

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ИММОРТАЛИЗАЦИЯ

УДК 576.312.6

УСИЛЕНИЕ КОНТРОЛЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ТЕЛОМЕРИЗОВАННЫХ КЛЕТКАХ*

© 2007 г. Е. Е. Егоров¹, М. В. Молдавер¹, Х. С. Вишнякова¹, С. М. Терехов²,
Э. Б. Дашинимаев³, И. Б. Чеглаков⁴, И. Ю. Торопыгин⁴, К. Н. Ярыгин⁴,
П. М. Чумаков¹, Д. И. Корочкин⁵, Г. А. Антонова⁵, Е. Ю. Рыбалкина⁶,
И. Н. Сабурин⁵, Н. С. Бурнаевский³, А. В. Зеленин¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
119991 Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 32

² Медико-генетический научный центр РАМН
115478 Москва, ул. Москворечье, д. 1

³ Московский физико-технический институт
141700 Долгопрудный, Московская обл., Институтский пер., д. 9

⁴ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
119992 Москва, ул. Погодинская, д. 10

⁵ Институт биологии гена РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

⁶ Всероссийский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН
115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: yegorov@eimb.ru

Поступила в редакцию 07.02.06 г.

Ранее получены клоны теломеризованных фибробластов кожи взрослого человека. Показано, что, несмотря на быстрый рост в массовой культуре, эти клетки плохо образуют колонии. Кондиционированная среда, антиоксиданты и снижение парциального давления кислорода усиливают их колониобразование, но не до уровня, характерного для исходных клеток. При этом оказалось, что кондиционированная среда от теломеризованных клеток усиливает колониобразование существенно сильнее, чем таковая от исходных клеток. Исследование протеома теломеризованных фибробластов в настоящей работе показало изменение в действии десятков генов. Общая тенденция состоит в ослаблении и повышенной лабильности цитоскелета и активации механизмов, контролирующих деградацию белков. Однако эти изменения не носят сильно выраженный характер. Установлено, что в процессе образования иммортальных теломеризованных клеток происходит отбор, который, вероятно, обуславливает изменения экспрессии ряда генов. Высказано предположение о том, что снижение способности теломеризованных клеток к образованию колоний происходит из-за повышенных требований этих клеток к межклеточным контактам. Только в самых крупных колониях скорость роста клеток достигает таковой, характерной для массовой культуры. В этой связи теломеризованные фибробласты напоминают стволовые клетки: они способны к самоподдержанию, но “сваливаются” в дифференцировку при отсутствии соответствующего микроокружения (ниши), которой являются другие фибробласты. Неделаящиеся клетки в тесте колониобразования следует рассматривать как дифференцированные, поскольку они не имеют признаков деградации, сохраняют свою жизнеспособность, активно перемещаются, растут, фагоцитируют дебрис и т.п. Мы показали также, что теломеризация не препятствует дифференцировке миобластов и нейральных стволовых клеток человека. Таким образом, все проведенные исследования свидетельствуют о существовании в теломеризованных клетках нормальных механизмов регуляции пролиферации, что открывает возможность их использования в клеточной терапии, особенно в случаях трансплантации аутологичных клеток пожилым людям, когда пролиферативный потенциал их клеток значительно снижается, а доступность стволовых клеток существенно ограничена.

Ключевые слова: теломеризация, иммортализация, теломераза, клетки человека, старение клеток, фибробласты, протеом, клеточная терапия, нейральные стволовые клетки, лентивирусы, колониобразование.

*Работа поддержана Российским фоном фундаментальных исследований (проекты № 99-04-48073, 02-04-49196, 05-04-49442), Программой по поддержке ведущих научных школ РФ (проекты НШ-1794.2003.4, НШ-20182003.4) и Программой фундаментальных исследований РАН “Стволовые клетки”.

Есть серьезные основания полагать, что медицина будущего будет во многом основываться на клеточных технологиях. Благодаря достижениям медицины продолжительность жизни людей сильно превысила ту, которая была выработана в процессе естественного отбора. Поэтому ресурсы человеческого тела оказываются недостаточными для нормальной жизни в возрасте, превышающем таковой (до 40 лет) людей каменного века (Fossel, 2004). В процессе старения происходит гибель клеток организма, которая приводит к ослаблению функций органов и тканей, уменьшению их надежности и развитию болезней, связанных со старением. Помимо собственно старения любые болезни, в том числе специфические, связанные с прогрессивной потерей клеток, и травмы также приводят к уменьшению числа клеток. В 1998 г. было показано, что введение гена каталитического компонента теломеразы способно иммортализовать клетки человека, т.е. придать им способность проходить в культуре неограниченное число делений. Перспективным подходом, позволяющим получать достаточное для клеточно-заместительной терапии количество клеток, по нашему мнению, является временная экспрессия гена каталитического компонента теломеразы в клетках человека *in vitro* (Narushima et al., 2005). При этом теломераза удлинняет теломеры без генетической модификации клеток. Такая процедура позволяет нарастить необходимую клеточную массу и провести в случае надобности генно-инженерную коррекцию дефекта. Таким образом, клеточно-заместительные технологии могут оказаться необходимыми и для генной терапии. Возможно, что основные манипуляции по “лечению больных генов” будут производиться *ex vivo*, вне тела пациента с последующим введением клеток в его организм. Цель нашей работы – всестороннее изучение различных теломеризованных клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Штаммы диплоидных фибробластов кожи взрослого человека № 1608, скелетных миобластов человека № 1603 и эмбриональных фибробластов легкого человека № 1075 взяты из коллекции культур клеток МГНЦ РАМН. Клетки получены от нормальных доноров и имеют нормальный кариотип. Фибробласты выращивали в среде DMEM, а миобласты – в среде F-12 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (“HyClone”, США), 5% пуповинной сыворотки человека (“ПанЭко”, Россия) и 40 ед/мл гентамицина.

Первичные культуры нейральных стволовых клеток (НСК) человека получены И.Н. Сабуриной (Институт биологии гена РАН) из переднего отдела мозга эмбрионов человека (медицинских абортусов) в возрасте 6–11 нед. Мозг эмбриона

человека измельчали, обрабатывали растворами трипсина и версена, пипетировали и переносили в культуральную среду. Клетки культивировали в монослойной культуре в пластиковых культуральных флаконах T25 (“Costar”, США) в среде DMEM-F-12 с добавлением 3% эмбриональной телячьей сыворотки; по 10 нг/мл ростовых факторов FGF-2 и EGF; 0.11 мг/мл пирувата натрия; 0.32 мг/мл глутамина и 40 ед/мл гентамицина. Пересев клеток осуществляли после образования монослоя при помощи растворов версена и смеси трипсин–версен (1 : 1). На ранней стадии культивирования (2-й пассаж) в клетки при помощи лентивирусной конструкции вводили ген каталитического компонента теломеразы человека (*lenti-hTERT*).

Долю апоптотных и митотических клеток подсчитывали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diaphot (“Nikon”, Япония). Апоптотными считали такие фибробласты, которые потеряли свою распластанность, округлились и имели ядро неправильной формы.

Введение гена *hTERT* в клетки человека с помощью плазмиды. Плазида p190, содержащая полную последовательность гена *hTERT* под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора/энхансера в векторе pCI-neo (“Promega”, США), создана в лаборатории проф. Р. Вайнберга, США (Whitehead Institute of Biomedical Research) и любезно предоставлена проф. П. Донини (Римский университет, Италия). В состав плазмиды входит ген неомицин фосфотрансферазы, ответственный за устойчивость к антибиотику G-418. В качестве контроля использовали введение плазмиды pCIneo. Трансфекцию осуществляли с помощью электропорации (Electro Cell Manipulator BTX, США).

Получение препаратов инфекционных рекомбинантных лентивирусных частиц. кДНК гена *hTERT* человека, включающая полную кодирующую область (Meyerson et al., 1997), была клонирована под промотором CMV в лентивирусный вектор pLU-PL3 (Sablina et al., 2005). Для упаковки векторных псевдовирусных частиц ДНК лентивирусного вектора вводили в клетки 293T (DuBridge et al., 1987; Pear et al., 1993) одновременно с двумя упаковочными плазмидами – pCMV-deltaR8.2 (Dull et al., 1998) (экспрессирует белок gag и обратную транскриптазу вируса HIV) и pVSV-G (Naldini et al., 1996) (экспрессирует белок G вируса везикулярного стоматита). Три плазмиды смешивали в равной пропорции и вводили в клетки методом липофекции с помощью системы Lipofectamine-plus по протоколу, рекомендованному производителем (“Invitrogen”, США). Сбор вирусных частиц производили начиная с 48 ч после трансфекции каждые 8 ч в течение 3 сут. Сразу после отбора вирусосодержащих супернатантов

их помещали на лед и добавляли 10% (объемных) ПЭГ-8000 (“Sigma”, США). После завершения сбора вируса преципитаты вирусных частиц, образовавшиеся при высаживании ПЭГ, осаждали низкоскоростным центрифугированием (5 тыс. об/мин, 10 мин) и суспендировали в 1/20 от исходного объема супернатанта свежей среды DMEM с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Препарат разделяли на аликвоты и хранили при температуре -70°C .

