

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Живень Мария Константиновна

**Модуляция экспрессии гена *HIF2A* в плюрипотентных
стволовых клетках человека с использованием системы
CRISPR/Cas9**

1.5.7. – генетика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
И.С. Захарова

Новосибирск-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений.....	6
Введение.	
Актуальность.....	8
Цель, задачи работы	9
Научная новизна. Теоретическая и практическая ценность. Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту. Вклад автора. Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	11
Апробация работы.....	12
Объем и структура диссертации.....	15
Глава 1. Обзор литературы.....	16
1.1 Роль гипоксии и HIFs в процессах ангиогенеза.....	16
1.2 Структура HIFs.....	19
1.3 Механизмы регуляции активности HIF	
1.3.1 Механизм кислород-зависимого регулирования активности HIF1A.....	21
1.3.2 Кислород-независимый путь регуляции HIF.....	22
1.3.2.1 Роль HAF в HIF1A деградации.....	23
1.3.2.2 SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор).....	23
1.3.2.3 EIF3E – ключевой регулятор экспрессии <i>HIF2A</i>	24
1.3.2.4 Роль фактора инициации трансляции EIF3 в жизнедеятельности клеток многоклеточных организмов.....	25
1.3.2.5 Активация транскрипции HIF1A с помощью гистондеацетилазы.....	27
1.4 Гены-мишени, транскрипционно активируемые HIFs.....	27
1.5 Роль HIFs в регуляции генов плюрипотентности и генов-мишеней основных физиологических процессов в эмбриональных стволовых клетках.....	29
1.6 Патофизиологическая роль фактора, индуцируемого гипоксией, в ангиогенезе и ремоделировании сосудов. Способы терапевтической регуляции HIFs.....	31

1.6.1 Клиническое применение активаторов и ингибиторов HIFs.....	34
1.6.1.1 PHD-ингибиторы.....	34
1.6.1.2 Аденовирусная активация <i>HIF1A</i>	35
1.6.1.3 Ингибирование HIF1A.....	36
1.6.1.4 Специфическая регуляция активности <i>HIF2A</i> с помощью нокаута <i>EIF3E</i>	37
1.7 Применение системы CRISPR/Cas9 для изучения механизмов функционирования сигнального пути HIF <i>in vitro</i>	38
1.8 Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток в мезодермальном и эндотелиальном направлении.....	39
1.9 Заключение к обзору литературы.....	41
Глава 2. Материалы и методы	
2.1 Объект исследования.....	43
2.2 Состав культуральных сред и условия культивирования.....	43
2.3.1 Разморозка ЭФМ.....	44
2.3.2 Пассирование ЭСК.....	45
2.3.3 Культивирование ЭСК в гипоксических и псевдогипоксических условиях.....	45
2.3.4 Замораживание ЭСК.....	46
2.3.5 Размораживание ЭСК	46
2.3.6 Дифференцировка ЭСК в мезодермальном и эндотелиальном направлении.....	47
2.3.7 Сортировка с помощью магнитных частиц MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированных с антителами к CD31	48
2.4 Методы количественной оценки жизнеспособности и характеристики клеточных популяций.....	48
2.4.1 Подсчет клеток с помощью проточной цитометрии.....	48
2.4.2 Оценка пролиферации клеток с помощью ХТТ-анализа.....	49
2.4.3 Оценка ангиогенного потенциала с помощью теста в матригеле <i>in vitro</i>	49

2.5 Методы получения генетически модифицированных линий ПСК, экспрессирующих <i>HIF2A</i>	50
2.5.1 Дизайн последовательностей направляющих РНК.....	50
2.5.2 Клонирование направляющих РНК в вектор.....	50
2.5.3 Получение химически компетентных клеток <i>E. coli</i> штамма Stb13.....	52
2.5.4 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.....	52
2.5.5 Секвенирование плазмидной ДНК.....	53
2.5.6 Доставка векторов с помощью нуклеофекции в ЭСК человека.....	53
2.5.7 Сортинг и количественная оценка GFP-позитивных клеток.....	55
2.5.8 Экспресс-метод выделения ДНК для первичного скрининга субклонов.....	55
2.5.9 Выделение геномной ДНК и РНК.....	56
2.6 Методы характеристики ЭСК человека с делецией <i>EIF3E</i>	56
2.6.1 Подбор праймеров для первичного скрининга субклонов. Первичный скрининг субклонов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием.....	56
2.6.2 Выделение ДНК из агарозного геля для секвенирования.....	57
2.6.3 Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами на основные маркеры плюрипотентности.....	57
2.6.4 Оценка экспрессии генов методом количественной ПЦР в режиме реального времени	58
2.7 Оценка экспрессии <i>HIF</i> с помощью цифровой ПЦР в каплях.....	60
2.8 Методы определения наличия белка <i>EIF3E</i> в исследуемых клеточных линиях ЭСК человека.....	62
2.8.1 Приготовление клеточных лизатов для Вестерн-блот-анализа.....	62
2.8.2 Измерение концентрации белка в клеточных лизатах исследуемых линий.....	63
2.8.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	63
2.8.4 Анализ результатов Вестерн-блот-гибридизации	64
2.9 Статистическая обработка данных.....	66

Глава 3. Результаты.....	67
3.1 Получение генетически модифицированных линий ЭСК, экспрессирующих <i>HIF2A</i>	67
3.2 Разработка системы детекции делеции в полученных субклонах ЭСК....	68
3.2.1 Подбор праймеров для первичного скрининга субклонов. Первичный скрининг субклонов с помощью ПЦР с последующим секвенированием.....	68
3.3 Кариотипирование полученных субклонов линий NuES9 и ESM04 с делецией участка гена <i>EIF3E</i>	70
3.4 Характеристика плюрипотентности в субклонах линий NuES9 и ESM04 с делецией <i>EIF3E</i>	71
3.5 Оценка пролиферации и жизнеспособности исследуемых ЭСК человека методами ХТТ-анализа и FACS с использованием йодида пропидия и аннексина V.....	72
3.6 Выбор подходящих референсных генов для цифровой ПЦР в каплях и оптимизация условий проведения реакции.....	74
3.7 Оценка уровня экспрессии генов <i>EIF3E</i> , <i>HIF1A</i> и <i>HIF2A</i> в полученных генетически модифицированных линиях ЭСК человека	77
3.8 Определение количества белка гена <i>EIF3E</i> в исследуемых линиях NuES9 и ESM04.....	79
3.9 Характеристика экспрессии генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях, в исследуемых линиях ЭСК человека.....	81
3.10 Получение и характеристика эндотелиальных производных исследуемых линий и генетически модифицированных линий ЭСК со сверхэкспрессией <i>HIF2A</i>	83
3.11 Оценка экспрессии проангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК человека.....	89
3.12 Оценка функциональных свойств полученных эндотелиальных производных ЭСК человека.....	91
Обсуждение.....	95
Заключение	103
Выводы.....	105
Библиографический список.....	107

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО – диметилсульфоксид

(И)ПСК – (индуцированные) плюрипотентные стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

цПЦР – цифровая ПЦР в каплях

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ЭФМ – эмбриональные фибробласты мыши

ANGPT1 – ангиопоэтин 1 (angiopoietin 1)

ANGPT2 – ангиопоэтин 2 (angiopoietin 2)

bFGF – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

bHLH – основная структура спираль-петля-спираль (basic helix-loop-helix)

BSA – бычий сывороточный альбумин (Bovine Serum Albumin)

CD31 – кластер дифференцировки 31 (cluster of differentiation 31)

CD34 – кластер дифференцировки 34 (cluster of differentiation 34)

C-TAD – С-концевой трансактивационный домен (C-terminal transactivation domain)

DMOG – диметилноксалилглицин (Dimethyloxalylglycine)

EIF3E – эукариотический фактор инициации трансляции 3e (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit e), синоним – INT6

FIH – фактор, ингибирующий HIF (factor inhibiting HIF)

HAIF – гипоксия-ассоциированный фактор (hypoxia-associated factor)

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia inducible factor)

HREs – гипоксия-реагирующие элементы (hypoxia response elements)

IBS – сайт связывания EIF3E (INT6 binding site)

N-TAD – N-концевой трансактивационный домен (N-terminal transactivation domain)

ODD – домен, отвечающий за кислород-зависимую деградацию (oxygen-dependent degradation domain)

PAS – белковый домен, имеющий в своем составе три аминокислотные последовательности: Per, ARNT, Sim (period circadian protein, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, single-minded protein)

PBS – натрий-фосфатный буфер (phosphate buffered saline)

PDGFB – тромбоцитарный фактор роста В (platelet-derived growth factor В)

PHD – пролилгидроксилазный домен (prolyl-hydroxylase domain); ферменты пролилгидроксилазы (prolyl hydroxylase domain enzymes)

PIGF – фактор роста плаценты (placental growth factor)

pVHL – белок фон Гиппеля-Линдау (von Hippel-Lindau protein)

RIPA – буфер для радиоиммунопреципитационного анализа (radioimmunoprecipitation assay buffer)

SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

shRNA – малые шпилечные РНК (small hairpin RNA)

SUMO – малый убиквитин-связанный модификатор (small ubiquitin-related modifier)

VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов А (Vascular endothelial growth factor А)

VEGFR2 – рецептор 2 типа фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor receptor 2)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В процессе развития у многоклеточных организмов сформировались системы регуляции гомеостатического баланса кислорода в тканях. В результате возникли комплексы, реагирующие на гипоксические условия (пониженную концентрацию кислорода в клетках и тканях: от 1 до 5 %) (Semenza *et al.*, 2003). Факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs), являются ключевыми регуляторами клеточного ответа на гипоксическое воздействие у млекопитающих, которые способствуют активации ряда транскрипционных факторов, играя важную роль в управлении механизмами гликолиза, ангиогенеза, эритропоэза, поддержания сосудистого тонуса и клеточной выживаемости (Prabhakar and Semenza, 2012). По своей структуре HIFs – гетеродимеры, образованные двумя кислород-регулируемыми субъединицами HIF1A и HIF2A и конститутивно экспрессирующейся субъединицей HIF-1 β (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Стабильность HIFs регулируется кислород-зависимым и кислород-независимым путями (Hashimoto and Shibasaki, 2015). На данный момент существуют несколько направлений клинических исследований, связанных с изучением роли HIF-сигнального пути в патологических процессах. Было показано, что в клетках опухолей большинства типов рака человека детектируется повышенный уровень экспрессии *HIFs* (Talks *et al.*, 2000), а также их генов-мишеней, вовлеченных в регуляцию механизмов ангиогенеза, метаболизма глюкозы, инвазию и метастазирование (Semenza *et al.*, 2003; Mazurier, Pages *et al.*, 2012). Таким образом, ключевой задачей в терапии при онкологических заболеваниях является снижение уровня экспрессии *HIFs* для ингибирования избыточного ангиогенеза в тканях опухолей. Методы терапевтической модуляции HIF-сигнального пути для лечения сердечно-сосудистых заболеваний являются еще одним направлением исследований на

сегодняшний день. Ключевая цель данной стратегии состоит в активации *HIFs*, а также факторов роста, вовлеченных в процессы ангиогенеза для эффективного лечения ишемических заболеваний (Hashimoto and Shibasaki, 2015).

В данной работе в качестве перспективного способа терапевтического ангиогенеза рассматривается активация HIF2A с помощью сайленсинга его ингибитора *EIF3E* в нормоксических условиях в эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК). Снижение уровня экспрессии *EIF3E* замедляет деградацию HIF2A и стабилизирует его в ядрах, что приводит к индукции экспрессии ряда генов, задействованных в механизмах пролиферации и поддержания плюрипотентных свойств ЭСК человека. Кроме того, определенный уровень сайленсинга *EIF3E* в эндотелиальных производных ЭСК способствует индукции процессов ангиогенеза в нормоксических условиях. Полученные эндотелиальные производные генетически модифицированных ЭСК найдут широкое применение в качестве модели для изучения механизмов HIF-сигнального пути, а также могут стать неограниченным источником эндотелиоцитов с повышенным регенеративным потенциалом для разработки методов терапевтического ангиогенеза.

Цель и задачи исследования. Получение генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток человека с повышенной экспрессией *HIF2A* и их дифференцированных эндотелиальных производных.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить генетически модифицированные линии ЭСК человека с нокаутом гена *EIF3E* (ингибитора HIF2A) посредством системы CRISPR/Cas9.
2. В полученных генетически модифицированных субклонах подтвердить сохранение плюрипотентных свойств, жизнеспособности и нормального кариотипа.

3. Проанализировать уровень экспрессии генов *EIF3E*, *HIF1A* и *HIF2A* в полученных генетически модифицированных линиях ЭСК.
4. Оценить экспрессию генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях, в исследуемых линиях ЭСК человека.
5. Провести направленную дифференцировку ЭСК с делецией *EIF3E* в эндотелиальные клетки и охарактеризовать полученные клеточные популяции.
6. Оценить ангиогенные свойства полученных эндотелиальных производных в тесте *in vitro*.

Научная новизна работы. В данной работе впервые были получены генетически модифицированные линии ЭСК человека с CRISPR/Cas9-опосредованной делецией участка одного аллеля гена *EIF3E* – ингибитора *HIF2A*. В полученных субклонах подтверждена повышенная экспрессия гена *HIF2A* в нормоксических условиях. Впервые показано, что эндотелиальные производные ЭСК человека, стабильно экспрессирующие *HIF2A*, проявляют повышенную эффективность мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки, а также обладают ангиогенным потенциалом в тестах *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования внесут вклад в понимание фундаментальных молекулярных механизмов HIF-зависимого ангиогенеза, расширят представления о сигнальных каскадах, вовлекаемых при активации HIFs. Кроме того, полученные данные необходимы для разработки эффективных стратегий модуляции экспрессии HIFs для терапевтического ангиогенеза и лечения ряда онкологических заболеваний.

Методология и методы исследования. Методологическую основу данного исследования составляют методы генетической инженерии, клеточной

биологии, статистики, а также анализа данных отечественной и зарубежной литературы. При выполнении исследования и оформлении материала были применены общенаучные методы: теоритический и методологический анализ источников литературы, экспериментальные методы исследования и сравнительный анализ полученных данных. Используемые методы и статистическая обработка экспериментального материала обеспечивают достоверность полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Супрессия активности гена *EIF3E* с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 повышает уровень экспрессии гена *HIF2A* в эмбриональных стволовых клетках человека и их способность к мезодермальной и эндотелиальной дифференцировке.
2. Супрессия активности гена *EIF3E* в эмбриональных стволовых клетках человека повышает в эндотелиальных производных эффективность формирования трехмерных капилляроподобных структур на матрикеле *in vitro* и экспрессию проангиогенных факторов *ANG1*, *bFGF*, *VEGFR2*, *VEGF* и *CXCR4*.

Вклад автора. Все основные этапы работы выполнены автором самостоятельно: получение ЭСК человека с делецией гена *EIF3E* с помощью системы CRISPR/Cas9, проведение анализа экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* в полученных субклонах ЭСК человека, проведение мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки субклонов с повышенной экспрессией *HIF2A* и исходных линий NuES9 и ESM04. Осуществлена оценка морфологических и функциональных свойств полученных эндотелиальных производных. Анализ кариотипа субклонов H9 и E12 выполнен в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» научно – исследовательском институте медицинской генетики

Медико-генетическом центре (Генетической клинике) врачом-цитогенетиком Тарховой Н.Б. Результаты Вестерн-блот анализа количества белка HIF2A предоставлены Ступниковой Аленой Сергеевной и Байрамовой Дарьей Олеговной.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Результаты диссертационного исследования получены современными методами исследования, которые соответствуют поставленным целям и задачам диссертации. Научные положения, выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены убедительными фактическими данными, представленные в таблицах и рисунках. Подготовка, статистический анализ и интерпретация результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на следующих научных мероприятиях:

1. Живень М.К., Захарова И.С., Смирнова А.М., Орищенко К.Е., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Модуляция экспрессии гена *HIF-2a* в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9 // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Open Bio. 22-25 октября 2019г., Кольцово, Россия - 2019: Сборник тезисов С. 80-82.
2. Захарова И.С., Живень М.К., Ступникова А.С., Шевченко А.И., Закиян С.М. Разработка клеточных технологий для регенерации сосудов // Гены и клетки. 2019. Т. XIV. Приложение. Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине. 20 - 23 Ноября 2019г., г. Москва, Россия. С. 95-96.
3. Живень М.К., Захарова И.С., Смирнова А.М., Шевченко А.И., Орищенко К.Е., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. CRISPR/Cas9-опосредованное получение

генетически модифицированной линии плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующих HIF — фактор, индуцируемый гипоксией // Гены и клетки. Приложение, №2. Материалы Международного конгресса CRISPR 2018, 10-14 сентября 2018, Новосибирск. С. 30.

<http://genescells.ru/article/materialyi-mezhdunarodnogo-kongressa-crispr-2018/>

4. Захарова И.С., Живень М.К., Смирнова А.М., Шевченко А.И., Орищенко К.Е., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Модуляция HIF (фактора, индуцируемого гипоксией) как перспективный подход к повышению регенеративного потенциала эндотелиальных клеток // Сборник научных трудов в международной конференции “Постгеном’2018 Казань, 29 октября – 2 ноября 2018 С. 112.

ISBN 978-5-0013-065-6

5. Smirnova A.M., Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Shevchenko A.I., Grigor'eva E. V., Elisafenko E.A., Zakian S.M. The obtaining of CRISPR/Cas 9-modified human pluripotent stem cell lines with upregulated Hypoxia Inducible Factor: a contribution to pluripotency and angiogenesis // Ontogenez 2018, V.49, №4S, p.45-46.

http://www.postgenome.org/files/uploaded/Postgenome_Abstracts_Volume15112018.pdf

ISSN 0475-1450

6. Захарова И.С., Смирнова А.М., Живень М.К., Шевченко А.И., Григорьева Е.В., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Получение генетически-модифицированной линии плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующей HIF-фактор, индуцируемый гипоксией // Гены и клетки, 2017, Том XII, No 3 (Материалы III Национального Конгресса по Регенеративной Медицине), стр. 97-98.

eLIBRARY ID: 37096418

7. Smirnova A., Zakharova I., Jiven M., Shevchenko A., Zakian S. The studying of activation effects of HIF transcription factor in human pluripotent stem cells on the potential of endothelial angiogenic derivatives // IX international congress «Biotechnology: state of the art and perspectives». 20-22 February 2017. Moscow. P. 541.

8. Смирнова А.М., Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Исследование эффектов активации фактора, индуцируемого гипоксией, на ангиогенный потенциал эндотелиальных производных плюрипотентных стволовых клеток человека // БЕЛЯЕВСКИЕ ЧТЕНИЯ Тезисы докладов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. 2017. 7–10 августа 2017 г., Новосибирск, Россия, С.108.

eLIBRARY ID: 30046186

9. Smirnova A., Zakharova I., Zhiven M., Shevchenko A., Elisaphenko E., Zakian S. The study of activation effects of HIF transcription factor on the potential of endothelial angiogenic derivatives in human pluripotent stem cells // 25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus. Programme&Abstract book. 19-22 June 2017. Nizhny Novgorod. P. 45.

По теме диссертации опубликованы работы:

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Орищенко К.Е., Закиян С.М. Получение и характеристика эмбриональных стволовых клеток человека с повышенной экспрессией HIF2A // Гены & Клетки. – 2020. – Т. 14. – №1. – С. 29-35.

2. Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Saaya S.B., Shevchenko A.I., Smirnova A.M., Strunov A., Karpenko A.A., Pokushalov E.A., Ivanova L.N., Makarevich P.I.,

Parfyonova Y.V., Aboian E., Zakian SM. Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts // Journal of Translational Medicine. – 2017. – V. 15. – № 1. – e 54.

3. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Гетерогенность клеток эндотелия // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 104-112.

Главы в монографии

1. Живень М. К., Захарова И. С., Смирнова А. М., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Получение делеции *EIF3E/EIF3E* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 / глава 33 в монографии "Редактирование генов и геномов", том 3, издательство Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск. – 2018. – С. 145-161.

eLIBRARY ID: 36278366 ISBN: 978-5-7692-1581-0

2. Живень М. К., Захарова И. С., Смирнова А. М., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Получение делеции *INT6/EIF3E* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 / глава 19 в монографии "Методы редактирования генов и геномов", издательство Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск. – 2020. – С. 363-377

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа представлена на 127 страницах и состоит из введения и четырех глав: обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, оглавления, списка сокращений и библиографического списка из 170 источников. Работа проиллюстрирована 29 рисунками и содержит 11 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

При длительном воздействии пониженного уровня кислорода (менее 20%) клетки выживают благодаря транскрипционной активности ряда генов, которые вовлечены в процессы ангиогенеза, метаболизма глюкозы и пролиферации клеток. В основном, клеточные ответы на гипоксические условия регулируются кислород-чувствительными факторами, обозначенными как факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs). Субъединицы HIF1A и HIF2A постоянно экспрессируются в клетках и деградируют при нормоксических условиях, но стабилизируются в условиях гипоксии. Кроме того, было выяснено, что HIFs являются главными регуляторами ангиогенеза вне зависимости от того, является ли этот процесс физиологическим или патологическим. При этом HIFs участвуют в формировании сосудов кровеносной системы совместно с проангиогенными факторами роста, такими как VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), PlGF (фактор роста плаценты) или ангиопоэтины. Принимая во внимание важную роль HIFs в процессах ангиогенеза и васкулогенеза, их можно рассматривать как многообещающую мишень для лечения онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

1.1 Роль гипоксии и HIFs в процессах ангиогенеза

Сердечно-сосудистая система закладывается на ранних этапах эмбрионального развития млекопитающих (Zimna and Kurpisz, 2015). На данный момент существуют две концепции механизмов формирования сосудистой сети *in vivo*: васкулогенез и ангиогенез (Carmeliet, 2000). Васкулогенез характеризует процесс образования кровеносных сосудов *de novo*: миграция недифференцированных эндотелиальных клеток-предшественников с последующей сборкой в капилляры *in situ*, что впоследствии способствует образованию первичной сосудистой сети (Novosel *et al.*, 2011). Процесс ангиогенеза заключается в развитии капилляров из

существующих кровеносных сосудов в период эмбрионального развития, роста опухолей и заживления ран, который регулируется ангиогенными факторами роста. Однако механизмы, при помощи которых происходит индукция ангиогенеза и восстановления сосудистой сети, остаются до конца неизученными. Известно, что ангиогенные факторы участвуют в регуляции взаимодействия эндотелиальных клеток между собой и внеклеточным матриксом, что приводит к усилению миграции, пролиферации эндотелиоцитов и формированию кровеносных сосудов. Поскольку ангиогенез играет важную роль в физиологических и патологических процессах, понимание механизмов активации и воздействия ангиогенных факторов на эндотелиальные клетки является перспективным направлением для разработки эффективных стратегий терапевтического лечения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

Гипоксические условия являются главным регулятором ангиогенных факторов роста как в физиологических, так и патологических процессах. Пониженная концентрация кислорода с помощью HIF1A индуцирует экспрессию ангиогенных факторов, которые участвуют в формировании сосудистой сети в эмбриогенезе и онтогенезе. Концентрация кислорода является основным стимулирующим фактором органогенеза и васкулогенеза на протяжении всего эмбрионального развития организма. Потребности растущего эмбриона в питательных веществах и кислороде возрастают по мере его развития. До начала формирования сосудистой системы концентрация кислорода низкая и не превышает 3% (Mitchell & Yochim, 1968). Гипоксия в тканях эмбриона вызывает активацию *HIF1A*. Известно, что HIF1A индуцирует направленную артериальную дифференцировку из эндотелиальных предшественников за счет регуляции генов, которые ингибируют фактор венозной специализации *Coup-TFII* (транскрипционный фактор COUP 2) в условиях *in vitro* (Diez *et al.*, 2007). Кроме того, HIF1A

участвует в определении пути миграции зрелых эндотелиальных клеток в гипоксических условиях (Ke and Costa, 2006).

Было показано, что экспрессия *HIF1A* в гипоксических условиях регулирует процессы ангиогенеза у взрослых организмов. Ангиогенез – это сложный многоступенчатый процесс (Carmeliet and Jain, 2011). На первых этапах HIF1A активирует VEGF-сигнальный путь. Стабильный HIF1A напрямую воздействует на VEGFA (Liu *et al.*, 1995). Взаимодействие HIF1A и проангиогенных факторов является основой формирования сосудистой сети под воздействием гипоксических условий. Изоформы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA, VEGFB, VEGFC и VEGFD) регулируют большинство процессов ангиогенеза (Park *et al.*, 1993). В свою очередь, в период гипоксии активный VEGF индуцирует экспрессию ряда ангиогенных факторов: PlGF, PDGF (тромбоцитарный фактор роста), ANGPT1, ANGPT2 (ангиопоэтин 1 и 2), а также рецепторов Flt-1, KDR, Tie 1 и Tie 2. Вовлечение данных факторов роста и рецепторов в процессы ангиогенеза обуславливает адекватное преобразование межклеточных сигналов, стимулирует миграцию эндотелиальных клеток и развитие капилляров. Известно, что HIF1A регулирует экспрессию проангиогенных факторов напрямую за счет связывания с гипоксия-реагирующим элементами (HREs) или опосредованно, активируя ряд сигнальных путей (Pugh and Ratcliffe, 2003). Исследование проангиогенных генов выявило наличие HREs в их промоторных районах (Schödel *et al.*, 2011). На следующем этапе ангиогенеза деградирует внеклеточный матрикс в результате активности матриксных металлопротеиназ (MMP), что значительно облегчает перемещение эндотелиальных клеток к формирующимся трубчатым структурам (Ben-Yosef and Lahat, 2005). Далее интегрины $\alpha\beta$ стимулируют пролиферацию и адгезию эндотелиальных клеток в сосудистых структурах. На заключительном этапе ангиогенеза происходит вовлечение окружающих клеток (переходов и гладкомышечных клеток) с формированием базальной мембраны. Было

показано, что на заключительной стадии ангиогенеза HIF2A стабилизирует кровеносный сосуд (Skuli *et al.*, 2009) с помощью регуляции активности транскрипции ангиогенных генов: *VEGF*, *PIGF*, *PDGFB*, *ANGPT1* и *ANGPT2* (Greijer *et al.*, 2005), также с помощью регуляции проангиогенных хемокиновых рецепторов (SDF-1 α , CXCR4, S1PRs). Кроме того, HIF2A вовлекает пролиферирующие эндотелиальные предшественники в область формирования сосуда (Ceradini *et al.*, 2004).

Таким образом, HIFs являются основными регуляторами процессов ангиогенеза и васкулогенеза за счет активации каскада проангиогенных факторов, источником которых могут быть тучные клетки, макрофаги, эндотелиальные клетки и др. Полученные данные применимы в разработке методов лечения на основе терапевтического ангиогенеза сердечно-сосудистых ишемических заболеваний (Hashimoto and Shibasaki, 2015; Loinard *et al.*, 2009).

1.2 Структура HIFs

HIFs представляют собой гетеродимеры, состоящие из кислород-регулируемых субъединиц HIF1A или HIF2A и конститутивно экспрессирующейся субъединицы HIF-1 β (Hashimoto and Shibasaki, 2015; Prabhakar and Semenza, 2012) (рис.1). HIFs существуют в виде нескольких изоформ: HIF1A, HIF2A, HIF3A, все изоформы обладают различными биологическими свойствами. Функциональные домены HIF1A и HIF2A являются высоко гомологичными, однако профили экспрессии *HIF1A* и *HIF2A* сильно различаются. *HIF1A* экспрессируется повсеместно во всех типах клеток и тканей млекопитающих, экспрессия *HIF2A* ограничена рядом клеточных типов: ткани хряща и легких, клетки эндотелия (Hashimoto and Shibasaki, 2015; Wiesener *et al.*, 2003). Кроме того, различается степень гипоксии, необходимая для активации экспрессии каждой из субъединиц HIFs. *HIF2A* начинает экспрессироваться при более повышенных концентрациях кислорода и при более долгосрочном воздействии, чем *HIF1A*.

Это обеспечивает быстрый и скоординированный транскрипционный ответ на гипоксические условия. HIF1A играет важную роль в артериальной дифференцировке предшественников эндотелия в процессах ангиогенеза (Zimna and Kurpisz, 2015). HIF-1 β участвует в формировании гемангиобластов из мезодермальных предшественников (Zimna and Kurpisz, 2015). HIF2A вовлечен в формирование зрелых сосудов (Licht *et al.*, 2006).

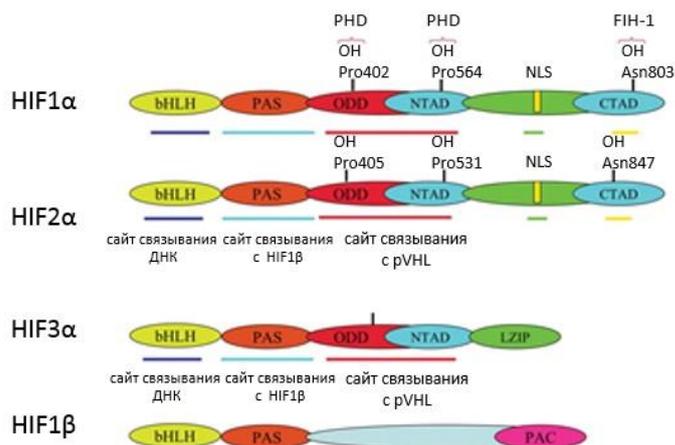


Рисунок 1. Структура доменов субъединиц HIF (Kenneth and Rocha, 2008)

Субъединицы HIFs имеют в своем составе специфические PAS-домены и относятся к bHLH-семейству транскрипционных регуляторов (Zimna and Kurpisz, 2015; Hashimoto and Shibasaki, 2015). PAS-домен вовлечен в формирование гетеродимера HIFs. Факторы транскрипции семейства bHLH контактируют с HRE целевых генов в энхансере типа E-боксы. HRE участвует в активации транскрипции за счет взаимодействия с HIFs (Arany *et al.*, 1996). Известно, что существует три различные изоформы HIF- α , кодируемые тремя генами: *HIF1A* кодирует HIF1A, *HIF2A* (*EPAS1*) – HIF2A и *HIF3A* – HIF3A (IPAS, многочисленные варианты сплайсинга) (Hashimoto and Shibasaki, 2015; URL: <https://www.genenames.org> (дата обращения: 25.09.2020)). Кроме того, идентичность аминокислотной последовательности HIF1A и HIF2A составляет 48%. Идентичность bHLH доменов и PAS-регионов – 83 и 70% соответственно. ODD-домены (домены, отвечающие за кислород-зависимую деградацию) являются также высоко гомологичными (Chen *et al.*, 2007).

Каждая из α -субъединиц HIFs содержит два трансактивационных домена: N- и C-концевой (N-, C-TAD). C-TAD высоко гомологичны у HIF1A и HIF2A, N-TAD – менее гомологичны. HIF3A не имеет C-концевого домена (Hashimoto and Shibasaki, 2015; Greer *et al.*, 2012).

