уровня PAR в митохондриальном матриксе. Это позволяет предположить, что пирофосфатаза NUDT13 может расщеплять NAD и таким образом регулировать уровень данного динуклеотида в митохондрии.

Чтобы подтвердить способность NUDT13 расщеплять NAD до мононуклеотидов NMN и AMP *in vitro*, мы оптимизировали метод аффинной очистки данного белка, слитого с 6xHis, после сверхэкспрессии в *E. coli*. В дальнейшей работе мы охарактеризуем субстратную специфичность пирофосфатазы NUDT13.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-74-00081.