

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Кулебякина Мария Александровна

**Механизмы влияния белков, секретируемых мезенхимными
стволовыми клетками, на дифференцировку фибробластов в
миофибробласты**

1.5.4 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научные руководители:

Ефименко Анастасия Юрьевна

доктор медицинских наук

Ткачук Всеволод Арсеньевич

доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты:

Ярыгин Константин Никитич

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, лаборатория клеточной биологии, заведующий лабораторией

Гривенников Игорь Анатольевич

доктор биологических наук, профессор, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», лаборатория молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета, главный научный сотрудник

Левицкий Дмитрий Иванович

доктор биологических наук, профессор, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, лаборатория структурной биохимии белка, заведующий лабораторией

Защита диссертации состоится 21 марта 2025 г. в 17 ч 30 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

Е-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3355> .

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

Список сокращений

- AKR1C3 – альдокеторедуктаза 1-го семейства, член C3
- ALIX – белок X, взаимодействующий с [продуктом] гена 2, связанного с апоптозом
- CD – кластер дифференцировки
- DAPI – 4,6-диаминидино-2-фенилиндол
- DKK3 – связанный с Диккопфом белок-3
- GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
- HSP70 – белок теплового шока 70 кДа
- KDM1 – лизин-специфическая деметилаза гистонов 1
- IgG – иммуноглобулины класса G
- ISLR – белок суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцином повтор
- LAMA2 – субъединица альфа-2 ламинина
- LTBP-1 – белок, связывающий латентный TGF- β , -1
- MFAP4 – ассоциированный с микрофибриллами гликопротеин-4
- MIF – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов
- NF- κ B – транскрипционный ядерный фактор карра B
- NOV – продукт сверхэкспрессируемого гена нефробластомы
- SDF-1 – фактор стромальных клеток 1
- TGF- β – трансформирующий фактор роста бета
- α SMA – альфа-гладкомышечный актин
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- КС-МСК – тотальная фракция белков секрета МСК
- РФ-МСК – фракция растворимых белковых факторов секрета МСК
- ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. В настоящее время фиброз-ассоциированные заболевания являются причиной почти пятой части всех случаев смертности в мире (Mutsaers et al, 2023). В контексте развития таких заболеваний фиброз представляет собой патологический процесс, при котором здоровая ткань замещается рубцовой,

что способно приводить к утрате тканями и органами своих функций. Ключевым патогенетическим звеном развития фиброза большинства тканей является избыточное образование миофибробластов – клеток, вносящих основной вклад в формирование рубцовой ткани – преимущественно из резидентных фибробластов (Dees et al, 2021). В связи с этим, поиск механизмов регуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты представляет собой важную задачу современной биологии и биомедицины.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) играют важнейшую роль в регуляции и координации всех клеточных процессов, происходящих в строме, при этом значительная часть эффектов МСК обусловлена продукцией ими биологически активных белковых факторов. Показано, что МСК секретируют белки, способные стимулировать ангиогенез и прорастание нейритов, регулировать функционирование иммунных клеток, формировать и ремоделировать внеклеточный матрикс (Kalinina et al, 2015). Данные литературы свидетельствуют о том, что МСК за счёт паракринных механизмов способны также препятствовать избыточному образованию миофибробластов из фибробластов (Basalova et al, 2020), однако роль растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в этом процессе не установлена. В связи с этим, актуальной задачей является исследование роли растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в регуляции процесса дифференцировки фибробластов в миофибробласты, а также изучение механизмов этого влияния.

Цель и задачи работы. Целью работы является установление роли растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в регуляции процессов дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Охарактеризовать фракцию растворимых белковых факторов секрета МСК жировой ткани человека методом протеомного анализа.
2. Установить белки, которыми обогащены фракции секрета МСК жировой ткани, обладающие различной выраженностью антифибротического

эффекта в *in vitro* модели дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

3. Определить сигнальные пути, с которыми способны взаимодействовать белки, выявленные в составе фракций секрета МСК.

4. Проверить влияние фракций секрета МСК на изменение экспрессии генов-мишеней предсказанных сигнальных путей при дифференцировке фибробластов в миофибробласты.

Научная новизна исследования. В настоящей работе впервые был проведён сравнительный протеомный анализ фракций секрета МСК, различающихся по способности препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*, и установлены белки, потенциально вносящие вклад в различие биологических эффектов данных фракций. Обнаружено, что фракция растворимых белковых факторов секрета МСК обогащена регуляторами сигнальных путей Wnt, TGF- β и Notch и что данная фракция подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах. Впервые установлено, что белок DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, необходим для ингибирования данной фракцией канонического сигнального пути Wnt в фибробластах и подавления их дифференцировки в миофибробласты. Впервые установлено, что тотальная фракция секрета МСК активирует сигнальный путь NF- κ B в фибробластах.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В ходе выполнения работы был описан механизм антифибротического действия фракции растворимых белковых факторов секрета МСК, связанный с паракринной регуляцией дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Полученные в данной работе результаты также указывают на необходимость контроля в составе секрета МСК компонентов, активирующих в клетках-мишенях провоспалительные сигнальные пути, что особенно важно при разработке терапевтических подходов с использованием секрета этих клеток. Результаты исследования могут быть использованы

для разработки новых подходов к лечению заболеваний, ключевым звеном патогенеза которых является дифференцировка фибробластов в миофибробласты, таких как фибротические заболевания, а также некоторых заболеваний, связанных с образованием хронических язв.

Методология и методы исследования. Методологические подходы исследования включают в себя анализ существующих данных литературы и степени разработанности темы, формулировку цели исследования, исходя из известных паракринных эффектов МСК в процессах заживления повреждённой ткани, а также постановку задач с учётом обоснованности применения существующих методологических подходов. В диссертационном исследовании использованы методы биохимии и молекулярной биологии, а также клеточной биологии и биоинформатики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фракция секрета МСК человека, обогащенная растворимыми белками, препятствует дифференцировке фибробластов кожи человека в миофибробласты *in vitro* сильнее, чем тотальная фракция секрета.

2. Тотальная фракция секрета МСК обогащена белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB, и при добавлении к фибробластам в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro* активирует NF-κB-зависимый сигнальный путь.

3. Фракция растворимых белков секрета МСК обогащена белками, способными регулировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты посредством влияния на канонический сигнальный путь Wnt. Эта фракция снижает базальный уровень активации канонического сигнального пути Wnt в фибробластах кожи человека в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*.

4. Белок DKK3 в составе фракции растворимых белков секрета МСК вносит значимый вклад в подавление дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*.

Степень достоверности полученных результатов. Научные результаты диссертационного исследования обладают высокой степенью достоверности, что подтверждается достаточной выборкой, воспроизводимостью результатов измерений, а также согласованностью результатов, полученных с использованием различных методов.

Апробация работы. Апробация работы была проведена на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В.Ломоносова. Результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, включая The 45th FEBS Congress, V Национальный конгресс по регенеративной медицине, Международную научную конференцию студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», XXXIV зимнюю молодежную научную школу "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 12-ю международную конференцию "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", 3-ю международную конференцию "Системная биология и системная физиология: регуляция сложных биологических систем", Международную научную конференцию молодых ученых в рамках Площадки открытых коммуникаций OpenBio-2024, Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Биохимия человека 2024». Доклад по результатам работы получил II место в секции «Биохимические основы фармакологии» на конференции «Биохимия человека 2024»; доклад с основными результатами работы признан лучшим в секции “Фундаментальная медицина” конференции OpenBio-2024.

Личный вклад автора. Автору принадлежит основная роль в анализе данных литературы, формулировке целей и постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке полученных данных, а также в подготовке публикаций по теме исследования.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения

полученных результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 105 машинописных листах, содержит 28 рисунков, 4 таблицы и 166 библиографических ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали линию иммортализованных МСК жировой ткани человека (hTERT ASC52telo, ATCC) и первичные культуры фибробластов кожи человека из коллекции биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В.Ломоносова, ID коллекции: MSU_FB (<https://human.depo.msu.ru>).