1.3. Механизмы регуляции активности HIF

1.3.1 Механизм кислород-зависимого регулирования активности HIF α

В нормоксических условиях субъединица HIF α постоянно экспрессируется в клетке, но быстро деградирует (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Низкий уровень белкового продукта HIF α поддерживается за счет PHD-зависимого гидроксирования. При нормоксических условиях происходит гидроксирование пролина по одному из двух консервативных остатков в области домена ODD. Гидроксирование катализируется семейством внутриклеточных пролилгидролаз (PHD). В клетках млекопитающих были идентифицированы три изоформы пролилгидроксилаз HIF, названные PHD1-3 (prolyl hydroxylase domain enzymes 1–3). Пролілгидроксилаза связывается с субъединицами HIF1A и HIF2A и катализирует гидроксирование Pro-402 и Pro-564 в HIF1A, Pro-405 и Pro-531 в HIF2A. Гидроксирование служит сигналом для распознавания α -субъединицы белком фон Гиппеля – Линдау (von Hippel-Lindau protein — pVHL). Взаимодействие белка фон Гиппеля – Линдау с α -субъединицей также опосредуется ацетилированием в положении K-532 ацетилтрансферазой ARD1. Далее происходит убиквитинирование, и образованный комплекс деградирует по протеасомному пути (рис. 2).

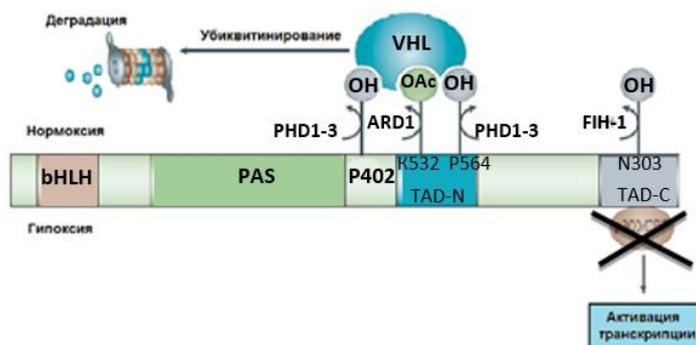


Рисунок 2. Кислород-зависимая регуляция активности HIF1A (по Semenza *et al.*, 2003).

Существует другой путь негативной регуляции HIF1A в условиях нормоксии, который осуществляется при участии FIH (фактор, ингибирующий HIFs). FIH-1 также связывается с HIF1A субъединицей и катализирует гидроксилирование остатка аспарагина Asn-803 в HIF1A и Asn-851 в HIF2A в домене C-TAD, что препятствует взаимодействию между HIF- α и коактиваторами транскрипции (Hashimoto and Shibasaki, 2015; Koh *et al.*, 2011) в условиях нормоксии (рис. 2). Известно, что FIH и PHD имеют разный порог чувствительности к концентрации кислорода в клетках. При нормоксических условиях задействованы обе гидроксилазы, при средней гипоксии отключается PHD, но FIH все еще работает и сдерживает экспрессию HIF1A. Во время хронической гипоксии FIH не работает, а HIF1A взаимодействует со своим коактиватором p300/CBP и индуцирует гены-мишени, которые не экспрессировались при кратковременном гипоксическом воздействии (Hashimoto and Shibasaki, 2015).

1.3.2 Кислород-независимый путь регуляции HIF

Известны три связывающих фактора, которые участвуют в кислород-независимой регуляции HIF1A: HAF (гипоксия-ассоциированный фактор), SUMO-специфические протеазы I и EIF3E (эукариотический фактор инициации трансляции 3E). Эти факторы непосредственно взаимодействуют с HIF- α и вызывают деградацию белка по протеасомному пути. Однако было отмечено, что SUMO-специфические протеазы I и HAF специфично

взаимодействуют только с HIF1A, в то время как EIF3E вызывает деградацию только HIF2A.

1.3.2.1 Роль HAF в негативной регуляции HIF1A

Гипоксия-ассоциированный фактор опосредует убиквитин-протеасомную деградацию HIF1A. HAF (также известен как SART1800) – убиквитинлигаза E3, изначально идентифицированная как ядерный белок, экспрессирующийся в пролиферирующих клетках и различных опухолях (Shichijo *et al.*, 1998).

HAF взаимодействует с доменом ODD у HIF1A и индуцирует убиквитинирование и протеасомную деградацию. С другой стороны, HAF связывается с участком между N-TAD и C-TAD у HIF2A, что приводит к его активации. Было отмечено, что количество данного фактора уменьшается в течение острой гипоксии, но повышается в период хронической гипоксии, обеспечивая быстрый и адекватный ответ на гипоксические условия. В этот процесс вовлекаются также MMP9, PAI-1 и OCT-3/4, что приводит к активному росту опухолей при продолжительной гипоксии. Недавние исследования показали, что активность сигнального пути NF- κ B также регулирует HAF-опосредованное переключение экспрессии от HIF1A к HIF2A в стволовых клетках.

1.3.2.2 SUMO (малый убиквитин-связанный модификатор)

SUMO – низкомолекулярные белки, которые мало гомологичны убиквитину, но обладают структурным сходством (Carbia-Nagashima *et al.*, 2007). SUMO после трансляции участвует в модификации многих белков, регулирует их локализацию и активацию. Таким образом, SUMO влияет на функционирование клетки, включая транскрипцию, ядерную трансляцию, реакцию на стресс, хроматиновую структуру. Модификация с помощью SUMO катализируется специфической лигазой и протеазами (SENPs). Нокаутные эмбрионы мышей по SENP1 демонстрируют нестабильность

HIF1A (Cheng and Yeh, 2007). Кроме того, нокаут этого гена приводит к тяжелой анемии из-за недостаточной выработки эритропоэтина. При гипоксических условиях белки SUMO связываются с HIF1A, что приводит к его деградации. Этот процесс катализируется pVHL-лигазным комплексом.

1.3.2.3 EIF3E – ключевой регулятор экспрессии *HIF2A*

EIF3 является сложным комплексом из множества белковых единиц, которые регулируют инициацию трансляции при помощи формирования сложных структур преинициаторного комплекса: 43S и 48S.

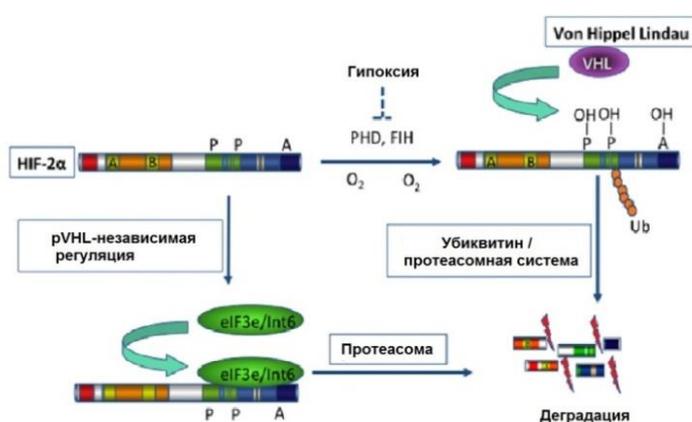


Рисунок 3. Схема кислород-независимой деградации HIF2A (по Hashimoto and Shibasaki, 2015)

Ген *EIF3E* впервые охарактеризовали как ген-супрессор опухолей с консервативной последовательностью, обнаруженной у дрожжей и млекопитающих. Далее показали, что EIF3E является регулятором HIF2A (Chen *et al.*, 2007). EIF3E специфически взаимодействует с HIF2A в связывающем сайте (IBS), что приводит к деградации по протеасомному пути при нормоксии и гипоксии (рис. 3). Дальнейшие исследования показали, что ингибирование EIF3E с помощью специфических малых интерферирующих РНК приводит к стабилизации HIF2A при нормоксических условиях, что также вызывает повышение экспрессии некоторых ангиогенных факторов, таких как ангиопоэтин-1 (ANG-1), фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Таким образом, активация и стабилизация HIF2A в клетках приводит к интенсивному ангиогенезу. Также отмечают, что

нокаут *EIF3E* эффективнее вызывает сверхэкспрессию *HIF2A*, чем активация *HIF2A* (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Из этого следует, что *EIF3E* выполняет функцию главного регулятора ангиогенеза за счет контроля экспрессии *HIF2A*.

1.3.2.4 Роль фактора инициации трансляции EIF3 в жизнедеятельности клеток многоклеточных организмов

EIF3 млекопитающих является сложным комплексом факторов инициации трансляции размером около 800 кДА (Hinnebusch, 2006). EIF3 необходим для стабилизации 43S преинициаторного комплекса и связывания матричной РНК с 40S рибосомой (Jackson *et al.*, 2010; Aitken and Lorsch, 2012; Hinnebusch and Lorsch, 2012). Кроме того, было показано, EIF3 регулирует не только инициацию трансляции, но и весь процесс синтеза белка, включая репрессию за счет связывания со шпичичной структурой, локализованной в 5'-нетранслируемой области (5'UTR) специфических мРНК, которые могут быть вовлечены в регуляцию канцерогенеза (Lee *et al.*, 2015).

Почти во всех многоклеточных организмах комплекс EIF3 состоит из тринадцати субъединиц, обозначенных EIF3A – EIF3M (Hinnebusch, 2006; Pick *et al.*, 2009). Несмотря на обширные исследования функций субъединиц EIF3, представления об их роли *in vivo* остаются ограниченными (Zeng *et al.*, 2013; Koyanagi-Katsuta *et al.*, 2002; Gildea *et al.*, 2011). Пять коровых субъединиц (EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3G, EIF3I) обладают консервативными функциями и обнаружены у дрожжей и высших эукариот. Состав этого корового комплекса определен на основании нокдаун-исследований на человеческих клетках. Например, подавление экспрессии субъединиц EIF3A и EIF3C приводит к полному разрушению комплекса EIF3 или нарушению в его сборке соответственно. Оба варианта нокдауна вызывают выключение трансляции (Wagner *et al.*, 2014). В то время как выключение EIF3J практически не имеет никакого эффекта. Таким образом, есть основания полагать, что несущественные субъединицы комплекса EIF3 не вовлечены в механизм

базовой инициации трансляции млекопитающих, а выполняют функции специфической трансляции (Wolf *et al.*, 2020). В частности, роль EIF3E в составе комплекса EIF3 у млекопитающих четко не определена (Sesen *et al.*, 2017). Есть данные, что EIF3E отвечает за специфическую трансляцию определенных подмножеств мРНК. Было показано, что взаимодействие EIF3E с MIF4GD и SLIP1 может усиливать трансляцию гистоновых белков в дрожжевых клетках и раковых клетках молочной железы (Neusiedler *et al.*, 2012).

Функции EIF3E *in vivo* были изучены во многих модельных организмах. У *Schizosaccharomyces pombe* клетки с полным нокаутом *EIF3E* жизнеспособны, но демонстрирует фенотип медленного роста (Bandyopadhyay *et al.*, 2000; Akiyoshi *et al.*, 2001; Yen and Chang *et al.*, 2003). В *Saccharomyces cerevisiae* ген отсутствует, кодирующий *EIF3E*, но обладают структурно сходным белком Pci8p, который не является регулятором трансляции (Shalev *et al.*, 2001). У *Drosophila melanogaster*, *EIF3E* – ключевой ген для жизнеспособности соматических, зародышевых и эмбриональных клеток (Rencus-Lazar *et al.*, 2008). У *Danio rerio* нокаут *EIF3E* приводит к аномальному развитию, являясь тканеспецифическим модулятором MEK-ERK – сигнального пути (Grzmil *et al.*, 2007).

У мыши локус гена *EIF3E*, также обозначаемый как сайт интеграции 6 (EIF3E), является одним из частых сайтов интеграции вируса опухоли молочной железы (MMTV), провоцирующего данное заболевание *EIF3* (Asano *et al.*, 1997). Интеграция MMTV происходит в интронных областях, что приводит к продукции усеченной химерной мРНК вируса EIF3E/MMTV на С-конце (Marchetti *et al.*, 1995). Предполагается, что экспрессия короткого варианта EIF3 провоцирует развитие онкологического заболевания (Mask *et al.*, 2007; Mayeur *et al.*, 2002).

Следует отметить, что в клетках человека и мыши наблюдается разница в эффектах модуляции *EIF3E*. Нокаут *EIF3E* у мышей приводит к смерти

эмбриона на ранних стадиях развития. Было показано, что *EIF3E* регулируют ангиогенез артерий и вен у мышей (Chen *et al.*, 2010), поскольку *EIF3E* является ключевым ингибитором HIF2A (Chen *et al.*, 2007)

У человека *EIF3E*, по-видимому, не играет критической роли в работе всего преинициаторного комплекса трансляции. В отличие от мыши, у человека не происходит снижения общей трансляции (общего синтеза белков) после siRNA-опосредованного нокдауна *EIF3E* в клеточных линиях рака молочной железы, остеосаркомы (Grzmil *et al.*, 2010) и глиобластомы (Sesen *et al.*, 2014).

1.3.2.5 Активация транскрипции *HIF1A* с помощью гистондеацетилазы

Известно, что гистондеацетилаза 7 (HDAC7) является транскрипционным репрессором и входит в состав 2 класса семейства HDAC млекопитающих вместе с другими гистондеацетилазами: HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC9 и HDAC10. На терминальном конце HDAC7 расположен консервативный каталитический домен HDAC (Bertos *et al.*, 2001), при помощи которого HDAC7 распознает и взаимодействует исключительно с HIF1A при нормоксии и гипоксии. Специфичность взаимодействия объясняется наличием домена ID в HIF1A и отсутствием в изоформах HIF2A и HIF3A. При нормальной концентрации кислорода HDAC7 преимущественно локализуется в цитоплазме, но при гипоксических условиях HDAC7 вместе с HIF1A перемещается в ядро, где образуют комплекс с транскрипционным коактиватором CBP/p300. Затем образованный комплекс активирует экспрессию генов-мишеней HIF1A.

1.4 Гены-мишени, транскрипционно активируемые HIFs

Было показано, что HIF1A регулирует активность более 2% генов в эндотелиальных клетках (Manalo *et al.*, 2005). HIF1A участвует в адаптации клеток и тканей к гипоксическим условиям за счет регуляции транскрипции целого ряда генов-мишеней: *VEGF*, *PDGF*, *TGF α* , *PlGF*, *FGF*, *IGF2*, *FLT-1*,

KDR, TIE 1, TIE 2, MyoD, Myf5, EPO, GLUT 1, NOS2, NDRG2, BNIP3, PDK1, LDHA, GADD45A, CXCR4, SDF1 и др. (Manalo *et al.*, 2005; Hashimoto & Shibasaki, 2015; Iyer *et al.*, 1998). Данные гены вовлекаются в процессы эритропоэза, ангиогенеза, метаболизма глюкозы, гликолиза, метаболизма внеклеточного матрикса, клеточной пролиферации, апоптоза, аутофагии и др. (рис. 4) (Semenza, 2003; Semenza, 2014). Первоначально HIF1A был открыт как транскрипционный активатор эритропоэтина в гипоксических условиях (Semenza and Wang, 1992). К 2003 году обнаружили еще 60 генов-мишеней, регулируемых HIF1A (Semenza, 2003). В другой работе авторы указывают, что HIFs контролируют экспрессию 150 генов (Skuli *et al.*, 2012). Вероятно, выявленный список таргетных генов является незавершенным и требует дальнейших исследований (рис. 4).



Рисунок 4. Биологические процессы, в которые вовлечены гены-мишени HIFs (по Semenza, 2003)

Таким образом, при длительном воздействии пониженных концентраций кислорода (5% O₂) адаптация клеток происходит за счет активации ДНК-связывающих транскрипционных факторов HIFs, которые опосредуют клеточный ответ на гипоксические условия. Было показано, что HIFs являются главными регуляторами ангиогенеза в патологических и физиологических условиях совместно с рядом проангиогенных факторов, такими как VEGF, PLGF и ангиопоэтины. Принимая во внимание важную роль

HIFs в процессах ангиогенеза и васкулогенеза, данные факторы можно рассматривать в качестве мишеней при разработке эффективных стратегий лечения ишемических и онкологических заболеваний.

1.5 Роль HIFs в регуляции генов плюрипотентности и генов-мишеней основных физиологических процессов в эмбриональных стволовых клетках

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека представляют собой плюрипотентные клетки, которые обладают неограниченным потенциалом дифференцировки во все клетки тканей организма. Поэтому ЭСК человека являются ценным и неограниченным источником клеток для фармакологических исследований, моделирования заболеваний *in vitro*, а также для разработки подходов для применения в регенеративной медицине. Однако при использовании ЭСК для этих целей возникают существенные затруднения, связанные со спонтанной дифференцировкой этих клеток. В результате многочисленные исследования были направлены на разработку оптимальных условий, при которых ЭСК сохраняли плюрипотентные свойства (неограниченное самообновление, экспрессия специфических маркеров и способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков) при длительном пассировании. Было показано, что пониженный уровень кислорода (~5 %) в условиях культивирования эмбриональных стволовых клеток человека предотвращает появление спонтанной дифференцировки, а также снижает вероятность возникновения хромосомных перестроек (Ezashi *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 2006; Westfall *et al.*, 2008). Таким образом, гипоксия благоприятно воздействует на свойства ЭСК человека. Адаптация клеток к гипоксическим условиям осуществляется с помощью HIF-сигнального пути. Преимущественно HIF2A регулирует долгосрочный ответ на понижение концентрации кислорода в клетках. Известно, что HIF2A связывается с цис-регуляторным элементом в пределах промотора *NANOG*, затем взаимодействует с HREs, образуя транскрипционный комплекс с

белками OCT4, SOX2 и белками ремоделинга хроматина. Данный комплекс приводит к образованию активного хроматина, а также индуцирует экспрессию *NANOG*. В ряде работ было показано, что *NANOG* связывается с регуляторными элементами генов *CDK6* и *CDC25A*, важных регуляторов клеточного цикла, способствуя повышению пролиферации ЭСК человека (Neganova *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009).

С другой стороны, *HIF1A* не экспрессируется при длительной гипоксии и демонстрирует только временную ядерную локализацию при острой гипоксии (рис. 5). Считается, что *HIF1A* играет важную роль при первоначальной адаптации эмбриональных стволовых клеток к гипоксическим условиям в течение первых 48 часов воздействия. Возможным регулятором экспрессии *HIF1A* и *HIF2A* при длительной и кратковременной гипоксии является субъединица *HIF3A*, функции и гены-мишени которой недостаточно изучены на данный момент. Предполагается, что *HIF3A* конкурирует с другими изоформами HIFs за сайт связывания в промоторной области, отрицательно регулируя экспрессию генов-мишеней *HIF1A* и *HIF2A* (Zhou and Jiang, 2018). Возможно, *HIF1A* и *HIF3A* взаиморегулируют экспрессию друг друга, поскольку при повышении экспрессии *HIF1A* наблюдается значительное снижение экспрессии *HIF3A* и наоборот. Более того, *HIF3A* рассматривают как регулятор *HIF2A* при хронической гипоксии (Forristal and Houghton, 2010).

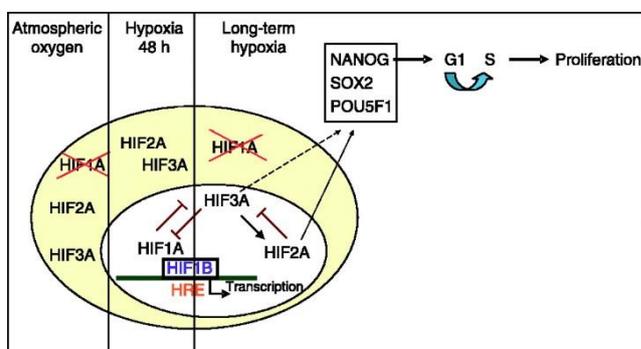


Рисунок 5. Схема локализации *HIF1A*, *HIF2A* и *HIF3A* в ЭСК человека при воздействии нормоксических и гипоксических условий (Forristal and Houghton, 2010)

Таким образом, гипоксия стабилизирует плюрипотентные свойства ЭСК человека. Ключевую роль в данном процессе играет HIF2A за счет активации каскада транскрипционных факторов при хронической гипоксии. HIF3A также участвует в регуляции экспрессии *HIF1A* и *HIF2A*. Однако детальное понимание этих механизмов требует дальнейших исследований.

1.6 Патофизиологическая роль фактора, индуцируемого гипоксией, в ангиогенезе и ремоделировании сосудов. Способы терапевтической регуляции HIFs

Известно, что белковые продукты HIF1A и HIF2A вовлечены во многие физиологические и патологические процессы, протекающие в клетках при пониженной концентрации кислорода. Патофизиологические процессы сердечно-сосудистой системы и злокачественных новообразований человека часто связывают с условиями гипоксии. Было показано, что сверхэкспрессия HIFs в результате хронической или повторной активации приводит к патологическому ремоделированию сосудов. Известна роль мутаций генов-регуляторов экспрессии HIFs, которые способствуют стабилизации HIF1A и HIF2A в клетках и развитию онкологических патологий. Исследования последних лет в области изучения механизмов HIF-сигнального пути открывают широкие возможности не только для понимания роли HIF1A и HIF2A в молекулярных механизмах развития патологических процессов, но и позволяют разработать эффективные методы лечения различных заболеваний. На данный момент разработка стратегий модуляции HIF-сигнального пути идет в нескольких основных направлениях: активация и стабилизация HIFs для лечения ишемических сердечно-сосудистых заболеваний и ингибирование их экспрессии при злокачественных новообразованиях.

Ишемическая болезнь сердца сопровождается окклюзией коронарной артерии или образованием атеросклеротических бляшек, что приводит к недостаточному кровоснабжению тканей сердца. В ответ на гипоксические условия происходит формирование коллатеральной сосудистой сети, которая

компенсирует недостаток кислорода и питательных веществ. Недавние исследования показали, что HIF1A индуцирует образование коллатеральных сосудов и регулирует переход от окислительного к гликолитическому пути метаболизма в период кратковременной ишемии с последующей реперфузией (Gho *et al.*, 1996). Это способствует защите сердца от ишемических повреждений. Кроме того, в ишемических тканях при заболеваниях периферических артерий наблюдается повышенный уровень HIF1A, который опосредует ответ на гипоксию посредством активации ряда ангиогенных цитокинов: VEGF, PDGF, TGF α , PlGF, ANG1, ANG2 (Hashimoto and Shibasaki, 2015) (рис. 6). Уровень HIF1A значительно повышен в тканях аневризмы артерий по сравнению со здоровыми сосудами (Erdozain *et al.*, 2011). Активация HIF-сигнального пути вызывает aberrантную экспрессию ангиогенных факторов, что приводит к формированию и поддержанию сосудистых мальформаций (Giatromanolaki *et al.*, 2005). Уровни экспрессии *HIF1A* и *VEGF* значительно повышены в артериовенозных мальформациях головного мозга (Ng *et al.*, 2005). Кроме того, наблюдается сверхэкспрессия *HIF1A* и *HIF2A* при варикозных расширениях вен (Lim *et al.*, 2011). Также экспрессия *HIF1A* значительно выше в атеросклеротических бляшках, чем в нормальном сосуде (Bitto *et al.*, 2010). Данные свидетельствуют, что HIF1A участвует в прогрессии атеросклероза, инициируя апоптоз, воспалительные процессы, ангиогенез и дисфункцию эндотелиальных клеток (Sluimer *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012). При хронических заболеваниях легких сигнальные каскады HIF1A способствуют утолщению стенок сосудов, уменьшению диаметра просвета легочных артериол и увеличению застоя кровотока (Lim *et al.*, 2013). Изменение регуляции в HIF-сигнальном пути вызывает неправильную интеграцию сосудистого трансплантата с окружающими тканями и формированию гиперплазии интимы (Lee *et al.*, 2000). Активация HIF1A способствует образованию и рассасыванию тромбов при венозной тромбоэмболии (Bovill *et al.*, 2011; Moldovan *et al.*, 2003).

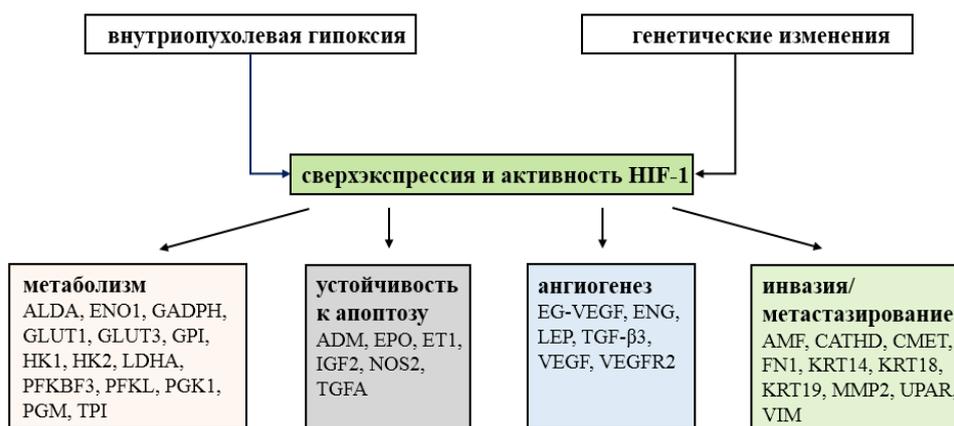


Рисунок 6. Связь генов-мишеней, активируемых HIF-1, и механизмов развития опухоли (по Semenza, 2003).

Известно, что в опухолевых клетках уровень экспрессии *HIF1A* значительно выше, чем в нормальных тканях. Гипоксические условия преобладают в быстрорастущих опухолях, активируя экспрессию *HIF1A* (рис. 6). Стабилизация HIF1A индуцирует транскрипцию *VEGF* и ряд каскадов ангиогенных факторов и их рецепторов: FLT-1, FLK-1, ANG-1, ANG-2 и TIE-2 (Brown and Giaccia, 1998). Кроме того, сверхэкспрессию *HIF1A* вызывает дестабилизация его ингибиторов из-за мутаций и геномных перестроек, что блокирует убиквитинизацию и протеасомную деградацию (Pugh *et al.*, 2003; Semenza *et al.*, 2000). Мутация в гене фон Гиппеля — Линдау, белковый продукт которого опосредует протеасомную деградацию, способствует димеризации HIF1A и HIF-1 β . В результате образуется стабильный комплекс, который активирует VEGF и проангиогенные факторы (Maxwell *et al.*, 1999). Изучение HIF-сигнального пути способствует пониманию механизмов патологических процессов сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Полученные знания найдут применение в разработке эффективных методов лечения таких патологий.

1.6.1 Клиническое применение активаторов и ингибиторов HIFs

Детальное изучение всех ключевых компонентов-регуляторов HIF-сигнального пути открыли широкие возможности не только для разработки эффективных терапевтических подходов лечения сердечно-сосудистых, ишемических и онкологических заболеваний, но и получения оптимальных моделей для эффективного скрининга лекарственных препаратов.

1.6.1.1 PHD-ингибиторы

Модуляция HIF-сигнального пути при помощи фармакологических препаратов или генной терапии является перспективной терапевтической стратегией коррекции различных заболеваний, связанных с нарушением механизмов данного сигнального пути. В особенности уделяется внимание разработке препаратов, направленных на модуляцию ангиогенеза при лечении онкологических заболеваний, макулодистрофии, атеросклероза и др. Кроме того, разработан ряд подходов, основанных на индукции *HIF1A* и *HIF2A*, с целью усиления процессов ангиогенеза при ишемических заболеваниях. Ингибирование пролилгидроксилазы запускает активацию гипоксической адаптации при нормоксии, что стимулирует заживление ран у мышей с диабетом (Botusan *et al.*, 2008) и повышение функциональных и гистологических показателей у моделей мышей с ишемией и геморрагическим инсультом (Kapurragounder *et al.*, 2012). Показано, что PHD-ингибирование после применения хлорида кобальта ослабляет формирование аневризм у мышей, данный эффект связан с уменьшением экспрессии цитокинов, связанных с процессами воспаления и активности MMP-2 и MMP-9 (Watanabe *et al.*, 2014). Использование малых РНК, образующих шпильки, специфичных к PHD2 или PHD3, стимулирует неоваскуляризацию ишемической области после лигирования бедренной артерии у мышей. Ингибирование PHD способствует формированию сосудов путем повышения уровня экспрессии эндогенного *HIF1A*. В клинических испытаниях использовали пероральные ингибиторы FG-2216 и FG-4592 для лечения почечной анемии. Кроме того,

применяли ингибитор GSK1278863 для лечения пациента с синдромом Шарко. Однако, не удалось показать преимущество этого препарата (Hashimoto and Shibasaki, 2015).

1.6.1.2 Аденовирусная активация *HIF1A*

Стимуляции ангиогенеза путем индукции сверхэкспрессии *HIF1A* рассматривается в качестве эффективной стратегии лечения ишемических заболеваний. Тестирование аденовирусных конструкций с конститутивной экспрессией *HIF1A* в комбинации с эндотелиальными производными красного костного мозга на моделях мышей с ишемизированной задней конечностью продемонстрировало значительное улучшение кровообращения и двигательной активности (Rey *et al.*, 2009). Кроме того, была показана эффективность аденовирусной активации *HIF1A* на моделях мышей с диабетом и тяжелой ишемией задней конечности (Sarkar & Semenza, 2009). Кроме того, гибридная конструкция с трансактиваторным белком вируса герпеса *HIF1A/VP16* также способствовала восстановлению периферического кровообращения на моделях крыс и кроликов с диабетом и ишемией задней конечности (Kajiwara *et al.*, 2009). Аналогичные подходы применили для заживления ран и восстановления после инфаркта миокарда (Liu *et al.*, 2008; Heintl-Green *et al.*, 2005). Эксперименты на мышах, направленные на ингибирование PHD, также показали восстановление ран при диабете (Botusan *et al.*, 2008). Таким образом, методы по активации экспрессии *HIF1A* в доклинических испытаниях способствовали восстановлению ишемических повреждений на моделях животных (Majmundar *et al.*, 2010). Первые клинические испытания регуляции активности *HIF1A* в заместительной генной терапии провели на пациентах с периферической артериальной болезнью и с критической ишемией конечности в период с 1999 по 2004 гг. (Rajagopalan *et al.*, 2007). Рекомбинантный аденовирус, кодирующий bHLH-PAS-домен *HIF1A*, объединили с VP16. Полученную генетическую конструкцию ввели внутримышечно 34 пациентам без дополнительных

процедур реваскуляризации. В период первой стадии исследования тестировалась преимущественно безопасность: единственное внутримышечное введение не привело к серьезным побочным эффектам, таким как образование злокачественных опухолей или к нарушениям неоваскуляризации, связанных с трансгенезом, в первый год после инъекции. Однако авторы отметили высокий уровень смертности и ампутаций в исследуемой группе, после этого дальнейшие испытания отменили.

Далее использовали этот метод в группах пациентов с перемежающейся хромотой с 2005 по 2010 гг. (Creager *et al.*, 2011). Пациентам делали одну внутримышечную инъекцию Ad2/HIF1A/VP16, которая также была неэффективна. Возможной причиной отрицательного результата может быть низкая эффективность переноса генов, непродолжительный эффект после однократной инъекции.