Введение гена hTERT в клетки человека с помощью лентивирусного вектора. Введение генов можно осуществлять как в растущие культуры, так и в неделящиеся клетки. Для увеличения доли трансфицированных клеток рекомендуется уменьшать количество клеток и повышать титр вируса. Обычно титр неконцентрированного вируса составляет примерно $3-5 \times 10^6/\text{мл}$. После удаления ростовой среды к растущим во флаконах T25 клеткам на стадии половины монослоя добавляли вирусный концентрат (1 мл с титром $10^8/\text{мл}$), разведенный полной ростовой средой с сывороткой в соотношении 1 : 2. Эта смесь содержала также 5 мкг/мл полибрена. Клетки инкубировали в течение ночи, после чего среду меняли на обычную. Экспрессия гена развивалась медленно в течение 3–4 сут. Эффективность лентивирусной трансфекции (по параллельному введению гена зеленого флуоресцирующего белка) составляла не менее 75%. Клонирования не производили.

Изучение пролиферативного потенциала. Для получения информации о количестве полученных клетками удвоенной популяции (УП) производили подсчет культивируемых во флаконах площадью 25 см^2 (“Nuncclone”, Дания) клеток при каждом пересеве. Подсчитывали число прикрепленных клеток на единицу площади культурального сосуда до и после пересадки. Для этого перед пересевом и через 2 ч после пересева подсчитывали количество прикрепленных клеток в поле зрения микроскопа. Подсчет проводили в 10 случайных полях зрения. Отношение средних значений, полученных перед пересадкой и через 2 ч после предыдущего посева, отражает степень мультипликации клеток между пересадками. Логарифм этой величины по основанию 2 является количеством УП.

Эффективность колониеобразования исследовали по ранее описанной методике (Егоров и др., 2004), а именно: в чашки Петри высевали по 100–200 клеток и через 6–18 сут подсчитывали.

Иммуногистохимия. Препараты эмбриональных нейральных стволовых клеток фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали 30 мин в растворе фосфатного солевого буфера с 10% сыворотки крупного рогатого скота, 0.1% Тритона X-100 и 0.01% Твина 20.

Нейрональный маркер β III-тубулин выявляли с помощью моноклональных антител мыши (“CYMBUS Biotechnology LTD”, США). Вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентным красителем Cy-3. Клетки фотографировали с помощью микроскопа Leitz (Германия).

Приготовление двумерных гелей. Препараты готовили из клеток, достигших плотности около 80% от сомкнутого монослоя. Клетки открепляли от подложки, обрабатывая раствором версена, после чего дважды промывали в фосфатном солевом буфере. Препарат, содержащий 40–210 мкг белка, смешивали с двумя объемами буфера, содержащего: 7 М мочевины, 2 М тиомочевину, 60 мМ дитиотреитол, 65 мМ CHAPS и 5% амфолита, pH 3.5–10. Изоэлектрическую фокусировку производили в стеклянных капиллярах (внутренний диаметр 1.5 мм, длина 170 мм). Капилляры заполняли раствором, содержащим 3.5% (вес/объем) акриламида; 8.5 М мочевины; 1.5% (вес/объем) CHAPS; 0.5% (вес/объем) NP40; 0.3% (объемных) амфолита, pH 3.5 – 10, 0.3% (объемных) амфолита, pH 5 – 8, 0.05% (объемных) TEMED и 0.05% (вес/объем) APS. Использовали только свежеприготовленные препараты. Катодным и анодным буферами служили 50 мМ NaOH и 6 мМ фосфорная кислота соответственно. Напряжение постепенно поднимали – 100, 200, 300, 400, 500 В по 45 мин, – а затем устанавливали 700 В на ночь. Электрофорез производили в 9–16%-ном ПААГ толщиной 1.5 мм при 10°C и силе тока 30 мА. Визуализацию белков осуществляли с помощью стандартного серебрения (Shevchenko et al., 1996).

Компьютерный анализ изображения двумерного геля. Посеребренные гели сканировали с разрешением 300 dpi и анализировали с помощью программы Melanie 3 (2D PAGE image analysis software (“GeneBio”, Швейцария)). Сравнивали аналогичные пятна в контрольных и опытных гелях. Анализировали не менее трех гелей.

Идентификация пятен двумерного геля. Пятна (примерно 2 мм^3) вырезали и обрабатывали трипсином в геле, как описано ранее (Shevchenko et al., 1996). Переваренные белки подвергали масс-спектрометрии на масс-спектрометре Reflex III MALDI-TOF (“Bruker”, США) в соответствии с инструкциями изготовителя: образцы пептидов (0.2–1 мкл) смешивали с равным объемом раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (20 мг/мл, “Sigma”, США), содержащей 20% CAN и 0.1% TFA, и высушивали из воздуха. Масс-спектры получали для 800–4000 Да в режиме отражения и калибровали, используя внутреннюю калибровку (MH^+ 1046.54, 2212.10 Да). Для идентификации белков использовали библиотеку данных NCBI protein и программное обеспечение Mascot.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Теломеризованные фибробласты человека. После введения гена каталитического компонента теломеразы (*hTERT*) в кожные фибробласты взрослого человека ранее было получено несколько клонов клеток (Егоров и др., 2002). Клетки немного замедляли пролиферацию, достигая предела Хейфлика, но в дальнейшем скорость их роста возрастала и впоследствии не менялась (рис. 1, *а*). Морфологически клетки различных клонов мало отличались друг от друга и напоминали молодые диплоидные фибробласты человека. Они быстро росли и образовывали монослой очень высокой плотности (рис. 1, *б*). Эти клетки

обладали теломеразной активностью, а их теломеры были существенно длиннее, чем у исходных клеток (рис. 1, *в*), они сохраняли диплоидный кариотип (рис. 1, *г*) и способность переходить в состояние покоя в результате сывороточного голодания, а также обладали контактным торможением пролиферации. При этом насыщающая плотность пролиферации у них существенно возросла (рис. 1, *д*), став примерно в два раза больше, чем у молодых (на уровне 21 УП) диплоидных фибробластов. В клетках продолжали действовать механизмы пролиферативного старения, описанные Егоровым и др. (2003), а при блокировании теломеразы с помощью азидотимидина на-

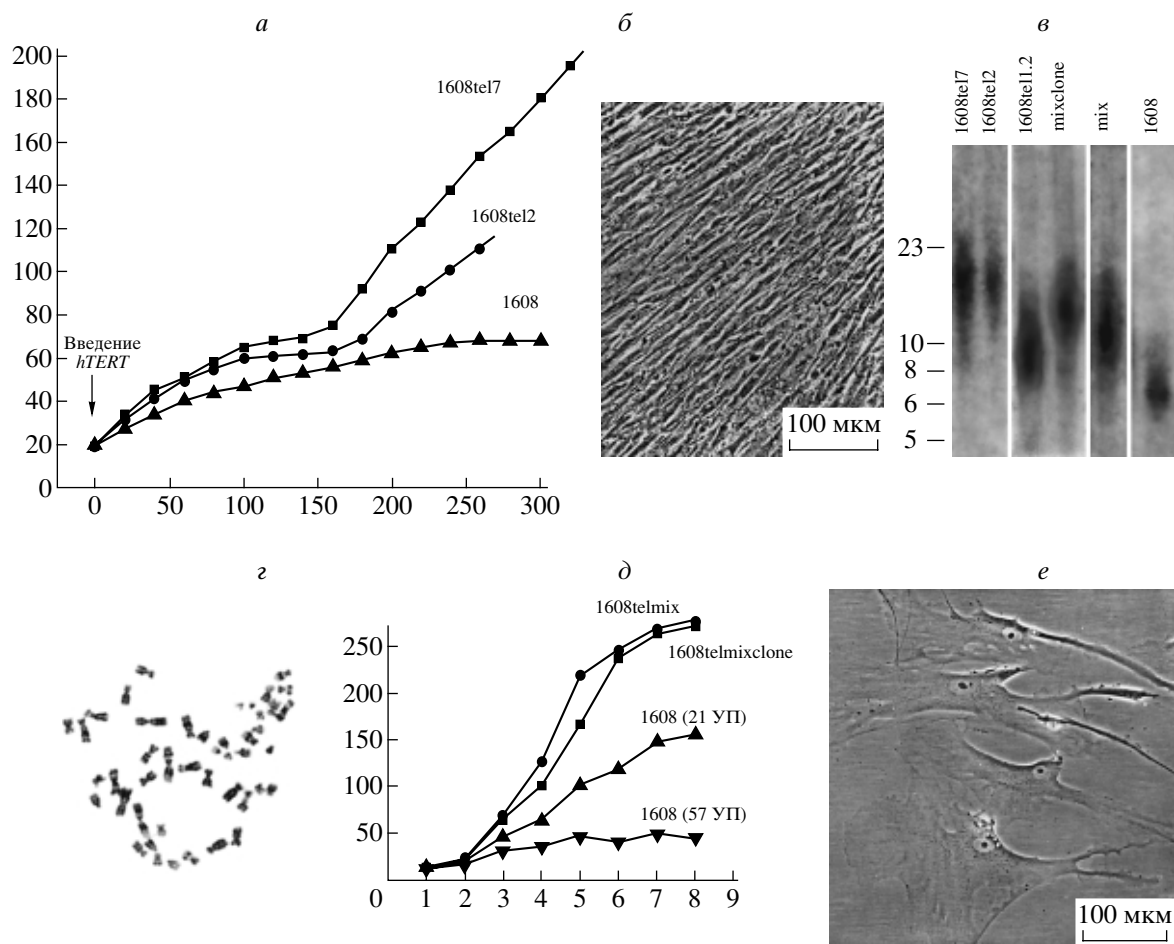


Рис. 1. Свойства теломеризованных фибробластов человека.

