

# Гемопоетичні стовбурові клітини людини генерують екзосоми, що містять активні протеасоми, але не каспази

І.М. Прудніков, А.М. Смірнов, В.М. Цивкін, І.В. Прісташ

Інститут фізіології ім. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: igor.prudnikov@biph.kiev.ua

*Були досліджені активності двох класів нейтральних протеаз: каспаз і протеасом, які містилися у позаклітинних везикулах, що генеруються мезенхімальними та гемопоетичними стовбуровими клітинами людини (МСК і ГСК відповідно). В цих клітинах не утворювались апоптосоми, що індукуються додаванням цитохрому С та дезоксиаденозинтрифосфорної кислоти (дАТФ). Наявність фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП $\alpha$ ) у культуральному середовищі ГСК викликає появу внутрішньоклітинної активності каспази-3. При цьому в екзосомах також була виявлена каспазна активність. Ця активність повністю пригнічувалася несубстратним інгібітором каспаз, емрікасаном, і не була чутлива до інгібіторів протеасом. Припускається, що активність каспаз з культурального середовища є сумою мембранної (зовнішня сторона мембран екзосом), внутрішньоклітинної та позаклітинної активностей. Очевидно, вона відноситься до апоптосом, оскільки виявлялася за допомогою гель-фільтрації культурального середовища з ФНП $\alpha$ , вільного від везикул. Таким чином, ФНП $\alpha$  індукуює в культурі ГСК появу нейтрофілів або генерацію інших диференційованих клітин, які здатні до апоптозу, на відміну від ГСК або МСК. Протеасомна активність помітно зросла в екзосомах з ГСК після додавання ФНП $\alpha$ . На відміну від екзосом з МСК, вся активність протеасом в екзосомах, продукованих ГСК, мала мембранну локалізацію.*

*Ключові слова: апоптоз; протеасоми; стовбурові клітини людини; екзосоми.*

## ВСТУП

Останнім часом список міжклітинних комунікаторів поповнився позаклітинними везикулами, чий вміст і мембранні білки беруть участь у сигналізації або в її модуляції [1]. Клітини, які належать до білого листка крові, виділяють екзосоми, що містять протеасоми у вигляді 20S-часток [2]. Протеасома здійснює убіквітинзалежну і незалежну деградацію в основному денатурованих протеїнів. Крім того, до субстратів 20S-протеасоми належать деякі короткоживучі неденатуровані білки, такі як декарбоксилази, c-Jun, c-Fos, I $\kappa$ B $\alpha$ , Fra-1, Hif-1 $\alpha$  [3]. Вважається, що протеасомна активність важлива не лише для внутрішньоклітинного протеолізу, про що свідчить наявність функціональних протеасом у плазмі крові, альвеолярній рідині, і у

© І.М. Прудніков, А.М. Смірнов, В.М. Цивкін, І.В. Прісташ

культуральному середовищі деяких клітин [3, 4]. Убіквітинування і робота протеасомної системи важливі для розвитку тканин і органів та підтримки їх клітинного гомеостазу. Наприклад, виявлено, що нестача Rpt 3, білка в складі регуляторної субодиниці протеасом, призводить до інактивації стовбурових сателітних клітин м'язів і їх апоптозу [5]. Протилежний приклад стосується убіквітинспецифічної протеази 7, яка деубіквітинує мішені протеасом і цим запобігає апоптозу лейкозних клітин [6]. Інгібітори протеасом викликають програмовану загибель мієлолейкозних стовбурових клітин, "рятуючи" від протеолітичної деградації білка р53, але не в гемопоетичних стовбурових клітинах (ГСК), оскільки вони не містять його в значній кількості, яка потрібна для регуляторної активності [7, 8].

Апоптоз – критична подія в житті клітин. Під час цього процесу цистеїнові протеази каспази організують глобальну програму руйнування клітин з протеолізом приблизно тисячі білкових субстратів [9]. Прямих даних, які вказують на існування канонічного апоптозного способу клітинної смерті у ГСК із формуванням апоптосом, обмаль, оскільки більшість відомостей про цей процес отримано опосередковано [10, 11]. Можливо, що запрограмована загибель клітин не існує в ГСК у канонічному вигляді [12, 13].