1.6.1.3 Ингибирование HIF1A

Клетки злокачественных опухолей адаптируются к гипоксическим условиям, в основном, за счет активности HIF1A. Наличие гипоксии в тканях опухолей достоверно ассоциировано с инвазией, метастазированием, а также с неэффективным лечением пациентов. Поэтому были подобраны препараты по ингибированию HIF1A, а также его генов-мишеней в раковых клетках. Препараты имеют разные механизмы действия на HIF1A, но приводят к сходному эффекту – останавливают рост опухоли в экспериментальных моделях ксенотрансплантатов. Так, например, антрациклины блокируют взаимодействие HIF1A с ДНК-мишенями (Lee *et al.*, 2009), препарат акрифлавин ингибирует димеризацию HIF1A и HIF2A (Lee *et al.*, 2009), дигоксин и сердечные гликозиды блокируют синтез HIF1A (Zhang *et al.*, 2008).

1.6.1.4 Специфическая регуляция активности HIF2A с помощью нокаута *EIF3E*

HIF2A вовлечен в ремоделирование микрососудов и в формирование сосудов во взрослых организмах (Howell *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2000). Стабилизация HIF2A через сайленсинг *EIF3E* стимулирует формирование функциональной сосудистой сети и способствует восстановлению периферической циркуляции крови в ишемизированной области у мышей. Сайленсинг *EIF3E* при помощи коротких РНК, образующих шпильки, замедляет деградацию HIF2A; стабилизированный HIF2A затем связывается с участком HRE в промоторном регионе *HIF2A*, повышая уровень собственной экспрессии. Показано, что сайленсинг *EIF3E* приводит к увеличению экспрессии *HIF2A*, не влияя на экспрессию *HIF1A* (Chen *et al.*, 2007). Стимуляция активности *HIF2A* способствует неоваскуляризации и ускорению заживления ран у мышей с диабетом.

Эффективность сайленсинга *EIF3E* также показана на моделях мышей с ишемизированной задней конечностью: восстановление периферического кровообращения и функционирования конечности после перевязки бедренной артерии. Также авторы отметили увеличение уровня транскрипции *PDGF-B* и *bFGF* в мышечных клетках и секреции bFGF и ANG-1, что стимулировало формирование сосудистых структур эндотелиальными клетками за счет паракринных эффектов. Кроме того, анализ с помощью ДНК-микрочипов идентифицировал активацию 378 генов и ингибирование 244 генов (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Среди активируемых генов присутствуют ангиогенные факторы: bFGF, PDGF, HGF и VEGF. Данные свидетельствуют, что *EIF3E* выполняет роль важного регулятора процессов ангиогенеза. Модуляция HIF2A посредством ингибирования *EIF3E* может стать перспективной стратегией терапевтического лечения ишемических заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт, заболевание периферической артерии.

1.7 Применение системы CRISPR/Cas9 для изучения механизмов функционирования сигнального пути HIF *in vitro*

На сегодняшний день существует ряд работ, связанных с исследованием модуляции HIF-сигнального пути. Объектами изучения являются мезенхимальные клетки костного мозга (Zhu *et al.*, 2016), клетки-предшественники эндотелия из пуповинной крови (Chung *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2015), эндотелиальные производные костного мозга (Hoenig *et al.*, 2008; Zimna and Kurpisz, 2015; Kütscher *et al.*, 2016), стволовые клетки-предшественники адипоцитов (Skiles, 2013). Несмотря на разнообразие исследуемых линий, еще не существует работ на моделях дифференцированных производных плюрипотентных стволовых клеток человека. Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 открывает широкие возможности регуляции экспрессии генов высших организмов. Данная система позволяет редактировать геном клеток, обеспечивая коррекцию мутаций, ответственных за заболевание, или введение функциональных последовательностей в заданный участок генома. На данный момент существует большое количество работ, связанных с исследованием экспрессии генов с помощью системы CRISPR/Cas9. Однако система CRISPR/Cas9 не применялась для изучения модуляции HIF-сигнального пути в плюрипотентных стволовых клетках человека. Существует работа, где показана возможность комплексного подхода в сочетании данного метода и лентивирусного подхода для нокаута pVHL на модели метастазирующей почечной карциномы в клеточной линии мышей (Schokrpur *et al.*, 2016). В других работах систему CRISPR/Cas9 использовали для исследования воздействия HIF и ключевых участников его сигнального пути на различные патологические процессы, связанные с раком молочной железы, нейробластомой и острой миелоидной лейкемией (Bao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Vukovic *et al.*, 2015). Кроме того, данную систему редактирования генома применили для изучения митохондриальных нарушений в

нейрональных клетках гиппокампа мышей (Neitemeier *et al.*, 2016). Таким образом, изучение NIF-сигнального пути с применением новейших методов генной инженерии на модели ПСК человека и их дифференцированных производных внесут вклад в разработку подходов по изучению модуляции NIF.

1.8 Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток в мезодермальном и эндотелиальном направлении

Эндотелиальные клетки (ЭК) выстилают внутреннюю поверхность всей сосудистой системы – от сердца до мельчайших сосудов различных диаметров. Поскольку ЭК контактируют как с циркулирующими компонентами крови, так и с окружающими тканями, они играют ключевую роль в регуляции ангиогенеза, коагуляции, воспалении и микрососудистой проницаемости, за счет которой осуществляется перемещение веществ и клеточных компонентов крови от сосудов до тканей и обратно (Pate *et al.*, 2010). Кроме того, ЭК задействованы и в патологических процессах, связанных с их дисфункцией. На данный момент широко используется подход получения ЭК путем дифференцировки ПСК (Liu *et al.*, 2016). Более того, эндотелиальные производные ПСК человека также могут быть использованы в заместительной клеточной терапии, а также для моделирования заболеваний. Использование ЭК в качестве модельного объекта для исследования патологических процессов открывает широкие возможности в разработке терапевтических подходов и средств лечения ишемии, атеросклероза, тромбоза и других сердечно-сосудистых заболеваний. Поскольку сосудистая система обеспечивает перемещение крови по всему организму, ЭК обладают разнообразными морфологическими и функциональными свойствами согласно ткане- или органоспецифическим требованиям. Гетерогенные свойства ЭК, а также их дифференцированное состояние значительно препятствуют получению и поддержанию специфической клеточной популяции в условиях *in vitro*. Существуют проблемы в эффективности

получения ЭК в необходимых количествах, а также с потерей клетками в процессах культивирования специфических маркеров. Такие ограничения существенны для изучения генетических заболеваний, где для результата эксперимента важны полученные производные от изогенных ЭК. На данный момент уже разработан ряд протоколов по получению эндотелиальных производных из плюрипотентных стволовых клеток. В основе дифференцировки в эндотелиальном направлении лежат два различных принципа: дифференцирование ПСК в эмбриоидных тельцах и в монослое. Протоколы первого способа получения эндотелиальных производных применимы, но требуют затрат времени и обладают меньшей эффективностью, поскольку в данных подходах пропущена стадия направленного получения эндотелиальных предшественников, что влияет на эффективность дифференцировки. Было показано, что поэтапное дифференцирование ПСК в монослое является наиболее эффективным методом. Такая дифференцировка включает несколько этапов: индукцию мезодермы, получение эндотелиальных предшественников, затем получение и увеличение популяции эндотелиальных производных (Gu, 2018). Первый этап индукции мезодермы заключается в активации сигнального пути WNT/ β -катенина (Lian *et al.*, 2013). Применение CHIR99021 для ингибирования киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) в первые 24 часа дифференцировки стабилизирует β -катенин – ключевой внутриклеточный элемент данного сигнального пути, который избегает деградации и стабилизируется в цитоплазме, затем перемещается в ядро, где взаимодействует с транскрипционными факторами, которые направляют β -катенин к генам-мишеням. Известно, что ингибирование β -катенина с помощью малых РНК, образующих шпильки, приводит к значительному снижению эффективности получения CD31/CD34-позитивных эндотелиальных предшественников. На следующем этапе эндотелиальной дифференцировки, который длится 2 дня, получают эндотелиальные предшественники. Для этого используют специфические факторы роста, такие как bFGF, VEGFA, BMP4 (костный

морфогенетический белок), Activin A (Активин А) в различной комбинации с использованием эндотелиальной ростовой среды (EBM). Существуют данные, что комбинация ростовых факторов 5 нг/мл bFGF и 10 нг/мл VEGFA способствует эффективной мезодермальной дифференцировке и образованию популяции CD31/CD34-позитивных эндотелиальных предшественников (Liu *et al.*, 2016). На последнем этапе осуществляется переход от предшественников к зрелым эндотелиальным клеткам. Для этого используют ростовую среду для микроциркуляторного эндотелия (EMV2 medium) с добавлением VEGFA (Rufaihah *et al.*, 2013). Примерно на 12 день осуществляют сортировку CD31-позитивных ЭК. Полученная популяция адекватно пролиферирует и сохраняет характерные морфологические и функциональные свойства. Кроме того, существует протокол получения трех гетерогенных субпопуляций ЭК: лимфатических, артериальных, венозных, проявляющих разные морфологические свойства и имеющих специфический паттерн экспрессии генов (Rufaihah *et al.*, 2013). Такие эндотелиальные производные могут найти применение в качестве модели для исследования процессов в период эмбрионального развития и патологических процессов, а также в качестве эффективного клеточного источника в регенеративной медицине сердечно-сосудистых заболеваний.

1.9 Заключение к обзору литературы

В процессах ангиогенеза ключевую роль выполняют HIFs за счет активации ряда проангиогенных генов, участвующих в данном процессе при физиологических и патологических состояниях. Понимание механизмов HIF-зависимого ангиогенеза имеет важное значение для разработки методов борьбы с ишемическими и онкологическими заболеваниями. На сегодняшний день в качестве перспективного способа терапевтического ангиогенеза рассматривается активация *HIF2A* посредством инактивации его ингибитора *EIF3E*. Нокаут *EIF3E* стабилизирует HIF2A в ядрах, что, в свою очередь, запускает процессы ангиогенеза при нормоксических условиях. Таким

образом, EIF3E действует как основной регулятор ангиогенеза, который вне зависимости от уровня кислорода влияет на стабилизацию белка HIF2A и экспрессию гена *HIF2A*. Предполагается, что эндотелиальные производные таких ПСК за счет повышенной экспрессии *HIF2A* будут обладать повышенным регенеративным потенциалом. Такие эндотелиальные производные найдут широкое применение в качестве модели для изучения HIF-зависимого ангиогенеза, а также источника в заместительной клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

В работе использовали линии ЭСК человека HuES9 (Cowan *et al.*, 2004) и ESM04 (Lagarkova *et al.*, 2006; Prokhorovich *et al.*, 2007), клетки которых имеют нормальный кариотип, демонстрируют наличие маркеров плюрипотентности и маркеров трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке. Культивирование проводили на подложке митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ), либо на культуральном пластике, покрытом матригелем. Кроме того, культивирование клеточных популяций ЭСК проводили в условиях псевдогипоксии (обработка клеток известными веществами-миметиками гипоксии: хлоридом кобальта (CoCl₂) и диметилноксалилглицином (DMOG), а также в условиях реальной гипоксии при культивировании в инкубаторе с пониженным содержанием кислорода (5%) (Живень и др., 2020).

2.2 Состав культуральных сред и условия культивирования

Автоклавированная ростовая бактериальная среда LB (2,5% Luria Broth (Sigma), 100 мкг/мл ампициллина, H₂O mQ), бактериальный агар (1,5% Vacto-Agar (BD), 100 мкг/мл ампициллина, H₂O mQ) для культивирования *E. coli*.

Среда SOC для восстановления *E. coli* после трансформации (1% бактотриптон (DIFCO); 0,5% дрожжевой экстракт (DIFCO), 10 мМ NaCl (BioFroxx), 2,5 мМ KCl (Sigma), 10 мМ MgCl₂ (BDH), 10 мМ MgSO₄ (BDH), 20 мМ глюкоза (Serva)).

Ростовая среда для культивирования ЭСК на слое ЭФМ (88% Knockout DMEM (Thermo Fisher Scientific), 15% мл Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл βFGF (Peprotech), GlutaMax 1-кратный (Thermo Fisher Scientific), раствор незаменимых аминокислот 1-кратный (Lonza), 0,1 мМ 2-Меркаптоэтанол (MERCCK), пенициллин/стрептомицин 1-кратный (Lonza), 10 мкМ Rock-ингибитор Y-27632 (StemRD)).

Ростовая среда для ЭФМ (85% DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific), 10% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific), пенициллин/стрептомицин (Lonza) 1-кратный, Glutamax 1-кратный (Thermo Fisher Scientific)).

Essential 8 (размороженная при комнатной температуре 50-кратная добавка, хорошо перемешанная с 500 мл базовой среды (Thermo Fisher Scientific)).

EGM2 (специфическая культуральная среда для эндотелиальных клеток Lonza)).

RPMI/B27-Insulin (культуральная среда для получения мезодермальных производных ПСК человека (Thermo Fisher Scientific), смешанная с добавкой B27-Insulin (Thermo Fisher Scientific)).

2.3.1 Разморозка ЭФМ

За 10-15 мин до разморозки фидерных клеток поверхность чашек Петри покрывали раствором 0,1% желатина так, чтобы раствор равномерно распределился по поверхности пластика. Чашку Петри инкубировали при комнатной температуре. Затем ампулу замороженных клеток оттаивали на водяной бане при 37 С или в руках. Когда содержимое ампулы частично разморозилось, переносили клеточную суспензию в центрифужную пробирку с 5 мл среды для культивирования фибробластов DMEM/F12 и центрифугировали 5 мин при 300g. Далее сливали супернатант и ресуспандировали осадок клеток в ростовой среде. Клеточную суспензию равномерно распределяли по поверхности культурального пластика и оставляли чашки Петри с размороженными клетками в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37°C), перемещая чашки Петри из стороны в сторону, чтобы равномерно распределить клетки. Через 2-3 часа размораживали или пересаживали ЭСК на слой ЭФМ, когда клетки фидера хорошо прикреплялись к пластику.

2.3.2 Пассирование ЭСК

Ростовую среду меняли каждый день: убирали не более 80% старой среды. При плотности клеток 80-95% производили пересадку. Культуральную среду убирали полностью, промывали PBS, не допуская пересыхания или открепления клеток. Затем наливали и равномерно распределяли TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific) в расчете 250-500 мкл на 10 см². Изменение морфологии клеток контролировали под микроскопом: после изменения формы на округленную сразу же аккуратно убирали TrypLETM Express. Смывали клетки с поверхности при помощи PBS и переносили суспензию в центрифужную пробирку. Центрифугировали 5 мин при 200g. Сливали супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в ростовой среде, которая содержит 10 мкМ Rock-ингибитора Y-27632 (StemRD). Клеточную суспензию ЭСК человека равномерно распределяли по поверхности культурального пластика с предварительно посаженным на него слоем ЭФМ. Затем чашки Петри с размороженными клетками помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂, 37°C), перемещая чашки Петри из стороны в сторону, чтобы равномерно распределить клетки. Отношение исходной площади, на которой культивировались клетки, к последующей подбирались индивидуально для каждой культуры (от 1:3 до 1:20).

2.3.3 Культивирование ЭСК в гипоксических и псевдогипоксических условиях

Исследуемые линии ЭСК обрабатывались веществами-миметиками гипоксии CoCl₂ и DMOG в концентрациях 50 мкМ и 250 мкМ соответственно. Кроме того, ЭСК культивировались в условиях физиологической гипоксии (5% O₂) в мультигазовом инкубаторе BINDER в течение трех пассажей. Обработка CoCl₂ имитирует состояние гипоксии вследствие замещения ионов железа (Goldberg *et al.*, 1988). Ионы кобальта могут связываться с мембранным транспортером двухвалентных ионов металлов DMT1 и блокировать доступность FeO для клеток (Wang and Semenza, 1993b; Gunshin, 1997). Потеря

железа приводит к стабилизации HIF1A, поскольку Fe^{2+} является необходимым кофактором для обеспечения гидроксирования пролиновых остатков пролилгидроксилазами и PHD-зависимой деградации HIF1A. Также активация HIFs может быть смоделирована введением DMOG, действие которого также связано с ингибированием пролилгидроксилаз и стабилизацией HIF1A и HIF2A (Taniguchi *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2014).

2.3.4 Замораживание ЭСК

Для заморозки клетки снимали, как при пересадке, центрифугировали при 200g, супернатант сливали и ресуспендировали 2×10^6 клеток в 900 мкл FBS. Хорошо перемешивали клетки и переносили суспензию в криопробирки. Затем добавляли к суспензии 100 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich). Закрывали и интенсивно встряхивали криопробирку несколько раз для перемешивания содержимого. При этом клетки с ДМСО (Sigma-Aldrich) не подвергали длительным воздействиям комнатной температуры. Далее переносили криопробирки в кельвинатор на $-70^{\circ}C$ в специальных боксах для постепенного замораживания. Через сутки убрали ампулы в жидкий азот для длительного хранения.

2.3.5 Размораживание ЭСК

Среду, в которой культивировались ЭФМ, меняли на ростовую среду для культивирования ЭСК на слое фидерных клеток на основе Knockout DMEM (Thermo Fisher Scientific) и оставляли в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , $37^{\circ}C$). Доставали ампулу замороженных ЭСК из криохранилища и оттаивали на водяной бане при $37^{\circ}C$. Как только начиналась частичная разморозка содержимого ампулы, клеточную суспензию переносили в центрифужную пробирку с 5 мл среды для культивирования ЭСК, содержащую 10 мкМ Rock-ингибитора Y-27632 (StemRD), центрифугировали 5 мин при 200g. Убирали супернатант, оставив осадок клеток. Ресуспендировали клеточный осадок в ростовой среде, которая содержит 10 мкМ Rock-ингибитора Y-27632

(StemRD). Переносили и равномерно распределяли клеточную суспензию ЭСК человека на поверхности ЭФМ. Инкубировали чашки Петри с размороженными клетками в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37°C). Чтобы равномерно распределить клетки, перемещали чашки Петри из стороны в сторону.

2.3.6 Дифференцировка ЭСК в мезодермальном и эндотелиальном направлении

Использовали систему дифференцирования в монослое на поверхности, обработанной матригелем (Corning), с применением ингибитора CHIR99021 (R&D Systems, Inc) в среде RPMI/B27-Insulin (Thermo Fisher Scientific) в первые несколько суток. На 3 день культуральную среду меняли на RPMI/B27-Insulin (Thermo Fisher Scientific) с добавлением факторов роста: 50 ng/ml VEGFA (Biolegend), 50 ng/ml bFGF (Biolegend) и 10 mM SB431542 (Stem cell technologies). Среду для дифференцировки заменяли каждый день. После 4-х дней подсчитывали количество VEGFR2-позитивных клеток-предшественников эндотелия методом проточной цитометрии и далее использовали EGM2 (Lonza) в качестве основной дифференцировочной среды с добавлением 50 ng/ml VEGFA (Biolegend), 50 ng/ml bFGF (Biolegend). На 8 день дифференцировки выполняли сортинг эндотелиальных производных с помощью MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированных с антителами к CD31 – основному маркеру эндотелиальных клеток. Полученную клеточную популяцию ЭК пересаживали на коллаген человека четвертого типа (Merck) в ростовой среде EGM2 (Lonza). Далее эндотелиальную ростовую среду заменяли каждый второй день.

2.3.7 Сортировка с помощью магнитных частиц MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированных с антителами к CD31

Клетки с чашки Петри снимали с помощью TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific), центрифугировали 3 мин при 300g. Затем ресуспендировали клетки в концентрации 1×10^7 в 80 мкл культуральной среды. Добавляли 20 мкл магнитных частиц, конъюгированных с антителами к CD31. Инкубировали 15 мин при 4°C. Добавляли 1 мл среды и центрифугировали 3 мин при 300g. Ресуспендировали клеточный осадок в 500 мкл культуральной среды. Заранее промывали культуральной средой колонки LS Column для сортировки: помещали колонки в область магнитного поля MiniMACS Separator и промывали 3 раза по 500 мкл буфера (PBS (Biolot), 2,5% BSA (Merk), 50 мМ ЭДТА (Sigma)). Далее пропускали клеточную суспензию через колонку. Промывали колонку буфером 3 раза по 3 мл и извлекали из колонки отсортированные клетки. Полученные CD31-позитивные клетки переносили и равномерно распределяли на поверхности пластика, покрытого 0,2% желатином в эндотелиальной среде EGM2 (Lonza). Инкубировали чашки Петри с клетками в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37°C). Чтобы равномерно распределить клетки, перемещали чашки Петри из стороны в сторону.

2.4 Методы количественной оценки жизнеспособности и характеристики клеточных популяций

2.4.1 Подсчет клеток с помощью проточной цитометрии

Концентрация и способ подготовки клеточных культур подбирались для определенных антител согласно протоколам фирм-производителей. Клетки с чашки Петри снимали с помощью TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific). Далее клетки центрифугировали 5 мин при 200g. Отбирали супернатант и растворяли клеточный осадок в 100 мкл PBS (Biolot)+2,5% BSA (Merk). Добавляли антитела к целевому маркеру в расчете на 100 тыс. клеток, инкубировали согласно протоколу производителя. Затем отмывали PBS

(Biolot) один раз и растворяли в 500 мкл буфера (PBS (Biolot), 2,5% BSA (Merk)). Переносили суспензию в специальную пробирку для сортирования. Анализ клеточных популяций производился на приборе BD FACS ARIA III в ЦКП «Проточной цитометрии» ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv>).

2.4.2 Оценка пролиферации клеток с помощью ХТТ-анализа

Анализ осуществляли согласно протоколу производителя Cell Proliferation Kit II (Merck). Исследуемые клетки предварительно культивировали в 96-луночном планшете. Затем добавляли ХТТ-реагент и инкубировали в течение 4 часов. Во время инкубации культуральная среда приобретала оранжевый цвет, интенсивность которого измеряли с помощью спектрофотометра Perkin Elmer (2030 Multilabel Reader Victor X3). Длина волны, используемая для измерения оптической плотности вещества, составляла 490 нм.

2.4.3 Оценка ангиогенного потенциала с помощью теста в матрикеле *in vitro*

Данный метод широко используется для оценки способности эндотелиальных клеток образовывать капилляроподобные структуры в экстрацеллюлярном матрикеле. На дно ячейки 48-луночного планшета наносили 150 мкл матригеля (BD Bioscience) и оставляли полимеризоваться 60 мин при комнатной температуре. Затем добавляли суспензию клеток в количестве 3×10^4 в культуральной среде EGM2 (Lonza). Равномерно распределяли клеточную суспензию по поверхности матригеля и оставляли в инкубаторе на 37°C. Проводили детекцию капилляроподобных структур каждые 6, 12, 24 часа с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа. Оценка длины капилляроподобных структур эндотелиальных производных проводилась с помощью программы AngioTool (Zudaire E. *et al.*, 2011).

2.5 Методы получения генетически модифицированных линий ЭСК, экспрессирующих *HIF2A*

2.5.1 Дизайн последовательностей направляющих РНК

Для эффективного нокаута *EIF3E* воспользовались системой редактирования генома CRISPR/Cas9 для удаления промоторной области и участка первого экзона с захватом точки начала транскрипции. Подобрали последовательности направляющих РНК, которые обладают строгой специфичностью к району интереса (табл. 1). Использовали онлайн-ресурсы NCBI, чтобы получить данные о расположении и последовательности промоторной области и экзонов *EIF3E* (NC_000008.11), а также MIT CRISPR Design Tool: <http://crispr.mit.edu>, с помощью которого осуществляли выбор последовательностей направляющих РНК и оценивали возможность off-target взаимодействий. Были выбраны две последовательности направляющих РНК в промоторной области (-158...-138 п.н.) и в экзоне (42...62 п.н.) для формирования делеции района *EIF3E* размером 220 п.н. Для клонирования последовательности направляющих РНК использовали плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP(pX458) (<https://www.addgene.org/48138/>), кодирующую нуклеазу Cas9 и маркерный белок GFP, по ранее описанному протоколу (Cong *et al.*, 2013).

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, необходимые для синтеза направляющих РНК системы CRISPR/Cas9

<i>INT6e</i> sgRNA №1	5'-TCACTCGCGCCCTAACGCAA -3' 5'-TTGCGTTAGGGCGCGAGTGA -3'
<i>INT6</i> sgRNA №2	5'- GCATCGCGCACTTTTTGGAT -3' 5'- ATCCAAAAAGTGCGCGATGC -3'

2.5.2 Клонирование направляющих РНК в вектор

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции

Суммарный объем реакции – 20 мкл

0,5 мкл BbsI, 2-3 ед. акт (NEB)

2 мкл NEBuffer 2.1, 10-кратный

1 мкг плазмидной ДНК

16,5 мкл H₂O mQ

Реакцию инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После прохождения реакции фермент инактивировали нагреванием 20 мин при 65°C.

Гель-электрофорез и выделение из геля

Для электрофоретического разделения ДНК использовали 1% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE (40 mM Трис-HCl (AppliChem), pH 8.0, 20 mM ацетат натрия (BDH), 1 mM ЭДТА (Sigma)) с добавлением бромистого этидия (AppliChem) (0,01 мкг/мл).

После гидролиза рестриктазой BbsI (NEB) полученные фрагменты ДНК нужной длины вырезали острым лезвием. С помощью набора Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit выделяли ДНК из геля по протоколу производителя.

Отжиг и фосфорилирование нуклеотидов

Смешивали все компоненты реакции в одной пробирке на льду. Суммарный объем реакции составлял 10 мкл. Инкубировали реакцию в течение 30 мин при 37°C. Затем инкубировали реакцию 20 мин при 65°C для инактивации фермента.

1 мкл олигонуклеотиды, 100 мкмоль (прямой и обратный олигонуклеотид)

1 мкл 10×T4 буфер для лигирования (NEB)

0,5 мкл T4 PNK, 5 ед. акт. (NEB)

7,5 мкл H₂O mQ

Реакция лигирования

Общий объем реакции составлял 10 мкл. Смешивание всех компонентов реакции проводили на льду. Инкубировали реакцию в течение ночи при 4°C.

1 мкл ДНК плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) для CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута *EIF3E*, 50 нг (порезанная по сайту рестрикции BbsI)

1 мкл олигонуклеотидов (фосфорилированные двуцепочечные фрагменты из предыдущего этапа), 37, 5 нг

1 мкл 10×T4 лигирующий буфер (Promega)

0,5 мкл T4 ДНК лигаза, 1-3 ед. акт. (Promega)

6,5 мкл H₂O mQ

2.5.3 Получение химически компетентных клеток *E. coli* штамма Stb13

Клетки *E. coli* (штамм Stb13) выращивали в среде SOB (0,05% NaCl (BioFroxx); 2% бактотриптон (DIFCO); 0,5% дрожжевой экстракт (DIFCO); 2,5 мМ KCl (BDH); 10 мМ MgCl₂ (BDH); pH 7.5) при 37°C; O.D. 550 (культуры клеток) = 0,55-0,65 о.е. с последующим охлаждением на льду (30 мин) и центрифугированием (10 мин, 300g при 4°C). Осадок суспендировали в 10 мл буфера для трансформации FSB (10 мМ ацетат калия (Медиген), pH 7.5; 100 мМ KCl (BDH); 45 мМ MgCl₂ (BDH); 10 мМ CaCl₂ (BDH); 3 мМ Co(NH₃)₆Cl₃ (BDH), 10% глицерин (Helicon)) при T буфера = 4 C и инкубировали на льду 15 мин. Клетки повторно центрифугировали и суспендировали в 20 мл FSB. Добавляли 1,4 мл ДМСО (Sigma-Aldrich) и инкубировали на льду (15 мин) (процедуру проводили дважды). Полученные клетки фасовали и хранили на -70°C.

2.5.4 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Центрифугировали 1,5 мл полученной бактериальной культуры 2 мин при 13000g, затем убирали супернатант. Добавляли к осадку по 200 мкл следующих растворов: раствор для ресуспендирования №1 (Tris-HCl (AppliChem) pH 8.0, 50 мМ; ЭДТА (Sigma), 10 мМ; РНКаза А (Sigma) 100

мкг/мл; суспендировали 5 мин), раствор для лизиса №2 (SDS (BDH), 1%; NaOH, 0,2 N, оставляли на 5 мин), нейтрализующий раствор №3 (KAc (Медиген), 5 M; ледяная уксусная кислота, H₂O mQ; оставляли до образования творожистого осадка на 2-5 мин). Центрифугировали 10 мин при 13500g. Добавляли к осадку 0,7 V изопропанола (Химмед), центрифугировали 10 мин при 13500g, затем – 1 мл 75% этанола (ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика»), центрифугировали 2 мин при 13500g. Концентрацию ДНК в осадке определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop-1000 ($\lambda=260$ нм). Для нуклеофекции плазмидную ДНК очищали с помощью набора PureLink™ HiPure Plasmid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), Midiprep Kit, согласно рекомендациям производителя.

2.5.5 Секвенирование плазмидной ДНК

Для верификации последовательностей направляющих РНК в составе векторных конструкций проводили реакции секвенирования плазмидной ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTC-3' и 5'-ССААGТАGGAАAGTСССАТААG-3' (Larsen *et al.*, 2013) и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), а также стандартной программы (96°C, 5 мин; 96°C, 20 сек; 56°C, 15 сек; 60°C, 4 мин; (2-4 этапы): 40 циклов; 10°C, ∞. Реакцию проводили на амплификаторе PCR System 9700 (GeneAmp®), анализ реакций секвенирования проводили в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН).

2.5.6 Доставка векторов с помощью нуклеофекции в ЭСК человека

Генетические конструкции доставляли в клетки методом нуклеофекции на приборе Neon® Transfection System (Invitrogen Life Technologies, МРК5000). Добавляли в культуральную среду 10 мМ Rock-ингибитор (StemRD) за сутки до нуклеофекции, чтобы предотвратить гибель ЭСК после нуклеофекции. Снимали клетки с поверхности матригеля или слоя ЭФМ с помощью TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific). При культивировании клеток на слое ЭФМ необходимо сделать “преплейтинг”. Такая процедура

проводится для очистки клеточной популяции ЭСК от контаминации фибробластных клеток. Для этого клетки суспендировали в 9 мл культуральной среды и равномерно распределяли по желатинизированной чашке Петри площадью 60 см². Затем оставляли чашку Петри в инкубаторе на 15-60 мин. С помощью микроскопа оценивали количество фидерных клеток, контактирующих с поверхностью культурального пластика. Когда большинство фибробластных клеток начинало прикрепляться к поверхности, суспензию ЭСК собирали и центрифугировали 5 мин при 200g. Затем отбирали супернатант и ресуспендировали клетки в PBS. Клетки окрашивали Trypan Blue (Invitrogen) и производили подсчет количества жизнеспособных клеток на приборе The Countess™ automated cell counter (Thermo Fisher Scientific). Далее промывали клеточный осадок PBS, чтобы полностью убрать остатки культуральной среды, центрифугировали на 200g в течение 5 мин. К осадку клеток добавляли плазмидную ДНК со встройками направляющих РНК. Концентрация ДНК составляла 7 мкг на 400 тыс. клеток. Доводили объем реакции до 100 мкл с помощью ресуспендирующего буфера R (Thermo Fisher Scientific Neon® Kit, 100 µL). Хорошо перемешивали все компоненты реакции нуклеофекции. Дальнейшая работа на приборе Neon® Transfection System (Thermo Fisher Scientific) выполнялась согласно рекомендациям производителя со следующими условиями электропарации: единичный импульс 1200 В, 30 мс.