Из кондиционированной среды МСК проводили **выделение фракций секретома МСК** методом ультрафильтрации с использованием центрифужных фильтров с пределом эксклюзии 10 кДа (JetBiofil, КНР) и 300 кДа (Sartorius, Германия). Тотальную фракцию белков секретома МСК (КС-МСК) получали, концентрируя белки кондиционированной среды на 10 кДа фильтре. Фракцию растворимых белковых факторов секретома МСК (РФ-МСК) получали в два этапа: вначале из кондиционированной среды на 300 кДа фильтре удаляли фракцию, обогащенную внеклеточными везикулами, после чего полученный фильтрат концентрировали на 10 кДа фильтре. В ходе выделения фракции белков секретома концентрировали в 200-300 раз.

Характеристику фракций секретома МСК проводили с использованием следующих методов:

- 1) методом **анализа траекторий наночастиц** на приборе ZetaView (Particle Metrix, Германия) определяли размер и количество частиц (включая внеклеточные везикулы) во фракциях секретома МСК;
- 2) методом **денситометрии** белковых полос после денатурирующего электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лэммли и окрашивания геля раствором Coomassie G-250 оценивали концентрацию белка во фракциях секретома МСК;

3) методом **вестерн-блоттинга** с использованием антител, специфичных к белкам CD63, CD9, CD81 (BioLegend, США), ALIX, бета-тубулину, коллагену I типа, коллагену IV типа, ламинину, фибронектину (Abscam, США), винкулину, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе (Sigma, США), HSP70 (Bioss, Германия) оценивали содержание указанных белков в образцах фракций секрета МСК;

4) методом **полуколичественного протеомного анализа** сравнивали **белковый состав фракций КС-МСК и РФ-МСК**. Образцы триптических пептидов готовили аналогично методу, описанному в работе (Nowacki et al 2015), очистку пептидов проводили с использованием картриджей Oasis HLB (Waters, США) согласно рекомендациям производителя. Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на базе ЦКП Сколково на приборах Ultimate 3000nano UPLC и TIMS-TOF-PRO. Полученные данные анализировали в ПО MaxQuant (Tyanova et al 2016), автоматическую аннотацию результатов протеомного анализа проводили с использованием ресурса gProfiler (Raudvere et al 2019).

Для **моделирования дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*** к культуре фибробластов после депривирования добавляли рекомбинантный TGF- β 1 человека (R&D, США) до концентрации 10 нг/мл. Для исследования эффекта фракций секрета МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты одновременно с внесением рекомбинантного TGF- β 1 к клеткам добавляли концентрированную фракцию КС-МСК либо РФ-МСК до пятикратной концентрации. В качестве контроля использовали культуру фибробластов, к которой после депривирования добавляли бессывороточную среду ДМЕМ. После индукции миофибробластной дифференцировки клетки культивировали:

- для оценки содержания бета-катенина и NF- κ B в ядре – в течение часа;
- для измерения экспрессии транскрипционных мишеней сигнальных каскадов методом ОТ-ПЦР – в течение шести часов;

- для оценки эффективности дифференцировки фибробластов в миофибробласты – в течение 96 часов.

Для **оценки эффективности миофибробластной дифференцировки фибробластов** проводили окрашивание клеток с использованием антител, специфичных к α SMA (ab32575; Abcam), флуоресцентно меченных антител козы к иммуноглобулинам кролика (A11034, Invitrogen, США) и флуоресцентно меченного фаллоидина (A12381; Molecular probe, США). Для визуализации ядер проводили окрашивание с использованием DAPI (D9542, Sigma). Изображения получали с использованием инвертированного микроскопа с флуоресцентным модулем DMi8 (Leica, Германия) и камерой DFC 7000 T (Leica, Германия).

Влияние фракций секрета на активацию сигнальных путей фибробластов в модели миофибробластной дифференцировки исследовали:

1) методом **ПЦР в реальном времени** с использованием праймеров на транскрипционные мишени канонического сигнального пути TGF- β (*ACTA2*, *COL1*, *FN1*, *VCAN*), канонического сигнального пути Notch (*HES1* и *JAG1*), канонического сигнального пути Wnt (*AXIN2*, *CCND1*, *FZD8* и *WNT3A*), сигнального пути NF- κ B (*CXCL1*, *CXCL2*, *COX2*, *IL1B*, *IL6*). Для этого проводили **выделение тотальной РНК** из культуры фибробластов методом фенол-хлороформной экстракции, **обратную транскрипцию** с использованием коммерческого набора MMLV RT Kit (Евроген, РФ), **ПЦР в реальном времени** с использованием коммерческого реагента qPCRmix-*HS* SYBR+LowROX (Евроген, РФ). Длину продуктов ПЦР анализировали методом электрофореза в 3% агарозном геле. Уровень экспрессии гена определяли, рассчитывая по результатам ПЦР величину Δ Ct (разницу пороговых циклов) – разницу значений Ct для гена интереса и нормировочного гена (*36B4*).

2) методом **вестерн-блоттинга**, оценивая содержание в ядерной фракции фибробластов бета-катенина (внутриклеточного посредника канонического сигнального пути Wnt) и NF- κ B. Для этого проводили **выделение ядерной**

фракции из фибробластов аналогично методу, описанному в работе (Longobardi and Blasi, 2003), **измерение концентрации белка** в полученных фракциях с использованием реактива Бредфорда и анализировали содержание белков в образцах методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к белкам NF-κB (субъединице p65) (CloudClone, КНР), бета-катенину (Sigma, США), GAPDH (Cell Signaling, США) и лизинового деметилазе гистонов KDM1 (маркер ядерной фракции; Abcam, США). Для расчёта содержания анализируемых белков в ядерной фракции в качестве нормировочного контроля использовали белок KDM1.

Для оценки вклада белка DKK3 в реализацию эффектов РФ-МСК проводили деплецию (удаление) DKK3 из РФ-МСК методом **иммунопреципитации** с использованием антител, специфичных к DKK3 человека (CloudClone, КНР).

Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО Microsoft Excel и GraphPad Prism. Для выборок с $n \geq 11$ проводили проверку нормальности распределения данных с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для характеристик с нормальным распределением рассчитывали арифметическое среднее и стандартное отклонение; для проверки наличия статистически значимых различий между экспериментальными группами применяли анализ ANOVA, далее при сравнении групп использовали t-критерий Стьюдента. Для характеристик с ненормальным распределением рассчитывали медиану и межквартильный размах (Q1-Q3); для проверки наличия статистически значимых различий между экспериментальными группами применяли критерий Краскела-Уоллиса, при сравнении групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Уровнем статистической значимости считали значение $p < 0,05$. Для оценки сходимости данных протеомного анализа и результатов, полученных методом вестерн-блоттинга, рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

Разделение на фракции растворимых белков и внеклеточных везикул влияет на способность секретомы МСК подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты *in vitro*

Для исследования механизмов паракринного действия МСК на процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты мы использовали фракции белков секретомы МСК, полученные методом ультрафильтрации: тотальную фракцию КС-МСК, а также выделяемую из неё при отделении внеклеточных везикул фракцию РФ-МСК. Схема получения РФ-МСК из КС-МСК приведена на рис. 1 А.

Методом вестерн-блоттинга мы оценили содержание белков, характерных для везикул (мембранных белков – ALIX, CD9, CD63, CD81 – и белков, находящихся внутри везикул – HSP70 и бета-тубулина), в выделяемой фракции РФ-МСК, а также в отделяемой при этом фракции, обогащенной внеклеточными везикулами. Полученные результаты (рис. 1 Б) подтвердили, что используемая нами методика фракционирования позволяет эффективно удалить везикулярные белки при выделении фракции РФ-МСК, обогатив, таким образом, последнюю растворимыми белками секретомы. Методом анализа траекторий наночастиц мы показали, что целостность везикул, содержащихся в кондиционированной среде МСК, в значительной степени сохраняется при процедуре отделения фракции, обогащенной внеклеточными везикулами, от РФ-МСК (рис. 1 В), что важно для предотвращения загрязнения РФ-МСК содержимым везикул. Таким образом, нами отработана методика получения фракции РФ-МСК, изучение состава и биологических эффектов которой позволит судить о механизмах паракринного действия МСК человека, связанных с продукцией растворимых секреторируемых белков, но не с продукцией внеклеточных везикул.