Спонтанна загибель нейтрофілів, опосередкована каспазою-3, є прототипом запрограмованої загибелі клітин і має вирішальне значення для модуляції запальних реакцій; тим не менше основні регуляторні шляхи залишаються недостатньо вивченими. У старіючих нейтрофілах розщеплення і активація каспази-3 не залежить від канонічного шляху, опосередкованого каспазою-8 або каспазою-9. Замість цього, активація каспази-3 здійснюється сериною протеїназою 3 (PR3), яка є в цитоплазматичних гранулах старіючих нейтрофілів і вивільняється з них у цитоплазму [14]. PR3 розщеплює прокаспазу-3 за сайтом розщеплення каспазою-9. Адаптивне перенесення нейтрофілів з дефіцитом PR3 показав, що їх відтермінована загибель відбувається через використання інших внутрішніх шляхів апоптозу/виживання, а не через запальне мікрооточення. Наявність інгібітора вищезгаданої протеази (SERPINB1) зменшує активність PR3 у старіючих нейтрофілах, а видалення SERPINB1 прискорює загибель цих клітин. Активація каспази-3, опосередкована PR3, контролює спонтанну смерть нейтрофілів, але чи існує цей процес в стовбурових клітинах – невідомо. Чи може PR3 бути в активному стані в ГСК також невідомо [14, 15].

Альтернативно існують інші варіанти клітинної смерті, наприклад некроптоз, і вони можуть мати відношення до гомеостазу ГСК. На відміну від апоптозу, некроптоз – це регульована форма некротичної загибелі клітин,

опосередкована рецепторною протеїнкіназою 3 і псевдокіназою MLKL [16, 17]. Він запускається зовнішніми лігандами, такими як ФНП $\alpha$  [16]. Стимуляція рецептора ФНП $\alpha$  призводить до фосфорилування псевдокіназного (кіназоподібного) білка змішаного походження (MLKL). Фосфорильований MLKL олігомеризується на цитоплазматичних некросомах і порушує мембранну цілісність, що призводить до загибелі клітин [17, 18].

Ще один приклад клітинної смерті в лейкоцитах, це піроптоз, який в основному описаний для моноцитів і макрофагів. Він викликається запальними каспазами, наприклад каспазою-1, -4, -5, -11 [19]. Ця форма клітинної загибелі молекулярно визначається завдяки специфічному обмеженому розщепленню газдерміну D (GSDMD) для вивільнення його N-кінцевого домену GsdmD p30 [20]. GsdmD p30 збирається з утворенням пор у плазматичній мембрані, що призводить до лізису клітин [21].

Мета нашої роботи – дослідження активності двох класів нейтральних протеаз: каспаз і протеасом, які можуть міститися в везикулах, що генеруються стовбуровими клітинами людини, і які беруть участь у нормальній клітинній фізіології, найчастіше визначаючи долю клітин і саме їхнє існування. Для цього ми порівнювали везикули ГСК з такими, що генерувалися мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК) тому, що останні більше вивчені.

## МЕТОДИКА

Для виділення дорослих гемопоетичних стовбурових клітин людини та їх культивування кістковий мозок аспірували з гепарином із грудини (sternum) трьох здорових добровольців-чоловіків віком 38, 44, та 54 років після отримання поінформованої згоди та затвердження протоколу дослідження Комітетом з питань етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Місцеву анестезію було здійснено 1%-м розчином лідокаїну у 1%-му розчині бікарбонату натрію, який

вводили підшкірно та в окістя. МСК та ГСК відокремлювали від інших клітин кісткового мозку, застосовуючи процедуру негативно-го відбору за допомогою моноклональних антитіл (“StemCell”, Канада). Для цього використовували коктейлі RosetteSep™, призначені для збагачення проб клітинами-попередниками, видаляючи зайві клітини з цілого кісткового мозку через негативний відбір за антигенами CD3, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD56, CD66b для ГСК та CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b для МСК та глікофору А. Виділені клітини ресуспендували в середовищі StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (SFEM, “StemCell”, Канада) та MesenCult™ MSC Basal Medium, доповненому відповідною стимуляторною добавкою, що містила рекомбінантні людські цитокіни: Flt3 ліганд, фактор стовбурових клітин, інтерлейкін-3, інтерлейкін-6 та тромбопоетин [22]. Подібне середовище було використано для МСК. Клітини культивували в зволоженому на 95% інкубаторі при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Середовище змінювали кожні три дні на нове протягом 3 тиж. Клітини, які культивувалися, концентрували за допомогою позитивної селекції за антигеном CD34<sup>+</sup>, використовуючи EasySep™ “Human CD34 Positive Selection Kit” на магнітних частинках. Виділені таким чином клітини були пермеабілізовані сапоніном (50 мкг/мл) перед подальшими маніпуляціями та зберігалися на льоду протягом 15–60 хв у відповідному ізотонічному забуференому середовищі в об’ємі 100–200 мкл.