После нуклеофекции клетки перемещали в чашку Петри площадью 10 см² в культуральной среде с Rock-ингибитором Y-27632 (StemRD), но без антибиотика. Через 6-8 часов заменяли на среду с пенициллином/стрептомицином. Через 24-48 часов клетки первично проверяли на предмет наличия целевых плазмид с помощью детекции GFP-позитивных клеток с целевыми генетическими конструкциями с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа. Затем проводили сортировку и количественную оценку GFP-позитивных клеток

методом проточной цитометрии с помощью прибора S3 (BioRad) согласно рекомендациям производителя.

2.5.7 Сортинг и количественная оценка GFP-позитивных клеток

Клетки с чашки Петри снимали с помощью TrypLETM Express (Thermo Fisher Scientific). Далее клетки центрифугировали 5 мин при 200g. Отбирали супернатант и растворяли клеточный осадок в 3 мл PBS (Biolot). Переносили суспензию в специальную пробирку для сортирования. С помощью проточного цитофлуориметра S3 (Bio-Rad) производили подсчет и сортирование GFP-позитивных ЭСК. Далее выполняли субклонирование полученной GFP-позитивной популяции ЭСК. Разбавляли клеточную суспензию в культуральной среде после сортирования таким образом, чтобы одна клетка соответствовала одной лунке 96-ти-ячеечного планшета. Осадок полученных GFP-позитивных клеток суспендировали в культуральной среде для ЭСК, содержащей Rock-ингибитор (StemRD). Хорошо перемешивали суспензию для равномерного распределения клеток. Затем раскапывали по лункам планшета с помощью многоканальной пипетки.

2.5.8 Экспресс-метод выделения ДНК для первичного скрининга субклонов

С целью подтверждения наличия целевого делетированного района гена *EIF3E* выделяли геномную ДНК лизирующим буфером (Tris-HCl (pH 8.0, 10 мМ) (AppliChen), Igepal (0,35%) (Sigma), ЭДТА (10 мМ) (Serva), Tween (0,35%) (AppliChen), Proteinase K (0,4 мкг/мл) (Roche), H₂O mQ) (Shatzkes *et al.*, 2014, с модификациями). Буфер добавляли в расчете 35 мкл на 0,5 см². Затем инкубировали планшеты в течение 3 часов при 65°C во влажной камере и 10-15 часов при 4°C. Полученный лизат разбавляли водой в 5-6 раз. Кроме того, использовали QuickExtract™ DNA Extraction Solution по рекомендациям производителя, как более быстрый и надежный способ получения клеточных лизатов для анализа геномной ДНК.

2.5.9 Выделение геномной ДНК и РНК

РНК и геномную ДНК образцов выделяли с помощью TRIzol Reagent® (Life technologies) согласно рекомендациям производителя. Для синтеза кДНК использовали Random Hexamer Primer (500 мкг/мл, Promega) и M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Концентрацию РНК и кДНК определяли флуорометрически на приборе Qubit™ 3.0 Fluorometer с использованием Qubit® 3.0 Quantitation Starter Kit согласно рекомендациям производителя.

2.6 Методы характеристики ЭСК человека с делецией *EIF3E*

2.6.1 Подбор праймеров для первичного скрининга субклонов.

Первичный скрининг субклонов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием

Подбор праймеров (табл. 2) на район требуемой делеции производили в программе DNASTAR Lasergene, раздел PrimerSelect, а также с помощью онлайн ресурсов <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl> Для реакции ПЦР для гена *EIF3E* использовали 2-кратную смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР 2-Color (Биолабмикс). Реакцию проводили на амплификаторе PCR System 9700 (GeneAmp®) (программа: 95°C, 5 мин; 95°C, 30 сек; 55°C, 30 сек; 72°C, 30 сек; (2-4 этапы): 40 циклов; 72°C, 5 мин; 4°C, ∞), с последующей визуализацией ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

Таблица 2. Последовательности праймеров для детекции делеции *EIF3E*

Название праймеров	Последовательность олигонуклеотидов	Tm (°C)	Длина ПЦР продукт а, п.н.
EIF3Edel1F	5'-ATTCTTCCCTGTATGTAАСТТССТG-3'	52,4	646
EIF3Edel1R	5'-TGAGACGACGCTAAАСТТАССА-3'	53,5	

EIF3Edel2F	5'-CCTCATGTTGTCCTTTGCCG-3'	54,6	607
EIF3Edel2R	5'-ACGCTAAACTACCAGAAGATCCT-3'	53,4	
EIF3Edel3F	5'-TTCTTCCCTGTATGTAACCTCCTG-3'	52,2	568
EIF3Edel3R	5'-ACTACAGACACCACCTTTCGG-3'	54,6	
EIF3Edel4F	5'-AATAGACTGCAAGCCACTGACTG-3'	56,0	361
EIF3Edel4R	5'-AGAGAAATTCAAGAAGCGGAAAGA-3'	53,2	
EIF3Edel5F	5'-CCGCATCCCAATGCAGTC-3'	59,6	500
EIF3Edel5R	5'-TACAGACACCACCTTTCGGC-3'	57,2	
EIF3Edel4F	5'-AATAGACTGCAAGCCACTGACTG-3'		454
EIF3Edel5R	5'-TACAGACACCACCTTTCGGC-3'	57,5	

2.6.2 Выделение ДНК из агарозного геля для секвенирования

Для подтверждения наличия целевой делеции проводили секвенирование фрагментов, полученных в результате ПЦР. ДНК для секвенирования выделяли с помощью набора Cleanup Mini (Евроген) согласно рекомендациям производителя. Для секвенирования использовали следующие праймеры: EIF3Edel4F, EIF3Edel5R, EIF3Edel3R,

DEL_F (5'GCGATGCGAGTAGTCAAGTC3'),

DEL_R (5'CCTAACGCAAAGGGTGGGACA-3').

2.6.3 Иммуофлуоресцентное окрашивание клеток антителами на основные маркеры плюрипотентности

ЭСК, растущие на культуральном пластике, после фиксации 4% PFA (раствор параформальдегида) (Sigma) в течение 10 мин пермеабелизовали 0,5% тритоном X-100 (Merk) 1 час и блокировали 2,5% BSA в PBS. Окрашивание первичными и вторичными антителами проводили согласно протоколам фирм-производителей. Анализировали окрашенные клетки на

инвертированном флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E в программе Nikon AR. Первичные антитела: TRA1-60, hNANOG, OCT 3/4, SOX2. Вторичные антитела представлены в Таблице 6.

2.6.4 Оценка экспрессии генов методом количественной ПЦР в режиме реального времени

Для оценки экспрессии генов, связанных с поддержанием состояния плюрипотентности (*SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG*, *hMYC*, *KLF4*), генов гликолитического пути и окислительного фосфорилирования (*MT-CO1*, *PDHX*, *MT-ND1*, *PDK1*, *HK1*), генов мезодермальной дифференцировки и генов, вовлеченных в процессы ангиогенеза (*ANG1*, *CXCR4*, *FGF2*, *SDF1*, *VEGFR2*, *VEGF*, *Brachyury*) провели количественную ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) на приборе LightCycler® 480 Instrument, в 96-ти-лучночном планшете (Roche, LightCycler® 480 Software). Каждая реакция (общим объемом 20 мкл) содержала 10 мкл смеси БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (RM04-40, Биолабмикс), 400 нМ праймеры, кДНК исследуемых линий в концентрации 60 нг/мкл (на 60 мкл реакции). Использовали стандартную программу: 95°C, 5 мин; 95°C, 15 сек; T°C отжига праймеров, 1 мин, шаг 2 (40 циклов); 95°C, 30 сек, 65°C, 1 мин; 97°C; 40°C, 10 сек; и пары праймеров для генов *SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG*, *hMYC*, *KLF4* (по Медведев и др., 2014), с модификациями. T отжига праймеров для генов представлена в Таблице 3. В качестве референсного гена использовали АСТВ. Каждая реакция проводилась в четырех повторностях.

Таблица 3. Оценка экспрессии генов гликолитического пути и окислительного фосфорилирования методом количественной ПЦР в режиме реального времени

Название праймеров	Последовательность олигонуклеотидов	Tm (°C)	Длина ПЦР продукт а, п.н.

PDK1_F	5'-CTGGGTAATGAGGATTTGACTGT-3'	62	74
PDK1_R	5'-AAGTCTGTCAATTTTCCTCAAAGG-3'		
HK1_F	5'-CACCTGTGAGGTTGGACTCA-3'	62	80
HK1_R	5'-CCACCATCTCCACGTTCTTC-3'		
PDHX_F	5'-GTCCCTCTAAAGCAGCTCAAAA-3'	63	93
PDHX_R	5'-CTCCCTTCAAAAAGATCCAACCTG-3'		
MT-CO1_F	5'-AGGTTTGAAGCTGCTTCTTC-3'	61	106
MT-CO1_R	5'-CGCTGCATGTGCCATTAAGA-3'		
MT-ND1_F	5'-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3'	63	115
MT-ND1_R	5'-GGAGAGGTTAAAGGAGCCACT-3'		

Таблица 4. Последовательности праймеров для анализа экспрессии HIF-таргентных генов и маркера мезодермальной дифференцировки в эндотелиальных производных ЭСК

Название праймеров	Последовательность олигонуклеотидов	Tm (°C)	Длина ПЦР продукта, п.н.
ANG1F	5'-ATGGGGGAGGTTGGACTGTA-3'	64	151
ANG1R	5'-TGCCTCTGACTGGTAATGGC-3'		
CXCR4 F	5'-TGGCCTTATCCTGCCTGGTATTGT-3'	57,6	173
CXCR4 R	5'-AGGAGTCGATGCTGATCCCAATGT-3'		
FGF2 F	5'-AGCGACCCTCACATCAAGCTACAA-3'	60	88
FGF2 R	5'-TAGCCAGGTAACGGTTAGCACACA-3'		
SDF1 F	5'-TAGTCAAGTGCGTCCACGA-3'	55	143
SDF1 R	5'-GGACACACCACAGCACAAC-3'		
VEGFR2 F	5'-CGGTCAACAAAGTCGGGAGA-3'	59	123

VEGFR2 R	5'-CAGTGCACCACAAAGACACG-3'		
VEGF F	5'-TTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGG-3'	58	125
VEGF R	5'-ACCACTTCGTGATGATTCTGCCCT-3'		
Brachyury F	5'-ACCTTCCATGTGAAGCAGCAA-3'	60	258
Brachyury R	5'-CTCCACAGTTGGGTTCATCTGTAA-3'		

2.7. Оценка экспрессии HIF с помощью цифровой ПЦР в каплях

Реакции проводились на базе ЦКП клеточных технологий ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Для проведения цифровой ПЦР в каплях применяли стандартные протоколы 10026235 ddPCR™ Supermix for Probes и ddPCR™ Total Guide bulletin 6407 (BIO-RAD), оборудование: ddPCR™ Foil Heat Seal, DG8™ Cartridges for QX100™ / QX200™ Droplet Generator (186-4008, BIO-RAD), Droplet Generator DG8™ Gasket (186-3009, BIO-RAD), ddPCR™ Plate Kit (10023379), QX100™ Droplet Generator, QX100™ Droplet Reader, PX1™ PCR Plate Sealer, амплификатор T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) и реактивы: Droplet Generation Oil for Probes (186-3005, BIO-RAD), ddPCR™ Supermix for Probes, 500 reactions (186-3010, BIO-RAD), 2× ddPCR™ Buffer Control for Probes (720001597, BIO-RAD). Концентрацию праймеров и проб выбирали из предполагаемых по данным qRT-PCR и стандартных протоколов: 400 нМ/ 400 нМ, 900 нМ/ 250 нМ. Температуру отжига пар праймеры-проба подбирали с помощью градиентной ПЦР в диапазоне температур 55-65 °С. Реакции проводили в двух биологических повторностях и трех технических. Для оценки уровня экспрессии референсных генов в условиях нормоксии и гипоксии брали эквивалентное количество РНК на синтез кДНК, оптимальную концентрацию кДНК выбирали, исходя из результатов, в зависимости от уровня копийности гена. Для оценки уровня экспрессии целевых генов *HIF1A*, *HIF2A* и *EIF3E* использовали праймеры и меченные флуорохромами пробы, подобранные ранее для qRT-PCR.

Таблица 5. Последовательности праймеров и зондов для экспериментов по подбору референсных генов:

Название праймеров	Последовательность олигонуклеотидов	Tm (°C)	Длина ПЦР продукта, п.н.
B2M_F B2M_R B2M_Probe	5'-CACCCCCACTGAAAAAGATG-3' 5'-ATATTA AAAAGCAAGCAAGCAGAA-3' (Wu <i>et al.</i> , 2013) HEX-ACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGG-BHQ1	56	244
RPL13A_F RPL13A_R RPL13A_Probe	5'-GCTGTGAAGGCATCAACATTT-3' 5'-CATCCGCTTTTTCTTGTCGTA-3' (Zhou <i>et al.</i> , 2013) HEX-TTGAAGTACCTGGCTTTCCTCC-BHQ1	56	245
RPLP0_F RPLP0_R RPLP0_Probe	5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' 5'-TCAGCAAGTGGGAAGGTGTAATC-3' (Bakhashab <i>et al.</i> , 2014) HEX-CTGGCCTTGTCTGTGGAGAC-BHQ1	63	75
TFRC_F TFRC_R TFRC_Probe	5'-GTCGCTGGTCAGTTCGTGATT-3' 5'-AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC-3' HEX-CCCATGATGTTGAATTGAACCTGG-BHQ1	65	80
GAPDH_F GAPDH_R GAPDH_Probe	5'-TGTTGCCATCAATGACCCCTT-3' 5'-CTCCACGACGTA CT CAGCG-3' (по Медведев С. и др., 2014) FAM-CATGTAAACCATGTAGTTGAGGTC-BHQ1	64	202
ACTB_F ACTB_R ACTB_Probe	5'-GTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' 5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3' R6G-CGCCCTGGACTTCTTCGAGCAAGAGA-BHQ2	61	174

HIF2A_F	5'-TCATGCGACTGGCAATCAGC-3'	56	187
HIF2A_R	5'-GTCACCACGGCAATGAAACC-3'		
HIF2A_Probe	FAMCTCTCCTCAGTTTGCTCTGAAABHQ1		
HIF1A_F	5'-CCACAGGACAGTACAGGATG-3'	56	149
HIF1A_R	5'-TCAAGTCGTGCTGAATAATACC-3'		
HIF1A_Probe	FAM-TGAGTTTCAACCCAGACATATCC-BHQ1		
EIF3E_F	5'-GACACATTGTCTGAATTGCATTAAGAT-3'	56	116
EIF3E_R	5'-CACTTCAGTCTCTTCAGCAGAGAAC-3'		
EIF3E_Probe	FAM-TGATTGAAGAAAACAAACAGAGACCAGTGAATGA-BHQ1		

2.8. Методы определения наличия белка EIF3E в исследуемых клеточных линиях ЭСК человека

2.8.1 Приготовление клеточных лизатов для Вестерн блот-гибридизации

Для получения клеточных лизатов исследуемых линий предварительно готовили Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) буфер с применением cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASY pack Protease Inhibitor Cocktail Tablets (05892791001, Roshe) и дополнительных компонентов: NaCl (BioFroxx) (150 мМ), ЭДТА (Sigma) (5 мМ), Tris-HCl (AppliChem) (pH 8.0, 50 мМ), дезоксихолат натрия (0,5%), NP40 Igepal (Sigma) (1%), SDS (BDH) (0,1 %), H₂O mQ. Клетки снимали с использованием PBS (Biolot) буфера, центрифугировали 5 мин при 300g. Осадок растворяли в PBS, центрифугировали повторно и добавляли к осадку RIPA буфер в расчете 24 мкл на один образец (4×10⁵ клеток). Лизаты оставляли в шейкере (4°C, 30 мин), центрифугировали пробирки 14000g при 15 мин (4°C). Полученные клеточные лизаты хранили на -70 °C.

2.8.2 Измерение концентрации белка в клеточных лизатах исследуемых линий

Концентрацию белка в клеточных лизатах определяли с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), согласно рекомендациям производителя. Измеряли оптическую плотность образцов с использованием сканирующего спектрофотометра Perkin Elmer (2030 Multilabel Reader Victor X3). Длина волны, используемая для измерения оптической плотности продукта, составляла 580 нм. Построение калибровочной кривой и анализ результатов проводили в программе OriginPro 8 SRO, v 8.0724 (B724), Copyright © 1991-2007 Origin Lab Corporation; One Round house Plaza, Northampton, MA 01060 USA. Полученные данные использовали для приготовления разведений лизатов для Вестерн блот-гибридизации.

2.8.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для электрофореза использовали белковые экстракты, полученные путем лизиса ЭСК человека с помощью RIPA буфера. Полученные клеточные лизаты растворили в буфере для нанесения образцов (Sampler Buffer SB: 0,0625 М, Трис-НСl (AppliChem), рН 6.8, 2% SDS (BDH), 10% глицерин, 0,05% БФС (Диаэм), 1% 2-меркаптоэтанол (Merk)). Образцы инкубировали 5 мин при 98°C, затем центрифугировали при 14000g в течение 5 мин. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (10×Трис-глициновый буфер для электрофореза, Running Buffer (250 мМ Трис (Norgen), 1,92 М Глицин (Sigma), 1% SDS (BDH), рН 8.3)), сначала в концентрирующем (5% раствор акриламида (Sigma), 130 мМ Трис-НСl (AppliChem) рН 6.8, 0,1% SDS (BDH), 1 мг/мл персульфата натрия, 0,05% TEMED), затем – в разделяющем (0,375 М Трис-НСl (AppliChem) рН 8.8, 7% раствор акриламида (Sigma), 0,1% SDS (BDH), 0,05 мг/мл персульфата натрия, 0,033% TEMED (Reanol)) полиакриламидном геле в зависимости от размера белка при напряжении электрического поля 10 В/см в концентрирующем, 18 В/см – в разделяющем геле.

2.8.4 Анализ результатов Вестерн блот-гибридизации

После проведения электрофореза белки из полиакриламидного геля переносили на мембрану Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting (BIO-RAD). Для этого гель предварительно инкубировали в 1×буфере для полусухого переноса 15 мин (25 мМ Трис (BDH), 192 мМ глицин (Sigma), 20% метанол (Вектор), 0,1% SDS (BDH)). Мембрану сначала вымачивали в метаноле 5 мин, а затем 5 мин в буфере для переноса. Перенос белков выполняли на приборе Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD) в течение 1 часа 30 мин с ограничением по силе тока 5 мА/см² и напряжению до 25 В. После переноса мембрану промывали в TBST (20 мМ Tris-HCl (AppliChen), 150 мМ NaCl (BioFroxx), 0,05% Tween20 (AppliChen), pH 7.5). Далее мембрану инкубировали в блокирующем буфере (5% сухое молоко или 5% бычий сывороточный альбумин в TBST) в течение 1 часа на шейкере при комнатной температуре, затем 18 часов – с первичными антителами на шейкере при 4 С и 2 часа – со вторичными антителами при комнатной температуре. Первичные и вторичные антитела приведены в Таблице 6. Мембраны от несвязанных антител отмывали 3 раза при комнатной температуре в течение 15 мин буфером TBST. Детекцию сигнала осуществляли с помощью хемолюминесценции. Для этого смешивали 1:1 растворы люминола и усиливающего агента из набора SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (ThermoScientific), затем наносили 125 мкл на см², инкубировали 5 мин в темноте. Детекцию сигнала проводили на приборе ChemiDoc™ XRS+ Imaging System в программе Quantity One – 4.69.

Таблица 6. Характеристика первичных и вторичных антител, использованных при иммунофлуоресцентном окрашивании (ИФ), Вестерн-блот-гибридизации (ВБ)

Антитела	Тип	Источник	Каталожный номер	Разведение	
				ВБ	ИФ
Первичные антитела					
Анти-Human CD 31	мышинные моноклональные	ДАКО	14028292		1:200

Анти-Фактор фон Виллебранда	кроличьи поликлональные	Life Technologies	A21134		1:200
Анти-EIF3ε	кроличьи поликлональные	Abcam	36766	1:1000	
Анти-EPAS1	кроличьи поликлональные	Sigma-aldrich	SAB2701992	1:1000	
Анти-Анти-ActinB	кроличьи поликлональные	Abcam	8227	1:3000	
Анти-TRA1-60	мышинные моноклональные	Abcam	ab16288		1:200
Анти-hNANOG	кроличьи поликлональные	ReproCELL	RCAB003P-F		1:200
Анти-ОСТ 3/4	мышинные моноклональные	Santa Cruz Biotechnology	SC-5279		1:100
Анти-SOX2	кроличьи поликлональные	РГП «Национальный центр биотехнологии» Казахстан	NCB1601		1:200
anti-COLLAGEN 4 типа	мышинные моноклональные	abcam	ab34710		1:200
anti-FIBRONECTIN	мышинные моноклональные	abcam	ab6328		1:200
Вторичные антитела					
Peroxidase-conjugated (HRP) Anti-mouse Ig G (H+L)		Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC	132222	1:20000	
Peroxidase-conjugated (HRP) Anti-rabbit IgG (H+L) donkey		Jackson ImmunoResearc Laboratori, INC	132960	1:20000	

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	козьи поликлональные	Life Technologies	A11029		1:400
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM	козьи поликлональные	Life Technologies	A-21042		1:400
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	козьи поликлональные	Life Technologies	A11008		1:400

2.9. Статистическая обработка данных

Для анализа полученных результатов qRT-PCR применяли $2^{-\Delta\Delta CT}$ метод (Livak and Schmittgen, 2001). Кроме того, для статистической оценки достоверности результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в программе Microsoft Excel 2007. Также для оценки достоверности различий полученных данных проточной цитометрии применяли критерий Хи-квадрат. Данные цифровой ПЦР в каплях обрабатывали и анализировали с помощью программы Quanta Soft™ Software Version 1.7.4.0917. Для анализа данных экспрессии референсных генов в нормоксических и гипоксических условиях использовали программу geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Оценка длины капиллярноподобных структур эндотелиальных производных проводилась с помощью программы AngioTool (Zudaire *et al.*, 2011).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе для модуляции экспрессии *HIF2A* в ЭСК человека был применен метод CRISPR/Cas9 для целевого нокаута *EIF3E* – основного ингибитора *HIF2A*. Данный метод позволяет стабилизировать белковый продукт *HIF2A* в клетках в условиях нормоксии и вызывает повышение экспрессии мРНК.

3.1 Получение генетически модифицированных линий ЭСК, экспрессирующих *HIF2A*

Были подобраны две последовательности направляющих РНК на ген *EIF3E* таким образом, чтобы делеция (Δ) составляла 220 п.н. и включала участок промотора и начало первого экзона (рис. 7).

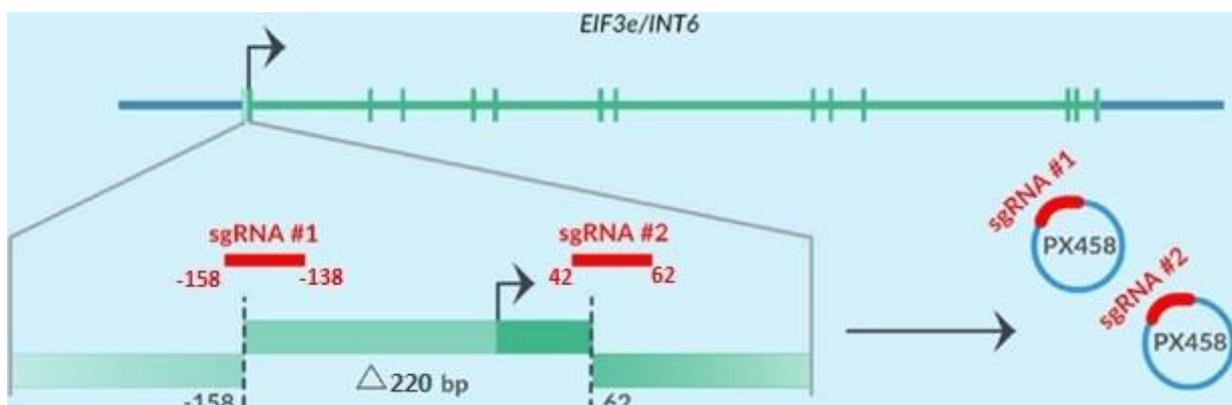


Рисунок 7. Схема расположения направляющих РНК для получения делеции (Δ) в гене *EIF3E*. Первая направляющая РНК подобрана на район -158...-138 п.н. до начала точки старта транскрипции, вторая – на район 42..62 п.н. начала первого экзона. Вертикальными полосками показаны экзоны. Стрелкой показана точка старта транскрипции. Красные линии и числовые значения соответствуют положению направляющих РНК.

Подобранные последовательности направляющих РНК были клонированы в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP(pX458), кодирующую нуклеазу Cas9 и маркерный белок GFP, по ранее описанному протоколу (Song *et al.*, 2013). Для верификации последовательностей направляющих РНК в

составе векторных конструкций проведены реакции секвенирования плазмидной ДНК.

Доставку двух векторов, включающих последовательности направляющих РНК и нуклеазу Cas9, проводили с помощью нуклеофекции на приборе Neon® Transfection System (ThermoScientific). Через 24-48 часов проводили сортирование GFP-положительных клеток, содержащих целевые конструкции, методом проточной цитометрии на приборе S3 (BioRad). В результате было получено 18% GFP-положительных клеток, которые содержат целевые конструкции (рис. 8, Г). В результате механического субклонирования сортированных клеток было получено 43 субклона ЭСК линий NuES9 и ESM04.

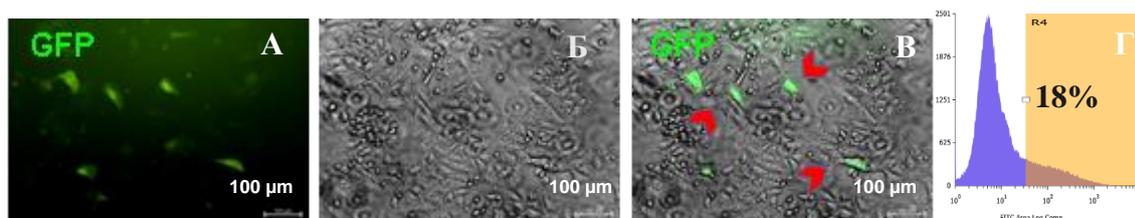


Рисунок 8. Визуализация экспрессии GFP-белка в ЭСК клеток линии NuES9, нуклеофицированных плазмидой (PX458) pSpCas9(BB)-2A-GFP, несущей целевые конструкции (А, Б, В). Г – графическое отображение количества GFP-положительных клеток по данным проточной цитометрии.

3.2 Разработка системы детекции делеции в полученных субклонах ЭСК

3.2.1 Подбор праймеров для первичного скрининга субклонов.

Первичный скрининг субклонов с помощью ПЦР с последующим секвенированием

Для анализа района делеции в полученных субклонах были подобраны пять пар праймеров (рис. 9) и оптимизированы условия проведения ПЦР с использованием различных комбинаций праймеров (рис. 10). В результате были выбраны 3 пары праймеров. (1F/4R: T отжига = 52.8°C, размер продукта = 480 п.н., 4F/3R: T отжига = 55.3°C, размер продукта = 449 п.н., 4F/5R: T

отжига= 55.6°C, размер продукта= 454 п.н). Затем провели скрининг полученных субклонов (рис. 10).

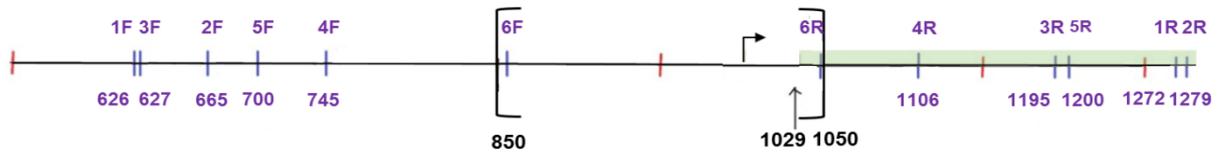


Рисунок 9. Схематичное представление района предполагаемой делеции в гене *EIF3E* с подобранными парами праймеров. Область делеции обозначена квадратными скобками []. Стрелкой вправо обозначена точка старта транскрипции, стрелкой вверх – начало кодирующей части, зеленым цветом – кодирующая часть гена *EIF3E*, фиолетовым – названия праймеров и их позиции относительно точки старта транскрипции.

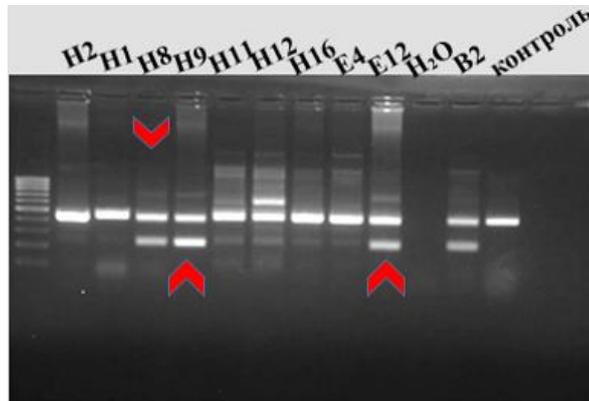


Рисунок 10. Первичный скрининг полученных субклонов. Анализ района *EIF3E* в полученных субклонах. Наличие делетированного района *EIF3E* в субклонах H8, H9, E12 с пары праймеров 4F/5R, контроль – NuES9 без делеции, B2 – контрольный субклон ИПСК с делецией *EIF3E*, ранее полученный в лаборатории (Живень и др., 2018).

В результате анализа при первичном скрининге выявлено 2 субклона H8 и H9 линии NuES9, а также 1 субклон E12 линии ESM04 (рис. 10). Полученные субклоны являются гетерозиготными по целевой делеции. Данные подтверждены секвенированием (рис. 11). Однако во втором аллеле гена *EIF3E* в полученных субклонах также детектируются участки с делецией размером 7 п.н. (H9), 2 п.н. (E12), 8 п.н. (H8) в промоторном районе (рис. 12).

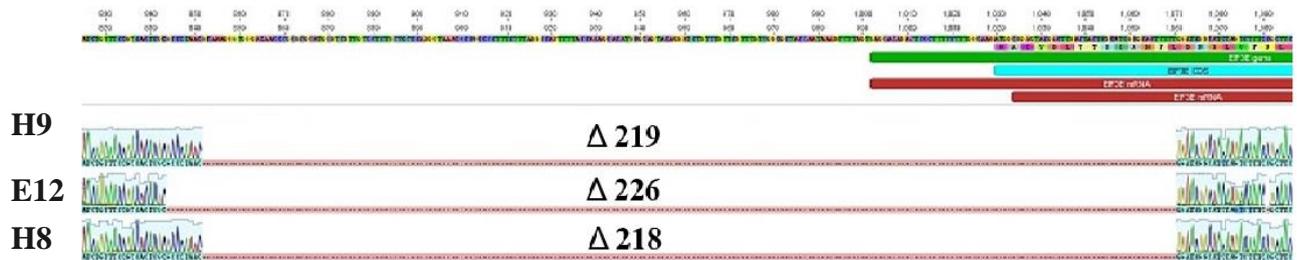


Рисунок 11. Секвенограмма области с целевой делецией (Δ , п.н.) участка одного из аллелей *EIF3E* в субклонах H9, H8, E12.