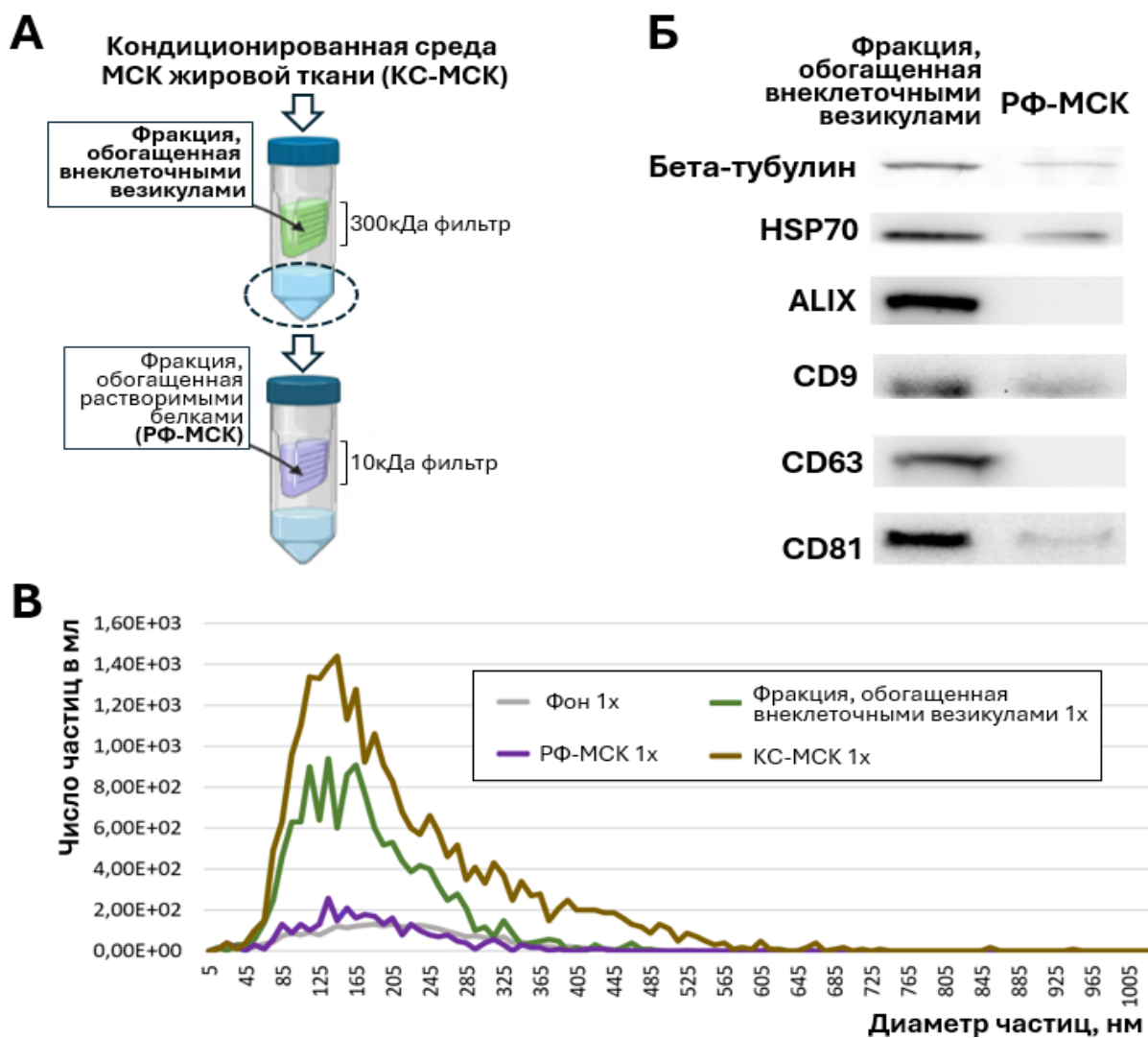


Рис. 1. Оценка эффективности избавления от внеклеточных везикул при выделении фракции РФ-МСК из кондиционированной среды МСК. **А.** Схема эксперимента по выделению фракции РФ-МСК. **Б.** Вестерн-блоттинг фракций, полученных в результате выделения РФ-МСК, с иммунохимическим окрашиванием на белки внеклеточных везикул. **В.** Распределение частиц по размеру и количеству во фракциях, получаемых при выделении РФ-МСК из кондиционированной среды МСК. Результаты анализа траекторий наночастиц. Фон – кондиционированная среда, собранная после кондиционирования МСК в течение 30 минут.

Оценку влияния РФ-МСК и КС-МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты мы проводили в *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки (рис. 2). Накопление α SMA и встраивание его в стресс-фибриллы (на рис. 2 стресс-фибриллы визуализированы как тяжи желтого цвета, образующегося при наложении красного и зеленого псевдоцветов) является характерным для фенотипа миофибробластов.

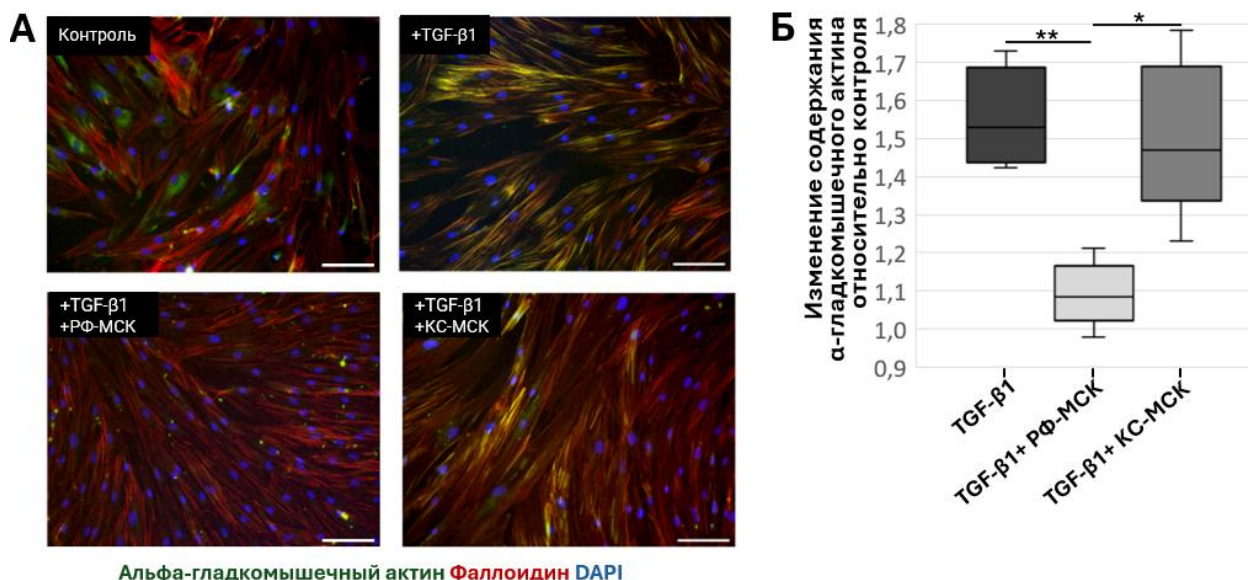


Рис. 2. Влияние фракций РФ-МСК и КС-МСК на *in vitro* дифференцировку фибробластов в миофибробласты. **А.** Иммуноцитохимическое окрашивание на α SMA, окрашивание фибриллярного актина фаллоидином и окрашивание ядер DAPI. Длина масштабного отрезка - 50 мкм. **Б.** Изменение содержания α SMA в фибробластах относительно контроля, рассчитанное по результатам иммуноцитохимического окрашивания. n=9. *p<0,05, **p<0,01.

Согласно полученным результатам (рис. 2 А, Б), РФ-МСК эффективно предотвращает дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а КС-МСК не обладает настолько выраженным эффектом. Для установления причин наблюдаемых различий мы провели сравнительный протеомный анализ данных фракций.

Фракция растворимых белковых факторов секрета МСК обогащена белками, способными регулировать канонические сигнальные пути TGF- β , Wnt и Notch

По итогам трёх независимых экспериментов по полуколичественному протеомному анализу РФ-МСК и КС-МСК в образцах обеих фракций нами идентифицировано 518 белков, 79,5% из которых (412 из 518) аннотированы в базе данных Gene Ontology как локализованные во внеклеточном пространстве либо во внеклеточном матриксе, т.е. являются секретируемыми (рис. 3 А). 89,8% секретируемых белков (370 из 412 белков) обнаруживаются в обеих фракциях секрета (рис. 3 Б).