а – кривые роста клеток после введения гена *hTERT*; по оси абсцисс – время, сут, по оси ординат – число удвоений популяции (УП). 1608 – исходные диплоидные фибробласты; 1608tel17 и 1608tel2 – клоны теломеризованных клеток.

б – вид сомкнутого монослоя теломеризованных клеток; видна очень высокая клеточная плотность.

в – длины теломер после теломеризации, т.п.н.; приведены результаты гибридизации по Саузерну. 1608 – исходные клетки, остальные дорожки – различные варианты теломеризованных клеток.

г – диплоидный кариотип теломеризованных клеток.

д – кривые насыщения пролиферации клеток, отражающие увеличение количества клеток на единицу площади по мере остановки роста в результате контактного подавления пролиферации; по оси абсцисс – время, сут; по оси ординат – количество клеток, тыс. 1608telmix, 1608telmixclone – теломеризованные клетки, 1608 (21 УП) – молодые исходные фибробласты, 1608 (57 УП) – старые фибробласты.

е – теломеризованные клетки в состоянии искусственного старения.

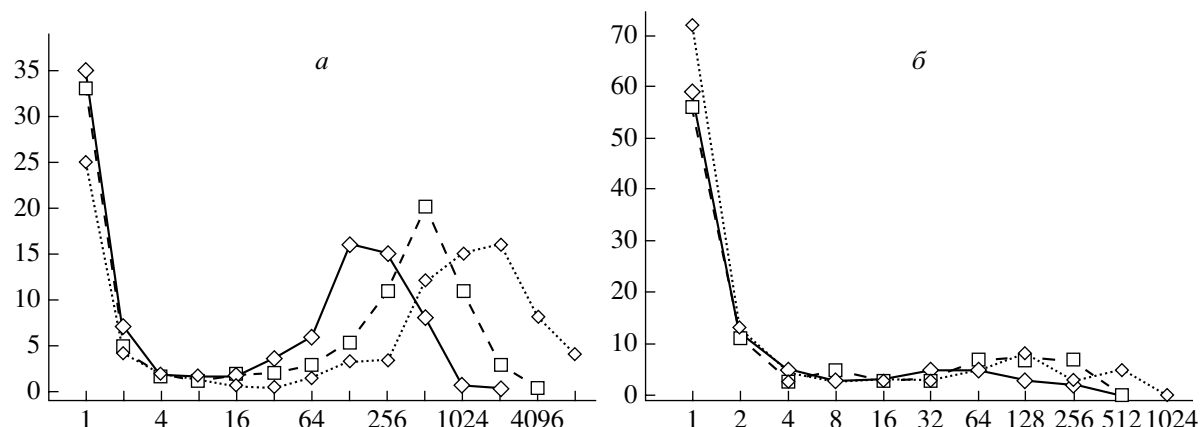


Рис. 2. Сниженная способность к колониообразованию теломеризованных клеток: *a* – 1608, *б* – клон telMC. По оси абсцисс – количество клеток в колониях; по оси ординат – количество колоний, % (размеры колоний, выраженные в количестве клеток, округляли до степени двойки). Время культивирования, сут: (◇) – 10, (□) – 12, (○) – 14.

блюдалось укорачивание теломер и переход клеток в состояние искусственного старения (рис. 1, *e*).

Колониообразование теломеризованных клеток. Несмотря на повышенную скорость роста в массовой культуре (рис. 1, *a*), оказалось, что эффективность колониообразования у теломеризованных клеток значительно снижена: они образуют существенно меньше колоний, размер которых тоже уменьшен (рис. 2).

Поскольку во всех вариантах опыта мы получали бимодальное распределение колоний по размерам, возникло предположение о существовании положительной обратной связи в регулировании роста колоний. Такая связь может быть реализована посредством секреции клетками различных ростстимулирующих факторов. Эта секреция может оказывать действие в непосредственной близости от колонии. Мы изучили распределение отдельно лежащих колоний по размеру и сравнили его с общим (Егоров и др., 2005б). Под отдельно лежащими колониями понимали такие, вокруг которых на расстоянии до 5 мм нет других. Достоверных различий обнаружено не было (рис. 3).

Действие кондиционированной среды. Поскольку независимость размера колонии от непосредственного окружения может быть объяснена тем, что факторы, выделяемые клетками, обладают значительной стабильностью и способны к диффузии в пределах чашки, мы провели опыты с кондиционированными средами по методике, описанной ранее (Егоров и др., 2005б). Выяснилось, что кондиционированные среды оказывают существенное ростстимулирующее действие на колониообразование. При увеличении концентрации кондиционированной среды количество крупных колоний увеличивалось, а мелких – уменьшалось (рис. 4, *a*). При этом действие кондиционированной среды, полученной в результа-

те культивирования теломеризованных клеток, оказывало в несколько раз более сильное воздействие, чем такая же среда от исходных клеток (рис. 4, *б*). Кондиционированная среда от теломеризованных клеток действовала и на исходные клетки, в то время как таковая исходных фибробластов не оказывала достоверного действия на колониообразование теломеризованных клеток (рис. 4, *б*).

Роль окислительного стресса. В дальнейших опытах мы решили проверить, не являются ли теломеризованные клетки более чувствительными к окислительному стрессу. Предполагалось, что при очень низкой концентрации (10 кл. в 1 мл) теломеризованные клетки более чувствительны к окислительному стрессу. Поскольку стандартные культуральные условия являются гипероксическими по сравнению с условиями в организме, были проведены опыты при сниженном парциальном давлении кислорода (Егоров и др., 2005а). Оказалось, что снижение парциального давления кислорода до 5% (вместо обычных 21%) существенно стимулирует колониообразование (рис. 4, *в*): образуется больше крупных колоний, уменьшается количество мелких. В результате наблюдали общий прирост количества клеток в чашках в 2.5 раза (рис. 4, *г*). Аналогично снижению парциального давления кислорода действуют антиоксиданты (рис. 4, *д*). Карнозин в концентрации 20 мМ увеличивает колониообразование при атмосферном кислороде и в условиях 5%-ного кислорода; при 21%-ном кислороде эффект проявляется сильнее.

Протеомный анализ. Итак, выяснилось, что теломеризованные клетки усиливают выработку секретруемых факторов, стимулирующих рост. Чтобы попытаться выяснить их химическую природу, мы провели протеомное исследование белков, экспрессируемых теломеризованными клетками.

С помощью программы Melanie 3 на изображениях двумерного электрофореза сравнивали вы-