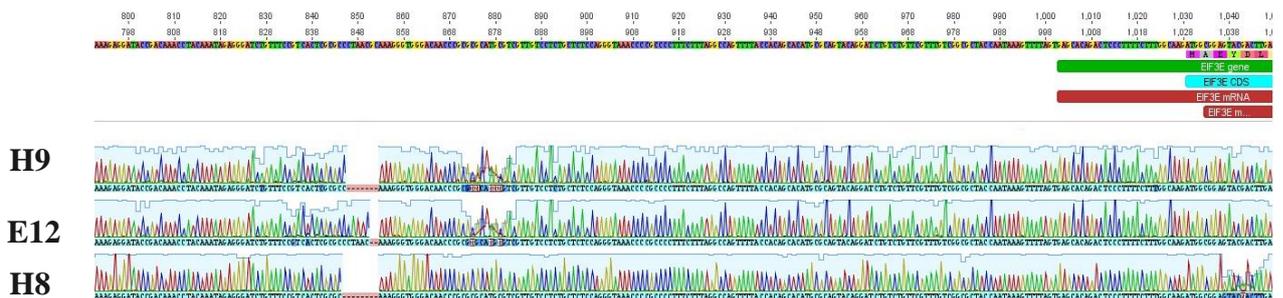


Рисунок 12. Секвенограмма области с минимальной делецией (Δ , п.н.) участка одного из аллелей *EIF3E* в субклонах H9, E12, H8.

3.3 Картирование полученных субклонов линий NuES9 и ESM04 с делецией участка гена *EIF3E*

В процессе получения субклонов клетки прошли значительное количество циклов деления и пассажей. В результате существует возможность накопления хромосомных нарушений, и кариотип полученных субклонов также мог претерпеть изменения. Поэтому на начальном этапе характеристики клеток было важно проанализировать кариотип.

В итоге было показано, что субклоны H9 и E12 линий NuES9 и ESM04 демонстрируют нормальный хромосомный набор 46, XX (рис. 13 А и Б). Полученные субклоны могут быть использованы в дальнейшей работе, в том числе для получения эндотелиальных производных. Отсутствие хромосомных aberrаций свидетельствует о том, что в полученных результатах работы нет вклада, связанного с нестабильностью кариотипа.

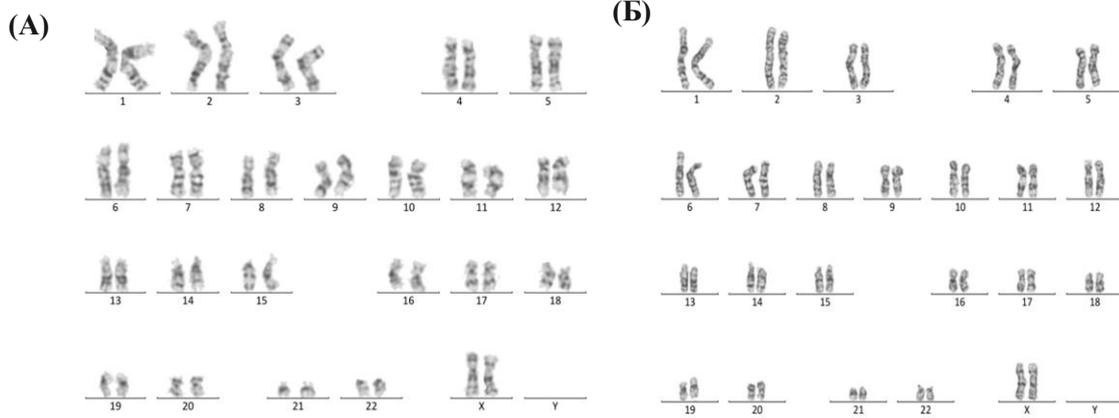


Рисунок 13. Кариотип субклонов А) Н9 и Б) Е12 линий HuES9 и ESM04.

3.4 Характеристика плюрипотентности в субклонах линий HuES9 и ESM04 с делецией участка гена *EIF3E*

Субклоны с делецией промоторного района и участка первого экзона гена *EIF3E* линий HuES9 и ESM04 демонстрируют экспрессию характерных маркеров плюрипотентности (рис. 14 и 15). У субклона E12 ($\Delta 226$ п.н.) наблюдается достоверное повышение экспрессии *NANOG*, *KLF4*, *SOX2*, *hMYC*, но снижение экспрессии *OCT3/4* в сравнении с контрольным образцом ESM04. В субклоне Н8 ($\Delta 218$ п.н.) обнаруживается повышенный уровень экспрессии *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4*, но пониженный *hMYC*, *NANOG*. В субклоне Н9 наблюдается пониженная экспрессия *KLF4*, *SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG*.

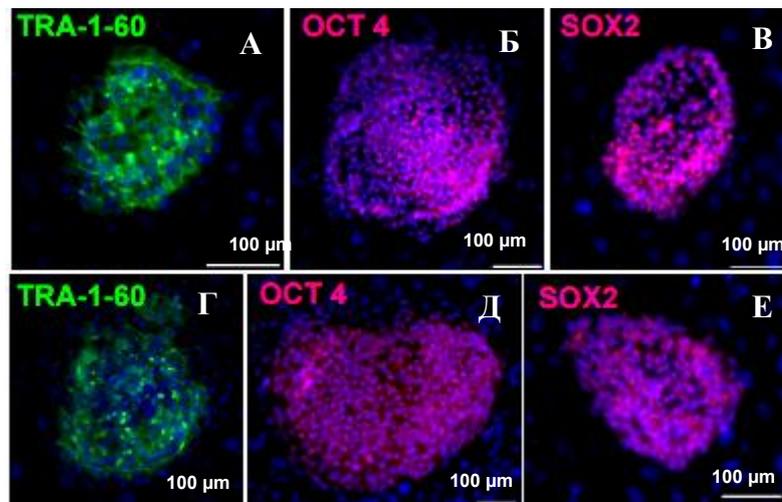


Рисунок 14. Иммунофлуоресцентное окрашивание генетически модифицированных ЭСК человека линий HUES9 и ESM04 антителами к маркерам плюрипотентности (зеленый и

красный сигнал), ядра окрашены DAPI (синий сигнал): А-В – субклон Н9, Г-Е – субклон Е12.

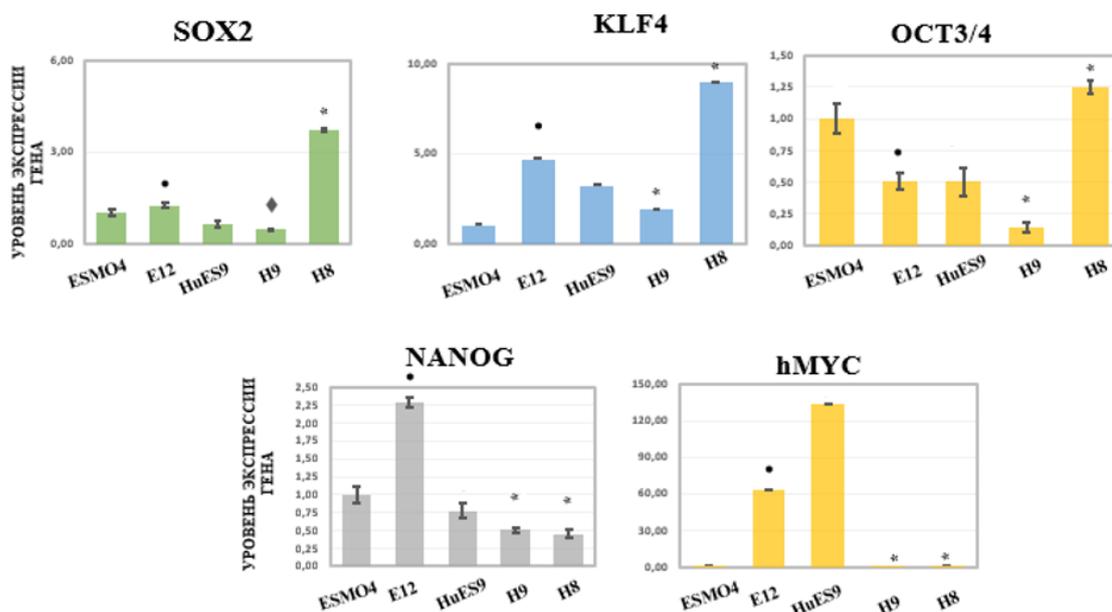


Рисунок 15. Анализ уровня экспрессии генов, отвечающих за поддержание состояния плюрипотентности. HUES9 и ESMO4 – контрольные линии, H8, H9, E12 – полученные субклоны с делецией *EIF3E*, (*) $p < 0,001$, (•) $p < 0,001$, (♦) $p < 0,05$ по сравнению с контрольной линией.

3.5 Оценка пролиферации и жизнеспособности исследуемых ЭСК человека методами ХТТ-анализа и FACS с использованием йодида пропидия и аннексина V

В ходе работы для того, чтобы показать сохранение жизнеспособности и пролиферативного потенциала полученных субклонов H9 и E12 с делетированным районом в гене *EIF3E*, а также ЭСК в условиях гипоксии и псевдогипоксии, был проведен ХТТ-анализ и FACS с использованием йодида пропидия и аннексина V (рис. 16 и 17). ХТТ-коэффициент поглощения отражает пролиферативный потенциал исследуемых клеток. Данный тест основан на способности НАДФ-Н-зависимых клеточных редуктаз митохондрий живых клеток восстанавливать тетразолиевый краситель до водорастворимого оранжевого красителя. Таким образом, количество метаболически активных клеток пропорционально интенсивности красителя. Анализ с использованием аннексина V и йодида пропидия позволяет

определить процентное соотношение между неокрашенными живыми клетками и клетками на стадии апоптоза. Показано, что ЭСК и субклоны с делецией *EIF3E* демонстрируют сходные показатели ХТТ-коэффициента поглощения (табл. 8). Кроме того, ЭСК, обработанные веществами-миметиками гипоксии (CoCl_2 и DMOG), а также полученные субклоны имеют незначительно сниженные показатели при оценке жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии с использованием йодида пропидия и аннексина V (табл. 7).

Таким образом, полученные субклоны с делецией Н9 и Е12, а также клетки в условиях гипоксии и псевдогипоксии сохраняют жизнеспособность и пролиферативный потенциал. Такие клетки можно рассматривать в качестве подходящих источников для получения эндотелиальных производных в дальнейших экспериментах.

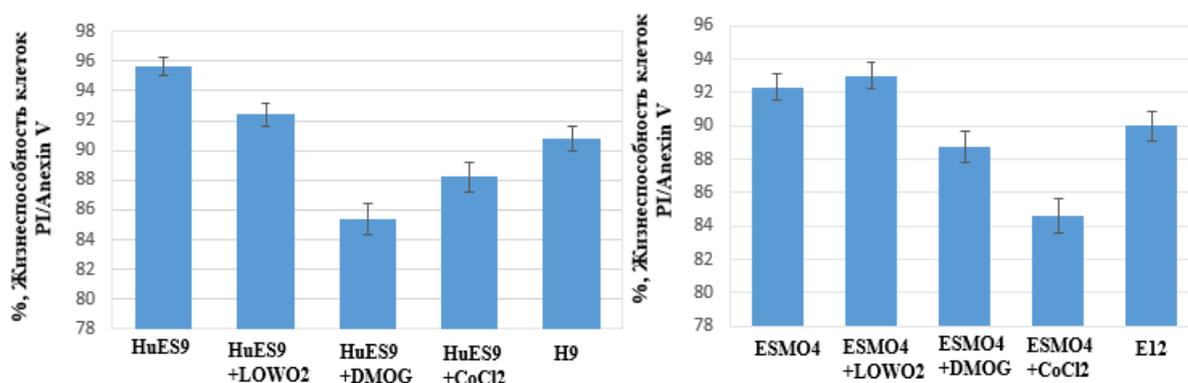


Рисунок 16. Оценка жизнеспособности исследуемых ЭСК человека методом FACS с использованием йодида пропидия и аннексина V. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК, культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂).

Таблица 7. Данные достоверности различия жизнеспособности исследуемых линий ЭСК человека. (Оценка проводилась критерием Хи-квадрат.)

Названия сравниваемых линий	P- значение	Названия сравниваемых линий	P- значение
HuES9/HuES9+DMOG	0,0036	ESM04/ESM04+DMOG	0,1769

HuES9/HuES9+LOWO2	0,7099	ESM04/ ESM04+LOWO2	0,7938
HuES9/HuES9+CoCl2	0,00021	ESM04/ESM04+CoCl2	0,0056
HuES9/H9	0,0157	ESM04/E12	0,30550

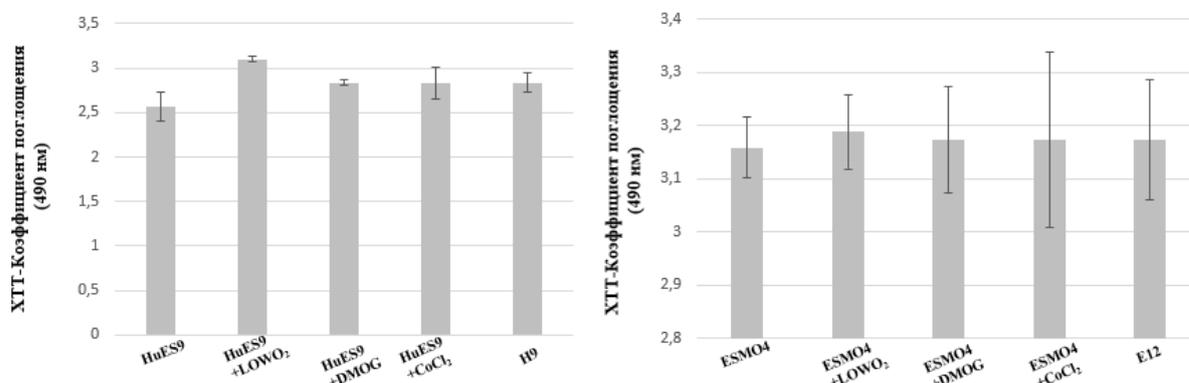


Рисунок 17. Оценка пролиферации исследуемых ЭСК человека методом ХТТ-анализа. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂)

Таблица 8. Данные достоверности различия пролиферативного потенциала исследуемых линий ЭСК человека. (Оценка проводилась критерием Хи-квадрат.)

Название исследуемых линий	P-значение	Название исследуемых линий	P-значение
HuES9/HuES9+DMOG	0,729	ESM04/ESM04+DMOG	0,979
HuES9/HuES9+LOW O ₂	0,790	ESM04/ESM04+LOWO ₂	0,978
HuES9/HuES9+CoCl ₂	0,797	ESM04/ESM04+CoCl ₂	0,912
HuES9/H9	0,704	ESM04/E12	0,322

3.6 Выбор подходящих референсных генов для цифровой ПЦР в каплях и оптимизация условий проведения реакции

В дальнейших исследованиях оценки экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF1A*, *HIF2A* была использована цифровая ПЦР в каплях, поскольку данный подход позволяет получить результаты с высокой достоверностью и точностью, обеспечивая абсолютную количественную оценку ДНК- или РНК-

мишеней с помощью меченных олигонуклеотидных зондов. В отличие от стандартной количественной ПЦР, которая протекает в общем реакционном объеме, метод цифровой ПЦР в каплях основан на разделении реакционной смеси на множество капель, где проходит ПЦР. В настоящем эксперименте был использован метод цПЦР для надежной оценки эффективности нокаута *EIF3E* в модуляции экспрессии *HIF2A*, а также для анализа экспрессии *HIF1A* в ЭСК человека в гипоксических и псевдогипоксических условиях.

В первую очередь были подобраны и оптимизированы условия проведения цПЦР для целевых генов. Было установлено, что оптимальная T отжига праймеров и пробы = 55.7°C , в соответствии с разделением кластеров позитивных и негативных капель (рис. 18), концентрация пар праймеры-проба: для *HIF1A* и *EIF3E* = 900 нМ/ 250нМ, *HIF2A* и *EIF3E*= 400 нМ/ 400 нМ.

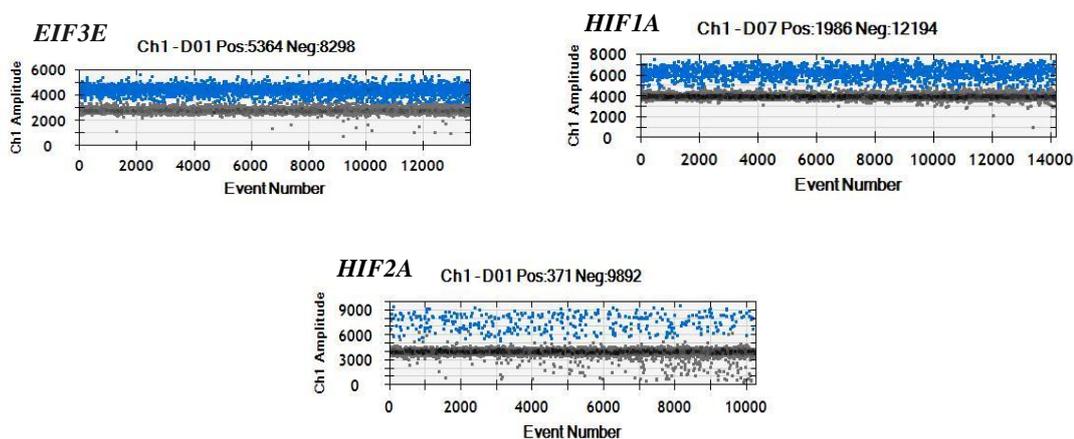


Рисунок 18. График двумерного распределения кластеров позитивных капель (обозначены синим цветом) и негативных (серым) при температуре 55.7°C , анализ экспрессии *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* в ЭСК человека с помощью цифровой ПЦР в каплях.

Затем был проведен анализ по выбору подходящих референсных генов, так как по литературным данным, референсные гены, широко используемые для исследований в нормоксических условиях, меняют экспрессию в условиях гипоксии в ряде клеточных линий (Tang *et al.*, 2010; Xiuying *et al.*, 2014). Кроме того, на сегодняшний день данные о сравнении уровней экспрессии референсных генов в ПСК человека в условиях гипоксии и нормоксии отсутствуют.

В результате анализа шести референсных генов: *B2M*, *RPL13A*, *RPLP0*, *TFRC*, *GAPDH*, *ACTB* в гипоксических и нормоксических условиях было установлено, что оптимальная концентрация праймеров/проб для проведения цифровой капельной ПЦР=900 нМ/ 250 нМ, Т отжига = 55.7 °С.

В результате статистического анализа с помощью алгоритма geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) было обнаружено, что *B2M*, β -*ACT*, *TFRC* – наиболее подходящие референсные гены для анализа ЭСК человека в гипоксических условиях (рис. 19, А, Б). geNorm – наиболее широко применяемый алгоритм для обнаружения стабильных референсных генов из набора тестируемых генов-кандидатов в выборке. geNorm вычисляет величину М стабильности экспрессии референсного гена как среднее попарное отклонение V этого гена со всеми другими тестируемыми референсными генами. Пошаговое исключение гена с наибольшим значением М позволяет ранжировать тестируемые гены в соответствии с их стабильностью экспрессии.

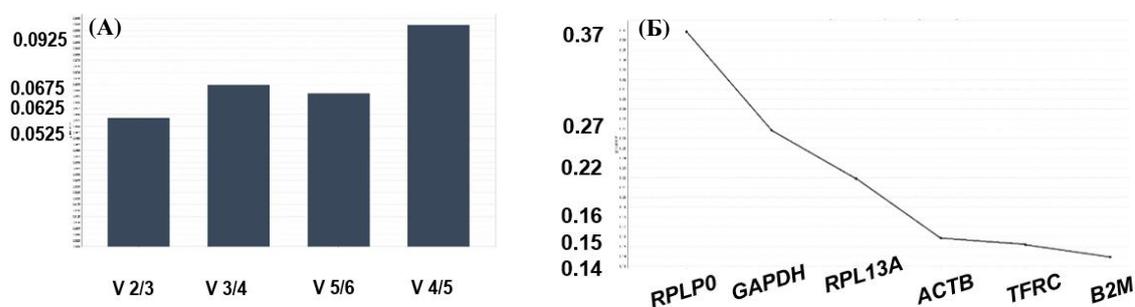


Рисунок 19. Данные анализа экспрессии референсных генов в программе geNorm. Определение оптимального количества референсных генов, geNorm V (А) и средняя стабильность экспрессии 6 – ти контрольных генов, geNorm М (Б). Гистограмма (А) показывает значение $V_n / n + 1$ на вертикальной оси для каждого сравнения между двумя последовательными референсными генами-кандидатами (n и n + 1). Гены-кандидаты оценивались в соответствии с их стабильностью (значения geNorm М – по вертикальной оси) от самых нестабильных генов с высоким значением М до наиболее стабильных с низким значением М референсных генов, слева направо (Б).

В результате исследования в качестве референсного гена был выбран *TFRC* для анализа экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* в ЭСК человека с помощью цПЦР.

3.7 Оценка уровня экспрессии генов *EIF3E*, *HIF1A* и *HIF2A* в полученных генетически модифицированных линиях ЭСК

Для того, чтобы оценить функциональную эффективность делеции гена *EIF3E* на модуляцию экспрессии *HIF2A* в полученных субклонах ЭСК, а также эффект воздействия гипоксических и псевдогипоксических условий на экспрессию *HIF1A* и *HIF2A* использовали цифровую ПЦР в каплях. В данном исследовании для нормирования использовали *TFRC* в качестве референсного гена, экспрессия которого стабильна в гипоксических и нормоксических условиях. Было обнаружено, что уровень экспрессии *EIF3E* достоверно снижен в полученных субклонах с делецией данного гена по сравнению с контрольным образцом (рис. 20). Одновременно с этим, в субклонах Н9 линии NuES9 и E12 линии ESM04 наблюдается достоверное повышение экспрессии *HIF2A* (рис. 20). Культивирование ЭСК в псевдогипоксических условиях (с добавлением вещества DMOG) способствовало повышению уровня экспрессии *HIF2A*, а также *HIF1A* в клетках.

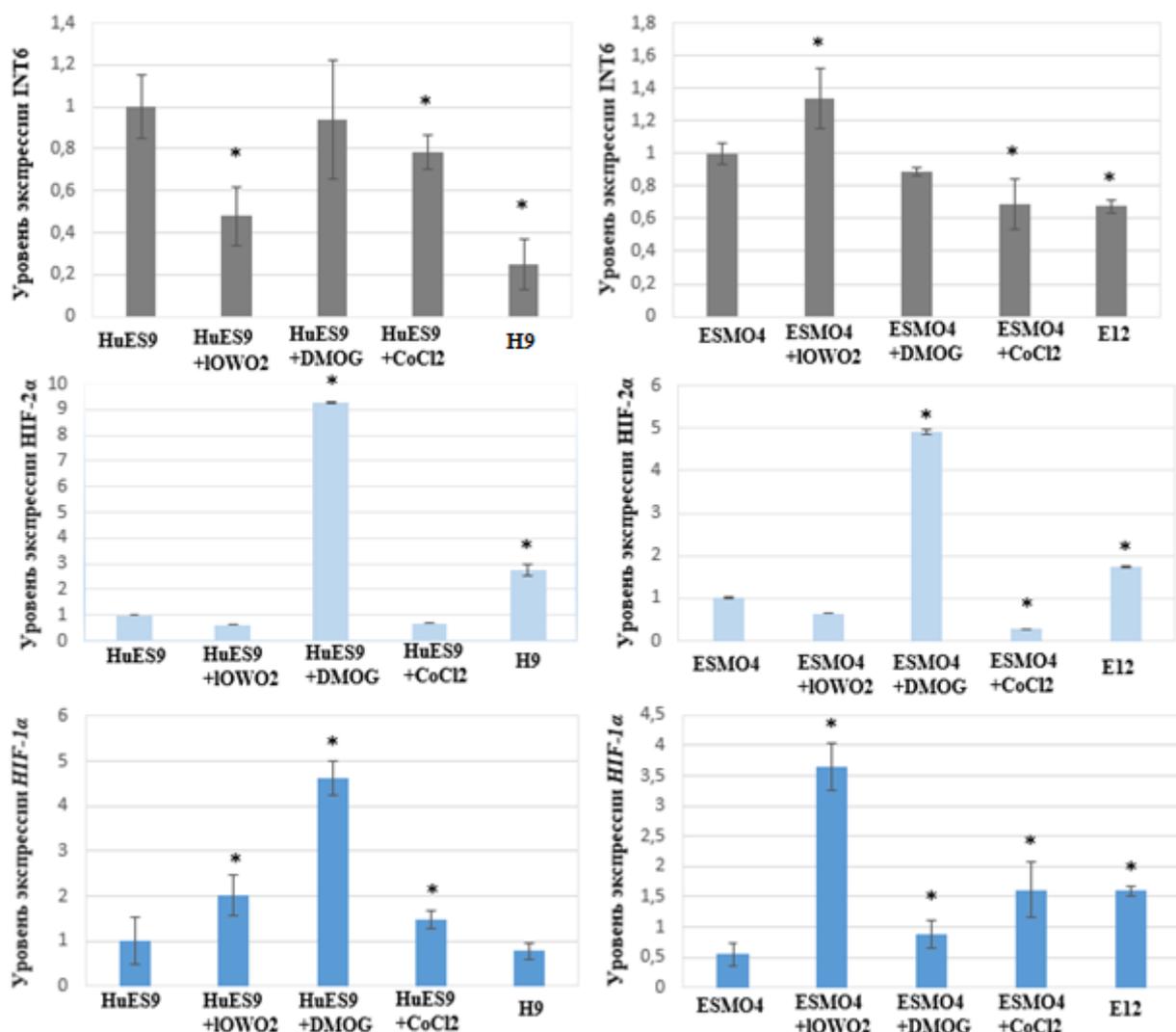


Рисунок 20. Анализ экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* с помощью цифровой ПЦР в каплях. HuES9, ESMO4 – исходные линии ЭСК человека, H9, H8 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESMO4+DMOG, ESMO4+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESMO4 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). Уровень экспрессии гена *EIF3E* достоверно снижен в субклонах с делецией данного гена, по сравнению с исходной линией ЭСК. В субклонах H9 и E12 наблюдается повышение экспрессии *HIF2A*, культивирование в условиях гипоксии и псевдогипоксии приводит к повышению экспрессии *HIF1A* (*) $p < 0,05$ vs исходные линии ЭСК. (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего)

Кроме того, культивирование в гипоксических и псевдогипоксических условиях (с добавлением вещества CoCl₂) способствуют повышению экспрессии *HIF1A*. Таким образом, было показано с помощью цПЦР, что делеция гена *EIF3E* в субклонах ЭСК достоверно способствует повышению экспрессии *HIF2A*.

3.8 Определение количества белка гена *EIF3E* и *HIF2A* в исследуемых линиях *HuES9* и *ESM04*

В предыдущих экспериментах было обнаружено, что делеция *EIF3E* оказывает нокаутующий эффект на экспрессию данного гена в ЭСК человека. В ходе работы также была проведена оценка содержания белков *EIF3E* и *HIF2A* в исследуемых клеточных линиях с помощью Вестерн-блот анализа (рис. 21, Б и рис. 22, Б). В результате было показано снижение уровня белка *EIF3E* у субклонов Н9 и Е12 с делецией данного гена. Кроме того, у субклона Е12 наблюдается появление дополнительного бэнда, что может свидетельствовать о протеасомной деградации данного белка. Выявлено повышенное количество белкового продукта *EIF3E* в клетках, длительное время культивируемых в условиях гипоксии, для линии *HuES9* и, напротив, снижение количества белка данного гена в клетках в условиях псевдогипоксии (при обработке веществом-миметиком гипоксии *DMOG*). Для линии *ESM04* показано снижение количества белка *EIF3E* в клетках, длительное время культивируемых в условиях гипоксии и псевдогипоксии.

Для генетически модифицированного субклона Е12 с делецией *EIF3E* обнаружили достоверное повышение уровня белка *HIF2A* более, чем в два раза по сравнению с контрольной линией *ESM04*. Культивирование в условиях гипоксии и псевдогипоксии (с применением вещества-миметика гипоксии *DMOG*) привело к стабилизации белка *HIF2A* в клетках линии *ESM04*. Однако не было выявлено повышение уровня *HIF2A* в клетках линии *ESM04* при использовании хлорида кобальта (вещества-миметика гипоксии). Для субклона Н9 с делецией *EIF3E* не было детектировано достоверного различия в уровне *HIF2A* по сравнению с контрольной линией *HuES9*. Кроме того, не выявлено достоверной разницы уровня белка *HIF2A* в клетках, культивируемых в условиях гипоксии и псевдогипоксии (с применением веществ-миметиков гипоксии), по сравнению с контрольной линией *HuES9*. Количественный анализ данных Вестерн-блота осуществлен с помощью

ImageJ – программы по анализу и обработки изображений (рис. 21, А и рис.22, А).

В целом, результаты Вестерн-блот анализа подтверждают результаты, полученные с помощью цПЦР в каплях: делеция гена *EIF3E* приводит к снижению количества белка данного в полученных субклонах, стабильно экспрессирующих мРНК *HIF2A*. Кроме того, делеция гена *EIF3E* способствует стабилизации белка HIF2A в субклоне E12 линии ESM04.

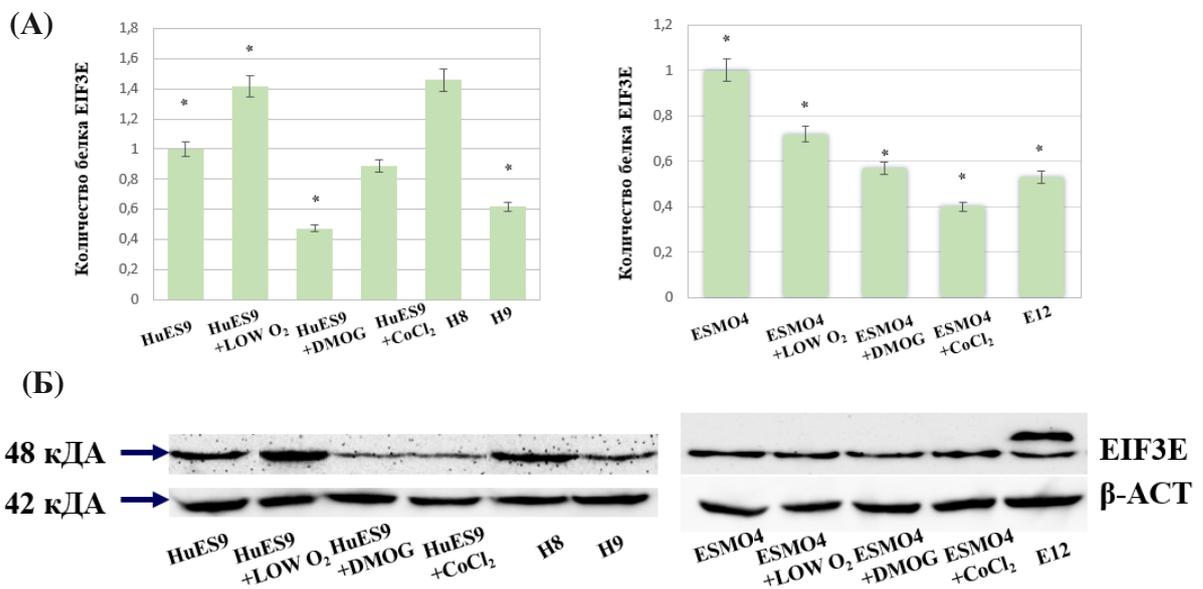


Рисунок 21. Анализ количества белкового продукта EIF3E в исследуемых линиях ЭСК человека. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). А) Результаты анализа данных Вестерн-блота клеточных лизатов исследуемых линий и субклонов с помощью программы ImageJ. Количество белкового продукта EIF3E достоверно снижено в субклонах с делецией по данному гену по сравнению с исходной линией, $p < 0,05$ ($n=2$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего) Б) Результат Вестерн-блот анализа клеточных лизатов исследуемых линий и субклонов, белки детектировали с помощью антител к EIF3E и β -актину.