Мы выполнили также поиск белков, которыми фракции обогащены в два и более раза относительно друг друга. Согласно полученным результатам, КС-МСК обогащена относительно РФ-МСК 133 белками, а фракция РФ-МСК обогащена относительно КС-МСК 38 белками (рис. 3 В). Валидацию результатов полуколичественного протеомного анализа мы провели методом вестерн-блоттинга (рис. 3 Г).

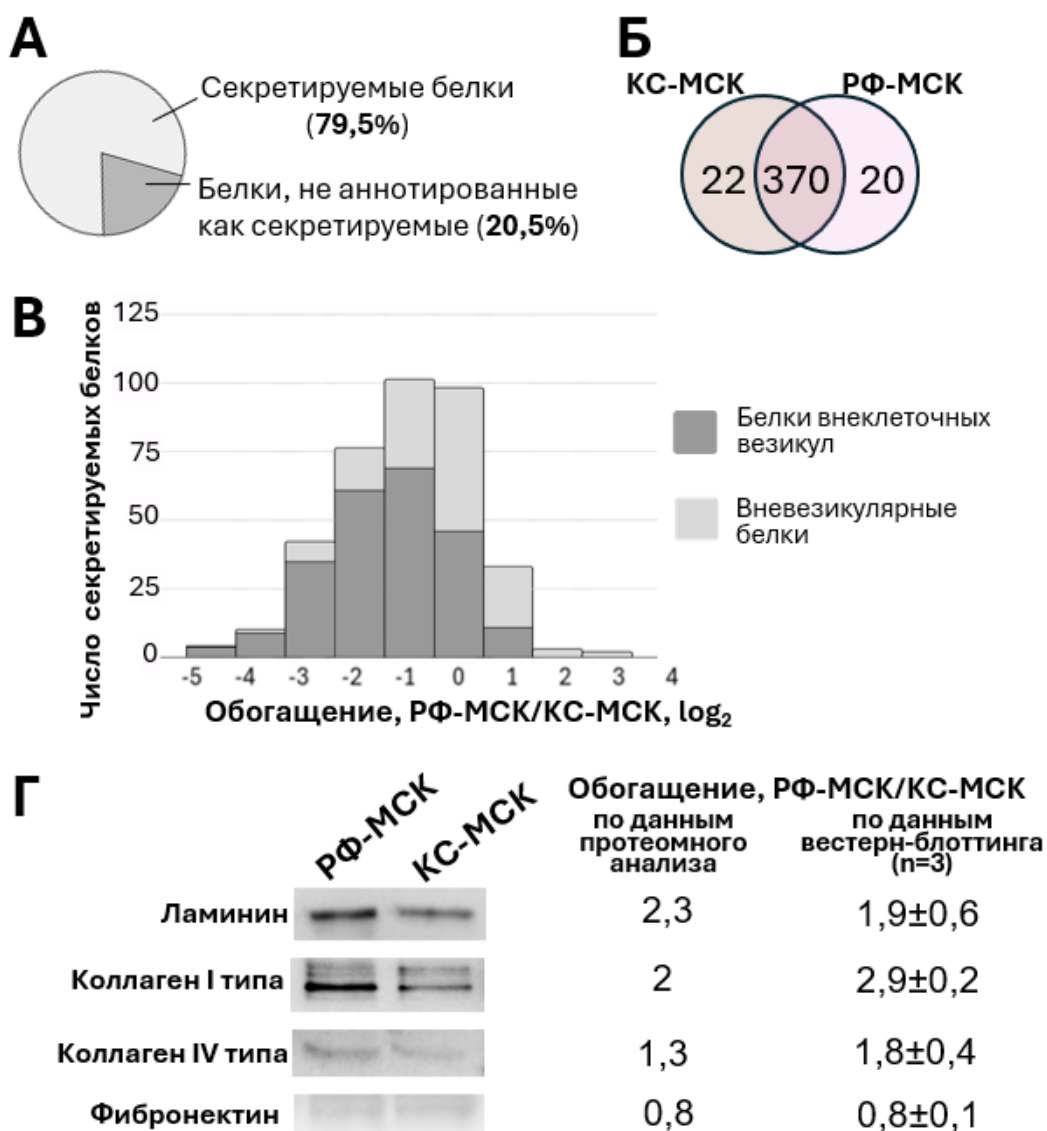


Рис. 3. Характеристика белкового состава фракций секретома МСК, выполненная методом протеомного анализа. **А.** Содержание секретируемых белков среди белков, обнаруженных в РФ-МСК и КС-МСК **Б.** Диаграмма Венна секретируемых белков, идентифицированных в КС-МСК и РФ-МСК. **В.** Распределение секретируемых белков по обогащению ими РФ-МСК относительно КС-МСК (РФ-МСК/КС-МСК). **Г.** Оценка содержания высоко представленных белков секретома МСК в РФ-МСК и КС-МСК методом вестерн-блоттинга.

Далее мы приступили к выяснению потенциальных механизмов действия белков фракции РФ-МСК, которая способна эффективно препятствовать миофибробластной дифференцировке *in vitro*. В качестве потенциальных эффекторов нами рассматривались те белки, которыми РФ-МСК обогащена относительно КС-МСК. Результаты протеомного анализа позволили обнаружить 58 таких белков: 20 белков, детектированных только в РФ-МСК (рис. 3 Б), а также 38 белков, содержание которых в РФ-МСК превышало их содержание в КС-МСК в два и более раза. Анализ литературы позволил выявить в данном наборе белков потенциальные регуляторы канонических сигнальных путей TGF- β , Wnt и Notch (Таблица 1). Каждый из перечисленных сигнальных путей регулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты.

Таблица 1. Участие секретируемых белков, которыми РФ-МСК обогащена относительно КС-МСК, в регуляции канонических сигнальных путей TGF- β , Wnt и Notch, по данным литературы. РФ-МСК/КС-МСК – обогащение РФ-МСК относительно КС-МСК.

Название белка	Ген	РФ-МСК/ КС-МСК, раз	Потенциально регулирует сигнальный путь		
			TGF- β	Wnt	Notch
Белок 3 семейства Диккопф	<i>DKK3</i>	2,1		✓ (Snelling et al, 2016)	
Белок суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцином повтор	<i>ISLR</i>	.*		✓ (Zhang et al, 2018)	
Ламинин, субъединица альфа-2	<i>LAMA2</i>	2		✓ (Yuzuriha et al, 2021)	
Белок, связывающий латентный TGF- β , -1	<i>LTBP1</i>	3,7	✓ (Robertson et al, 2015)		
Белковый продукт сверхэкспрессируемого гена нефробластомы	<i>NOV</i>	.*			✓ (Suresh et al, 2013)
Тенасцин С	<i>TNC</i>	2,2	✓ (Aubert et al, 2021)		

* – указанный белок не обнаружен в КС-МСК

Фракция растворимых белков секрета МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах

На предыдущих этапах работы мы установили, что РФ-МСК обогащена относительно КС-МСК набором белков, способных влиять на дифференцировку фибробластов в миофибробласты посредством взаимодействия с компонентами канонических сигнальных путей TGF- β , Wnt и Notch. Это позволило предположить, что РФ-МСК может отличаться от КС-МСК по влиянию на указанные сигнальные пути в фибробластах. Для проверки данного предположения мы оценили способность РФ-МСК и КС-МСК регулировать уровень активации канонических сигнальных путей TGF- β , Wnt и Notch в используемой нами модели *in vitro* дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Согласно полученным результатам, добавление РФ-МСК (так же, как и КС-МСК) к фибробластам не приводило к значимому изменению в них экспрессии транскрипционных мишеней канонических сигнальных путей TGF- β и Notch спустя шесть часов (данные не приведены). При этом добавление РФ-МСК, но не КС-МСК, приводило к значимому снижению экспрессии одного из генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt – гена *AXIN2* (рис. 4 А), экспрессия которого отражает уровень активации данного сигнального пути.