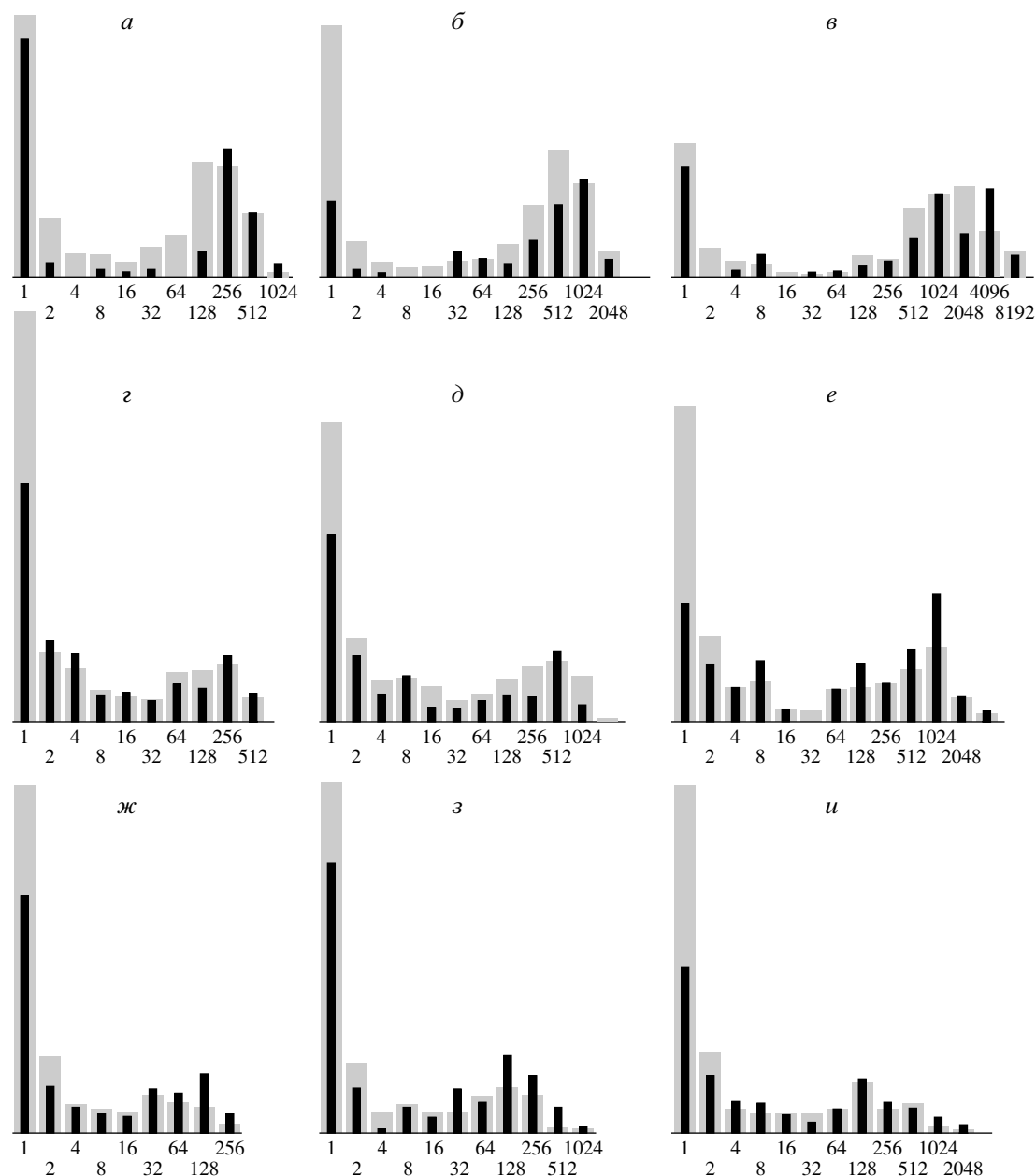


Рис. 3. Распределение по размерам отдельно лежащих колоний. По оси абсцисс – количество клеток в колониях; по оси ординат – количество колоний, %. Клетки через 10, 12, 14 сут культивирования соответственно: а–в – 1608; г–е – 1075; ж–и – telMC (теломеризованные). Распределение колоний: (■) – общее, (■) – отдельно лежащих.

раженность отдельных пятен, соответствующих определенным белкам. Те пятна, которые имели существенные различия у теломеризованных и исходных клеток (разница не менее чем в 2.5 раза), подвергали масс-спектрометрическому анализу (MALDI-TOF), позволяющему провести идентификацию белков. Были обнаружены различия по 69 белкам, включенным в различные базы данных (табл. 1). Часть различий, которая представляется нам наиболее интересной, представлена в табл. 2. При анализе полученных различий мы обратили внимание на следующие особенности.

1. Белки цитоскелета. Содержание цитоскелетных белков (β 5-тубулина, ламин А и С, тропомиезина 3) оказалось сниженным, а повышенным было содержание белка, дестабилизирующего микротрубочки (статмина 1), и белка, кеппирующего F-актин (субъединицы β). Теломеризованные клетки содержат много белков, участвующих в сайтах локальной адгезии (Lasp-1, ZYX, изоформу 1 легкой щелочной цепи миозина). Таким образом, теломеризованные клетки обладают относительно слабо развитым, более лабильным цитоскелетом, что согласуется с их

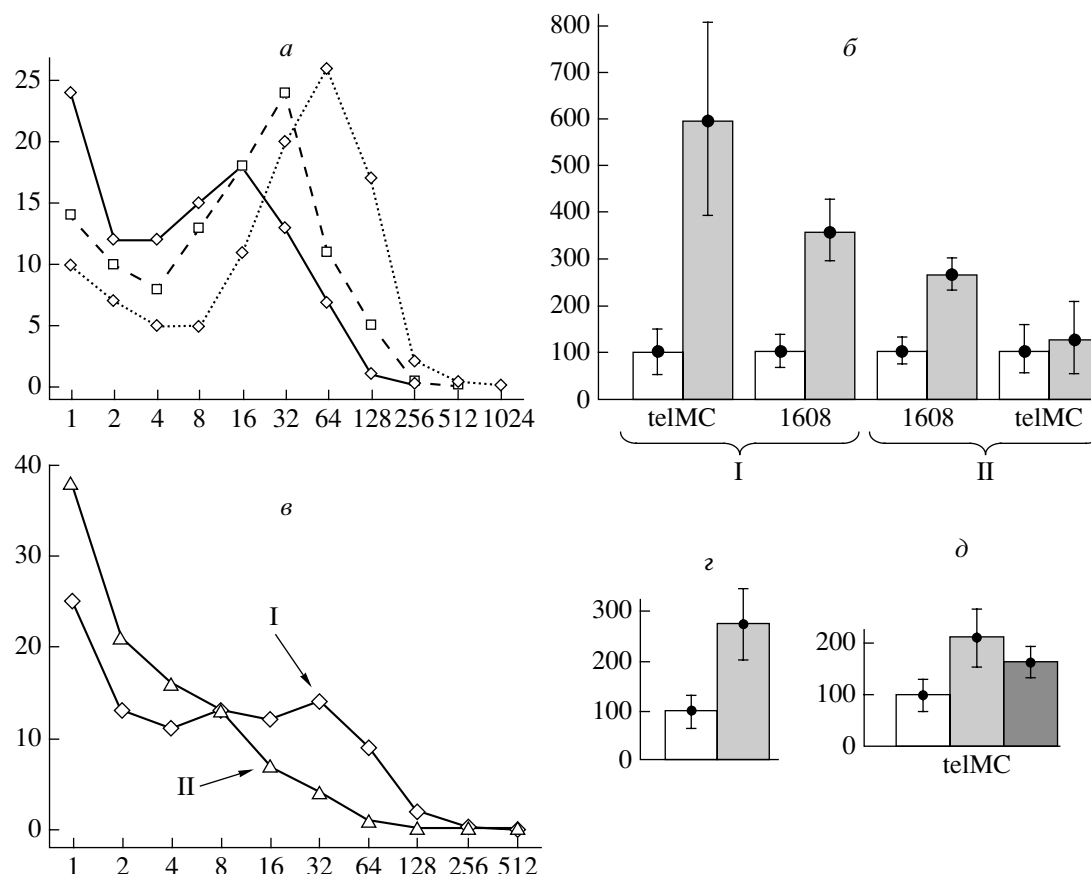


Рис. 4. Увеличение колониеобразования теломеризованных клеток при добавлении кондиционированной среды, снижении парциального давления кислорода и добавлении антиоксидантов.

а – распределение по размерам 6-суточных колоний 1608 при действии кондиционированной среды теломеризованных клеток разной концентрации, %: (—◇—) – 0, (—□—) – 20, (—○—) – 95. По оси абсцисс – количество клеток в колониях; по оси ординат – количество колоний, %.

б – действие кондиционированных сред от исходных клеток (штамм 1608, II) и от теломеризованных (telMC, I) на колониеобразование клеток 1608 и telMC: (□) – 95% кондиционированной среды, (□) – без нее. По оси ординат: суммарное количество клеток, выросших в чашке, %.

в – влияние концентрации кислорода на распределение по размеру 6-суточных колоний теломеризованных клеток. По оси абсцисс – количество клеток в колониях; по оси ординат – количество колоний, %. Клетки культивировали 4 нед до опыта при соответствующей концентрации кислорода, %: I – 5, II – 21.

г – прирост суммарного количества клеток в опытах, показанных на *в*. Концентрация кислорода, %: (□) – 5, (□) – 21.

д – влияние антиоксидантов на суммарный прирост количества теломеризованных клеток в 6-суточных опытах колониеобразования в условиях 5%-ного кислорода, %; (□) – контроль, (□) – 20 мМ карнозина, (■) – 0.1 мМ N-ацетил-цистеина.

морфологией (сравнительно мелкие и подвижные клетки).

2. Интенсивность обмена белков. Обращает на себя внимание увеличенное количество различных шаперонов в теломеризованных клетках (белки теплового шока 4 и 9В, оба с молекуляр. массой 70 кДа; t-комплекс 1, АНSA1, HSPA8) против снижения белка 1 теплового шока, 27 кДа. Кроме шаперонов в теломеризованных клетках активированы протеасомы (активатор протеасомы PA28, β-цепь), что свидетельствует об интенсификации обмена белков. Таким образом, в теломеризованных клетках повышен контроль за

конформациями белков и интенсифицированы пути их деградации.