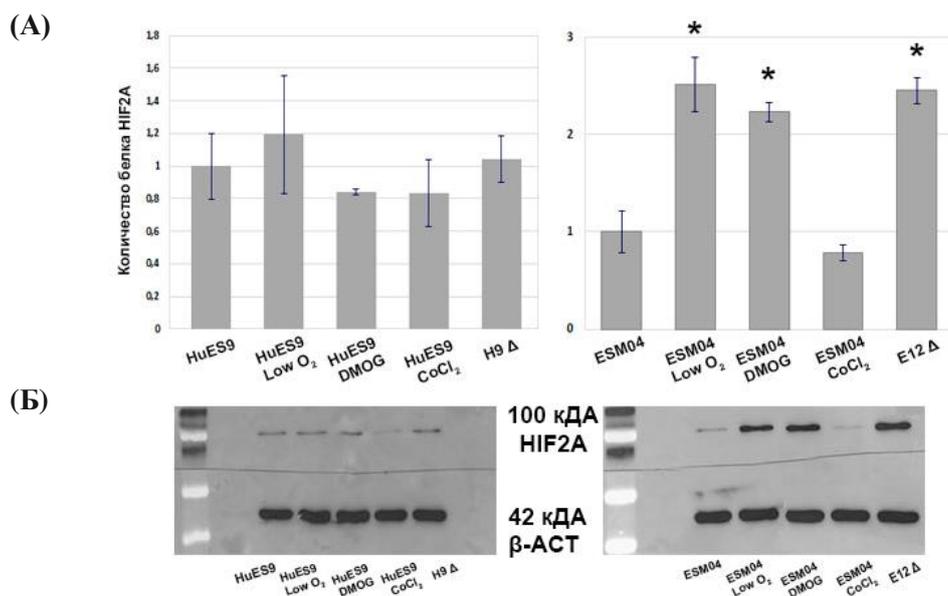
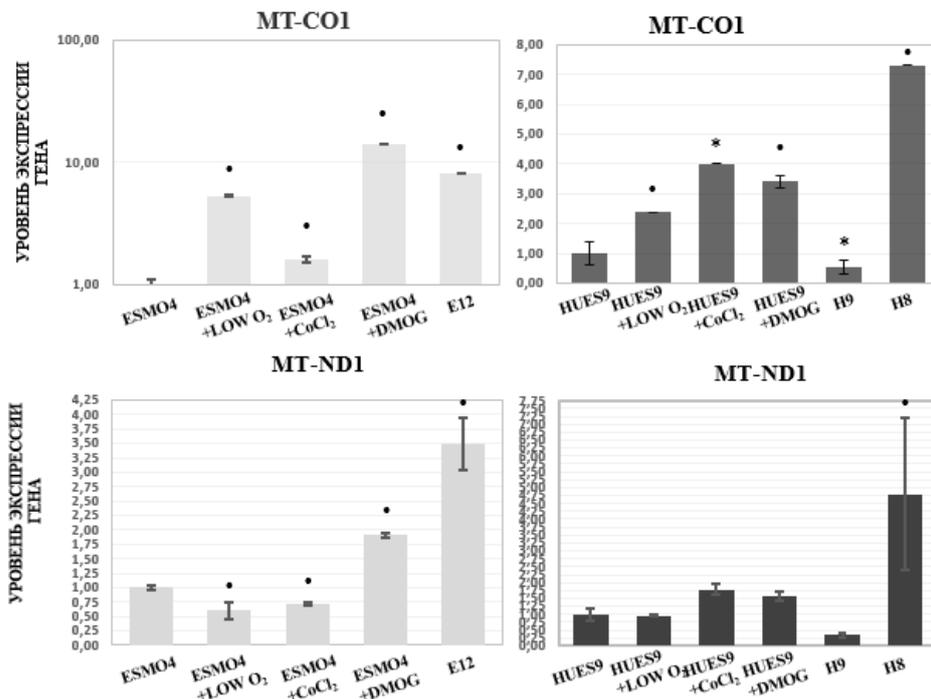


Рисунок 22. Анализ количества белка HIF2A в исследуемых линиях ЭСК человека. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). А) Результаты анализа данных Вестерн-блота клеточных лизатов исследуемых линий и субклонов с помощью программы ImageJ. Количество белка HIF2A достоверно повышено в субклоне E12 с делецией *EIF3E* по сравнению с исходной линией, $p < 0,05$ ($n=3$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего) Б) Результат Вестерн-блот анализа клеточных лизатов исследуемых линий и субклонов, белки детектировали с помощью антител к HIF2A и β -актину. Данные любезно предоставлены Ступниковой Аленой Сергеевной и Байрамовой Дарьей Олеговной.

3.9 Характеристика экспрессии генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях, в исследуемых линиях ЭСК человека

Под воздействием низких концентраций кислорода (1-4% O₂) клетки претерпевают метаболическую адаптацию, при которой наблюдается подавление энергетической активности митохондрий. В этих процессах важную роль играют HIFs, которые непосредственным участием подавляют активность переноса электронов, происходит скоординированная регуляция метаболизма и переход на аэробный гликолиз (Wheaton and Chandel, 2011). В исследуемых ЭСК человека проанализированы ферменты гликолитического пути и ферменты, вовлеченные в окислительные процессы, происходящие в

митохондриях (рис. 23). В данном случае обнаружено, что уровень экспрессии генов гликолитических ферментов *PDK1* и *PDHX* достоверно повышается в клетках культивируемых в гипоксических условиях, а также в субклонах E12, H9 и H8. Также в субклоне H8 повышен уровень гексокиназы *HK1*, которая переключает метаболизм с аэробного дыхания на гликолиз. При этом обработка веществами-миметиками гипоксии не вызвала значительного повышения экспрессии гликолитических ферментов. Кроме того, достоверно повышается уровень экспрессии митохондриальных ферментов, таких как митохондриальной цитохром с-оксидазы, так и НАДН-убихинон-оксидоредуктазы в субклонах E12 и H8. Из этого следует, что полученные генетически модифицированные ЭСК с повышенной экспрессией HIFs адаптировались к энергетически выгодному пути метаболизма, совместив гликолиз с последующим митохондриальным окислением пирувата.



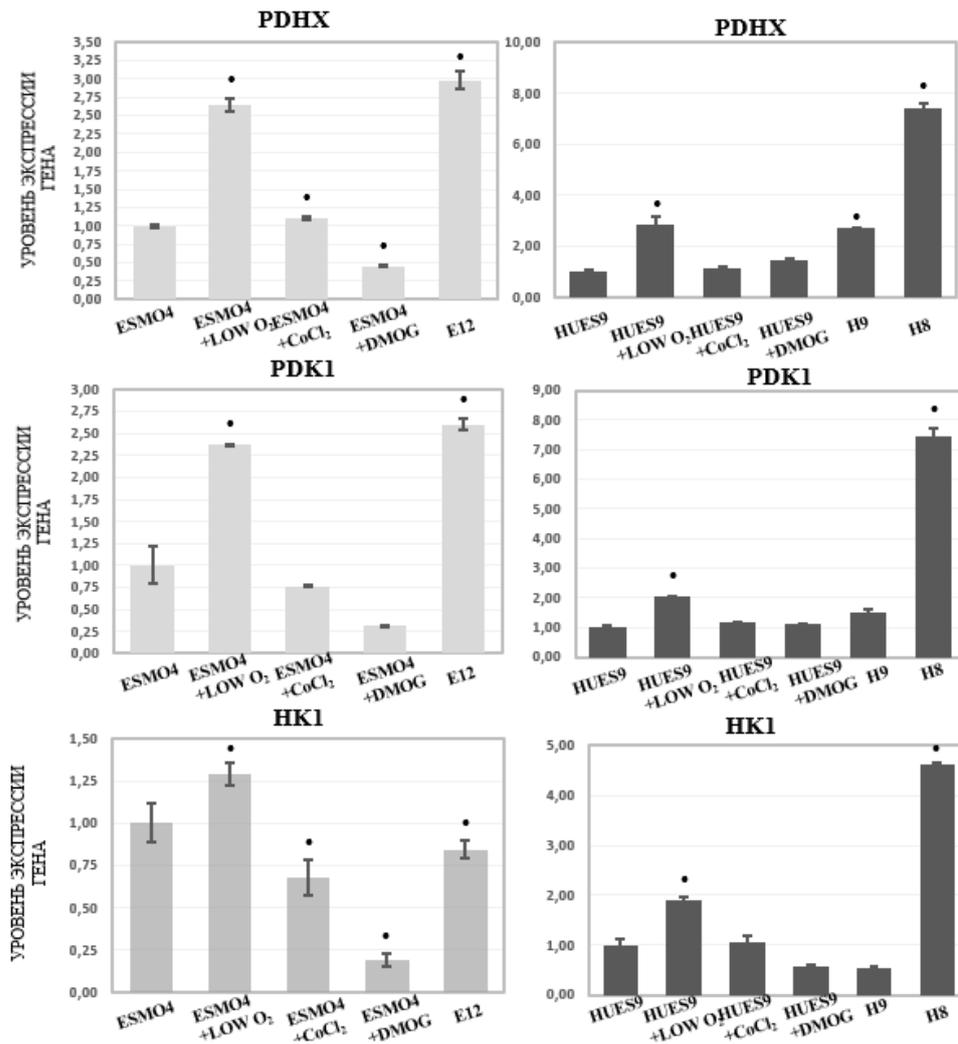


Рисунок 23. Уровень экспрессии генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях, в исследуемых линиях ЭСК человека. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 и H8 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂– линии ЭСК, культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). HK1 – hexokinase 1, PDK1 – pyruvate dehydrogenase kinase-1, PDHX – Pyruvate Dehydrogenase Complex Component X, MT-ND1 – NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1, MT-CO1 – mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (Cytochrome c oxidase I, COX1), (•) p<0,001, (*)p<0,05. (n=4, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего).

3.10 Получение и характеристика эндотелиальных производных исследуемых линий и генетически модифицированных линий ЭСК со сверхэкспрессией *HIF2A*

С целью получения эндотелиальных клеток с повышенным регенеративным потенциалом были использованы генетически модифицированные линии ЭСК человека со сверхэкспрессией *HIF2A*,

ключевого регулятора процессов ангиогенеза, а также линии ЭСК, длительное время культивируемые в гипоксических и псевдогипоксических условиях.

Дифференцировка осуществлялась по протоколу, описанному в статье (Gu, 2018) с модификациями. На начальном этапе была запущена мезодермальная дифференцировка в монослое на поверхности, обработанной матригелем, с применением ингибитора CHIR99021. Поскольку ингибитор CHIR99021 активирует WNT/ β -катенин-сигнальный путь, который играет ключевую роль в процессах эффективной мезодермальной дифференцировки. По истечении двух суток от начала дифференцировки проводилась смена культуральной среды на содержащую ростовые факторы, необходимые для получения эндотелиальных производных. На данном этапе использовали VEGFA, bFGF, а также вещество SB431542, которое является ингибитором сигнального пути TGF- β 1, способствуя снижению количества фибробластов в культуре дифференцируемых клеток. В случае анализа эффектов воздействия гипоксических и псевдогипоксических условий линии ЭСК человека культивировались в условиях физиологической гипоксии (концентрация кислорода 5%), а также с веществами-миметиками гипоксии (DMOG и CoCl₂) в течение двух пассажей до начала дифференцировки в эндотелиальном направлении. Воздействие гипоксических условий стабилизирует HIFs в ЭСК человека, а в эндотелиальных производных активируется транскрипция ангиогенных факторов, что влияет на эффективность получения эндотелиальных клеток.

На первом этапе для оценки эффективности дифференцировки был осуществлен анализ экспрессии первого мезодермального маркера – гена *Brachyury* с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени (рис. 24). В качестве референсного гена был использован *B2M*, который стабильно экспрессируется в условиях гипоксии и нормоксии.

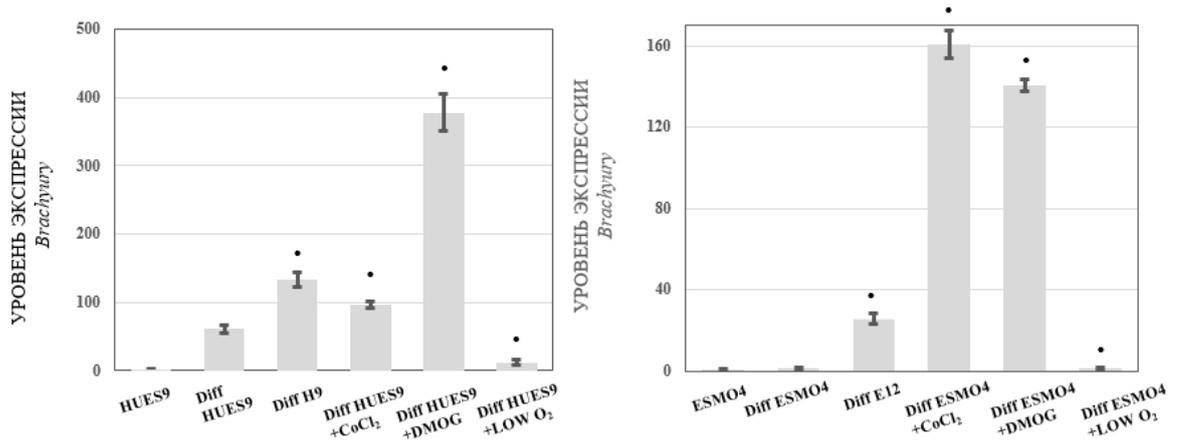


Рисунок 24. Анализ экспрессии *Brachyury* на второй день от начала мезодермальной дифференцировки с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК, культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). (•) p<0,001 в сравнении с исходной линией на второй день дифференцировки (diff HuES9/diff ESM04). (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего).

Для субклона H9 линии HuES9 выявлено повышение экспрессии *Brachyury* более, чем в 2 раза по сравнению с исходной линией HuES9 без делеции *EIF3E*. Сходная ситуация прослеживается в субклоне E12 линии ESM04, где уровень экспрессии *Brachyury* в 19 раз выше по сравнению с исходной линией ESM04. Кроме того, достоверное повышение уровня экспрессии *Brachyury* показано для линий ESM04 и HuES9 в псевдогипоксических условиях дифференцирования.

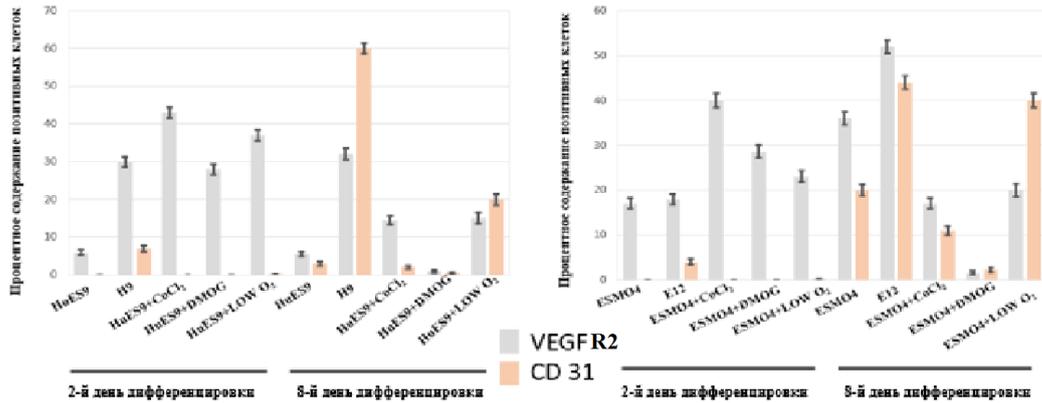


Рисунок 25. Анализ процентного содержания VEGFR2⁺ и CD31⁺ клеток в ходе дифференцировки. Оценка методом FACS. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 – субклоны ($\Delta EIF3E$). HuES9+CoCl₂, ESM04+CoCl₂, HuES9+DMOG, ESM04+ DMOG – линии ЭСК человека, обработанные веществами-миметиками гипоксии. HuES9 lowO₂, ESM04 lowO₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях гипоксии (5% O₂, 5% CO₂). (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего).

Таблица 9. Достоверность различий процентного содержания CD 31-позитивных клеток в популяциях эндотелиальных производных исследуемых линий ЭСК человека. Оценка проводилась критерием Хи-квадрат.

Название исследуемых линий	P- значение	Название исследуемых линий	P- значение
HuES9/HuES9+DMOG	1	HuES9/HuES9+DMOG	0,8875
HuES9/HuES9+LOWO ₂	0,9992	HuES9/HuES9+LOWO ₂	0,000546
HuES9/HuES9+CoCl ₂	1	HuES9/HuES9+CoCl ₂	0,9595
HuES9/H9	0,9441	HuES9/H9	0,000659
ESM04/ESM04+DMOG	1	ESM04/ESM04+DMOG	$8 \cdot 10^{-6}$
ESM04/ESM04+LOWO ₂	0,9680	ESM04/ESM04+LOWO ₂	$5,9 \cdot 10^{-27}$
ESM04/ESM04+CoCl ₂	1	ESM04/ESM04+CoCl ₂	0,0239
ESM04/ESM04+CoCl ₂	0,9680	ESM04/E12	$1,9 \cdot 10^{-9}$

Таблица 10. Достоверность различий процентного содержания VEGFR2-позитивных клеток в популяциях эндотелиальных производных исследуемых линий ЭСК человека. Оценка проводилась критерием Хи-квадрат.

Название исследуемых линий	P- значение	Название исследуемых линий	P- значение
HuES9/HuES9+DMOG	7,310 ⁻³⁹	HuES9/HuES9+DMOG	0,0483
HuES9/HuES9+LOW O ₂	2,9*10 ⁻²⁰	HuES9/HuES9+LOW O ₂	9,8*10 ⁻⁵²
HuES9/HuES9+CoCl ₂	1,4*10 ⁻⁵⁴	HuES9/HuES9+CoCl ₂	0,0001
HuES9/H9	5,2*10 ⁻²⁴	HuES9/H9	5,4*10 ⁻³¹
ESM04/ESM04+DMOG	0,0020	ESM04/ESM04+DMOG	6,8*10 ⁻¹³
ESM04/ESM04+LOW O ₂	0,1138	ESM04/ESM04+LOW O ₂	0,0069
ESM04/ESM04+CoCl ₂	9,1*10 ⁻¹⁰	ESM04/ESM04+CoCl ₂	7,8*10 ⁻⁵
ESM04/E12	0,7913	ESM04/E12	0,00086

В ходе работы методом проточной цитометрии также выполнена оценка процентного содержания характерных эндотелиальных маркеров – VEGFR2 и CD31 на второй и восьмой день эндотелиальной дифференцировки (рис. 25). Было показано, что на второй день мезодермальной дифференцировки во всех исследуемых линиях ЭСК, исключая субклон E12, процент VEGFR2-позитивных клеток достоверно повышен по сравнению с дифференцированными мезодермальными предшественниками, полученными из исходных линий (табл. 10). На восьмой день дифференцировки детектируется максимальное количество VEGFR2/CD31-позитивных клеток субклонов E12 и H9 с делецией *EIF3E* (табл. 9 и 10). Воздействие гипоксических условий (5% O₂) также способствовало эффективной дифференцировке и увеличению процентного содержания CD31-позитивных клеток на восьмой день. Однако в случае использования веществ-миметиков гипоксии эффективность эндотелиальной дифференцировки снижена. В данной ситуации, длительное применение DMOG и CoCl₂ может отрицательно воздействовать на получение эндотелиальных производных ЭСК.

На восьмой день популяцию эндотелиальных производных ЭСК обогатили с помощью антител к CD31, конъюгированных с магнитными частицами (Miltenyi). С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показали, что эндотелиальные популяции субклонов Н9 и Е12 экспрессируют характерные эндотелиальные маркеры: CD31 и фактор фон Виллебранда (рис. 25 и 26).

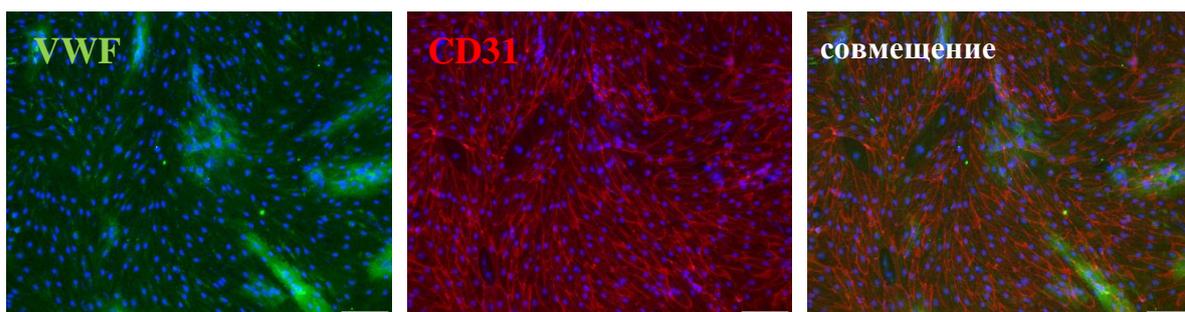


Рисунок 26. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных эндотелиальных производных субклона Н9 линии NuES9 антителами к специфическим маркерам эндотелия: CD31 (красный сигнал), фактор фон Виллебранда (зеленый сигнал), DAPI (синий сигнал). Линейка – 100 мкм.

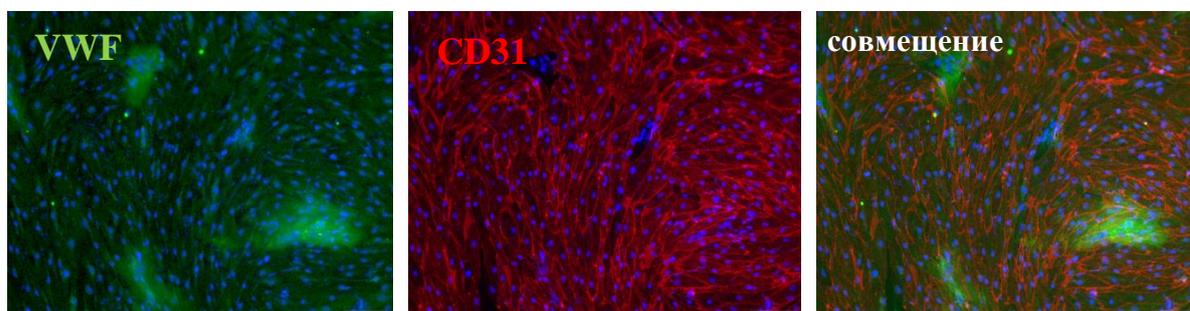


Рисунок 27. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных эндотелиальных производных субклона Е12 линии ESM04 антителами к специфическим маркерам эндотелия: CD31 (красный сигнал), фактор фон Виллебранда (зеленый сигнал), DAPI (синий сигнал). Линейка – 100 мкм.

Таким образом, сверхэкспрессия *HIF2A*, опосредованная сайленсингом *EIF3E*, способствует повышению эффективности мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки ЭСК человека по сравнению с эндотелиальными производными исходных линий. Полученные эндотелиальные производные ЭСК человека с делецией *EIF3E* обладают специфическими морфологическими свойствами, характерными для зрелых эндотелиальных клеток.

3.11 Оценка экспрессии проангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК человека

В процессах ангиогенеза ключевую роль играют эндотелиальные клетки, которые участвуют в формировании новых кровеносных сосудов за счет миграции, пролиферации и взаимодействия с окружающими клетками (перипитами). В основе механизмов регуляции неоваскуляризации эндотелиальными клетками лежат сложные взаимодействия проангиогенных факторов роста. Известно, что экспрессия HIFs индуцирует транскрипцию ряда генов, а также их рецепторов, задействованных в данном процессе, что способствует эффективной реваскуляризации и восстановлению ишемизированной области.

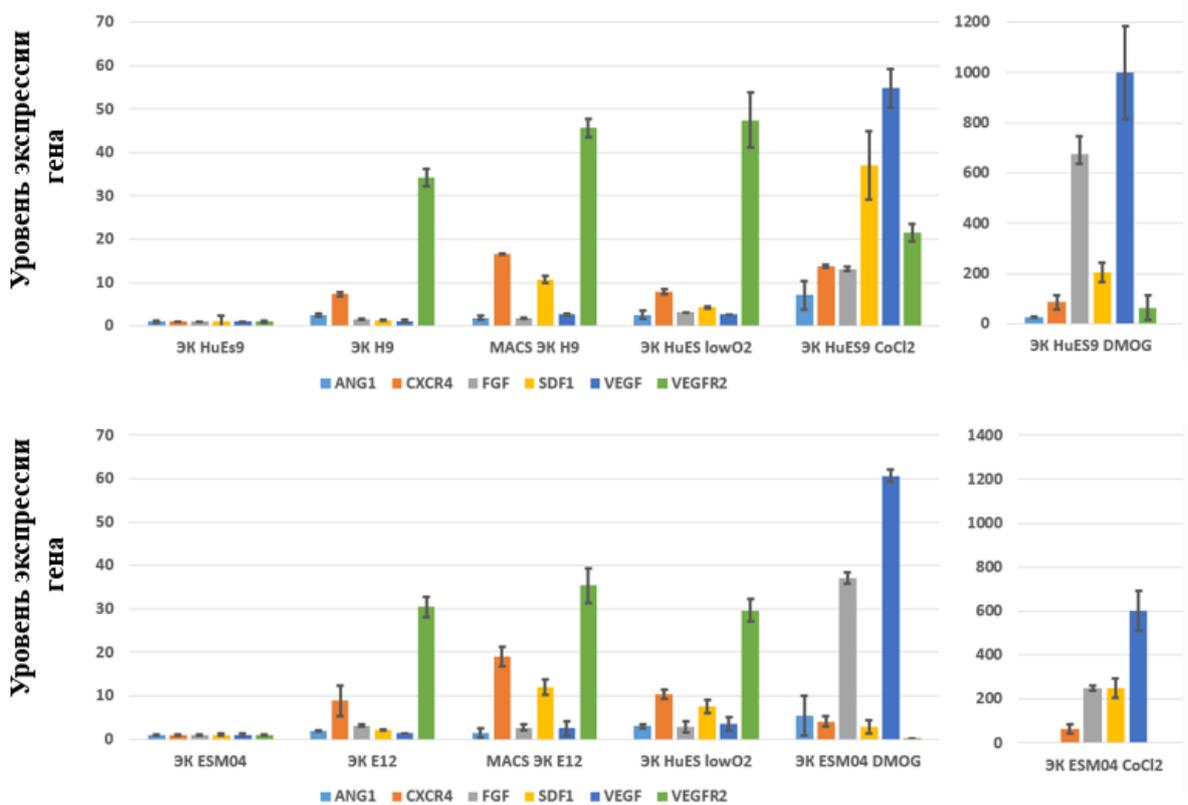


Рисунок 28. Анализ экспрессии генов ангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК человека. Оценка методом ПЦР в режиме реального времени. Анализ экспрессии проводился на восьмой день дифференцировки. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 – субклоны ($\Delta E1F3E$). MACS H9, E12 – позитивные клетки, сортированные по маркеру CD31, HuES9+CoCl₂, ESM04+CoCl₂, HuES9+DMOG, ESM04+DMOG – линии ЭСК человека, обработанные веществами-миметиками гипоксии. HuES9 LowO₂, ESM04 LowO₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях гипоксии

(5% O₂, 5% CO₂). (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего)

Таблица 11. Достоверность различий уровней экспрессии генов ангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК человека, полученных с помощью ПЦР в реальном времени. Анализ экспрессии проводился на восьмой день дифференцировки. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 – субклоны ($\Delta EIF3E$), MACS H9 и MACS E12 – эндотелиальные производные субклонов после магнитного сортирования, HuES9+CoCl₂, ESM04+CoCl₂, HuES9+DMOG, ESM04+ DMOG – линии ЭСК человека, обработанные веществами-миметиками гипоксии. HuES9 Low O₂, ESM04 Low O₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях гипоксии (5% O₂, 5% CO₂)

p-value	ANG1	CXCR4	FGF	SDF1	VEGF	VEGFR2
HuES9/H9	$5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$
HuES9/MACS H9	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-10}$	10^{-3}	10^{-5}	$6 \cdot 10^{-7}$
HuES9/HuES9+ LOW O ₂	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-6}$	$1,21 \cdot 10^{-9}$	$6,13 \cdot 10^{-4}$	$3,11 \cdot 10^{-7}$	$1,48 \cdot 10^{-7}$
HuES9/HuES9+DMOG	$7,4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4,3 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$
HuES9/HuES9+CoCl ₂	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-4}$
ESM04/E12	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-1}$	$9 \cdot 10^{-4}$
ESM04/MACS E12	$5,6 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$9 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$
ESM04/ESM04+ LOW O ₂	$6 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-10}$	$2,07 \cdot 10^{-8}$	$1,07 \cdot 10^{-6}$	$3,89 \cdot 10^{-14}$	$5,39 \cdot 10^{-7}$
ESM04/ESM04+DMOG	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	10^{-5}	$7 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-8}$
ESM04/ESM04+CoCl ₂	$1,3 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1,12 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-7}$

На восьмой день дифференцировки с помощью метода количественной ПЦР в режиме реального времени произведена оценка экспрессии генов ангиогенных факторов: *ANG1*, *bFGF*, *VEGF*, *VEGFR2*, *CXCR4*, *SDF1* в эндотелиальных производных генетически модифицированных ЭСК, а также в ЭСК, культивируемых с использованием миметиков гипоксии и в условиях гипоксического инкубатора. Было показано, в эндотелиальных производных субклонов H9 и E12, а также линии ESM04 и HuES9 в условиях физиологической гипоксии наблюдается повышение большинства генов

ангиогенных факторов по сравнению с исходными линиями (рис. 28 и табл. 11). Однако наблюдается низкий уровень экспрессии гена *VEGFR2* в эндотелиальных производных, обработанных веществами-миметиками гипоксии: хлоридом кобальта и DMOG. Возможно, отсутствие экспрессии рецептора фактора роста эндотелия при повышенном уровне экспрессии ряда других ангиогенных факторов приводит к низкому процентному содержанию дифференцированной популяции CD31-позитивных эндотелиоцитов.

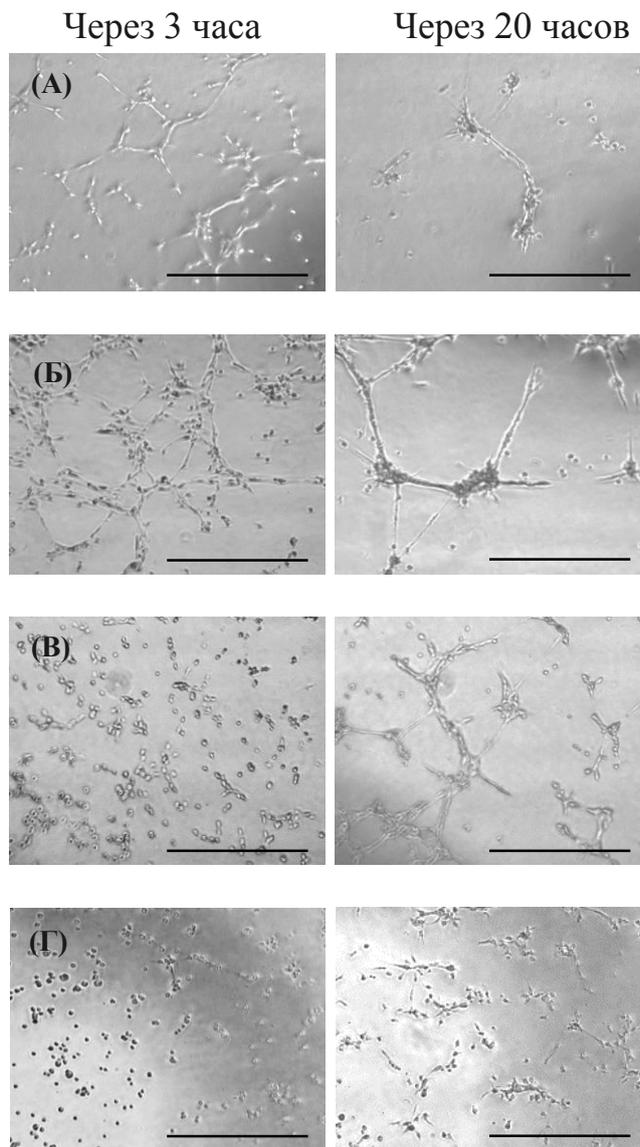
Таким образом, повышенная экспрессия и стабилизация HIF2A в ЭСК способствует эффективному повышению экспрессии генов, вовлеченных в процессы ангиогенеза, в полученных эндотелиальных производных исследуемых линий ЭСК.

3.12 Оценка функциональных свойств полученных эндотелиальных производных ЭСК человека

Для оценки функциональных свойств полученных эндотелиальных производных использовали тест на матригеле *in vitro*. Было показано, что эндотелиальные производные ЭСК человека способны образовывать трехмерные капилляроподобные структуры в толще матригеля. Функциональный анализ эндотелиальных производных был проведен после предварительного обогащения всех клеток популяцией CD31-позитивных эндотелиоцитов методом магнитного сортирования. Количественная оценка с помощью программы *AngioTool* показала, что общая длина сосудоподобных структур в генетически модифицированных субклонах линий NuES9 и ESM04 более, чем в три раза превышает значения для контрольных линий ЭСК (рис. 29 и рис. 30). При этом эндотелиальные производные ЭСК с делецией *EIF3E* и ЭК, полученные при дифференцировке в условиях 5% кислорода, формируют сосудоподобные структуры в течение трех часов. Спустя двадцать часов количество сосудоподобных структур значительно уменьшается. Кроме того, в случае эндотелиальных производных ЭСК, обработанных хлоридом кобальта и DMOG, динамика формирования сосудоподобных структур

отличается: через три часа формируется минимальное количество капилляроподобных структур. Спустя двадцать часов их количество увеличивается, однако остается на уровне, незначительно превышающем контрольную популяцию.

Также полученные эндотелиальные клетки нарабатывают характерные для эндотелия компоненты внеклеточного матрикса: фибронектин и коллаген 4 типа (рис. 31).



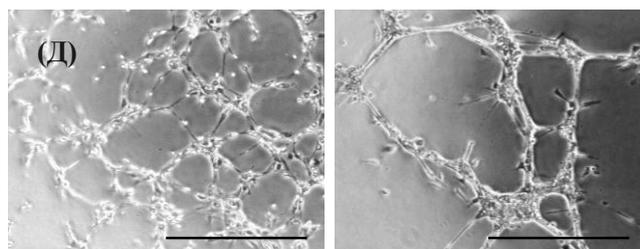


Рисунок 29. Визуализация капилляроподобных структур эндотелиальных производных исследуемых линий ЭСК в тесте на ангиогенез *in vitro*. А) эндотелиальные производные исходной линии ESM04, Б) эндотелиальные производные субклона E12 ($\Delta EIF3E$). В) эндотелиальные производные ESMO4+CoCl₂ (обработанные веществом-миметиком гипоксии), Г) эндотелиальные производные ESMO4+DMOG (обработанные веществом миметиком гипоксии). Д) эндотелиальные производные ESMO4 Low O₂ (культивируемые в условиях физиологической гипоксии (5% O₂, 5% CO₂)). Линейка – 100 мкм.

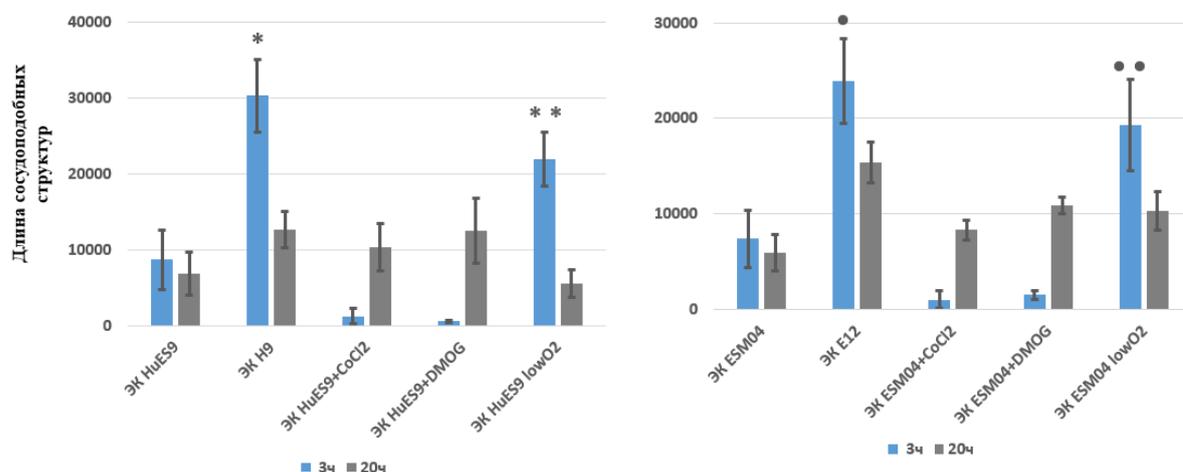


Рисунок 30. Анализ общей длины сосудоподобных структур в тесте на матригеле *in vitro*. Анализ проводился с помощью программы Angiotool. ЭК – эндотелиальные клетки. (*) $p=2,09 \cdot 10^{-10}$ ЭК Н9 vs ЭК HuES9, (**) $p=0,001$ HuES9+Low O₂ vs ЭК Н9, (•) $p=2,88 \cdot 10^{-6}$ ЭК E12 vs ЭК ESM04, (••) $p=0,08$ ЭК ESM04+Low O₂ vs ЭК E12.

Таким образом, стабилизация HIF2A в ЭСК способствует повышению эффективности мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки по сравнению с исходными линиями. Полученные эндотелиальные производные субклонов с делецией *EIF3E* обладают повышенной экспрессией проангиогенных факторов, а также демонстрируют функциональные свойства, набиравая характерные для эндотелия компоненты внеклеточного матрикса. Кроме того, полученные эндотелиальные производные демонстрируют повышенный ангиогенный потенциал в тесте *in vitro*.

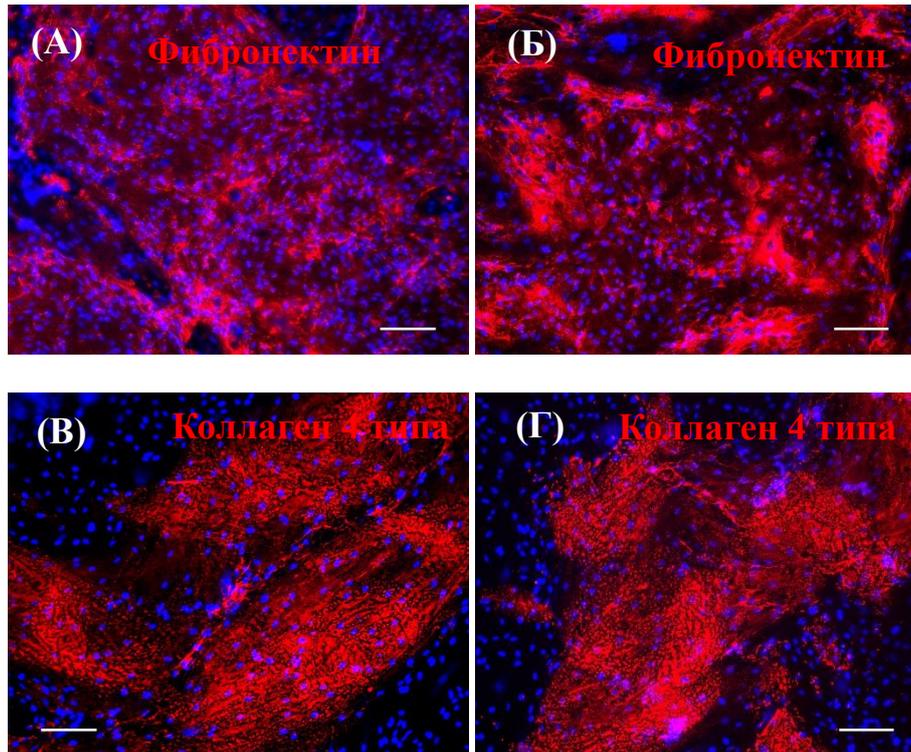


Рисунок 31. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных эндотелиальных производных антителами к коллагену четвертого типа (красный сигнал), фибронектину (красный сигнал), DAPI (синий сигнал). А,В-субклон Н9 (Δ EIF3E), Б, Г- субклон Е12 (Δ EIF3E). Линейка – 100 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания являются самыми распространенными среди населения. При этом уровень смертности от ишемической болезни сердца и инфаркта ежегодно растёт. Это свидетельствует о том, что принимаемые меры недостаточно эффективны и требуется разработка новых подходов к лечению. Основной целью при лечении ишемических заболеваний, которые вызваны недостаточным кровоснабжением, является восстановление кровотока путем индукции образования новых сосудов, т.е. ревазуляризации. Хирургические методы часто оказываются неэффективными для усиления ревазуляризации, поэтому актуальным является разработка подходов терапевтического ангиогенеза путем доставки в ишемизированную область факторов роста или трансплантации клеток, которые их эффективно секретируют (Park *et al.*, 2012). Результаты клинических исследований методов терапевтического ангиогенеза, основанных на прямой доставке ангиогенных факторов, противоречивы: во многих случаях не удается достичь ревазуляризации при клинических испытаниях (Uccioli *et al.*, 2018). Это связывают с низкой эффективностью трансфекции векторов, кодирующих факторы, быстрой деградацией после введения и недостаточной кратностью введения. Клеточная терапия может быть более эффективным подходом для достижения терапевтического ангиогенеза по сравнению с терапией факторами роста (Tu *et al.*, 2015). Во-первых, трансплантированные клетки могут служить более длительным источником ряда ангиогенных факторов роста, что необходимо для регенерации сосудистой сети, тогда как непосредственно инъецированные факторы роста подвержены быстрой деградации. Во-вторых, трансплантированные клетки могут выделять факторы роста и цитокины более сбалансированным и физиологически значимым образом, чем это реализуется в случае инъекций плазмид, вирусных векторов или белков.

В настоящее время, по данным базы клинических исследований clinicaltrials.gov, в мире проходят более 800 клинических испытаний с применением трансплантации клеток для реваскуляризации (<https://clinicaltrials.gov>). Из них более 200 – с применением генетически модифицированных для улучшения ангиогенных свойств клеток. Обычно это достигается сверхэкспрессией одного или двух ангиогенных факторов.

Другой перспективный подход для повышения регенеративных свойств клеток связан с применением физиологического ответа на гипоксию. Первичным посредником гипоксического ответа и главным регулятором кислородного гомеостаза в эукариотических клетках является фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) (Semenza, 2014; Semenza, 2012). Экспрессия *HIF* во взрослых организмах способствует ангиогенезу за счет активации транскрипции ангиокринных факторов, проангиогенных хемокинов и их рецепторов (Semenza, 2011; Hashimoto *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2006; Bartoszewski *et al.*, 2019; Befani and Liakos, 2018; Nauta *et al.*, 2017).

Другим перспективным подходом является стабилизация HIF2A во взрослых организмах для усиления регенеративных свойств эндотелиальных клеток при ишемических поражениях тканей. Использование генетически модифицированных клеток со стабильной экспрессией HIF является более перспективной стратегией терапевтического ангиогенеза по сравнению с активацией отдельных ангиогенных факторов (Tu *et al.*, 2015). Это связано с тем, что HIF активирует целый каскад ангиогенных факторов, приводя к индукции ангиогенеза и реваскуляризации ишемизированных тканей (Semenza, 2011; Hashimoto *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2006; Bartoszewski *et al.*, 2019; Befani *et al.*, 2018; Nauta *et al.*, 2017). На сегодняшний день существует несколько подходов стабилизации HIF в клетках. Прямой подход индукции сверхэкспрессии HIF оказался неэффективным в клинических испытаниях лечения ишемизированных

конечностей (Bosch *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2009; Cooke and Losordo, 2015; Rajagopalan *et al.*, 2007; Creager *et al.*, 2011). Другой метод основан на ингибировании пролилгидроксилазы – фермента, необходимого для деградации HIF-альфа-субъединиц (Botusan *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2014). Это приводит к стабилизации альфа-субъединиц и способствует активации таргетных ангиогенных факторов. Однако в клинических испытаниях этот подход также оказался неэффективен (Olson *et al.*, 2014). В этой связи ведется поиск новых подходов к стабилизации и активации HIF.

В качестве перспективного способа терапевтического ангиогенеза в настоящее время рассматривается стабилизация белка HIF2A-субъединицы путем нокаута его ингибитора EIF3E (INT6) (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Сайленсинг EIF3E – ключевого ингибитора HIF2A – приводит к стабилизации белка HIF2A в условиях нормоксии, вследствие чего идет активация генов ангиогенеза (Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2018; Sesen *et al.*, 2017). Есть данные, что нокаут EIF3E эффективнее вызывает сверхэкспрессию HIF2A, чем прямая активация HIF2A (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Стабилизация и активация HIF2A посредством нокаута EIF3E способствует формированию функциональных сосудов и восстановлению периферического кровообращения ишемизированной области. В настоящее время данный подход используется в ряде исследований на соматических клетках (фибробластах, миоцитах, эндотелиоцитах разных типов) и животных с моделями заболеваний (ишемией конечностей, перемежающейся хромотой, преэклампсией) (Okamoto *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2016; Spilka *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; Endler *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018). В данной диссертационной работе впервые исследован эффект нокаута *EIF3E* в ЭСК человека и их дифференцированных эндотелиальных производных.

В результате работы с помощью современного метода генетической инженерии CRISPR/Cas9 были получены три генетически модифицированные линии ЭСК человека с делецией участка гена *EIF3E*. Секвенирование по

Сенгеру показало, что полученные субклоны являются гетерозиготными по целевой делеции. Делеции участка одного аллеля в каждой из полученных линий составляют 219 п.н., 218 п.н., 226 п.н. соответственно и включают участок промоторной области и начало первого экзона. Во втором аллеле присутствуют микроделеции, которые включают участок промоторного района и не вызывают сдвига рамки считывания. Эффективность нокаута *EIF3E* в полученных линиях генетически модифицированных субклонов подтверждена методом цифровой ПЦР в каплях и анализом с помощью Вестерн-блота: уровни мРНК и белка EIF3E достоверно снижены по сравнению с исходными линиями.

Белок EIF3E является одной из субъединиц мультисубъединичного комплекса EIF3, играющего роль в инициации трансляции (Cate, 2017). Этот комплекс у многоклеточных организмов состоит из тринадцати субъединиц, критически важными для процесса трансляции являются пять субъединиц (EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3G, EIF3I) (Sesen *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2014). Функциональность остальных субъединиц остается не до конца изученной. EIF3E не входит в состав корового комплекса и, вероятно, не играет ключевой роли в функционировании преинициаторного комплекса трансляции (Wolf *et al.*, 2020). В связи с этим, ингибирование субъединицы E комплекса EIF3 у человека не приводит к снижению общего количества белка в клетках, что не отражается на пролиферации и метаболизме (Sesen *et al.*, 2017; Sesen *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2020; Grzmil *et al.*, 2010).

Полученные в ходе данной работы генетически модифицированные субклоны имеют нормальную жизнеспособность. Во-первых, это связано с тем, что нокаутированная субъединица EIF3E не является критически значимой для трансляции белка. Во-вторых, полученные субклоны с делецией гена *EIF3E* являются гетерозиготами, в которых не происходит полного подавления функционирования данного белка.

Кроме того, в ходе работы подтверждено, что полученные линии ЭСК с делецией участка гена *EIF3E* сохраняют плюрипотентность и нормальный кариотип.

В результате проделанной работы впервые показано, что нокаут *EIF3E* в ЭСК человека способствует повышению уровня экспрессии гена *HIF2A*. Кроме того, в одном из полученных субклонов выявлено повышение уровня белка HIF2A. Несмотря на то, что сайленсинг EIF3E замедляет деградацию белка HIF2A, приводя к его стабилизации, это отражается также и на повышении уровня мРНК. Стабилизированный белок HIF2A связывается с участком последовательности ДНК в промоторном районе гена *HIF2A*, повышая уровень собственной экспрессии (Chen *et al.*, 2007).

Эндотелиальные производные генетически модифицированных ЭСК с повышенной экспрессией *HIF2A* могут стать оптимальным источником клеток для терапии ишемических сердечно-сосудистых заболеваний, хронических раневых областей при сахарном диабете за счет усиленных ангиогенных свойств. Стабилизация и активация *HIF2A* может способствовать неоваскуляризации при нарушениях кровоснабжения и усилению васкуляризации имплантированных тканеинженерных сосудистых конструкций за счет паракринных эффектов в микроокружении эндотелиальных клеток.

Предполагается, что полученные субклоны моделируют состояние клеток при длительной гипоксии. При культивировании клеток линии ESM04 в условиях гипоксического инкубатора при 5% O₂ и в условиях псевдогипоксии (после обработки миметиком гипоксии CoCl₂) наблюдается ситуация, характерная для стадии адаптации к гипоксии – повышение экспрессии *HIF1A*, но не *HIF2A*. Обработка веществом-миметиком гипоксии DMOG не только вызывает повышение экспрессии *HIF1A* в ЭСК линий NuES9 и ESM04, но и приводит к повышению экспрессии *HIF2A*. Это согласуется с данными о том, что DMOG вызывает одновременную стабилизацию HIF1A и HIF2A в клетках (Zhdanov *et al.*, 2015).

По литературным данным известно, что HIF2A играет важную роль в регуляции поддержания плюрипотентности за счет активации транскрипции генов, вовлеченных в данный процесс. Было показано, что HIF2A взаимодействует с цис-регуляторным элементом в районе промотора *NANOG*, а также с HREs, образуя транскрипционный комплекс с белками OCT4, SOX2 и белками ремоделинга хроматина (Petruzzelli *et al.*, 2014). Образованный комплекс способствует формированию активного хроматина и индуцирует транскрипцию *NANOG*, который, в свою очередь, участвует в процессах пролиферации ЭСК человека. Таким образом, полученные на данный момент результаты для ЭСК человека, в основном, согласуются с литературными сведениями: нокаут EIF3E – ингибитора HIF2A способствует повышению экспрессии генов плюрипотентности в ЭСК по сравнению с исходными линиями. Кроме того, полученные линии ЭСК демонстрируют сходный уровень пролиферации и жизнеспособности по сравнению с исходными линиями. Однако наблюдается тенденция к снижению жизнеспособности ЭСК после обработки CoCl_2 и DMOG, которая может быть связана с длительностью воздействия веществ-миметиков гипоксии.

Сравнение эффективности мезодермальной дифференцировки субклонов ЭСК с делецией участка гена *EIF3E* с эффективностью дифференцировки линий ЭСК, обработанных миметиками гипоксии CoCl_2 и DMOG, а также линий, культивируемых в условиях гипоксического инкубатора (5% O_2), проводилось на основании анализа уровня экспрессии гена *Brachyury* на второй день после запуска дифференцировки. Для субклона H9 линии NuES9 выявлено повышение экспрессии *Brachyury* более, чем в два раза по сравнению с исходной линией NuES9 без делеции. Аналогичная тенденция наблюдается в субклоне E12 линии ESM04: уровень экспрессии *Brachyury* в девятнадцать раз выше по сравнению с исходной линией ESM04 без делеции. Эффекты достоверного повышения уровня *Brachyury* детектируются также в случае обработки хлоридом кобальта и DMOG. Принимая во внимание данные об уровне экспрессии *HIF2A* и *HIF1A* в

анализируемых линиях, можно заключить, что достоверное повышение *HIF2A* в субклонах, вызванное делецией гена *EIF3E*, приводит к достоверному повышению маркера ранней мезодермы *Brachyury*. В случае воздействия миметика гипоксии хлорида кобальта детектируется повышение экспрессии *HIF1A*, а также достоверное повышение уровня *Brachyury*. В ответ на воздействие DMOG в ЭСК повышается не только *HIF1A*, но и *HIF2A*. Тем не менее в случае применения DMOG уровень *Brachyury* повышается достоверно и даже больше, чем в генетически модифицированных субклонах. В то же время в случае культивирования клеток в условиях гипоксического инкубатора в течение двух пассажей наблюдается достоверное повышение *HIF1A*, но не наблюдается достоверного повышения уровня экспрессии *Brachyury*. Как отмечалось ранее, в ЭСК человека повышение *HIF1A* связано с адаптацией к гипоксическому воздействию. В условиях длительной продолжающейся гипоксии *HIF1A* отключается и активируется *HIF2A*. Вероятно, обе линии ЭСК, культивируемые в гипоксическом инкубаторе, находятся в состоянии адаптации к гипоксии, и спустя два пассажа не происходит переключение на *HIF2A*. Это, в свою очередь, не вызывает достоверного повышения экспрессии *Brachyury*. То, что в случае хлорида кобальта уровень *Brachyury* выше, чем при культивировании в гипоксическом инкубаторе, может объясняться разным механизмом воздействия факторов на клетку. Таким образом, повышение экспрессии *HIF2A* путем делеции участка *EIF3E* в ЭСК человека приводит к повышению уровня экспрессии *Brachyury* в дифференцированных мезодермальных предшественниках, что свидетельствует о повышении эффективности мезодермальной дифференцировки. Модуляция уровня *HIF2A* и *HIF1A* с помощью миметиков гипоксии также повышает эффективность мезодермальной дифференцировки ЭСК.

Стабилизация *HIF2A* за счет нокаута *EIF3E*, а также культивирования в гипоксических и псевдогипоксических условиях способствует повышению

эффективности эндотелиальной дифференцировки ЭСК человека: наблюдается повышение процентного содержания VEGFR2/CD31-позитивных эндотелиальных клеток. Кроме того, полученные эндотелиальные производные экспрессируют гены-мишени HIF2A: *ANG1*, *bFGF*, *VEGF*, *VEGFR2*, *CXCR4*, что способствует повышению ангиогенного потенциала.

В результате выполненной работы впервые были получены генетически модифицированные линии ЭСК человека с делецией участка *EIF3E*, моделирующие в нормоксических условиях состояние длительной гипоксии с повышенной экспрессией *HIF2A*. Эндотелиальные производные таких генетически модифицированных линий ЭСК экспрессируют специфические маркеры и демонстрируют характерные функциональные свойства: нарабатывают внеклеточный матрикс коллаген и фибронектин, а также обладают повышенным ангиогенным потенциалом в тестах *in vitro*. Полученные результаты данного исследования позволят определить взаимосвязь модуляции уровня HIFs и экспрессии ангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК, что необходимо для детального понимания аспектов функционирования HIF-сигнального пути и выбора эффективной стратегии терапевтического ангиогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность сосудов, вовлечены в регуляцию сосудистого тонуса, задействованы в процессах перемещения клеток иммунной системы, транспорта питательных веществ и кислорода к клеткам, восстановлении поврежденных тканей. Также известно, что эндотелиальные клетки играют важную роль в патологических изменениях сосудов: сосудистой проницаемости, увеличении адгезии между эндотелием и лимфоцитами, что приводит к формированию инфильтрата в кровеносном русле и стенозу сосудов. В таких условиях эндотелий отвечает за снижение концентрации кислорода посредством механизмов HIF-сигнального пути. Модуляция экспрессии *HIF2A* является перспективной терапевтической стратегией для управления онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Однако остается актуальным вопрос поиска оптимальных методов эффективной регуляции *HIF2A*. В данной работе была использована система геномного редактирования CRISPR/Cas9 в качестве эффективного способа сайленсинга *EIF3E* – главного регулятора *HIF2A* в ЭСК человека. Было показано, что полученные субклоны генетически модифицированных ЭСК обладают повышенной экспрессией *HIF2A* в нормоксических условиях. Эндотелиальные производные полученных субклонов демонстрируют повышенную эффективность мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки по сравнению с исходной клеточной линией. Кроме того, в тестах *in vitro* полученные эндотелиальные производные проявляют ангиогенный потенциал. Сверхэкспрессия *HIF2A* в эмбриональных стволовых клетках человека стабилизирует экспрессию характерных генов плюрипотентности, а также способствует повышению эффективной эндотелиальной дифференцировки. Полученные эндотелиальные производные обладают повышенным ангиогенным потенциалом в тестах *in vitro*. Таким образом, эндотелиальные производные могут стать оптимальным

клеточным источником для терапевтической трансплантации в область ишемического поражения, а также перспективной моделью для изучения процессов эмбрионального развития человека и скрининга фармакологических препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Получены генетически модифицированные ЭСК человека с делецией участка гена *EIF3E*. Делеции участка одного аллеля в полученных субклонах составляют 219 п.н., 218 п.н., 226 п.н. и включают участок промоторной области и начало первого экзона; делеции участка второго аллеля составляют 7 п.н., 8 п.н., 2 п.н. соответственно и включают участок промоторного района. В полученных субклонах выявляется снижение уровня мРНК и белка EIF3E.
2. Полученные генетически модифицированные ЭСК человека с делецией участка гена *EIF3E* сохраняют плюрипотентные свойства, имеют нормальный кариотип и жизнеспособность.
3. Делеция участка гена *EIF3E* в субклоне Н9 (Δ 219 п.н.) линии NuES9 вызывает достоверное повышение мРНК *HIF2A*, но не вызывает увеличения уровня белка. В субклоне E12 линии ESM04 с делецией (Δ 226 п.н.) детектируется повышение экспрессии мРНК и белка HIF2A и мРНК *HIF1A*.
4. Наличие стабильного белка HIF2A в субклоне E12 вызывает повышение экспрессии генов гликолитического пути (*PDHX*, *PDK1*) и митохондриального окисления (*MT-ND1*, *MT-CO1*), что может быть связано с совмещением процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования в клетке.
5. В субклонах Н9 и E12 с делецией *EIF3E*, демонстрирующих повышенную экспрессию *HIF2A*, наблюдается повышенная эффективность направленной мезодермальной дифференцировки.
6. Эндотелиальные производные генетически модифицированных субклонов ЭСК с делецией *EIF3E* обладают характерными ангиогенными свойствами: повышенными показателями формировать трехмерные капилляроподобные структуры на матриксе *in vitro*, демонстрируют повышенную экспрессию проангиогенных факторов: *ANG1*, *bFGF*, *VEGFR2*, *CXCR4* для субклонов Н9 и

E12, *VEGF* – для субклона Н9. При этом эндотелиальные производные обладают повышенным ангиогенным потенциалом *in vitro* по сравнению с дифференцированными эндотелиальным производными исходных линий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Aitken C. E. and Lorsch J.R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes // *Nat Struct Mol Biol.* – 2012. – Vol. 19. – № 6. – P. 568–576.
2. Akiyoshi Y., Clayton J., Phan L., Yamamoto M., Hinnebusch AG, Watanabe Y and Asano K. Fission yeast homolog of murine Int-6 protein, encoded by mouse mammary tumor virus integration site, is associated with the conserved core subunits of eukaryotic translation initiation factor 3 // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276. – № 13. – P. 56–62.
3. Arany Z., Huang, L. E., Eckner R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., ... Livingston, D. M. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1996. – Vol. 93. – № 23. – P. 69-73.
4. Asano K., Merrick W.C. and Hershey J.W. The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272. – № 38. – P.77–80.
5. Bakhashab S., Lary S., Ahmed F., Schulten H., Bashir A., Ahmed F., Al-Malki A., Jamal H., Gari M., Weaver J. Reference genes for expression studies in hypoxia and hyperglycemia models in human umbilical vein endothelial cells // *G3 (Bethesda).* – 2014. – Vol. 4. – № 11. – P. 59-65.
6. Bandyopadhyay A., Matsumoto T. and Maitra U. Fission yeast Int6 is not essential for global translation initiation, but deletion of int6(+) causes hypersensitivity to caffeine and affects spore formation // *Mol Biol Cell.* – 2000. – Vol. 11. – № 11. – P. 4005–4018.
7. Bartoszewski R., Moszyńska A., Serocki M. Primary endothelial-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia // *FASEB J.* – 2019. – Vol. 33. – № 7. – P. 29-41.
8. Befani C., Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in

- angiogenesis // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 233. – № 12. – P. 87-98.
9. Ben-Yosef Y., Miller, A., Shapiro, S., & Lahat, N. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *American Journal of Physiology // Cell Physiology.* – 2005. – Vol. 289. – № 5. – P. 21-31.
 10. Bertos N. R., Wang, A. H., & Yang, X. J. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation // *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire.* – 2001. – Vol. 79. – № 3. – P. 43-52.
 11. Bitto A., De Caridi, G., Polito, F., Calò, M., Irrera, N., Altavilla, D., Squadrito, F. Evidence for markers of hypoxia and apoptosis in explanted human carotid atherosclerotic plaques // *Journal of Vascular Surgery.* – 2010. – Vol. 52. – № 4. – P. 15-21.
 12. Bosch-Marce M., Okuyama H., Wesley J. B. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia // *Circ Res.* – 2007. – Vol. 101. – № 12. – P. 1310-8.
 13. Botusan I. R., Sunkari, V. G., Savu, O., Catrina, A. I., Grünler, J., Lindberg, S., Catrina, S.-B. Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2008. – Vol. 105. – № 49. – P. 26-31.
 14. Bovill E. G., & van der Vliet, A. Venous valvular stasis-associated hypoxia and thrombosis: what is the link? // *Annual Review of Physiology.* – 2011. – Vol. 73. – № 1. – P. 27-45.
 15. Brown J. M., & Giaccia, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy // *Cancer Research.* – 1998. – Vol. 58. – № 7. – P. 8-16.
 16. Buttitta F., Martella C., Barassi F., Felicioni L., Salvatore S., Rosini S., D'Antuono T., Chella A., Mucilli F., Sacco R., Mezzetti A., Cuccurullo F., Callahan R., Marchetti A. EIF3E expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol.