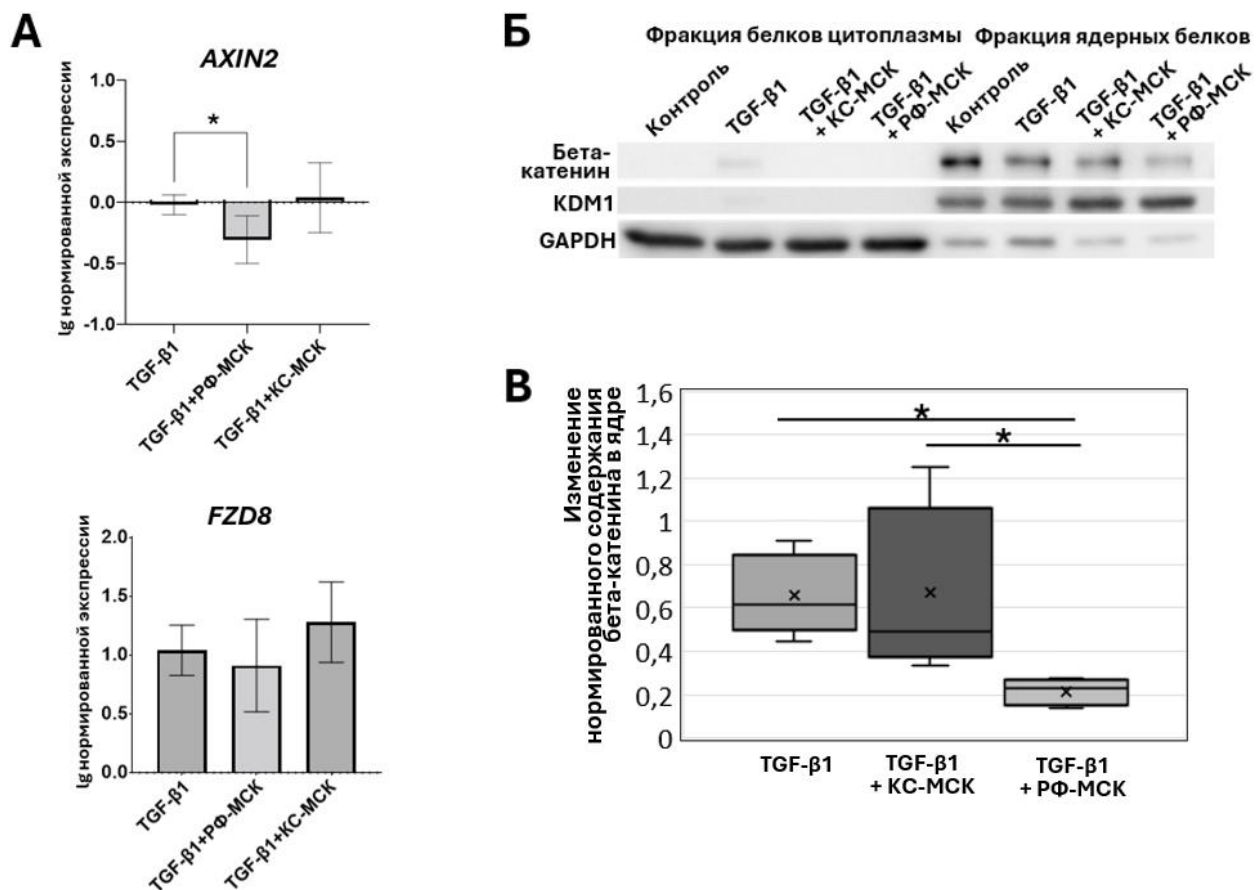


Рис. 4. Фракция растворимых белков секрета МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах. **А.** Влияние КС-МСК и РФ-МСК на экспрессию генов-мишеней канонического сигнального пути Wnt в фибробластах. Изменение уровня экспрессии генов относительно контроля, измеренное методом ОТ-ПЦР. n=11. *p<0,05. **Б, В.** Влияние КС-МСК и РФ-МСК на содержание бета-катенина в ядерной фракции фибробластов. Вестерн-блоттинг. **Б.** Содержание бета-катенина во фракции ядерных белков фибробластов. **В.** Изменение нормированного на KDM1 содержания бета-катенина в ядре относительно контроля. n=5. *p<0,05, **p<0,1.

Методом вестерн-блоттинга мы подтвердили, что добавление РФ-МСК, но не КС-МСК, приводит к значимому снижению содержания бета-катенина – посредника канонического сигнального пути Wnt – в ядерной фракции фибробластов (рис. 4 Б, В). Таким образом, компоненты РФ-МСК снижают в фибробластах уровень активации канонического сигнального пути Wnt.

Белок DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов секретома МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты

В ходе выполнения данной работы нами установлено, что РФ-МСК, в отличие от КС-МСК: а) эффективно препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты; б) обогащена секретируемыми белками DKK3, ISLR и LAMA2, способными регулировать канонический сигнальный путь Wnt, регулирующий дифференцировку фибробластов в миофибробласты и в) подавляет активацию канонического сигнального пути Wnt в фибробластах. Согласно данным литературы, секретируемые белки ISLR и LAMA2 являются активаторами канонического сигнального пути Wnt в фибробластах (Zhang et al, 2018; Yuzuriha et al, 2021). Относительно влияния экзогенно добавляемого белка DKK3 на канонический сигнальный путь Wnt в литературе имеются как данные, свидетельствующие в пользу того, что DKK3 способен ингибировать данный сигнальный путь (Nakamura et al, 2010; Snelling et al, 2016; Xu et al, 2017), так и данные, свидетельствующие, что DKK3 может выступать в качестве его (ко)активатора (Nakamura et al, 2007; Nakamura et al, 2010). Мы исследовали вклад DKK3 в реализацию эффекта РФ-МСК, выражающегося в подавлении канонического сигнального каскада Wnt в фибробластах. Для этого методом иммунопреципитации мы обеднили РФ-МСК по белку DKK3 (эффективность обеднения проверили методом вестерн-блоттинга; рис. 5 А) и оценили изменение эффекта РФ-МСК при её обеднении по белку DKK3 на уровень активации канонического сигнального пути Wnt в фибробластах.