3. Были обнаружены изменения, связанные с пролиферацией. Увеличено содержание кофактора репликативного синтеза ДНК PCNA, что может быть объяснено повышенной пролиферацией при уменьшении общего содержания цитоскелетных белков. Теломеризованные клетки усиленно продуцируют трансферрин, который можно рассматривать как фактор роста. Снижено содержание внеклеточного ингибитора протеаз α2-макроглобулина, который может связываться с факторами роста и менять чувствительность клеток к ним.

Таблица 1. Различия по содержанию белков в теломеризованных и исходных клетках

Белок	Содержание*	Хромосомная локализация
Статмин 1	+	1p36.1-p35
Cap Z	+	1p36.1
CRABP2, cellular retinoic acid binding protein 2	–	1q.21.3
Ламин А/С, изоформа 2	–	1q21.2-q21.3
Пероксиредоксин 6	+	1q25.1
Poly(rC) binding protein 1	+	2p13-p12
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75 кДа, precursor	+	2q33-q34
Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) ER60 precursor	–	3q21.1
Фактор инициации трансляции eIF-4A2	+	3q28
SEC13-like 1 isoform α , SEC13-related protein	+	3p25-p24
Септин 11	–	4q21.1
Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein, precursor	–	5p15
WD-40 repeat protein	+	5q35, 5q31
Кариоферин	+	5q13.2
Белок 4 теплового шока, изоформа α , 70 кДа	+	5q31.1-q31.2
Белок 9В теплового шока (precursor HSPA9B (mortalin-2)), 70 кДа	+	5q31.1
DPYSL3, protein dihydropyrimidinase-like 3	+	5q32
G3BP, Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	+	5q33.1
Кальнексин (CANX)	–	5q35
Ядерный хлоридный канал (CLIC1)	+	6p22.1-p21.2
β 5-Тубулин (tubulin β 1 chain class Ivb)	–	6p21.33
Экто-5'-нуклеотидаза	–	6q14-q21
Супероксиддисмутаза 2 (SOD2)	–	6q25.3
t-Комплекс 1 (T-complex locus TCP-1)	+	6q25.3-q26
FSCN1, fascin homolog 1	–	7p22
ACTB	–	7p15-p12
Белок теплового шока 1, 27кДа	–	7q11.23
ZYX	+	7q32
Альдозоредуктаза (EC 1.1.1.21)	+	7q35
Dihydropyrimidinase-like 2; collapsin response mediator protein hCRMP-2	–	8p22-p21
Valosin containing protein	–	8q13
Эукариотический фактор элонгации трансляции eef1 δ , изоформа 2	+	8q24.3
Трансферрин	+	8q32
Тиоредоксин	+	9q31
TXNDC4, thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum)	–	9q31.1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform α , uracil-DNA glycosylase	+	9q21.32-q21.33
Аннексин 1 (lipocortin I)	–	9q12-q21.2
P4HA1, prolyl-4-hydroxylase protein	–	10q21.3-q23.1
Трансальдолаза (TALDO1, EC 2.2.1.2)	+	11p15.5-p15.4
Rcal, reticulocalbin 1 precursor	–	11p13
Никотинамид-N-метилтрансфераза	–	11q23.1
Zinc finger protein 259	+	11q23.3
Белок теплового шока 8, изоформа 1, 70 кДа (HSPA8)	+	11q24.1
α 2-Макроглобулин	–	12p13.3-p12.3

Таблица 1. Окончание

Белок	Содержание*	Хромосомная локализация
Триозофосфатизомераза (Tim, EC 5.3.1.1)	+	12p13
FK506-binding protein 4	+	12p13.33
Щелочная легкая цепь гладкомышечного и немышечного миозина, изоформа 1	+	12q13.2
C12orf8, endoplasmic reticulum protein 29 precursor	+	12q24.13
Активатор протеасомы PA28, β -цепь	+	14q11.2
hnRNP C2	+	14q11.2
LGALS3	–	14q21-q22
AHSA1, AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1	+	14q23.3-31
Phospholipase C α , protein disulfide isomerase-associated 3	–	15q15
Тропомиозин 3, фибробластный	–	1q22-q23
Фактор инициации трансляции eIF-5A	–	17p13-p12
Lasp-1, LIM and SH3 protein 1	–	17q11-q21.3
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 48	+	17q25.3
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) α	+	17q25.3
TXNL1, thioredoxin-like protein	+	18q21.2
INB2, serine (or cysteine) proteinase inhibitor	+	18q21.3
R33729_1, chromosome 19 open reading frame 10	–	19p13.3
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	–	19q13.1
Фактор элонгации 2 (EEF2, EF-2)	–	19pter-q12
Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)	+	20pter-p12
CCT8 Chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	–	21q22.11
Супероксиддисмутаза 1 (SOD1, Cuznsod)	–	21q22.1, 21q22.11
Коллаген типа VI, α 1	+	21q22.3
Пиридоксалькиназа (PDXK)	–	21q22.3
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	+	Xq28

* “+” – повышенное, “–” – сниженное.

4. В теломеризованных клетках **изменена защита от активных форм кислорода**. Снижено содержание супероксиддисмутаз 1 и 2 и повышено содержание тиоредоксина и пероксиредоксина 6. При этом также повышено содержание трансальдолазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что свидетельствует об усилении продукции НАДФ и поддержания глутатиона в редуцированном состоянии.

Связь со структурой генома. Обнаружив столь большое количество отличий теломеризованных клеток, мы решили проверить, не связаны ли эти различия (хотя бы частично) со структурой генома. Распределение генов, изменивших свою представленность белками (ГИСПБ), по хромосомам оказалось случайным (рис. 5, а). Также вполне случайным выглядит распределение ГИСПБ внутри хромосом (рис. 5, б): они расположены в основном на участках с высокой плотностью генов. Однако мы обнаружили, что ГИСПБ собраны в кластеры (рис. 5, б); вероятность не-

случайности этого распределения (при сравнении со случайной выборкой) была оценена в 90% (рис. 5, в). Вероятно, что повышенная кластеризованность связана со взаимным влиянием близко расположенных генов, что само по себе способно увеличивать количество ГИСПБ.

Селекция в процессе теломеризации. Большое количество изменений, вызванных работой одного гена (*hTERT*), можно объяснить процессом селекции при получении теломеризованных клеток, тем более что мы отметили длительную поддержку пролиферации в районе предела Хейфлика (рис. 1, а). Было решено проверить предположение о селекции с помощью высокоэффективной трансфекции гена *hTERT* с участием лентивирусного вектора. Через несколько суток после трансфекции количество погибающих клеток увеличилось (табл. 3), что однозначно указывает на наличие селекции клеток в процессе теломеризации.

Таблица 2. Особенности содержания* белков в теломеризованных клетках

Структурные белки		β5-Тубулин	–
		Ламин А/С	–
		Тропомиозин 3	–
Поддержание структуры клетки	Белки участков фокальной адгезии	Lasp-1	–
		ZYX	+
		Легкая щелочная цепь миозина, изоформа 1	+
	Дестабилизация микротрубочек	Статмин 1	+
	Рост актиновых филаментов	Белок, кеппирующий F-актин, субъединица β	+
Обмен белков	Белки-шапероны	Белок теплового шока 4, 70 кДа	+
		Белок теплового шока 9В, 70 кДа	+
		t-Комплекс 1	+
		AHSA1	+
		HSPA8	+
		Белок теплового шока 1, 27 кДа	–
	Увеличение презентации МНС-1	Активатор протеасомы PA28, В-цепь	+
Пролиферация	Фактор роста	Трансферрин	+
	Внеклеточный ингибитор протеаз	α2-Макроглобулин	–
	Кофактор ДНК-полимеразы	Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)	+
Защита от активных форм кислорода		Супероксиддисмутаза 1 (SOD1)	–
		Супероксиддисмутаза 2 (SOD2)	–
	Внеклеточная защита	Тиоредоксин	+
		Пероксиредоксин 6	+
		Белок, похожий на тиоредоксин (TXNL1)	+
	Продукция НАДФ-ключевого донора электронов	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	+
	Поддержка глутатиона в редуцированном состоянии	Трансальдолаза	+

* См. в табл. 1.

Дифференцировка теломеризованных клеток. Интересна судьба клеток, которые прекращают пролиферацию в тесте колониеобразования. Во-первых, выяснилось, что количество таких клеток существенно не изменяется в процессе проведения теста длительностью до 14 сут. Мы сравнивали суммарное число колоний, образованных фибробластами взрослого человека № 1608 и теломеризованными клетками, через различное время после посева.

Клетки	Сроки колониеобразования, сут		
	10	12	14
Исходные фибробласты	108.8 ± 14	104.8 ± 12.4	88.8 ± 13.1
Теломеризованные	58.8 ± 9	61.4 ± 13.3	64 ± 10.8

Под колониями понимали любую группу клеток, в том числе и одиночные клетки. Видно, что число колоний, образованных различными фибробластами, имеет тенденцию к уменьшению со временем, но это уменьшение статистически недостоверно.

Во-вторых, мы обнаружили, что неделящиеся клетки подвергаются закономерным изменениям во времени (рис. 6, а): прежде всего они увеличиваются и распластаются, активно передвигаются и фагоцитируют дебрис. Трудно себе представить, что все эти процессы являются проявлением начала дегенерации вследствие повреждения клеток. Поскольку иммортальные клетки не должны быть подвержены репликативному старению, то единственной причиной их перехода в длительное неделящееся состояние может быть процесс диф-

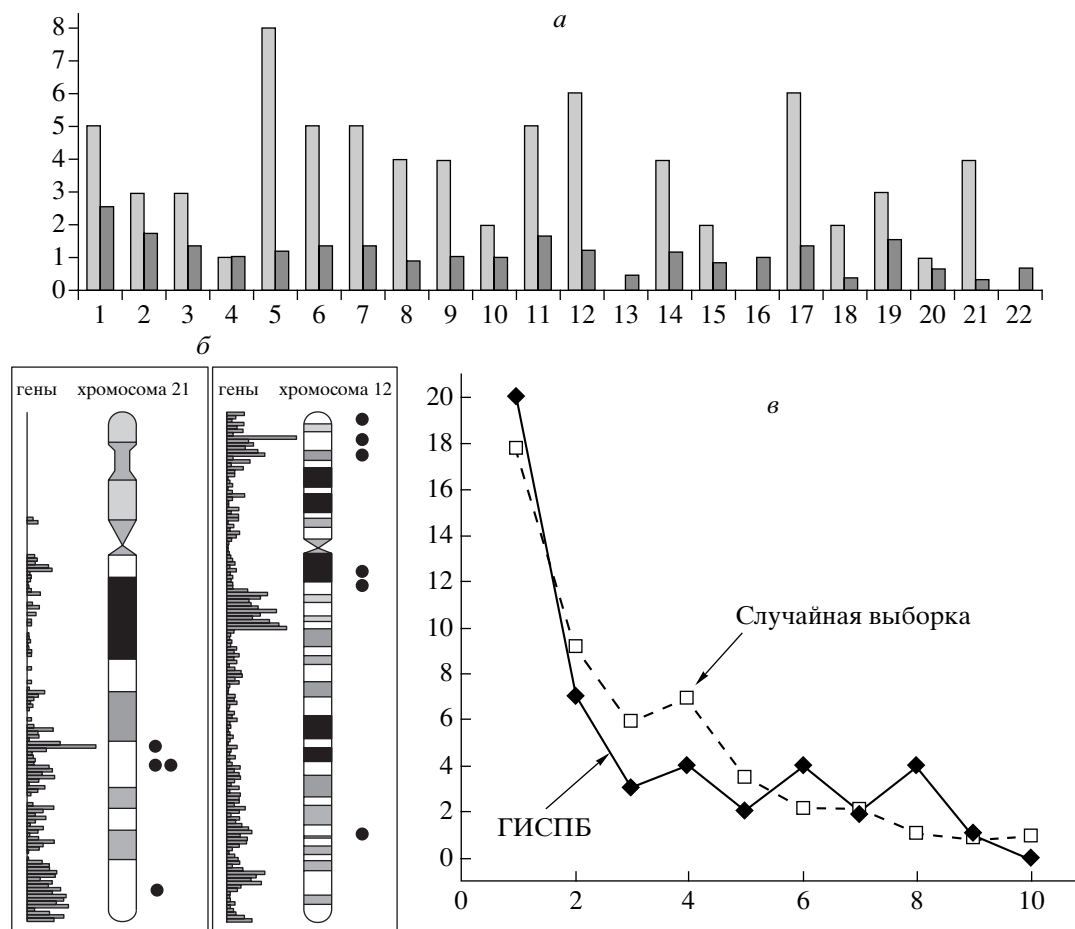


Рис. 5. Связь генов, изменивших свою представленность белками (ГИСПБ) при теломеризации, со структурой генома. *а* – распределение ГИСПБ по хромосомам. По оси абсцисс – номер хромосомы, по оси ординат – количество ГИСПБ (□) и общее количество генов на каждой хромосоме, тыс. штук (■). *б* – примеры распределения ГИСПБ внутри хромосом. *в* – суммарное распределение расстояний между ГИСПБ (сравнение со случайной выборкой); по оси абсцисс – расстояние между ГИСПБ, млн п.н., по оси ординат – количество ГИСПБ.

ференцировки. Мы склонны рассматривать неделящиеся клетки в тесте колониеобразования как дифференцированные.

В других опытах мы показали, что экспрессия *hTERT* не препятствует дифференцировке. Во-первых, клоны теломеризованных миобластов человека при индукции миогенной дифференцировки образовывали мышечные волокна (рис. 6, б). Не наблюдали существенной разницы в доле клеток, принимающих участие в образовании мышечных волокон, и теломеризованными и исходными миобластами, прошедшими одинаковое число УП в культуре.

Во-вторых, теломеризованные НСК человека в культуре подвержены спонтанной нейрональной дифференцировке в той же степени, что и контрольные (рис. 6, в; табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

С нашей точки зрения, наиболее существенно объяснить причины сниженного колониеобразования теломеризованных клеток. Мы полагаем, что для устойчивой пролиферации теломеризо-

Таблица 3. Эффект введения гена *hTERT* с помощью лентивирусов в диплоидные фибробласты через 6 сут после манипуляции, $p = 95\%$

Эффект, %	Фибробласты		Пролиферативный возраст клеток, УП
	контрольные	после трансфекции	
Митозы	0.05 ± 0.06	0.5 ± 0.2	40
Апоптозы	0.20 ± 0.13	2.0 ± 0.4	
Митозы	2.00 ± 0.90	5.0 ± 1.4	13
Апоптозы	0.10 ± 0.10	0.5 ± 0.3	

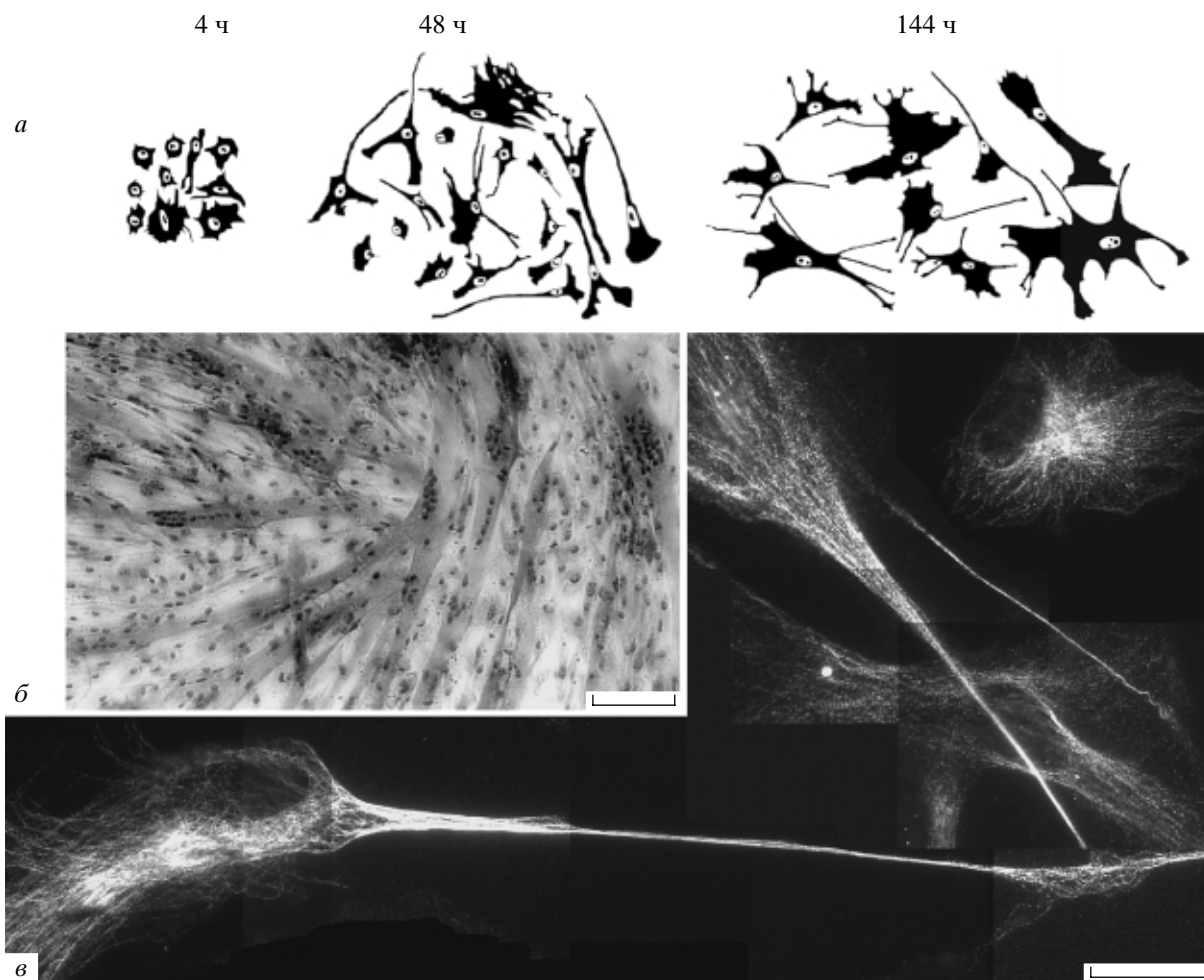


Рис. 6. Дифференцировка теломеризованных клеток: *a* – морфология неделящихся теломеризованных фибробластов в ходе теста колониеобразования, время после посева; *б* – образование мышечных волокон теломеризованными миобластами, видны многоядерные клетки; *в* – дифференцировка нейральных стволовых клеток человека через 9 пассажей после высокоэффективного введения гена *hTERT* с помощью лентивирусов, окраска на βIII-тубулин, видны типичные нейроноподобные клетки. Масштаб: *б* – 80, *в* – 40 мкм.

ванные клетки в большей степени, чем исходные фибробласты, нуждаются в определенном микроокружении. Теломеризованные фибробласты,

Таблица 4. Влияние экспрессии гена *hTERT* на спонтанную нейрональную дифференцировку в культурах нейральных стволовых клеток (НСК)

№ пассажа	Нейронально дифференцированные клетки, %*	
	НСК	НСК- <i>hTERT</i>
2-й	6.3 ± 2.4	6.7 ± 2.6
4-й	13.4 ± 2.7	16.5 ± 3.2
7-й	34.7 ± 3.5	43.2 ± 3.5
9-й	41.2 ± 4.2	49.3 ± 4.6
10-й	51.0 ± 4.4	54.5 ± 4.5

* Нейрональная дифференцировка оценивалась по морфологии клеток и наличию нейронального маркера βIII-тубулина.

находящиеся в составе наиболее крупных колоний, растут примерно с той же скоростью, что и клетки в массовой культуре. За 70 сут в культуре среднее время УП составляет 18 ч. При образовании колонии из 256 клеток (максимальный размер 6-суточной колонии) на одно удвоение требуется в среднем столько же времени (18 ч) (Егоров и др., 2005a). Наиболее вероятно, что для пролиферации клетки должны находиться в непосредственном контакте друг с другом. Это требование не является абсолютным; в противном случае колонии не смогли бы образовываться вовсе. Непосредственный контакт требуется не в каждом клеточном цикле. Сигналом к выходу из клеточного цикла служит, вероятно, длительное (несколько клеточных циклов) отсутствие межклеточных контактов. По нашему мнению, наиболее логично назвать процесс выхода из клеточного цикла иммортальных, неповрежденных клеток,

находящихся в оптимальной для роста среде, дифференцировкой (Егоров и др., 2005б), так как все происходит аналогично поведению любых других клеток. Скорее всего, при такой дифференцировке изменяется спектр синтезируемых белков.

Недавно появилась работа, доказывающая, что хорошо известный штамм эмбриональных легочных фибробластов человека MRC-5 способен проявлять многие признаки стволовых клеток (Rieske et al., 2005). Достаточно было изменить традиционные условия культивирования (поменять сыворотку на среду со смесью определенных факторов роста), как в клетках началась экспрессия маркеров эмбриональных стволовых клеток и клеток нейрональной дифференцировки, вплоть до появления тирозингидроксилазы – маркера зрелых нервных клеток. Такие примеры, хотя и вызывают удивление возможностями истинной или ложной трансдифференцировки фибробластов, однозначно трактуются как явления, имеющие прямое отношение к дифференцировке. В то же время переход фибробласта в терминальное неделиющееся состояние исследователи обычно не связывают с дифференцировкой. Однако даже если предположить, что все фибробласты человеческого тела одинаковы, то переход этих клеток в терминальное неделиющееся состояние по сути своей является дифференцировкой, а образующиеся при этом клетки следует называть фиброцитами, аналогично тому, как это называется у других клеток: хондробласт-хондроцит, остеобласт-остеоцит и т.п. К сожалению, название “фиброцит” исторически было присвоено вполне определенному типу фибробластов и более широкое его применение может вызвать путаницу.

В последнее время становится ясно, что для устойчивой пролиферации стволовых клеток обязательно наличие межклеточных контактов с клетками так называемой ниши (Scadden, 2006). Возможно, что в случае фибробластов мы имеем похожую ситуацию: клетки, потерявшие контакт с другими, переходят к дифференцировке, т.е. в длительное неделиющееся состояние. Аналогия со стволовыми клетками становится наиболее явной для теломеризованных клеток, так как они способны к бесконечному самоподдержанию и дифференцируются в ответ на длительную потерю контакта с другими клетками.

Характер полученных протеомных данных вполне вписывается в наши представления о теломеризованных клетках. Цитоскелет таких клеток развит слабее (меньше ламин, тропомиозина) и более лабилен (повышено количество статмина – дестабилизатора микротрубочек): увеличен рост актиновых волокон (количество F-actin capping protein β subunit), изменены белки фокальных контактов – Lasp-1, ZYX, изоформа 1 легкой щелочной цепи миозина. Эти изменения

согласуются и с внешним видом теломеризованных клеток: они более мелкие и подвижные.

Изменения белков, связанных с регуляцией пролиферации, также согласуются с ранее полученными данными: клетки растут быстрее, поэтому в них повышены концентрация PCNA – кофактора полимеразы α – и количество трансферрина; последний выделяется во внешнюю среду и может служить фактором роста. Мы показали, что кондиционированная среда теломеризованных клеток обладает повышенным ростстимулирующим свойством (Егоров и др., 2005б), при этом снижено количество α 2-макроглобулина – секретируемого ингибитора протеаз, способного связывать различные цитокины (Mathew et al., 2003). Можно предположить, что сниженная способность теломеризованных клеток к колониеобразованию частично обусловлена этим изменением.

Изменение количества разнообразных белков теплового шока и шаперонов (увеличены HSP70 – белки 4 и 9В ; t-комплекс 1, AHSA1, HSPA8; уменьшены только CCT8, HSP27 белок 1 и калнексин), а также увеличение количества активатора протеасомы (PA28, β -цепь) свидетельствуют в пользу интенсификации белкового обмена. Учитывая “бессмертный” (и при этом неизменный) характер теломеризованных клеток, такие изменения указывают на усиление контроля за конформациями белков. Известно, что подавление протеасом (замедление обмена белков) способно индуцировать процессы старения в фибробластах человека (Torres et al., 2006). Недавно появились сведения, указывающие на повышенную активность промоторов белка теплового шока (HSP 16.2) у долгоживущих особей нематод *C. elegans* (Rea et al., 2005). Такая активность помогает конкретным особям выдерживать летальные стрессы. Очевидно, что бессмертные клетки обязаны более тщательно контролировать конформацию белков.

Возможно, повышенная активность активатора протеасомы может иметь и дополнительное значение: в составе организма она должна привлекать все внутренние белки теломеризованных клеток в состав комплекса с МНС-1, что в свою очередь должно повысить внимание иммунитета к теломеризованным клеткам.

На первый взгляд удивительными оказались изменения в антиоксидантной системе. Можно было ожидать тотального усиления антиоксидантной защиты в бессмертных неменяющихся клетках. Однако мы обнаружили сниженное содержание ключевых ферментов, обезвреживающих супероксид анион, – SOD1 и SOD2. При этом в клетках повышается содержание пероксиредоксина, тиоредоксина и белка, похожего на тиоредоксин (TXNL 1). Мы полагаем, что уменьшение содержания SOD1 и SOD2 можно объяснить конститутивным снижением в теломеризованных клетках продукции активных форм кислорода,

основным источником которых в клетке являются митохондрии. Кроме того, митохондрии содержат собственный геном, повреждения которого могут ограничивать пролиферативный потенциал клеток примерно так же, как и укорочение теломера. В результате естественного отбора продолжительность репликации митохондрий должна была бы быть сопоставимой с пролиферативным потенциалом клетки. Возможно, что теломеризация существенно влияет на функции митохондрий либо прямым путем, либо в результате отбора клеток с менее поврежденными митохондриями или митохондриями, продуцирующими меньшее количество активных форм кислорода. Известно, что экспрессия *hTERT* способна каким-то образом повышать потенциал на митохондриальной мембране и блокировать повышение концентрации активных форм кислорода (Kang et al., 2004).

И ранее описывали большое количество отличий, присущих теломеризованным клеткам (Kanzaki et al., 2002, 2003; Lindvall et al., 2003; Young et al., 2003; Walter et al., 2003; Kang et al., 2004). Протеомные данные в отличие от большинства других, полученных с помощью экспрессионных чипов, имеют свои достоинства и недостатки. С одной стороны, применение масс-спектрометрии позволяет получать прямые данные о наличии или отсутствии конкретных белковых продуктов. Интерпретация экспрессионных данных затруднена в силу различных скоростей обмена белков, различной стабильности мРНК, всевозможных посттранскрипционных модификаций и т.п. С другой стороны, масс-спектрометрические данные касаются, прежде всего, мажорных фракций белков, поэтому обычно они не оперируют с белками-регуляторами, представленными минорными фракциями. Масс-спектрометрические данные позволяют определять структурные перестройки клеток и общий характер изменения метаболизма. В идеале для полной картины желательно сочетать оба метода.

Столь большое количество различий (см. “Результаты”) трудно объяснить действием одного гена. Примененный масс-спектрометрический метод способен определить не более 2000 белковых продуктов. В клетках человека существует примерно 25000 генов; в результате альтернативного сплайсинга, различных посттранскрипционных модификаций и процессов деградации общее число различных белков может составлять порядка 100000. Это значит, что мы обнаружили 69 различий из тысяч существующих. По всей видимости, помимо прямого и опосредованного действия экспрессии гена *hTERT*, описанные различия происходят также и в результате длительной селекции иммортализованных клеток. Задержка пролиферации теломеризованных клеток в районе предела Хейфлика и увеличенное количество погибающих клеток после массовой трансфекции гена *hTERT* однозначно

указывают на наличие процесса отбора при становлении иммортализованных линий клеток.

Таким образом, хотя мы и обнаружили многочисленные изменения белкового состава в теломеризованных клетках, эти изменения, вероятно, связаны с аккомодацией клеток к условиям долговременной пролиферации и с сохранением всех клеточных механизмов, для этого необходимых. В процессе жизнедеятельности нормальных клеток происходят многочисленные изменения экспрессии генов, не связанные с генетической модификацией. Примером тому может служить старение клеток (Zhang et al., 2003, 2004). Мы и другие исследователи показали, что теломеризованные клетки сохраняют все нормальные механизмы регуляции роста, ни разу на протяжении семи лет мы не наблюдали случаи их спонтанной трансформации. Все это внушает надежду, что теломеризация *ex vivo* с последующим тщательным анализом получившихся клеток сможет в будущем использоваться для ауотрансплантации в клеточно-заместительной терапии.

Мы благодарны Е.В. Казимирчук, Д.Н. Караченцеву, Т.Д. Смирновой, Т.Г. Цветковой и М.А. Эльдарову за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова Х.С. и др. Иммортализация нормальных фибробластов кожи взрослого человека путем введения гена каталитического компонента теломеразы // Биол. мембраны. 2002. Т. 19. С. 483–490.
- Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова Х.С. и др. Теломеризация – способ получения иммортализованных клеток человека, сохраняющих нормальные свойства // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 183–192.
- Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Терехов С.М. и др. Теломеризация не увеличивает способность фибробластов человека к колониеобразованию // Биол. мембраны. 2004. Т. 21. С. 298–305.
- Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Вишнякова Х.С. и др. Действие кислорода на культуры фибробластов человека // Там же. 2005а. Т. 22. С. 43–51.
- Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Вишнякова Х.С. и др. Свидетельства в пользу дифференцировки иммортализованных фибробластов человека *in vitro* при редком посеве // Там же. 2005б. Т. 22. С. 458–465.
- DuBridge R.B., Tang P., Hsia H.C. et al. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. P. 379–387.
- Dull T., Zufferey R., Kelly M. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system // J. Virol. 1998. V. 72. P. 8463–8471.
- Fossel M.B. Cells, aging, and human disease. N. Y.: Oxford Univer. Press, 2004. 503 p.
- Kang H.J., Choi Y.S., Hong S.-B. et al. Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity // J. Neurosci. 2004. V. 24. P. 1280–1287.
- Kanzaki Y., Onoue F., Ishikawa F. et al. Telomerase rescues the expression level of keratinocyte growth factor and insulin-like growth factor-II in senescent human fibroblasts // Exp. Cell Res. 2002. V. 279. P. 321–329.

- Kanzaki Y., Onoue F., Sakurai H. et al. Telomerase upregulates expression levels of interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in normal human fibroblasts // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003. V. 305. P. 150–154.
- Lindvall C., Hou M., Komurasaki T. et al. Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epiregulin gene // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 1743–1747.
- Mathew S., Arandjelovic S., Beyer W.F. et al. Characterization of the interaction between alpha2-macroglobulin and fibroblast growth factor-2: the role of hydrophobic interactions // *Biochem. J.* 2003. V. 374. P. 123–129.
- Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N. et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalisation // *Cell.* 1997. V. 90. P. 785–795.
- Naldini L., Blomer U., Gallay P. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector // *Science.* 1996. V. 272. P. 263–267.
- Narushima M., Kobayashi N., Okitsu T. et al. A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes // *Nat. Biotech.* 2005. V. 23. P. 1274–1282.
- Pear W.S., Nolan G.P., Scott M.L. et al. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 8392–8396.
- Rea S.L., Wu D., Cypser J.R. et al. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. P. 894–898.
- Rieske P., Krynska B., Azizi S.A. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin // *Differentiation.* 2005. V. 73. P. 474–483.
- Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V. et al. The anti-oxidant function of the p53 tumor suppressor // *Nat. Med.* 2005. V. 11. P. 1306–1313.
- Scadden D.T. The stem-cell niche as an entity of action // *Nature.* 2006. V. 441. P. 1075–1079.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 850–858.
- Torres C., Lewis L., Cristofalo V.J. Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* 2006. V. 207. P. 845–853.
- Walter M., Davies J.P., Ioannou Y.A. Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes // *J. Lipid Res.* 2003. V. 44. P. 243–253.
- Young J.I., Sedivy J.M., Smith J.R. Telomerase expression in normal human fibroblasts stabilizes DNA 5-methylcytosine transferase I // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19904–19908.
- Zhang H., Pan R.H., Cohen S.N. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 3251–3256.
- Zhang H., Herbert B.S., Pan R.H. et al. Disparate effects of telomere attrition on gene expression during replicative senescence of human mammary epithelial cells cultured under different conditions // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 6193–6198.

Enhanced Control of Proliferation in Telomerized Cells

E. E. Yegorov¹, M. V. Moldaver¹, Kh. S. Vishnyakova¹, S. M. Terekhov², E. B. Dashinimaev³, I. B. Cheglakov⁴, I. Yu. Toropygin⁴, K. N. Yarygin⁴, P. M. Chumakov¹, L. I. Korochkin⁵, G. A. Antonova⁵, E. Yu. Rybalkina⁶, I. N. Saburina⁵, N. S. Burnaevskii³, and A. V. Zelenin¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

² Medical-Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Moskvorech'e 1, Moscow, 115478 Russia

³ Moscow Physical-Technical Institute, Institutskii per. 9, Dolgoprudnyi, Moscow oblast', 141700 Russia

⁴ Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinslaya 10, Moscow 119992 Russia

⁵ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow 119334 Russia

⁶ Blokhin National Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow 115478 Russia

E-mail: yegorov@eimb.ru

Abstract—Clones of telomerized fibroblasts of adult human skin have earlier been obtained. It was shown that despite their fast growth in mass cultures, these cells poorly form colonies. Conditioned medium, antioxidants, and reduced partial oxygen pressure enhanced their colony formation, but not to the level characteristic of the initial cells. The conditioned medium of telomerized cells enhanced colony formation to a much greater extent than that of the initial cells. A study of proteome of the telomerized fibroblasts has revealed changes in the activities of tens of genes. A general trend consists in weakening and increased lability of the cytoskeleton and in activation of the mechanisms controlling protein degradation. However, these changes are not very pronounced. During the formation of immortal telomerized cells, selection takes place, which appears to determine changes in the expression of some genes. It was proposed that a decrease in the capacity of telomerized cells for colony formation is due to increased requirements of these cells to cell-cell contacts. The rate of cell growth reached that characteristic of mass cultures only in the largest colonies. In this respect, the telomerized fibroblasts resembled stem cells: they are capable of self-maintenance, but “escape” to differentiation in the absence of the corresponding microenvironment (niche), which is represented by other fibroblasts. Non-dividing cells in the test of colony formation should be regarded as differentiated cells, since they have no features of degradation, preserve their viability, actively move, grow, phagocytized debris, etc. It was also shown that telomerization did not prevent differentiation of myoblasts and human neural stem cells. Thus, the results obtained suggest the existence of normal mechanisms underlying the regulation of proliferation in the telomerized cells, which opens possibilities of their use in cell therapy, especially in the case of autotransplantation to senior people, when the cell proliferative potential is markedly reduced and accessibility of stem cells is significantly restricted.

Key words: telomerization, immortalization, telomerase, human cells, cell aging, fibroblasts, proteome, cell therapy, neural stem cells, lentiviruses, colony formation.