11. – № 9. – P. 198-204.
17. Carmeliet P., Jain R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – № 7347. – P. 298-307.
18. Carbia-Nagashima A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G. K., Arzt, E. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. – 2007. – Vol. 131. – № 2. – P. 9-23.
19. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 6. – № 4. – P. 89-95.
20. Cate J. H. D. Human eIF3: From ‘blobology’ to biological insight // *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. – 2017. – Vol. 372. – № 1716. – P. 20160176.
21. Ceradini D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Gurtner, G. C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1 // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10. – № 8. – P. 58-64.
22. Chen L., Uchida K., Endler A., Shibasaki F. Mammalian tumor suppressor INT6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 α for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation // *J. Biol. Chem*. – 2007. – Vol. 282. – № 17. – P. 7-16.
23. Christin JR, Beckert MV. Origins and Applications of CRISPR-Mediated Genome Editing // *Einstein J Biol Med*. – 2016. – Vol. 31. – № 1-2. – P. 2-5.
24. Chung S., Rho S., Kim G., Kim S., Baek K., Kang M., Lew H. Human umbilical cord blood mononuclear cells and chorionic plate-derived mesenchymal stem cells promote axon survival in a rat model of optic nerve crush injury // *Int. J. Mol. Med*. – 2016. – Vol. 37. – № 5. – P. 70-80.
25. Chen L., Endler A., Uchida K., Horiguchi S., Morizane Y., Iijima O., Toi M. and Shibasaki F. Int6/eIF3e silencing promotes functional blood vessel outgrowth and enhances wound healing by upregulating hypoxia-induced factor 2 α expression // *Circulation*. – 2010. – Vol. 122. – № 9. – P. 910–

919.

26. Chen L., Uchida K., Endler A. and Shibasaki F. Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282. – № 17. – P. 707–716.
27. Cheng J., Kang, X., Zhang, S., & Yeh, E. T. H. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – № 3. – P. 84-95.
28. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science.* – 2013. – Vol. 339. – № 6121. – P. 19-23
29. Cooke J. P., Losordo D. W. Modulating the Vascular Response to Limb Ischemia: Angiogenic and Cell Therapies // *Circ Res.* – 2015. – Vol. 116. – № 9. – P. 1561-78.
30. Cowan C., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J., Wang S., Morton C., McMahon A., Powers D., Melton D. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *The New England journal of medicine.* – 2004. – Vol. 350. – № 13. – P. 53-56.
31. Creager M. A., Olin, J. W., Belch, J. J. F., Moneta, G. L., Henry, T. D., Rajagopalan, S., Hiatt, W. R. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication // *Circulation.* – 2011. – Vol. 124. – № 16. – P. 65-73.
32. Depoix C., Flabat O., Debiève F., Hubinont C. HIF-1alpha and EPAS-1 mRNA and protein expression during in vitro culture of human primary term cytotrophoblasts and effect of oxygen tension on their expression // *Reprod Biol.* – 2016. – Vol. 16. – № 3. – P. 203-211.
33. Déry M. A. C., Michaud, M. D., & Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* – 2005. – Vol. 37. – № 1. – P. 35-40.

34. Diez H., Fischer A., Winkler A., Hu C., Hatzopoulos A., Breier G., Gessler M. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate // *Exp. Cell. Res.* – 2007. – Vol. 313. – № 1. – P. 1-9.
35. Endler A., Chen L., Li Q. Int6/eIF3e silenced HIF2 α stabilization enhances migration and tube formation of HUVECs via IL-6 and IL-8 signaling // *Cytokine.* – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 115-22.
36. Ezashi T, Das P & Roberts RM Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells // *PNAS.* – 2005. – Vol. 102. – P. 4783-4788
37. Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions // *Reproduction.* – 2010. – Vol. 139. – № 1. – P. 185-97
38. Forsyth NR, Musio A, Vezzoni P, Simpson AH, Noble BS & McWhir J. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities // *Cloning and Stem Cells.* – 2006. – Vol. 8. – P. 16-23
39. Gao L., Chen, Q., Zhou, X., & Fan, L. The role of hypoxia-inducible factor 1 in atherosclerosis: Figure 1 // *Journal of Clinical Pathology.* – 2012. – Vol. 65. – № 10. – P. 72-76.
40. Gho B. C., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J., & Verdouw, P. D.. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94. – № 9. – P. 193-200.
41. Giatromanolaki A., Arvanitidou, V., Hatzimichael A., Simopoulos C., & Sivridis, E. The HIF-2 α /VEGF pathway activation in cutaneous capillary haemangiomas. *Pathology.* – 2005. – Vol. 37. – № 2. – P. 49-51.
42. Gildea D. E., Luetkemeier E. S., Bao X., Loftus S. K., Mackem S., Yang ., Pavan W.J. and Biesecker L.G. The pleiotropic mouse phenotype extra-toes spotting is caused by translation initiation factor Eif3c mutations and is

- associated with disrupted sonic hedgehog signaling // *FASEB*. – 2011. – Vol. 25. – № 5. – P. 1596–1605.
43. Goldberg MP, Monyer H, Choi DW. Hypoxic neuronal injury in vitro depends on extracellular glutamine // *Neurosci Lett*. – 1988. – Vol. 94.– № 1-2. – P. 52-7
44. Gomes-Duarte A., Lacerda R., Menezes J., Romão L. eIF3: a factor for human health and disease // *RNA Biol*. – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 26-34.
45. Greijer A., van der Groep P., Kemming D., Shvarts, A., Semenza, G., Meijer G., van der Wall, E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) // *The Journal of Pathology*. – 2005 – Vol. 206. – № 3. – P. 291-304
46. Grzmil M., Rzymiski T., Milani M. An oncogenic role of eIF3e/INT6 in human breast cancer // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29. – № 28. – P. 4080-9.
47. Grzmil M., Whiting D., Maule J., Anastasaki C., Amatruda J. F., Kelsh R. N., Norbury C. J. and Patton E. E. The INT6 cancer gene and MEK signaling pathways converge during zebrafish development // *PLoS One*. – 2007. – Vol. 2. – № 9. – P. e959.
48. Gunshin H., Allerson C. R., Polycarpou-Schwarz M., Rofts A., Rogers J. Hashimoto T, Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch // *Front. Pediatr.*– 2015. – Vol. 3.- P. 33.
49. Hashimoto T., Chen L., Kimura H. Silencing of eIF3e promotes blood perfusion recovery after limb ischemia through stabilization of hypoxia-inducible factor 2 α activity // *J Vasc Surg*. – 2016. – Vol. 64. – № 1. – P. 219-226.
50. Heinl-Green A., Radke, P. W., Munkonge, F. M., Frass, O., Zhu, J., Vincent, K., Alton, E. W. F. W. The efficacy of a “master switch gene” HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia // *European Heart Journal*. – 2005. – Vol. 26. – № 13. – P. 27-32.
51. Hinnebusch A. G. and Lorsch J. R. The mechanism of eukaryotic translation

- initiation: new insights and challenges // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – Vol. 4. – № 10. – P. a011544.
52. Hinnebusch A. G. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes // *Trends Biochem Sci.* – 2006. – Vol. 31. – N. 10. – P. 553–562.
53. Hoenig M, Bianchi C, Sellke F. Hypoxia Inducible Factor-1 α , Endothelial Progenitor Cells, Monocytes, Cardiovascular Risk, Wound Healing, Cobalt and Hydralazine: A Unifying Hypothesis // *Curr. Drug. Targets.* – 2008. – Vol. 9. – № 5. – P. 22-35.
54. Howell K., Preston R. J., McLoughlin Paul. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary // *circulation J Physiol.* – 2003. – Vol. 547. – № 1. – P. 133-45
55. Hu C., Iyer S., Sataur A., Covello K. L., Chodosh L. A., Simon M. C. Differential Regulation of the Transcriptional Activities of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha (HIF-1 α) and HIF-2 α in Stem Cells // *Mol Cell Biol.* – 2006. – Vol. 26. – № 9. – P. 14-26.
56. Iyer N. V, Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Semenza, G. L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha // *Genes & Development.* – 1998. – Vol. 12. – № 2. – P. 49-62.
57. Jackson R. J., Hellen C. U. and Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11. – № 2. – P. 113–127.
58. Kajiwara H., Luo, Z., Belanger, A. J., Urabe, A., Vincent, K. A., Akita, G. Y., ... Jiang, C. A hypoxic inducible factor-1 α hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats // *The Journal of Gene Medicine.* – 2009. – Vol. 11. – № 5.– P. 390-400.
59. Karuppagounder SS, Ratan RR. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32. – № 7.– P. 47-61.

60. Ke Q., & Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) // *Molecular Pharmacology*. – 2006. – Vol. 70. – № 5. – P. 1469-1480
61. Kenneth N. S., Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 114. – № 1. – P. 19-29
62. Koh M. Y., Lemos, R., Liu, X., & Powis, G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 11. – P. 15-27.
63. Koyanagi-Katsuta R., Akimitsu N., Hamamoto H., Arimitsu N., Hatano T. and Sekimizu K. Embryonic lethality of mutant mice deficient in the p116 gene // *J Biochem.* – 2002. – Vol. 131. – № 6. – P. 833–837.
64. Kütscher C., Lampert F., Kunze M., Markfeld-Erol F., Stark G., Finkenzeller G. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha improves vasculogenesis-related functions of endothelial progenitor cells // *Microvasc. Res.* – 2016. – Vol. 105. – P. 85-92.
65. Larson M., Gilbert L., Wang X., Lim W., Weissman J., Qi L. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression // *Nat. Protoc.* – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 80-96.
66. Laszkiewicz I., Wang H., Dovat S., Gans B., Madesh M., Cheung J., Miller B. Depletion of the Human Ion Channel TRPM2 in Neuroblastoma Demonstrates Its Key Role in Cell Survival through Modulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Bioenergetics // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291. – № 47. – P. 49-64.
67. Lagarkova M. A., Volchkov P. Y., Lyakisheva A. V., Philonenko E. S., Kiselev S. L. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines // *Cell Cycle*. – 2006. – Vol. 5. – P. 16-20.
68. Lee A. S., Kranzusch P. J. and Cate J. H. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression // *Nature*. – 2015. – Vol. 522. – № 7554. – P. 111–114.
69. Lee E. S., Bauer, G. E., Caldwell, M. P., & Santilli, S. M. Association of artery

- wall hypoxia and cellular proliferation at a vascular anastomosis // *The Journal of Surgical Research.* – 2000. – Vol. 91. – № 1.– P. 32-7.
- 70.Lee K., Qian, D. Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J. O., & Semenza, G. L. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* –2009. – Vol. 106. – № 7.– P. 2353-8
- 71.Lee K., Zhanga H., Qiana David., Rey S., Liuc Jun O., Semenza G. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization // *PNAS.* – 2009. – Vol. 106. – № 42. – P. 10-15.
- 72.Li Q., Yao B., Endler A., Chen L., Shibasaki F., Cheng H. Int6/eIF3e Silencing Promotes Placenta Angiogenesis in a Rat Model of Pre-eclampsia // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – №. 1.
- 73.Lian X.,Zhang J.,Azarin, MZhu S., Hazeltine K., BBao L., Hsiao X., Kamp C., JPalecek T. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // *Nature protocols.* – 2013. – Vol. 8. – № 1.– P. 62-75
- 74.Liu X., Qi J., Xu X., Zeisberg M., Guan K., Zeisberg E. M. Differentiation of functional endothelial cells from human induced pluripotent stem cells: A novel, highly efficient and cost effective method // *Differentiation.* – 2016. – Vol. 92. – № 4.– P. 25-36.
- 75.Licht A., Müller-Holtkamp F., Flamme I., Breier G. Inhibition of hypoxia-inducible factor activity in endothelial cells disrupts embryonic cardiovascular development // *Blood.* – 2006. – Vol. 107. – № 2. – P. 84-90.
- 76.Lim C. S., Kiriakidis, S., Sandison, A., Paleolog, E. M., & Davies, A. H. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall // *Journal of Vascular Surgery.* – 2013. – Vol. 58. – № 1.– P. 19–30.
- 77.Lim C. S., Qiao, X., Reslan, O. M., Xia, Y., Raffetto, J. D., Paleolog, E.,Khalil, R. A.. Prolonged mechanical stretch is associated with upregulation

- of hypoxia-inducible factors and reduced contraction in rat inferior vena cava. *Journal of Vascular Surgery*. – 2011. – Vol. 53.– № 3.– P. 64-73
- 78.Liu L., Marti, G. P., Wei, X., Zhang, X., Zhang, H., Liu, Y. V, Harmon, J. W. Age-dependent impairment of HIF-1 α expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells // *Journal of Cellular Physiology*. – 2008. – Vol. 217. – № 2. – P. 19-27.
- 79.Liu Y., Cox, S. R., Morita, T., & Kourembanas, S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer // *Circulation Research*. – 1995. – Vol.77– № 3. – P. 38-43.
- 80.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-8.
- 81.Loinard C, Ginouvès A, Vilar J, Cochain C, Zouggari Y, Recalde A. Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization // *Circulation*. – 2009. – Vol. 120. – P. 9-50
- 82.Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions // *Nature Biotechnology*. – 2006. –Vol. 24.– P. 85-87
- 83.Manalo DJ., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly BD., Ye SQ., Garcia JG., Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – N 2. – P. 59-69.
- 84.Mariah P., Chi V., Negi S., Krishnaswamy S., Guha. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response // *Advances in clinical chemistry*. –2010. – Vol. 52.– P.109-30
- 85.Mazurier F., Pages G., Nieto L., Cuvillier O. Rôle de la Sphingosine Kinase 1 dans la régulation de l'hypoxie intratumorale // Thèse, l'Université Toulouse

III - Paul Sabatier. – 2012. – P. 1-245

86. Mack D. L., Boulanger C. A., Callahan R. and Smith G.H. Expression of truncated Int6/eIF3e in mammary alveolar epithelium leads to persistent hyperplasia and tumorigenesis // *Breast Cancer Res.* – 2007. – Vol. 9. – № 4. – P. R42.
87. Majmundar A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress // *Molecular Cell.* – 2010. – Vol. 40. – № 2. – P. 294-309.
88. Marchetti A., Buttitta F., Miyazaki S., Gallahan D., Smith G.H. and Callahan R. Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia // *J Virol.* – 1995. – Vol. 69. – № 3. – P. 1932–1938.
89. Maxwell P. H., Wiesener, M. S., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Ratcliffe, P. J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* – 1999. – Vol. 399. – № 6733. – P. 71-75
90. Mayeur G.L. and Hershey J.W. Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3e) // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 514. – № 1. – P. 49–54.
91. Mitchell J. A., & Yochim, J. M. Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the rat: its relation to uterine respiration and vascular activity // *Endocrinology.* – 1968. – Vol. 83. – № 4. – P. 701-5
92. Moldovan N. I., & Asahara, T. Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, present, and future // *Trends in Cardiovascular Medicine.* – 2003 – Vol. 13. – № 7. – P. 265-9.
93. Nauta T. D., van den Broek M., Gibbs S. Identification of HIF-2 α -regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro // *Angiogenesis.* – 2017. – Vol. 20. – № 1. – P. 39-54.

94. Neganova I, Zhang X, Atkinson S & Lako M. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28. – P. 20-30
95. Neitemeier S., Dolga A., Honrath B., Karuppagounder S., Alim I., Ratan R., Culmsee C. Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 5. – № 7. – P. 2214.
96. Neusiedler J., Mocquet V., Limousin T., Ohlmann T., Morris C., Jalinot P. INT6 interacts with MIF4GD/SLIP1 and is necessary for efficient histone mRNA translation // *RNA*. – 2012. – Vol. 18. – № 6. – P. 1163-1177.
97. Ng I., Tan, W.-L., Ng, P.-Y., & Lim, J. Hypoxia inducible factor-1alpha and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in cerebral arteriovenous malformations // *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. – 2005 – Vol. 12. – № 7. – P. 794-9.
98. Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2011. – Vol. 63. – № 4-5. – P. 300-11
99. Okamoto N., Tanaka A., Jung K. Silencing of int6 gene restores function of the ischaemic hindlimb in a rat model of peripheral arterial disease // *Cardiovasc Res.* – 2011. – Vol. 92. – № 2. – P. 209-17.
100. Olson E., Demopoulos L., Haws T. F. Short-term treatment with a novel HIF-prolyl hydroxylase inhibitor (GSK1278863) failed to improve measures of performance in subjects with claudication-limited peripheral artery disease // *Vasc Med.* – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 73-82.
101. Park H. J., Yang F., Cho S. W. Nonviral delivery of genetic medicine for therapeutic angiogenesis // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2012. – Vol. 64. – № 1. – P. 40-52.

102. Park J. E., Keller, G. A., & Ferrara, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF // *Molecular Biology of the Cell*. –1993. – Vol. 4. – № 12. – P. 17-26.
103. Patel T. H., Kimura H., Weiss C. R., Semenza G. L., Hofmann L. V. Constitutively active HIF-1 α improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia // *Cardiovasc Res*. – 2005. – Vol. 68 – № 1. – P. 144-54.
104. Peng L., Shu X., Lang C., Yu X. Effects of hypoxia on proliferation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells // *Cytotechnology*. – 2016. – Vol. 68. – № 4. – P. 15-22.
105. Peng L., Zhang L., Drysdale L., Fong G. The transcription factor EPAS-1 hypoxia-inducible factor 2a plays an important role in vascular remodeling // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97. – № 15. – P. 86-91
106. Petruzzelli R., Christensen D. R., Parry K. L., Sanchez-Elsner T., Houghton F. D. HIF-2 α Regulates NANOG Expression in Human Embryonic Stem Cells following Hypoxia and Reoxygenation through the Interaction with an Oct-Sox Cis Regulatory Element // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 10. – P. e108309.
107. Pick E., Hofmann K. and Glickman M. H. PCI complexes: beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika // *Mol Cell*. – 2009. – Vol. 35. – № 3. – P. 260–264.
108. Prabhakar N., Semenza G., Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 // *Physiol Rev*. – 2012. – Vol. 92. – № 3. – P. 967-1003.
109. Prokhorovich M. A., Lagar'kova M. A., Shilov A. G., Karamysheva T. V., Kiselyov S. L., Rubtsov N. B. Cultures of hESM human embryonic stem

- cells: Chromosomal aberrations and karyotype stability // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 144. – № 1. – P. 26-29.
110. Pugh C. W., & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine.* –2003. –Vol. 9. – № 6. – P. 77-84.
111. Rajagopalan S., Olin, J., Deitcher, S., Pieczek, A., Laird, J., Grossman, P. M., ... Chronos, N. Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1alpha transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: phase I dose-escalation experience // *Circulation.* –2007. – Vol. 115. – № 10. – P. 34-43.
112. Rencus-Lazar S., Amir Y., Wu J., Chien C.T., Chamovitz D.A. and Segal D. The proto-oncogene *Int6* is essential for neddylation of Cull1 and Cul3 in *Drosophila* // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3. – № 5. – P. e2239.
113. Rufaihah A.J., Huang N.F., Kim J., Herold J., Volz K.S., Park T.S., Lee J.C., Zambidis E.T., Reijo-Pera R., Cooke J.P. Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity // *Am. J. Transl. Res.* – 2013. – Vol. 5. – № 1. – P.21-35
114. Rufaihah A. J. Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity // *American journal of translational research.* – 2013 – Vol. 5.– P.21-35
115. Sarkar K., Fox-Talbot, K., Steenbergen, C., Bosch-Marcé, M., & Semenza, G. L. Adenoviral transfer of HIF-1alpha enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2009. –Vol. 106. – № 44. – P. 69-74.
116. Schokrpur S., Hu J., Moughon D., Liu P., Lin L., Hermann K., Mangul S., Guan W., Pellegrini M., Xu H., Wu L. CRISPR-Mediated VHL Knockout Generates an Improved Model for Metastatic Renal Cell Carcinoma // *Sci Rep.* – 2016. – № 6. – P. 29032.
117. Schödel J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe,

- P. J., & Mole, D. R. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq // *Blood*. – 2011. – Vol. 11. – № 723.
118. Semenza G., Targeting HIF-1 for cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – № 10. – P. 21-32.
119. Semenza G. L. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. 47-71.
120. Semenza G., Guan W. A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation // *Molecular and cellular biology*. – 1992. – Vol. 12. – № 12. – P. 47-54.
121. Semenza Gregg L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. – № 3. – P. 399-408.
122. Semenza Gregg L. Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease // *N Engl J Med*. – 2011. – Vol. 365. – № 6. – P. 37-47.
123. Sesen J., Casaos J., Scotland S. J., Seva C., Eisinger-Mathason, T. S. K., & Skuli, N. The bad, the good and eIF3e/INT6 // *Frontiers in Bioscience - Landmark*. – 2017. – Vol. 22. – P. 1-20.
124. Sesen J., Cammas A., Scotland S. J. Int6/eIF3e is essential for proliferation and survival of human glioblastoma cells // *Int J Mol Sci*. – 2014. – Vol. 15. – № 2. – P. 72-90.
125. Shatzkes K., Teferedegne B., Murata H. A simple, inexpensive method for preparing cell lysates suitable for downstream reverse transcription quantitative PCR // *Sci Rep*. – 2014. – Vol. 4. – P. 4659
126. Shalev A., Valasek L., Pise-Masison C.A., Radonovich M., Phan L., Clayton J., He H., Brady J.N., Hinnebusch A.G. and Asano K. *Saccharomyces cerevisiae* protein Pci8p and human protein eIF3e/Int-6 interact with the eIF3 core complex by binding to cognate eIF3b subunits // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276. – № 37. – P. 48–57.

127. Shichijo S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F. Itoh, K.. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. // *The Journal of Experimental Medicine.*–1998. – Vol. 187.– № 3.– P. 277-88.
128. Siridechadilok B., Fraser C. S., Hall R. J., Doudna J. A. and Nogales E. Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis // *Science.* – 2005. – Vol. 310. – № 5753. – P. 1513–1515.
129. Skiles M. Characterizing Hypoxia and its behavioral effects in 3-Dimensional Cell.Aggregates // *Doctoral dissertation.* – 2013. – P. 1-172.
130. Skuli N., Liu L., Runge, A., Wang, T., Yuan, L., Patel, S., Keith, B. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – № 2. – P. 69-77
131. Skuli N., Majmundar, A. J., Krock, B. L., Mesquita, R. C., Mathew, L. K., Quinn Z. L., Simon, M. C. Endothelial HIF-2 α regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2012. – Vol. 122. – № 4. – P. 27-43.
132. Sluimer J. C., & Daemen, M. J.. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis // *The Journal of Pathology.*– 2009. – Vol. 218. – № 1. – P. 7-29.
133. Spilka R., Ernst C., Mehta A. K., Haybaeck J. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression // *Cancer Lett.* – 2013. – Vol. 340. – № 1. – P. 9-21.
134. Spirina L., Usynin Y., Yurmazov Z., Slonimskaya E., Kolegova E., Kondakova I. Transcription factors NF-kB, HIF-1, HIF-2, growth factor VEGF, VEGFR2 and carboanhydrase IX mRNA and protein level in the development of kidney cancer metastasis // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2017. – Vol. 51. – № 2. – P. 372-377.
135. Kishi F., Hentze M.W., Rouault T.A., Andrews N.C. and Hediger M.A.

- Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 509. – P. 9-16.
136. Talks K., Turley H., Gatter K., Maxwell P., Pugh C., Ratcliffe P., Harris A. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 157. – № 2. – P. 11-21.
137. Tang K., Xia F., Wagner P., Breen E. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2010. – V. 170. – № 1. – P. 16-22.
138. Tang N., Wang L., Esko J., Giordano F., Huang Y., Gerber H., Ferrara N., Johnson R. Loss of HIF1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 6. – № 5. – P. 485-95.
139. Taniguchi C., Miao Y., Diep A., Wu C., Rankin E., Atwood T., Xing L., Giaccia A. PHD Inhibition Mitigates and Protects Against Radiation-Induced Gastrointestinal Toxicity via HIF2 // *Sci Transl Med.* – 2014. – Vol. 6. – № 236. – P. 36-64
140. Tu C., Das S., Baker A. B., Zoldan J., Suggs L. J. Nanoscale strategies: Treatment for peripheral vascular disease and critical limb ischemia // *ACS Nano.* – 2015. – Vol. 9. – № 4. – P. 36-52.
141. Tu T. C., Nagano M., Yamashita T. A chemokine receptor, CXCR4, which is regulated by hypoxia inducible factor 2 α , is crucial for functional EPC migration to ischemic tissue and wound repair // *Stem Cells Dev.* – 2015. – Vol. 25. – № 3. – P. 266-76.
142. Uccioli L., Meloni M., Izzo V., Giurato L., Merolla S., Gandini R. Critical limb ischemia: current challenges and future prospects // *Vasc Health Risk Manag.* – 2018. – Vol. 14. – P. 63-74.
143. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B. Accurate

- normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome Biology*. – 2002. – Vol. 3. – № 7. – P. 1-11.
144. Vukovic M., Guitart A., Sepulveda C., Villacreces A., O'Duibhir E., Panagopoulou T., Ivens A., Menendez-Gonzalez J., Iglesias J., Allen L., Glykofrydis F., Subramani C., Armesilla-Diaz A., Post A., Schaak K., Gezer D., So C., Holyoake T., Wood A., O'Carroll D., Ratcliffe P., Kranc K. Hif-1 α and Hif-2 α synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance // *J. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 212. – № 13. – P. 2223.
145. Wagner S., Herrmannová A., Malík R., Peclinovská L., Valášek L. S. Functional and Biochemical Characterization of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 in Living Cells // *Mol Cell Biol.* – 2014. – Vol. 34. – № 16. – P. 41-52.
146. Wang G. L. and Semenza G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1993b – Vol. 90. – P. 304-308.
147. Watanabe A., Ichiki T., Sankoda C. Suppression of abdominal aortic aneurysm formation by inhibition of prolyl hydroxylase domain protein through attenuation of inflammation and extracellular matrix disruption // *Clin Sci (Lond)*. – 2014. – Vol. 126. – № 9. – P. 671-8.
148. Westfall S. D., Sachdev S., Das P., Hearne L. B., Hannink M., Roberts RM & Ezashi T. Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells // *Stem Cells and Development*. – 2008. – Vol. 17. – P. 69-82.
149. Wheaton W. W., Chandel N. S. Hypoxia regulates cellular metabolism // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2011. – Vol. 300. – № 3. – P. 385-93
150. Wiesener M., Jürgensen J., Rosenberger C., Scholze C., Hörstrup J., Warnecke C., Mandriota S., Bechmann I., Frei U., Pugh C., Ratcliffe P.,

- Bachmann S., Maxwell P., Eckardt K. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17. – № 2. – P. 271-3.
151. Wolf D. A., Lin Y., Duan H., & Cheng, Y. EIF-Three to Tango: Emerging functions of translation initiation factor eIF3 in protein synthesis and disease // *Journal of Molecular Cell Biology*. Oxford University Press. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 403-409.
152. Wu C., Wang X., Zhong M., Liu H., He Q., Yang X., Wen J., Feng D. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR studies in human hepatoma cell lines treated with TNF- α // *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* – 2013. – Vol. 45. – № 9. – P. 780-6.
153. Xiuying L., Qiwei Y., Jinping B., Yanyan Y., Lingzhi Z., Yimin W. Identification of optimal reference genes for quantitative PCR studies on human mesenchymal stem cells // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – P. 304-311
154. Yang L., Shen L., Li G., Yuan H., Jin X., Wu X. Silencing of hypoxia inducible factor-1 α gene attenuated angiotensin II -induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice // *Atherosclerosis.* – 2016. – Vol. 252. – P. 40-9.
155. Yen H. C. and Chang E. C. INT6—a link between the proteasome and tumorigenesis // *Cell Cycle.* – 2003. – Vol. 2. – № 2. – P. 81–83.
156. Zeng L., Wan Y., Li D., Wu J., Shao M., Chen J., Hui L., Ji H. and Zhu X. The m subunit of murine translation initiation factor eIF3 maintains the integrity of the eIF3 complex and is required for embryonic development, homeostasis, and organ size control // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288. – № 42. – P. 87–93.
157. Zhang Z., Christin J., Wang C., Ge K., Oktay M., Guo W. Mammary-Stem-Cell-Based Somatic Mouse Models Reveal Breast Cancer Drivers Causing Cell Fate // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 16. – № 12. – P. 3146-3156.
158. Zhang H., Qian, D. Z., Tan, Y. S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y. R., Semenza, G. L. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and

- block tumor growth // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. –2008. –Vol. 105.– № 50. – P. 19579-86.
159. Zhang X., Neganova I., Przyborski S., Yang C., Cooke M., Atkinson S. P., Anyfantis G., Fenyk S., Keith W. N., Hoare S. F. A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A // Journal of Cell Biology –2009. –Vol. 184 – P. 67-82
160. Zhang X., Zhang Y., Wang P. Adipocyte Hypoxia-Inducible Factor 2 α Suppresses Atherosclerosis by Promoting Adipose Ceramide Catabolism // Cell Metab. – 2019. – Vol. 30. – №. 5. – P. 37-51.
161. Zhao T., Zhang C. P, Liu Z. H, Wu L. Y, Huang X, Wu H. T, Xiong L, Wang X, Wang X. M, Zhu L. L. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells-role of hypoxia-inducible transcription factor-1a // FEBS Journal. –2008. –Vol. 275. – P. 1824-1834.
162. Zhdanov A. V., Okkelman I. A., Collins F. W., Melgar S., Papkovsky D. B. A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1847.– № 10.– P. 54-66
163. Zhou Z., Zhang J., Xia P., Wang J., Chen S., Fang X., Fan S. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time polymerase chain reaction in human cartilage endplate of the lumbar spine // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. 88892.
164. Zhu C., Yu J., Pan Q., Yang J., Hao G., Wang Y., Li L., Cao H. Hypoxia-inducible factor-2 alpha promotes the proliferation of human placenta-derived mesenchymal stem cells through the MAPK/ERK signaling pathway // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 35489.
165. Zimna A., Kurpisz M., Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies // Biomed. Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 549-412.
166. Zudaire E., Gambardella L., Kurcz C., Vermeren S. A computational

- tool for quantitative analysis of vascular networks // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – № 11. – P. e27385
167. Живень М.К., Захарова И.С., Смирнова А.М., Шевченко А.И., Орищенко К.Е., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. CRISPR/Cas9-опосредованное получение генетически модифицированной линии плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующих HIF — фактор, индуцируемый гипоксией // Гены и клетки. – 2018. – No 2 (приложение). Материалы Международного конгресса CRISPR-2018. С. 30.
168. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Орищенко К.Е., Закиян С.М. Получение и характеристика эмбриональных стволовых клеток человека с повышенной экспрессией HIF2A // Гены & Клетки. – 2020. – Т. 14. – № 1. – P. 29-35.
169. Захарова И.С., Смирнова А.М., Живень М.К., Шевченко А.И., Григорьева Е.В., Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Получение генетически-модифицированной линии плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующей HIF-фактор, индуцируемый гипоксией // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – № 3. – P. 97-98
170. Медведев С., Шевченко А., Сухих Г., Закиян С. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки // 2-е изд. Новосибирск: Изд-во СО РАН. – 2014. – С. 376.