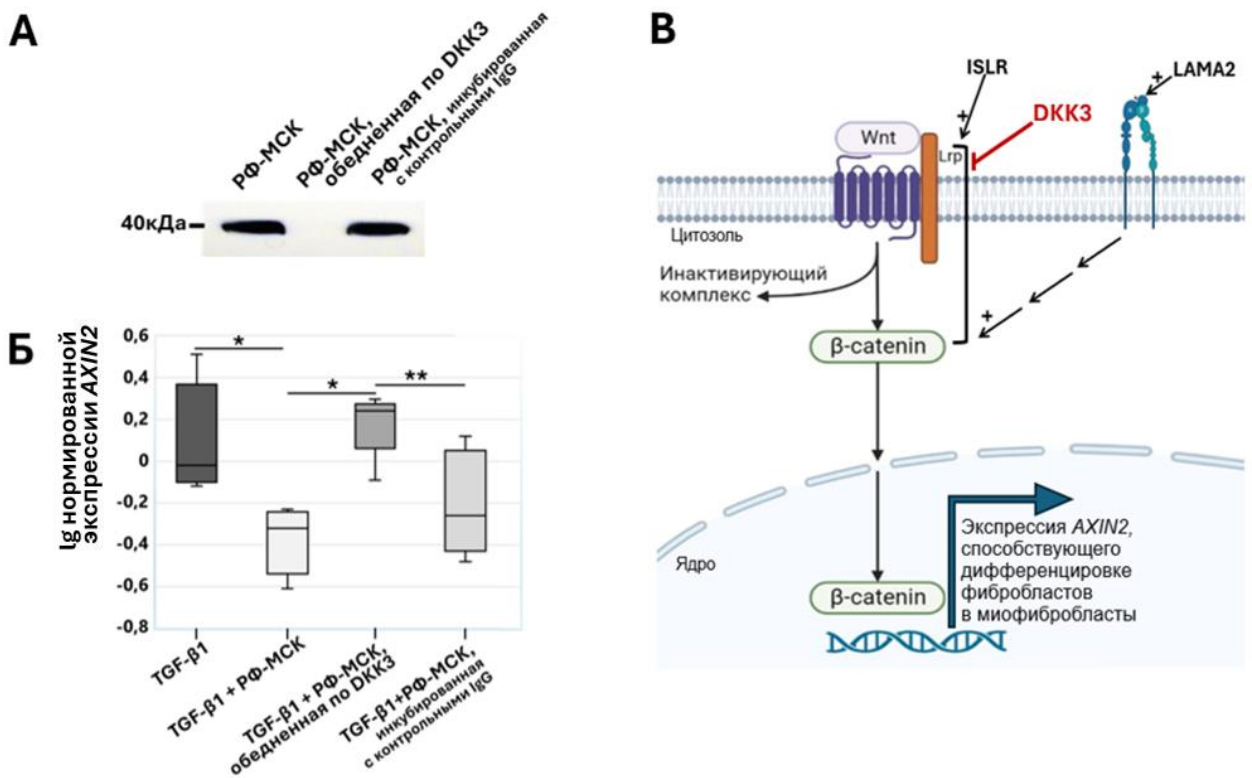


Рис. 5. Обеднение РФ-МСК по белку DKK3 значительно снижает способность данной фракции подавлять канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах. **А.** Оценка эффективности удаления (деплеции) DKK3 из фракции РФ-МСК. Вестерн-блоттинг с иммунохимическим окрашиванием с использованием антител, специфичных к DKK3 человека. **Б.** Влияние РФ-МСК, обедненной по белку DKK3, на экспрессию гена *AXIN2* в фибробластах. Приведены значения изменения нормированной экспрессии гена *AXIN2* в фибробластах относительно контроля (фибробласты без добавления TGF-β1). $n=5$. * $p<0,05$, ** $p<0,1$. **В.** Схема регуляции канонического сигнального пути Wnt белками, которыми обогащена РФ-МСК.

Согласно полученным результатам (рис. 5 Б), обеднение РФ-МСК по белку DKK3 значительно снижает способность данной фракции подавлять базальный уровень экспрессии гена *AXIN2* в фибробластах. Предполагаемая схема влияния белков, которыми обогащена РФ-МСК, на канонический сигнальный путь Wnt, способствующий дифференцировке фибробластов в миофибробласты, приведена на рис. 5 В.

Наконец, аналогичным образом мы оценили вклад DKK3 в реализацию эффекта РФ-МСК на процесс миофибробластной дифференцировки *in vitro*. Согласно полученным результатам (рис. 6), РФ-МСК, обедненная по белку

DKK3, в значительной степени теряет способность препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты.

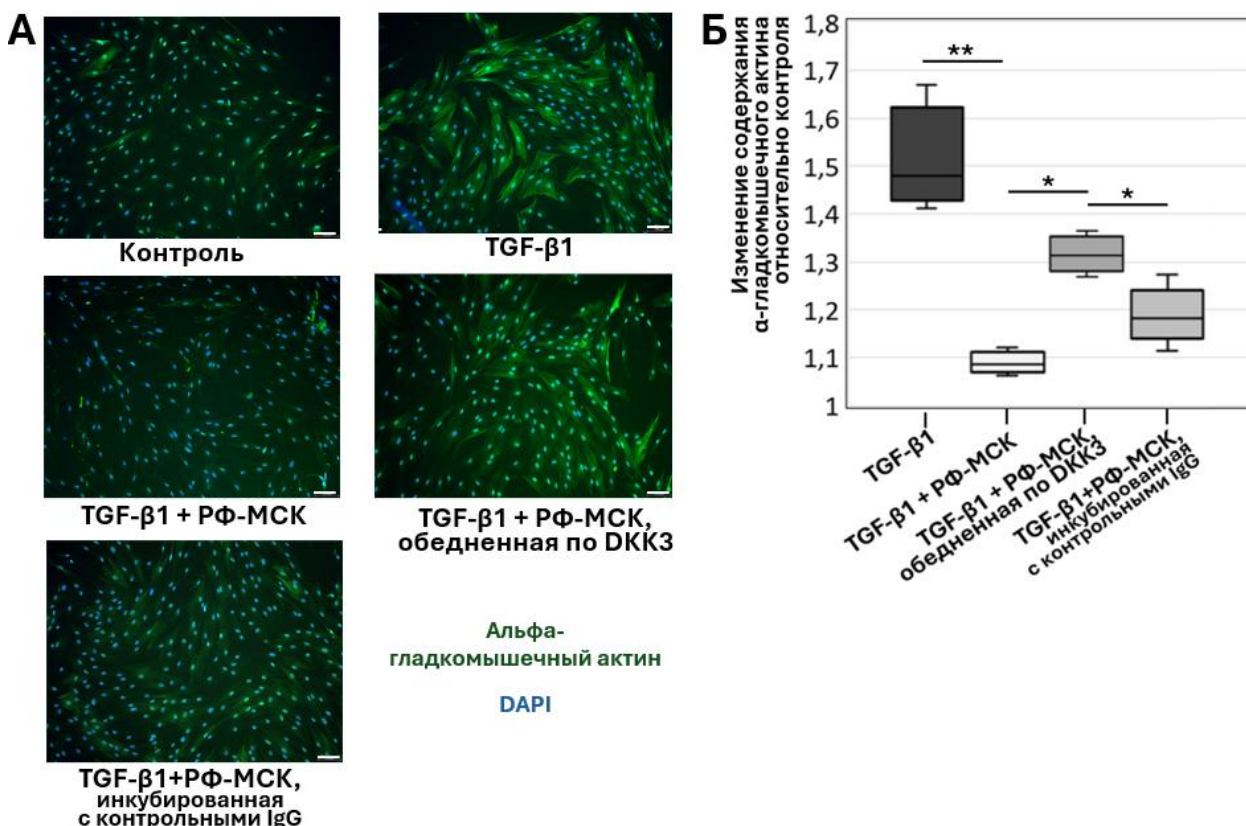


Рис. 6. Влияние РФ-МСК, обедненной по белку DKK3, на эффективность *in vitro* дифференцировки фибробластов в миофибробласты. **А.** Иммуноцитохимическое окрашивание на α SMA (зелёный) и окрашивание ядер DAPI (синий). Длина масштабного отрезка – 50 мкм. **Б.** Изменение содержания α SMA в фибробластах относительно контроля, рассчитанное по результатам иммуноцитохимического окрашивания. $n=5$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Таким образом, DKK3 в составе РФ-МСК вносит существенный вклад в подавление дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*, причем механизм действия DKK3 в данной модели связан с подавлением канонического сигнального каскада Wnt в фибробластах.

Тотальная фракция белков секретома МСК обогащена белками, активирующими сигнальный путь NF- κ B

В рамках нашей работы мы установили, что тотальная фракция белков секретома (КС-МСК) демонстрирует сниженную способность препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro* по сравнению с выделяемой из неё фракцией растворимых белковых факторов секретома

МСК (РФ-МСК). Предположительно, КС-МСК может быть обогащена относительно РФ-МСК некоторыми белками, стимулирующими дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Чтобы проверить данное предположение, среди общего набора белков, которыми, по нашим данным, КС-МСК обогащена относительно РФ-МСК, мы провели поиск потенциальных регуляторов миофибробластной дифференцировки. По результатам анализа литературы нами обнаружено четыре белка, способные активировать в фибробластах провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB и тем самым способствовать их дифференцировке в миофибробласты: два секретлируемых белка – SDF-1 и MIF, а также два белка, способные секретироваться клетками в составе внеклеточных везикул – AKR1C3 и MFAP4. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Участие секретлируемых белков, которыми КС-МСК обогащена относительно РФ-МСК, в активации транскрипционного фактора NF-κB, по данным литературы. КС-МСК/РФ-МСК – обогащение КС-МСК относительно РФ-МСК.