Частина вирощених ГСК через 10 днів культивування була використана для індукції генеративної нейтрофілів та індукції в них клітинної смерті за допомогою ФНП $\alpha$ . Для цього останню заміну середовища SFEM змінили на середовище без ростових факторів. У нове середовище було додано ФНП $\alpha$ , інтерлейкін-2 та гранулоцитарно-макрофагальний колонійстимулюючий фактор по 10 нг/мл (далі “ФНП $\alpha$ -коктейль” або “ФНП $\alpha$ ” у підписах до рисунків). Клітини вирощували у новому середовищі протягом 4 днів.

Культуральне середовище фільтрували (фільтр 0,22 мкм), центрифугували 30 хв при 15 000g та концентрували у 15 разів з використанням 150 кДа-фільтрів (“Millipore”, США). Концентрат використовували для гель-фільтрації та виділення екзосом за допомогою набору для “Total exosome isolation” (“Invitrogen”, США). Екзосоми також виділяли центрифугуванням на холоді 3,5 год при 50 000g. Осад, що був сформований таким чином, ресуспендували у ізотонічному середовищі та зберігали на льоду.

Концентроване культуральне середовище фракціонували за допомогою носія для високомолекулярної гель-фільтрації HW-65 (“Supelco”, Японія) на циліндричній колонці 50×1 см, при швидкості 0,3 мл/хв. Кожна фракція була повторно концентрована з використанням 150 кДа-фільтрів.

Апоптоз індукували в пермеабілізованих сапоніном клітинах за допомогою розчину цитохрому C (5 мкмоль/л) та дАТФ (1 ммоль/л) протягом години при 32°C та з додаванням суміші інгібіторів протеаз (“Sigma”, США) та 2 ммоль/л дитіотреїтолу [23]. Протеазні реакції проводили в об’ємі 200 мкл з використанням термоміксерів (“Eppendorf”, Німеччина) при 37°C. Активність каспази-3 вимірювали за допомогою субстрату (Z-Asp-Glu-Val-Asp)<sub>2</sub>-Rhodamine 110 (Z-DEVD)<sub>2</sub>R110 у середовищі з 10 ммоль/л тріс- або 30 ммоль/л HEPES-буфером (pH 7,3) при довжині збуджуючого світла у 485 нм та емісії 535 нм. (Z-DEVD)<sub>2</sub>R110 як субстрат використовували для вимірювання активності каспаз для всіх препаратів разом із емрікасаном для підтвердження специфічності і разом із 20 мкмоль/л бортезомібу або 2 мкмоль/л AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS – для зменшення фонові протеасомної активності [23]. Хімотрипсину- (Z-LLYV-AMC), трипсину- (LY-AMC) та каспазоподібну (VEHD-AMC та DEHD-AMC) активності протеаз протеасом вимірювали при довжині збуджуючого світла у 360 нм та емісії 440 нм після додавання у середовище вищевказаних субстратів у кон-

центрації 20 мкмоль/л. Специфічність активності доводили додаванням інгібіторів усіх типів протеасомної активності: 2 мкмоль/л бортезомібу, 2 мкмоль/л AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS або 0,1 мкмоль/л епоксоміцину [23].

Для виявлення експресії специфічних антигенів виділяли мРНК. Загалом 20 мкг РНК з кожного зразка досліджуваних ГСК було виділено за допомогою набору “RNeasy mini” (“Qiagen”, США) та оброблено DNase I (“GE Healthcare”, США). Синтез кДНК проводили за допомогою зворотної транскриптази SuperScript III (“Invitrogen”, США) з поліА-праймерами, згідно з рекомендованою виробником процедурою, а кДНК обробляли RNase H (“Hoffmann-La Roche”, США). Для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували Tfi ДНК-полімерази “гарячого старту” (“Invitrogen”, США) і реакції проводили відповідно до рекомендованої виробником процедури. Продукти реакцій ПЛР мРНК/кДНК білкових антигенів CD14, CD34 та CD45 з набором праймерів обробляли рестриктазою EarI (“Fermentas”, США) для підтвердження специфічності використовуваних праймерів. Аліквоти (15 мкл) продуктів реакції ПЛР наносили на нативний агарозний 2%-й гель, фарбували SyberGreen (“Invitrogen”, США) і візуалізували під УФ-світлом. ПЛР з мінус-шаблоном була включена в експеримент як негативний контроль, а праймери до фрагмента кДНК білка 15S малої РНК-рибосомальної субодиниці (праймери від “Ambion”, США) – як позитивний контроль.

Результати представлено як середнє значення ± s.d. Статистичний аналіз достовірності відмінностей був виконаний з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ

З кожного зразка кісткового мозку були виділені і розмножені в специфічних середовищах подібними способами дві популяції клітин: МСК і ГСК. ГСК експресували

мРНК, які відповідали білковому фенотипу CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>. Після культивування з ФНП–коктейлем у препараті мРНК з’являвся маркер CD14. Набір сумарних мРНК, виділених та ідентифікованих з таких клітин, став виглядати як CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>.

Результати експериментів наведені у вигляді порівняння властивостей екзосом, виділених із культур МСК і ГСК, оскільки є достатня кількість інформації в літературі про екзосоми з МСК. У самих клітинах ГСК, виділених імуноафінним способом, і в МСК активність протеасом відносно до різних тетрапептидів блокувалася непептидними аналогами, щоб уникнути помилкового уявлення щодо приналежності протеазної активності до протеасомної. Використані інгібітори протеасом мають певну селективність щодо різних субодиниць, але у концентраціях, в яких вони використовувалися, бортезоміб і AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS повністю блокували всі протеазні активності протеасом. Результати застосування бортезомібу наведені на рис. 1. Слід зазначити, що хімотрипсину- (Z-LLYV-АМС), трипсину- (LY-АМС) та каспазоподібна активності виявляються в ГСК клітинах (як і в МСК) тільки після додавання сапоніну, тобто вони є внутрішньоклітинними. Наші спроби індукувати апоптоз за допомогою цитохрому С і дАТФ (в умовах пермеабілізації клітин сапоніном) були не ефективні ні у ГСК, ні МСК клітин. Ми зробили спробу індукувати появу апоптозу за допомогою ФНПа (протягом 4 днів, додаючи його в концентрації 10 нг/мл) у культурі з ГСК, але специфічна для каспаз, індукована цитохромом С і дАТФ активність, не була виявлена. Проте частина клітин втратила спорідненість до анти-CD34 іммобілізованих антитіл. У популяції клітин, вільних від CD34<sup>+</sup>-клітин, ми також не змогли виявити внутрішньоклітинну протеазну активність, селективну для каспаз, яка викликається додаванням індукторів апоптозу. Таким чином, можна припустити, що МСК і ГСК не мають можливості для розвитку класичного апоптозу, індукованого виходом із мітохондрій цитохрому С.

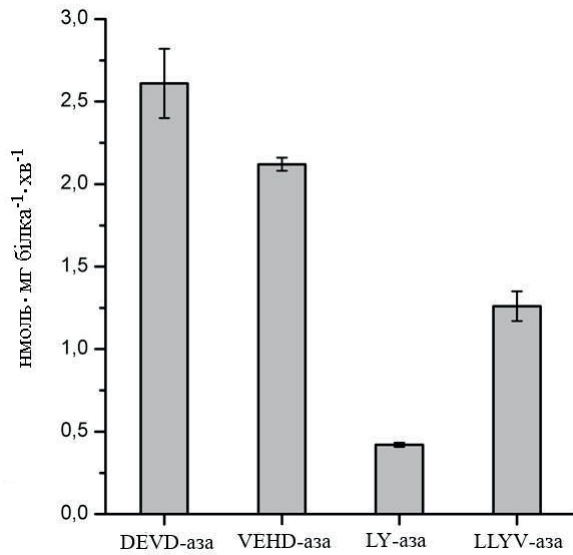


Рис. 1. Активність чутливих до бортезомібу протеасом в CD34<sup>+</sup>-гемопоетичних стовбурових клітинах

Водночас у ФНП $\alpha$ -оброблених пермеабілізованих CD34<sup>-</sup>-клітинах виявлялася незначна активність щодо субстрату (Z-DEVD)<sub>2</sub>R110, яка повністю інгібувалася додаванням 0,1 мкмоль/л емрікасану. У екзосомах із таких клітин сапонін викликав демаскування каспазної активності (рис. 2).

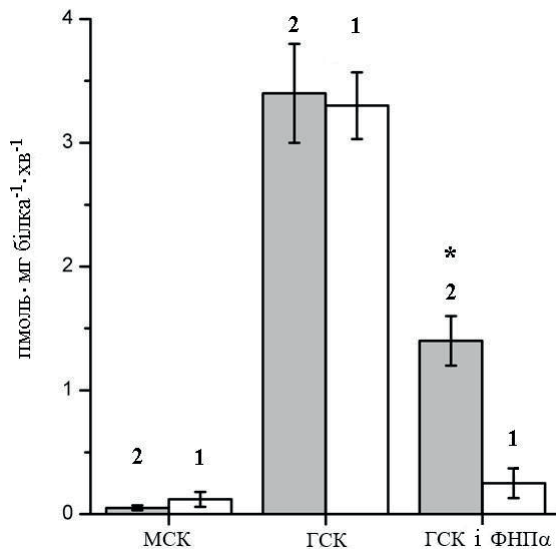


Рис. 2. Активність емрікасанчутливої (Z-DEVD)<sub>2</sub>R110-ази в екзосомах з культуральних середовищ гемопоетичних (ГСК) і мезенхімальних стовбурових клітинах (МСК): 1 – контроль, 2 – сапонін (50 мкг/мл). \*P < 0,01 відносно контролю

Це дає змогу припустити також і внутрішньоклітинну локалізацію активних каспаз у нейтрофілах і/або у їх попередників.

LLYV-азна активність, яка інгібувалася бортезомібом і AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS, була і в екзосомах (рис. 3). У разі з МСК вона помітно збільшувалася після додавання сапоніну. Протеасомна активність в екзосомах з культурального середовища ГСК була у багато разів меншою, ніж з МСК і додавання сапоніну не збільшувало її. Активність у везикулах із культурального середовища з ФНП $\alpha$ -коктейлем була помітно вищою, ніж без цього фактора (див. рис. 3), але після додавання сапоніну не збільшувалася.

Хроматографія концентрованого середовища з культури ГСК показала, що воно містить протеасоми поза екзосомальних мембран, оскільки піки протеасомної активності препаратів, приготованих після обробки Triton X-100 (0,05%) і без нього, збігалися і відповідали міграції на колонці стандартним 20S-протеасомам (рис. 4). Такий самий профіль виявився і для специфічної каспазної активності, що корелює з відомими даними

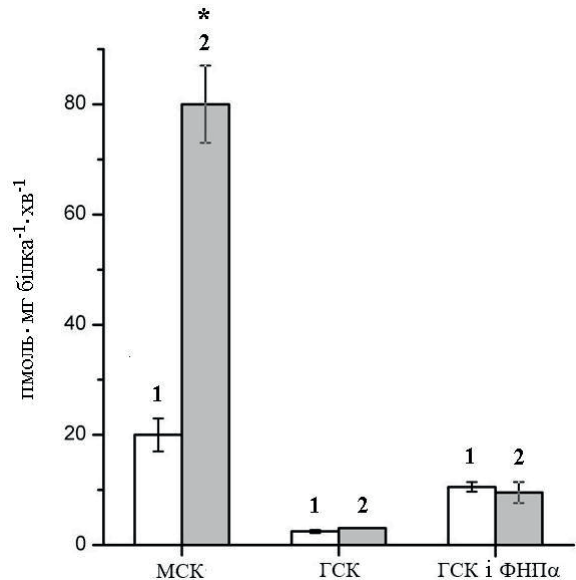


Рис. 3. Бортезоміб- і AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS-чутлива активність LLYVase в екзосомах з культуральних середовищ гемопоетичних (ГСК) і мезенхімальних стовбурових клітинах: 1 – контроль, 2 – сапонін (50 мкг/мл). \*P < 0,01 відносно контролю

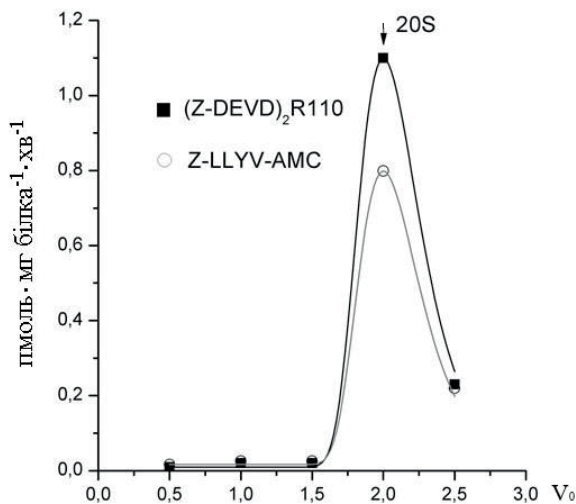


Рис. 4. AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS- і емрікасанчутлива активність нейтральних протеаз в елюаті при гель-фільтрації культуральних середовищ. За віссю X – об’єм елюату у вільних смностях колонки (V<sub>0</sub>). Стрілкою вказано положення стандарту – зразка 20S-протеасом (“Enzo Inc.”, США)

про молекулярні розміри апоптозом. Але останнє спостереження правильне тільки після застосування ФНП $\alpha$ -коктейлю під час культивування. У середовищі з культури МСК каспазної активності не було виявлено.

## ОБГОВОРЕННЯ

Ми спробували з’ясувати, чи може відбуватися апоптоз у стовбурових клітинах з кісткового мозку, чи мають екзосоми, генеровані цими клітинами, активні каспази та порівняти два типи дорослих стовбурових клітин у контексті клітинної програмованої смерті. З терапевтичної точки зору це розуміння також має значення для практики: бо відомо, що екзосоми, які генеруються натуральними кілерами мають цитотоксичний ефект [24]. Припускають, що внутрішній шлях апоптозу не обов’язковий для гомеостазу ГСК під час розвитку [25, 26].

Вдалося з’ясувати, що ГСК виділяють у культуральне середовище екзосоми, які містять протеасоми. Що ця активність протеасомна, а не належить до інших протеаз, свідчать дані як з її пригнічення селективними ін-

гібіторами, так і з гель-фільтрації. З’ясувалося, що протеасомна активність є у фракції, білки в якій мають таку саму молекулярну масу, як і маса 20S-протеасом. Це не є несподіваним, оскільки протеасоми часто виявляють в цих позаклітинних везикулах [27–30]. Але очевидно, що екстравезикулярна протеасомна активність також існує і її кількість цілком можна порівняти з везикулярною. Це теж відомий феномен, який описаний для Т-лімфоцитів [2] і не суперечить відомим спостереженням про наявність вільних, позаклітинних, інтактних і активних протеасом у плазмі, рідині з легенів, черві кальній рідині тощо [29, 30].

Неможливість індукції утворення апоптосом у МСК і ГСК за участю цитохрому C у наших експериментах корелює з відомими даними, які наведено вище. Разом із тим і в культуральному середовищі і в екзосомах ми змогли виявити каспазоподібну активність щодо субстрату та її чутливість до селективного інгібітора. Активність повністю пригнічується несубстратним інгібітором – емрікасаном, і не чутлива до інгібіторів протеасом. Зауважимо, що ми застосовували інгібітори протеасом, які не є структурними аналогами їх субстратів, що значно збільшує точність отриманих результатів. Виявлена каспазна активність, імовірно, має дві локалізації – зовнішній бік плазматичної мембрани і внутрішньоклітинну. Це впливає з результатів про активність після пермеабілізації мембран сапоніном. Позаклітинна активність має молекулярну масу, подібну до маси 20S-протеасом і, ймовірно, представлена апоптосомами. Обробка культури клітин ФНП $\alpha$  призводить до утворення внутрішньоклітинних апоптосом, які виділяються із екзосом і залишаються циркулювати поза клітинами (наприклад, завдяки нейтральній сфінгомелідазній активності). Можна припустити, що ФНП $\alpha$ -коктейль індукує генерацію нейтрофілів, лейкоцитів у культурі ГСК або генерацію інших диференційованих клітин, які здатні до апоптозу, на відміну від ГСК або МСК [31–34].

Таким чином, виявлена каспазна активність, мабуть, має відношення до нейтрофілів, чия мембранна каспаза була раніше активована протеазою PR3 [14]. Оскільки в наших умовах ми використовували коктейль інгібіторів протеаз (в тому числі і серинових), можна припустити, що каспаза була активована при спонтанній генерації диференційованих лейкоцитів, а не під час виділення мембран.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**И.М. Прудников, В.Н. Цывкин, А.Н. Смирнов, И.В. Присташ**

### **ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕРИРУЮТ ЭКЗОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АКТИВНЫЕ ПРОТЕАСОМЫ, НО НЕ КАСПАЗЫ**

Были исследованы активности двух классов нейтральных протеаз: каспаз и протеасом, которые содержались в внеклеточных везикулах, генерируемых мезенхимальными и гемопоэтическими стволовыми клетками человека (МСК и ГСК соответственно). В этих клетках не образовывались апоптосомы, индуцированного цитохромом С и дезоксиаденозинтрифосфорной кислотой (дАТФ). Присутствие фактора некроза опухолей  $\alpha$  (ФНП $\alpha$ ) в культуральной среде ГСК вызывает появление внутриклеточной каспазной активности. В экзосомах после культивирования ГСК с ФНП $\alpha$ , была также обнаружена каспазная активность, которая полностью угнеталась несубстратным ингибитором каспаз, эмрикасаном, и не была чувствительна к ингибиторам протеасом. Предполагается, что активность каспаз из культуральной среды является суммой мембранной (внешняя сторона мембран экзосом), внутри- и внеклеточной активностей. Очевидно, она относится к апоптосомам, поскольку выявлялась гель-фильтрацией культуральной среды с ФНП $\alpha$ , свободной от везикул. Таким образом, ФНП $\alpha$  индуцирует в культуре ГСК появление нейтрофилов или генерацию других дифференцированных клеток, которые способны к апоптозу, в отличие от ГСК или МСК. Протеасомная активность заметно выросла в экзосомах из ГСК после добавления ФНП $\alpha$ . В отличие от экзосом из МСК, вся активность протеасом в экзосомах, продуцируемых ГСК, имела мембранную локализацию.

**I.M. Prudnikov, V.M. Tsyvkin, A.M. Smirnov, I.V. Pristash**

### **HUMAN HEMATOPOIETIC STEM CELLS GENERATE EXOSOMES CONTAINING ACTIVE PROTEASOMES BUT NOT CASPASES**

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: igor.prudnikov@biph.kiev.ua*

Activities of two classes of neutral proteases were studied: caspases and proteasomes, which are contained in extracellular vesicles generated by mesenchymal and hematopoietic human stem cells (MSCs and HSCs, respectively). The formation of apoptosomes induced by the cytochrome C and dATP did not occur in these cells. The presence of TNF $\alpha$  in the culture medium of HSCs causes the appearance of caspase-3 intracellular activity. Herewith caspase activity was detected in exosomes also. This activity was completely inhibited by a non-substrate caspase inhibitor, emricasane, and it was not sensitive to proteasome inhibitors. It is assumed that the caspases' activity from the cultural medium is the sum of membrane (outer side of exosome membrane), intracellular and extracellular activities. Apparently, this activity refers to apoptosomes as it was revealed by gel filtration of cultural medium with TNF $\alpha$  free from exosomes. Thus, TNF $\alpha$  induces the appearance of neutrophils in the culture of HSCs or the generation of other differentiated cells that are capable of apoptosis, in contrast to HSCs or MSCs. Proteasomal activity increased noticeably in exosomes from HSCs after the addition of TNF $\alpha$ . In contrast to exosomes from MSCs, all activity of proteasomes in HSCs-produced exosomes had a membrane localization.

Key words: apoptosis; proteasomes; human stem cells; exosomes.

### **REFERENCES**

1. Prudnikov IM, Tsyvkin VM, Smirnov, et al. Current comprehension of vesicular intercellular signaling. *Fiziol Zh.* 2019; 65(6):105-25. [Ukrainian].
2. Bochmann I, Ebstein F, Lehmann A, et al. T lymphocytes export proteasomes by way of microparticles: a possible mechanism for generation of extracellular proteasomes. *J Cell Mol Med.* 2014; 18(1):59-68.
3. Prudnikov IM, Tsyvkin VM, Smirnov, et al. Extracellular proteasomes. *Fiziol Zh.* 2020; 66(4): in press. [Ukrainian].
4. Ravichandran R, Bansal S, Rahman M, et al. The role of donor-derived exosomes in lung allograft rejection. *Hum Immunol.* 2019; 80(8):588-94.
5. Kitajima Y, Suzuki N, Nunomiya A, et al. the ubiquitin-proteasome system is indispensable for the maintenance of muscle stem Cells. *Stem Cell Report.* 2018;11(6):1523-38.
6. Shan H, Li X, Xiao X, et al. USP7 deubiquitinates and stabilizes NOTCH1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Signal Transduct Target Ther.* 2018;3:29.
7. Suresh B, Lee J, Kim H, Ramakrishna S. Regulation of pluripotency and differentiation by deubiquitinating en-

- zymes. *Cell Death Differ.* 2016; 23(8):1257-64.
8. Hao Q, Chen Y, Zhou X. The janus face of p53-targeting ubiquitin ligases. *Cells.* 2020; 9(7):1656.
  9. Crawford ED, Wells JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:1055-87.
  10. Tanzen V, Fleming HE, Riedt T, et al. Hematopoietic stem cell responsiveness to exogenous signals is limited by caspase-3. *Cell Stem Cell.* 2008;2(6):584-94.
  11. Wang LS, Liu HJ, Xia ZB, et al. Expression and activation of caspase-3/ CPP32 in CD34<sup>+</sup> cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal. *Exp Hematol.* 2000; 28(8):907-15.
  12. Nonomura K, Yamaguchi Y, Hamachi M, et al. Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells. *Dev Cell.* 2013; 27(6):621-34.
  13. Ning X, Wang Y, Jing M, et al. Apoptotic caspases suppress type I interferon production via the cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol Cell.* 2019;74(1):19-31.e7.
  14. Loison F, Xu Y, Luo HR. Proteinase 3 and Serpin B1: a novel pathway in the regulation of caspase-3 activation, neutrophil spontaneous apoptosis, and inflammation. *Inflamm Cell Signal.* 2014; 1(6):e462.
  15. Burgener SS, Leborgne NGF, Snipas SJ, et al. Cathepsin G inhibition by serpinb1 and serpinb6 prevents programmed necrosis in neutrophils and monocytes and reduces GSDMD-driven inflammation. *Cell Rep.* 2019; 27(12):3646-3656.e5.
  16. Cao M, Chen F, Xie N, et al. c-Jun N-terminal kinases differentially regulate TNF- and TLRs-mediated necroptosis through their kinase-dependent and -independent activities. *Cell Death Dis.* 2018; 9(12):1140.
  17. Xiao Y, Li H, Zhang J, et al. TNF- $\alpha$ /Fas-RIP-1-induced cell death signaling separates murine hematopoietic stem cells/progenitors into 2 distinct populations. *Blood.* 2011;118(23):6057-67.
  18. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity.* 2013; 39(3):443-53.
  19. Samson AL, Zhang Y, Geoghegan ND, et al. MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nat Commun.* 2020;11(1):3151.
  20. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010; 11(12):1136-42.
  21. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signaling. *Nature.* 2015;526(7575):666-71.
  22. Kedong S, Xiubo F, Tianqing L, et al. Simultaneous expansion and harvest of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(12):3183-93.
  23. Prudnikov IM, Smirnov AN. Short peptide tools for monitoring caspase and proteasome activities in embryonal and adult rat brain lysates: an approach for the differential identification of proteases. *J Biochem.* 2012;151(3):299-316.
  24. Batsali AK, Georgopoulou A, Mavroudi I, et al. The role of bone marrow mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles (MSC-EVs) in normal and abnormal hematopoiesis and their therapeutic potential. *J Clin Med.* 2020;(3):856.
  25. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.
  26. White MJ, McArthur K, Metcalf D, et al. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell.* 2014;159(7):1549-62.
  27. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: Implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int J Proteomics.* 2012;2012:971907.
  28. Zoeger A, Blau M, Egerer K, et al. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem.* 2006;52:2079-86.
  29. Tsimokha AS, Zaykova JJ, Bottrill A, Barlev NA. Extracellular proteasomes are deficient in 19S subunits as revealed by iTRAQ quantitative proteomics. *J Cell Physiol.* 2017;232:842-51.
  30. Ramachandran KV, Fu JM, Schaffer TB, et al. Activity-dependent degradation of the nascentome by the neuronal membrane proteasome. *Mol Cell.* 2018; 71:169-77.
  31. Dong T, Liao D, Liu X, Lei X. Using small molecules to dissect non-apoptotic programmed cell death: Necroptosis, ferroptosis, and pyroptosis. *ChemBiochem.* 2015; 16(18):2557-61.
  32. Luo HR, Am FL. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *J Hematol.* 2008; 83(4):288-95.
  33. Scheel-Toellner D, Wang K-Q, Webb PR, et al. Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(Pt3):461-4.
  34. Tang R, Xu J, Zhang B, et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity. *J Hematol Oncol.* 2020; 13:110.

*Матеріал надійшов  
до редакції 03.08.2020*