Название белка	Ген	КС-МСК/ РФ-МСК, раз	Ссылка на источник
Альдокеторедуктаза 1-го семейства, член С3	<i>AKR1C3</i>	2,8	(Zhou et al, 2021)
Фактор стромальных клеток (SDF-1)	<i>CXCL12</i>	3,5	(Kucia et al, 2003)
Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов	<i>MIF</i>	16,9	(Lantner et al, 2007; Li et al, 2023)
Ассоциированный с микрофибриллами гликопротеин-4	<i>MFAP4</i>	13,1	(Pan et al, 2020)

На основании данных литературы можно предположить механизм активации NF-κB в фибробластах каждым из указанных белков (рис. 8). Так, запуск внутриклеточной сигнализации белком MIF, опосредуемый рецептором CD74, приводит к высвобождению NF-κB из комплекса с белками IκB и его транслокации в ядро, где NF-κB регулирует экспрессию

генов. Запуск внутриклеточной сигнализации белком SDF-1, опосредуемый рецептором CXCR4, может активировать NF-κB аналогичным образом. Белки AKR1C3 и MFAP4, предположительно, проникают в цитоплазму клеток-мишеней посредством эндоцитоза внеклеточных везикул, содержащих данные белки, и также способствуют активации NF-κB за счёт высвобождения его из комплекса с белками IκB.

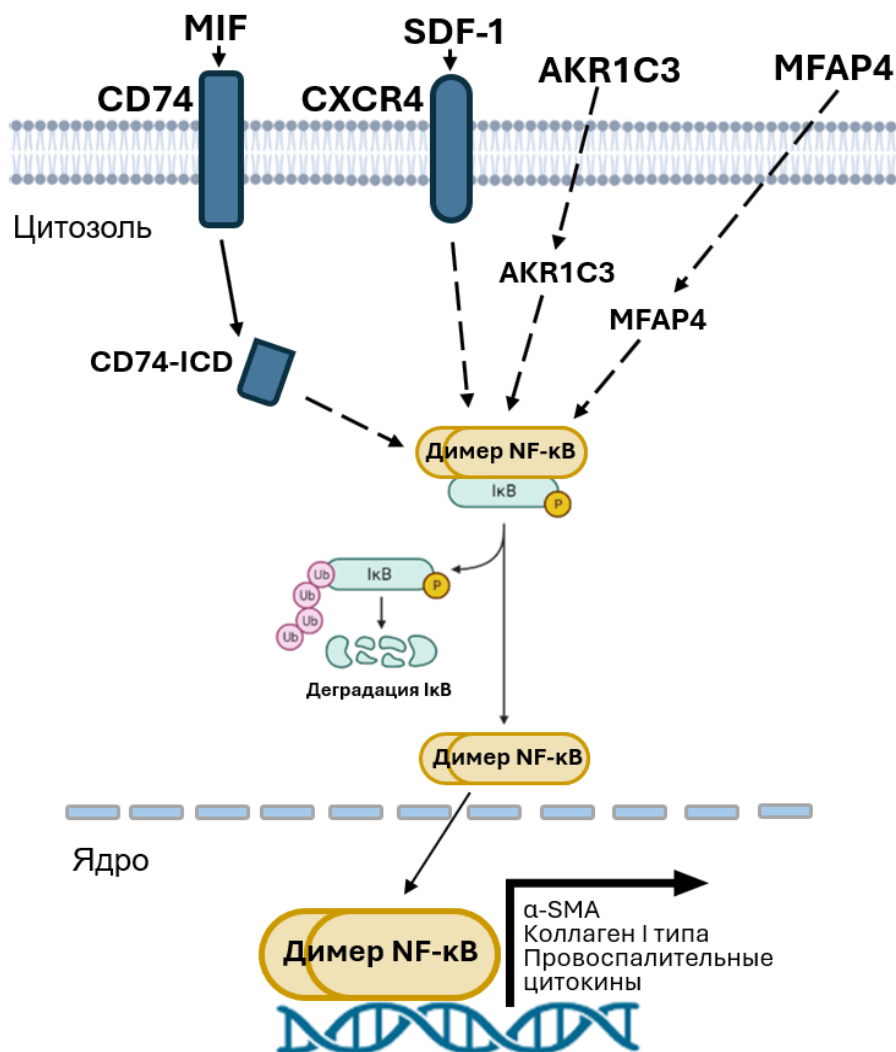


Рис. 7. Предполагаемая схема активации NF-κB в фибробластах под действием компонентов тотальной фракции белков секрета МСК. Димер NF-κB – гетеродимер p65/p50; в случае запуска внутриклеточной сигнализации белком MIF возможна активация гомодимера p65/p65.

Тотальная фракция белков секрета МСК активирует NF-κB в фибробластах

Мы оценили способность фракций секрета МСК активировать NF-κB в фибробластах кожи человека в модели миофибробластной дифференцировки. Согласно полученным результатам, КС-МСК, но не РФ-МСК, активирует экспрессию генов-мишеней NF-κB в культуре фибробластов (рис. 8 А).

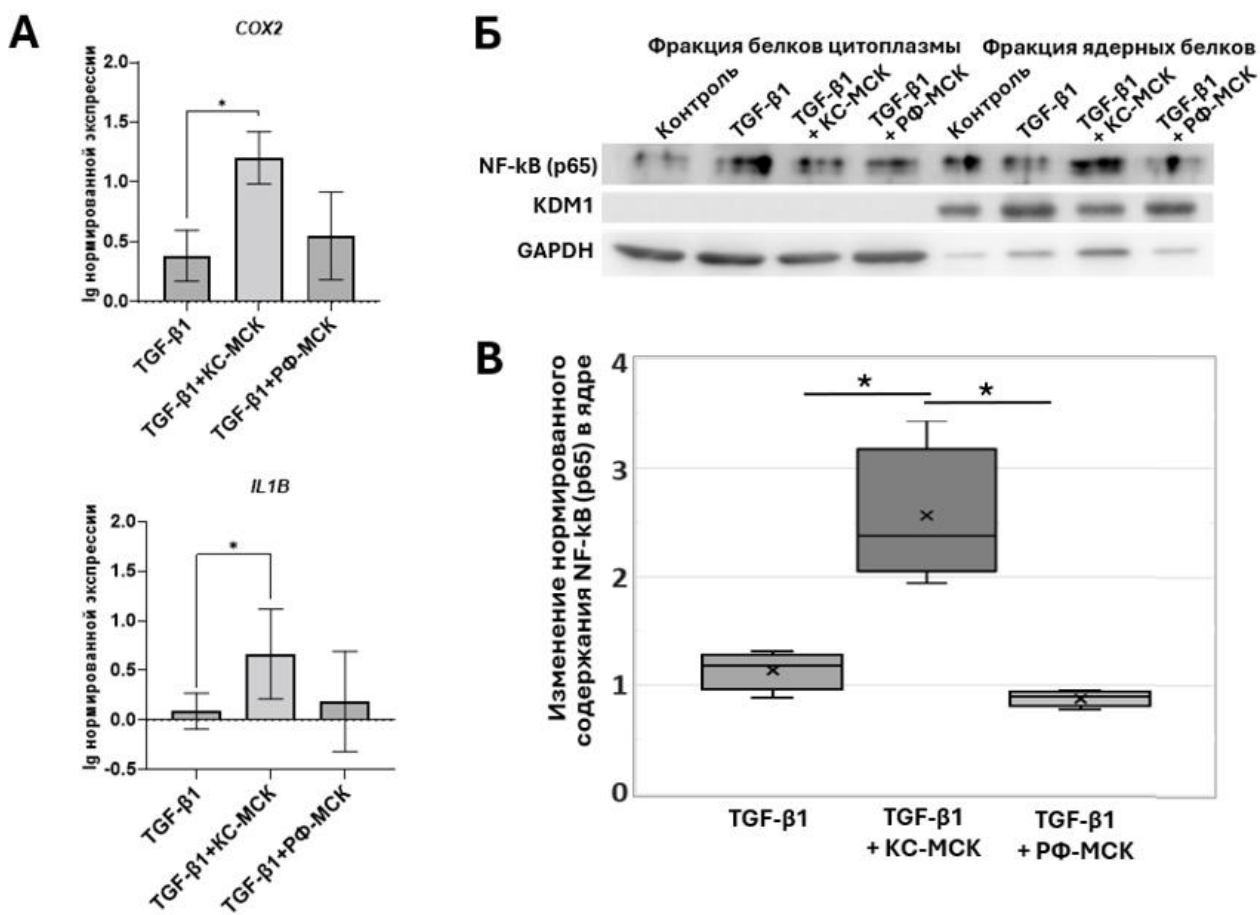


Рис. 8. А. Влияние КС-МСК и РФ-МСК на экспрессию генов-мишеней транскрипционного фактора NF-κB в фибробластах. Изменение уровня экспрессии генов относительно контроля, измеренное методом ОТ-ПЦР. n=13. *p<0,05. Б, В. Влияние КС-МСК и РФ-МСК на содержание NF-κB (субъединицы p65) в ядерной фракции фибробластов. Вестерн-блоттинг. Б. Содержание NF-κB (p65) во фракции ядерных белков фибробластов. В. Изменение нормированного на KDM1 содержания NF-κB (p65) в ядре относительно контроля (культура фибробластов без добавления TGF-β1). n=5. *p<0,05.

Методом вестерн-блоттинга мы подтвердили, что добавление КС-МСК, но не РФ-МСК, приводит к возрастанию содержания в ядре фибробластов NF-κB (субъединицы p65) (рис. 8 Б, В). Таким образом, добавление КС-МСК к фибробластам кожи человека активирует сигнальный путь NF-κB в этих клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе в ходе изучения действия белков, секретлируемых МСК, на дифференцировку фибробластов в миофибробласты, нами получены результаты, которые можно представить в виде следующей схемы (рис. 9). Фракция растворимых белковых факторов, выделенная из тотальной фракции секрета МСК, сильнее подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты, чем исходная тотальная фракция секрета. Мы показали, что фракция растворимых белковых факторов при выделении из тотальной фракции секрета МСК обогащается белками, способными взаимодействовать с компонентами канонического сигнального пути Wnt – в частности, белком DKK3. Нами продемонстрировано, что именно фракция растворимых белковых факторов секрета МСК подавляет канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах и что данный эффект определяется содержанием белка DKK3 в составе данной фракции. Наконец, мы показали, что наличие белка DKK3 в составе фракции растворимых белковых факторов секрета МСК необходимо для того, чтобы эта фракция эффективно препятствовала дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*.

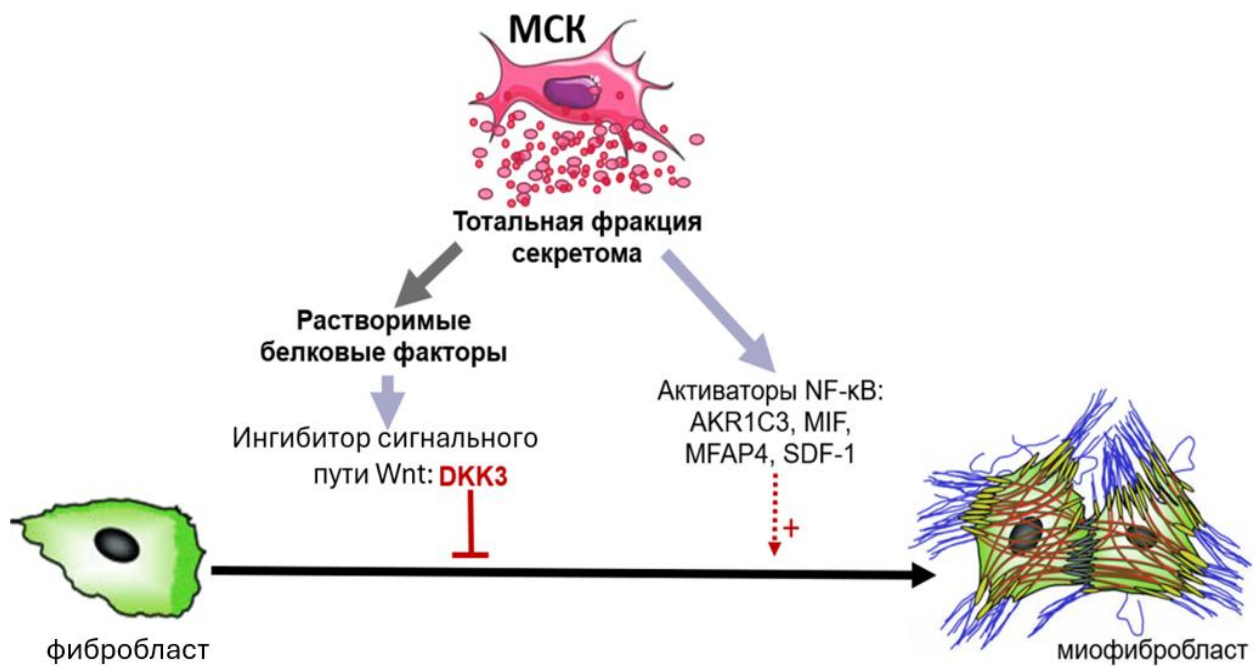


Рис. 9. Предположительные белковые медиаторы регуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты под действием фракций секрета МСК человека.

Мы также исследовали возможные причины того, почему тотальная фракция секрета МСК препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro* слабее, чем выделенная из неё фракция растворимых белковых факторов. Нами показано, что тотальная фракция секрета обогатена относительно фракции растворимых белковых факторов белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB, и при добавлении к фибробластам активирует NF-κB-зависимый сигнальный путь в *in vitro* модели миофибробластной дифференцировки. Мы предполагаем, что наличие в составе тотальной фракции секрета МСК белков, активирующих NF-κB, препятствует эффективному подавлению данной фракцией дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

ВЫВОДЫ

1. Тотальная фракция секретомы МСК человека препятствует дифференцировке фибробластов кожи человека в миофибробласты *in vitro* слабее, чем фракция секретомы МСК человека, обогащенная растворимыми белками.

2. По данным сравнительного протеомного анализа тотальная фракция секретомы МСК обогащена белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB. Показана способность данной фракции запускать NF-κB-зависимый сигнальный путь в фибробластах кожи в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*.

3. По данным сравнительного протеомного анализа фракция растворимых белков секретомы МСК обогащена белками, способными взаимодействовать с компонентами канонических сигнальных путей TGF-β, Wnt, а также Notch.

4. Добавление фракции растворимых белков секретомы МСК к фибробластам кожи человека снижает в них базальный уровень активации канонического сигнального пути Wnt в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*.

5. Белок DKK3, взаимодействующий с компонентами канонического сигнального пути Wnt, в составе фракции секретомы МСК, обогащенной растворимыми белками, снижает уровень экспрессии гена *AXIN2* и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*.

Список публикаций по теме диссертации в рецензируемых изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science:

1. **Kulebyakina M.**, Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K., Klychnikov O., Efimenko A. Balance between pro- and antifibrotic proteins in mesenchymal stromal cell secretome fractions revealed by proteome and cell subpopulation analysis //

International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25, №1. – P. 290. IF WoS (JIF) = 4.9 (1,71/1,36)¹.

2. Eremichev R., **Kulebyakina M.**, Alexandrushkina N., Nimiritsky P., Basalova N., Grigoryeva O., Egiazaryan M., Dyikanov D., Tkachuk V., Makarevich P. Scar-free healing of endometrium: Tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – V. 9. – P.616893. IF WoS (JIF) = 4.6 (1.92/0.26).

3. Grigorieva O., Basalova N., Dyachkova U., Novoseletskaia E., Vigovskii M., Arbatskiy M., **Kulebyakina M.**, Efimenko A. Modeling the profibrotic microenvironment in vitro: Model validation // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – V. 733. – P. 150574. IF WoS (JIF) = 2.5 (1/0,1).

4. Grigorieva O., Vigovskiy M., Dyachkova U., Basalova N., Aleksandrushkina N., **Kulebyakina M.**, Zaitsev I., Popov V., Efimenko A. Mechanisms of endothelial-to-mesenchymal transition induction by extracellular matrix components in pulmonary fibrosis // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. V. 171, №4. P. 523–531. IF WoS (JIF) = 0.9 (0,97/0,12).

5. Grigorieva O., Basalova N., Vigovskiy M., Arbatskiy M., Dyachkova U., **Kulebyakina M.**, Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Kalinina N., and Efimenko A. Novel potential markers of myofibroblast differentiation revealed by single-cell rna sequencing analysis of mesenchymal stromal cells in profibrotic and adipogenic conditions // Biomedicines. – 2023. – V. 11, № 3. – P. 840. IF WoS (JIF) = 3.9 (1,77/0,29).

¹ В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах