

УДК 57.05

## СТОХАСТИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА p53 В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Р.А. Ковалёв, Н.Д. Федорова, Р.А. Пантина, Е.В. Семенова, М.В. Филатов, Е.Ю. Варфоломеева

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 188300, Гатчина, Ленинградская обл., мкр. Орлова роща, 1

E-mail: varfolomeeva\_ey@npi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 24.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

Стохастическая экспрессия генов может иметь важные последствия для судьбы как каждой конкретной клетки, так и клеточной популяции в целом. В данной работе мы демонстрируем значительную вариабельность экспрессии p53, вплоть до полного ее отсутствия, в клетках первичных глиобластом человека, чего не наблюдается в клетках нормальных фибробластов ФЛЭЧ и перевиваемых опухолевых линий, таких как HeLa и HT1080. При этом вариабельность экспрессии p53 в клетках зависит от густоты посева. Показываем, что при подавлении транскрипции актиномицином Д или нокдауне гена p53 РНК-интерференцией восстановление его уровня экспрессии в клетках проходит стохастически.

*Ключевые слова:* стохастическая клеточная гетерогенность, экспрессионный шум, p53, первичные глиобластомы.

DOI: 10.31857/S0006302922030127, EDN: AODLQO

Экспрессия генов – это стохастический процесс, в результате которого в популяции генетически идентичных клеток могут возникнуть значительные межклеточные расхождения в уровнях мРНК и белков. Неоднородность экспрессии может иметь важные последствия для судьбы как каждой конкретной клетки, так и клеточной популяции в целом [1–4]. Клетки разнообразных организмов от микробов до высших постоянно подвергаются воздействию эндогенных и экзогенных стрессов, приводящих к генетическим повреждениям, эпигенетическим отклонениям и ошибкам регуляторных систем, что, в конечном итоге, и обуславливает стохастический характер экспрессии генов [2, 5]. Экспрессионный шум способствует формированию различных фенотипов и улучшает способность приспосабливаться к изменяющимся условиям на уровне популяции, являясь, по-видимому, важной составляющей эволюционного прогресса. Однако в некоторых случаях стохастические флуктуации экспрессии могут вызывать индукцию онкогенов или нарушение регуляции генов-супрессоров опухолей, облегчая адаптивные программы злокачественной трансформации в условиях стресса [6]. Ключевую

роль в определении судьбы клетки при повреждениях играет белок p53 [7]. Отсутствие белка p53 в клетках затрудняет своевременный ответ на клеточные стрессы, способствуя онкогенезу. Очевидно, что анализ стохастических процессов при экспрессии гена p53 в опухолевых клетках представляет не только научный, но и большой практический интерес, поскольку экспрессионный профиль может контролироваться различными стратегиями регуляции генов, приводящим к режимам с низким уровнем шума [8].

Наиболее подходящей методологией исследования стохастической экспрессии генов является мониторинг продукции, деградации и функционального состояния биомолекул в реальном времени в живых клетках [9]. В подавляющем большинстве работ уровень экспрессии p53 оценивают, используя вестерн-блот либо полимеразную цепную реакцию, однако эти методы дают лишь усредненное значение уровня экспрессии, не отражая поклеточного распределения. Конфокальная микроскопия и цитометрия же позволяют выявить неоднородность экспрессионных профилей внутри популяции.

В этой работе мы изучали экспрессию гена p53 в клетках различных линий человека, как в перевиваемых, так и в первичных. Продемонстриро-

*Сокращение:* GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein).

вана стохастическая изменчивость экспрессии гена *p53* в популяции при внесении возмущений в функционирование клеток. Используя покадровую микроскопию и проточную цитометрию, мы исследовали кинетику такой изменчивости экспрессии генов в клетках. Также нами показана значительная вариабельность экспрессии *p53* в первичных клетках глиобластомы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточные линии и условия культивирования.

Работа проведена на первичных и перевиваемых культурах клеток человека: ФЛЭЧ (фибробласты легкого эмбриона человека), HT-1080 (фибросаркома) и HeLa (аденокарцинома шейки матки) — стандартные перевиваемые клеточные линии с диким типом белка *p53* (Коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург), и G1-La, G1-Tr — первичные культуры глиомных клеток, полученные в нашей лаборатории, а также на клеточной линии GFP-p53ΔY126-HEK293, полученной нами путем введения плазмиды p53ΔY126-GFP в клетки линии HEK293 с последующим клонированием [10].

Клетки культивировали в полной среде (DMEM/F12 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Biowest, Франция)), без антибиотиков, в 5%-й CO<sub>2</sub>-атмосфере при 37°C.

Для получения клонов (потомков одной клетки) клетки линии GFP-p53ΔY126-HEK293 рассевали в 96-луночные планшеты. Один из наиболее ярких по уровню флуоресценции меченого зеленого флуоресцентного белком (GFP — Green Fluorescent Protein) клон (далее в тексте GFP-клон) с высоким уровнем экспрессии белка GFP-p53ΔY126 был использован в дальнейшей работе. Ранее было показано, что в клетках GFP-клона детектируются как белок GFP-p53ΔY126, так и белок *p53* дикого типа [11]. В дальнейшем пересев клеток осуществляли по мере образования клетками монослоя. Клетки обрабатывали раствором Версен/трипсин 1:1 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) в течение 10 мин, переносили в центрифужную пробирку, осаждали 5 мин при 1000 об/мин, ресуспендировали в питательной среде и 1/20 часть суспензии клеток переносили в свежий флакон. Анализ полученных клеточных линий (клонов) и отбор линий с высоким содержанием GFP проводили на цитометре Cell LabQuanta (Beckman Coulter, США). Для прижизненного наблюдения клетки сеяли в чашки диаметром 35 мм с оптическим дном (MatTek Corp., США) и визуализировали на конфокальном микроскопе Leica SP5 (Leica, Германия).

**Проточная цитометрия и сортировка клеток.** Регистрацию количества клеток, несущих флуорес-

центный белок GFP, проводили с помощью проточного цитофлуориметра Cell Lab Quanta SC фирмы Beckman Coulter (США). Сортировка клеток по уровню флуоресценции GFP-белка осуществлялась с помощью сортера фирмы Beckman Coulter (США).

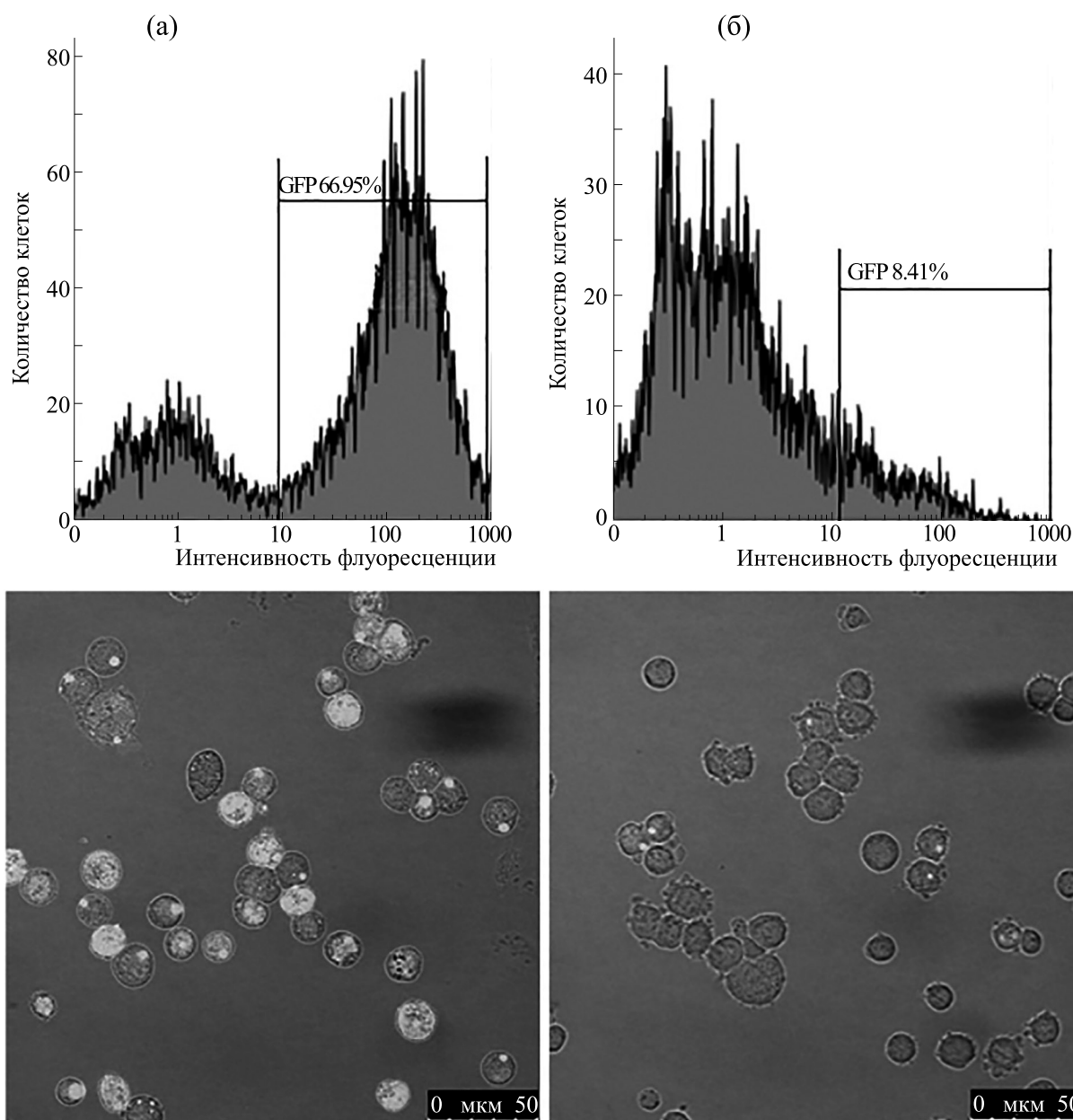
**Анализ экспрессии генов в режиме реального времени в живых клетках по технологии SmartFlare.** Для прижизненного наблюдения за уровнем и динамикой включения экспрессии генов в клетках (оценка концентрации РНК) использовали набор SmartFlare™ (Merck Millipore, Германия). Согласно инструкции производителя зонды SmartFlare™ добавляли к исследуемому образцу, спустя 4 ч инкубации с использованием конфокального микроскопа (Leica, Германия) регистрировали флуоресценцию в клетках.

**Процедура подавления транскрипции РНК с помощью актиномицина Д.** Исследуемый образец клеток инкубировали в полной среде с добавлением актиномицина Д в концентрации 0.1 мкг/мл в течение 14 ч. Далее добавляли зонды SmartFlare™ на 4 ч и затем регистрировали флуоресценцию на конфокальном микроскопе. После этого заменяли полную среду с актиномицином Д на полную среду без него, снова добавляли зонды SmartFlare™ и наблюдали за динамикой флуоресценции образца в течение суток (для регистрации флуоресценции использовался конфокальный микроскоп).

**Система РНК-интерференции для подавления экспрессии гена TP53.** Подавление экспрессии гена *p53* проводили с помощью трансфекции коротких интерферирующих молекул РНК (антиP53-siРНК) через 24 ч после посева клеток в чашки с оптическим дном. Трансфекцию антиP53-siРНК (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon, США) в концентрации 100 нМ в 1× трансфекционном буфере (Dharmacon, США) проводили с использованием липофектамина (Dharmacon-FECT) по методике производителя (<http://www.dharmacon.com>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Стохастическая экспрессия белка GFP-p53ΔY126 в клетках линии GFP-p53ΔY126-HEK293.** Плаزمида p53ΔY126-GFP кодирует мутантный белок *p53* с делецией тирозина в 126-м положении пептидной цепи белка, несущий на N-конце зеленый флуоресцентный белок (GFP). Мутантная форма белка *p53* обладает некоторыми функциями белка *p53* дикого типа. В частности, белок *p53*ΔY126 может работать как транскрипционный фактор, активируя индукцию белка *p21*, и вызывать клеточную гибель, однако по сравнению с диким типом белка *p53* его актив-



**Рис. 1.** Экспрессия белка GFP-p53ΔY126 в клетках различных клонов HEK293.

ность снижена [11]. Исследование клона линии HEK293, экспрессирующего белок GFP-p53ΔY126, показало существенное различие экспрессии данного белка в различных клетках клона от высокой до полностью отсутствующей. Чтобы исключить зависимость наблюдаемой нами разницы в концентрации GFP-p53ΔY126 как от потери встроенной плазмиды во время роста клеточной культуры, так и разницы в считывании из-за места ее встраивания, мы повторно расклонировали линию GFP-p53ΔY126-HEK293. Все полученные нами новые клоны также продемонстрировали разнообразие концентрации белка GFP-

p53ΔY126 GFP от клетки к клетке в каждом клоне (рис. 1а,б).

Чтобы показать, что в конкретной клетке концентрация исследуемого белка GFP-p53ΔY126 может меняться с течением времени, мы с помощью конфокального микроскопа в течение 72 ч вели наблюдение за живыми клетками линии GFP-p53ΔY126-HEK293. Мы обнаружили, что концентрация GFP-p53ΔY126 меняется стохастически в каждой отдельно взятой клетке от полного отсутствия наблюдаемого белка к его высокой концентрации через несколько часов, и наоборот (рис. 2).

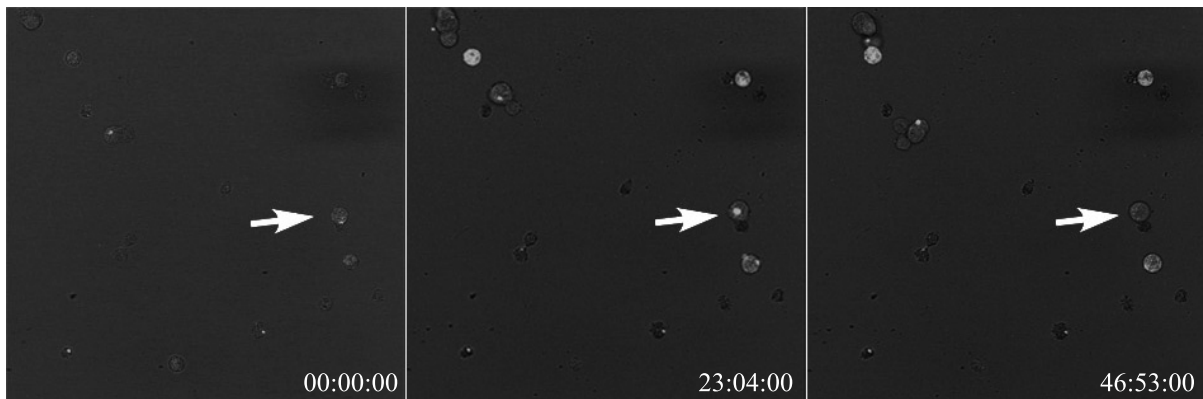


Рис. 2. Изменение концентрации белка GFP-p53ΔY126 в клетках с течением времени.

Чтобы оценить кинетику экспрессии белка GFP-p53ΔY126 в отдельных клетках исследуемой нами линии GFP-p53ΔY126-HEK293, мы отобрали на сортере клетки с низким («темные») и высоким («яркие») уровнем экспрессии GFP-p53ΔY126. Отсортированные темные клетки (рис. 3б) были помещены в питательную среду при температуре 37°C. Нами было отмечено, что после 17 ч культивирования появляются яркие клетки, содержащие белок GFP-p53ΔY126 (рис. 3в). С течением времени количество флуоресцентно окрашенных клеток увеличивалось, и спустя 72 ч соотношение «темных» и «ярких» клеток приблизилось к распределению в исходной популяции (рис. 3а,г). При дальнейшем культивировании клеточной культуры в течение 30 суток картина распределения «темных» и «ярких» клеток существенно не менялась. Однако вариabельность экспрессии белка GFP-p53ΔY126 могла быть обусловлена как местом встраивания плазмиды в генетический материал клетки, так и наличием мутации в гене p53ΔY126.

**Вариabельность мРНК, кодирующей p53 в клетках первичных и перевиваемых клеточных линий.** Для проверки гипотезы о стохастичности экспрессии белка p53 мы проанализировали изменение концентрации кодирующей его мРНК в различных клеточных линиях. Нами была использована методика прижизненной оценки концентрации РНК с помощью зонда Smart Flare на пяти клеточных линиях. Наблюдение за концентрацией мРНК гена p53 показало наличие некоторых особенностей экспрессии данного гена в зависимости от условий роста и типа используемых культур клеток.

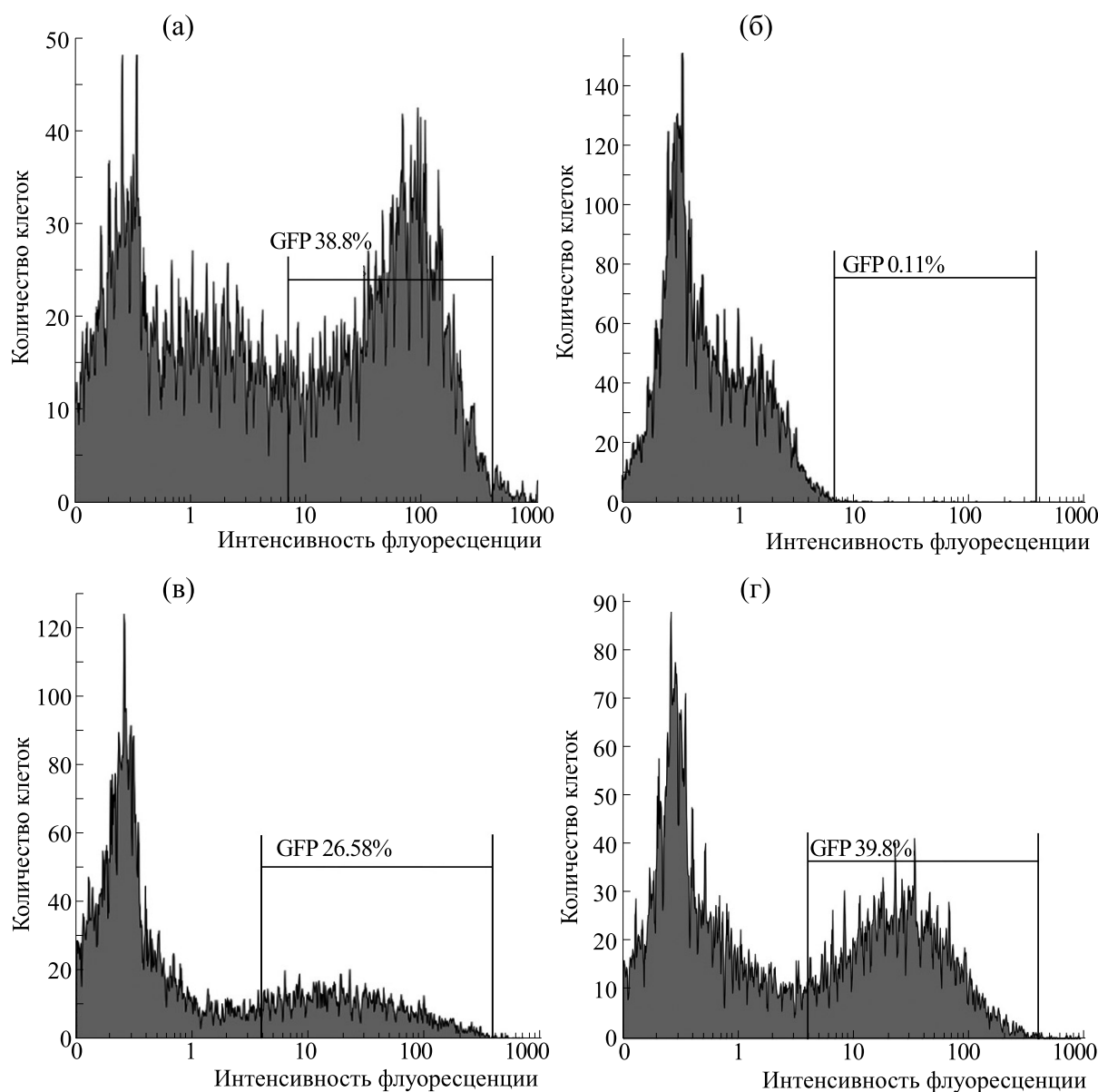
Так, для перевиваемых линий (HeLa, HT1080, ФЛЭЧ) и первичных культур клеток (G1-La и G1-Tr) наблюдается разница в характере экспрессии гена p53.

Если на перевиваемых линиях мы не отметили значимых различий в концентрации РНК, коди-

рующей p53 между клетками каждой из этих культур, то первичные культуры клеток глиомы человека демонстрируют заметную вариabельность по количеству кодирующей p53 РНК, от полного отсутствия до ее значительной концентрации в каждой конкретной клетке (рис. 4).

Также была обнаружена зависимость количества мРНК p53 в первичных культурах клеток глиом человека от густоты посева. На редких посевах можно увидеть как клетки, содержащие РНК, так и клетки с полным ее отсутствием, а на густых посевах мы не наблюдаем значительной разницы в количестве РНК (рис. 5).

**Изучение динамики восстановления уровня транскрипции мРНК p53 после ее подавления различными агентами.** Нами было установлено, что в клетках перевиваемых линий профиль мРНК p53 не отличался от клетки к клетке при стандартных условиях культивирования (рисунок 4а–в). Наблюдаемое единообразие может быть обусловлено относительной стабильностью клеточных процессов, сформировавшейся в результате длительного культивирования линий. Возможно, именно это кардинально отличает степень экспрессионной гетерогенности в перевиваемых линиях от таковой в первичных опухолевых линиях. Для проверки этого предположения мы решили нарушить нормальное функционирование клеток перевиваемых линий, влияя на различные внутриклеточные механизмы. Мы использовали как агент, подавляющий общую транскрипцию в клетке (актиномицин Д), так и прямое специфичное выключение гена с помощью РНК-интерференции. Далее с помощью конфокальной микроскопии визуализировали динамику восстановления профиля экспрессии (рис. 6). В обоих случаях мы наблюдаем стохастичное восстановление экспрессии исследуемого гена.

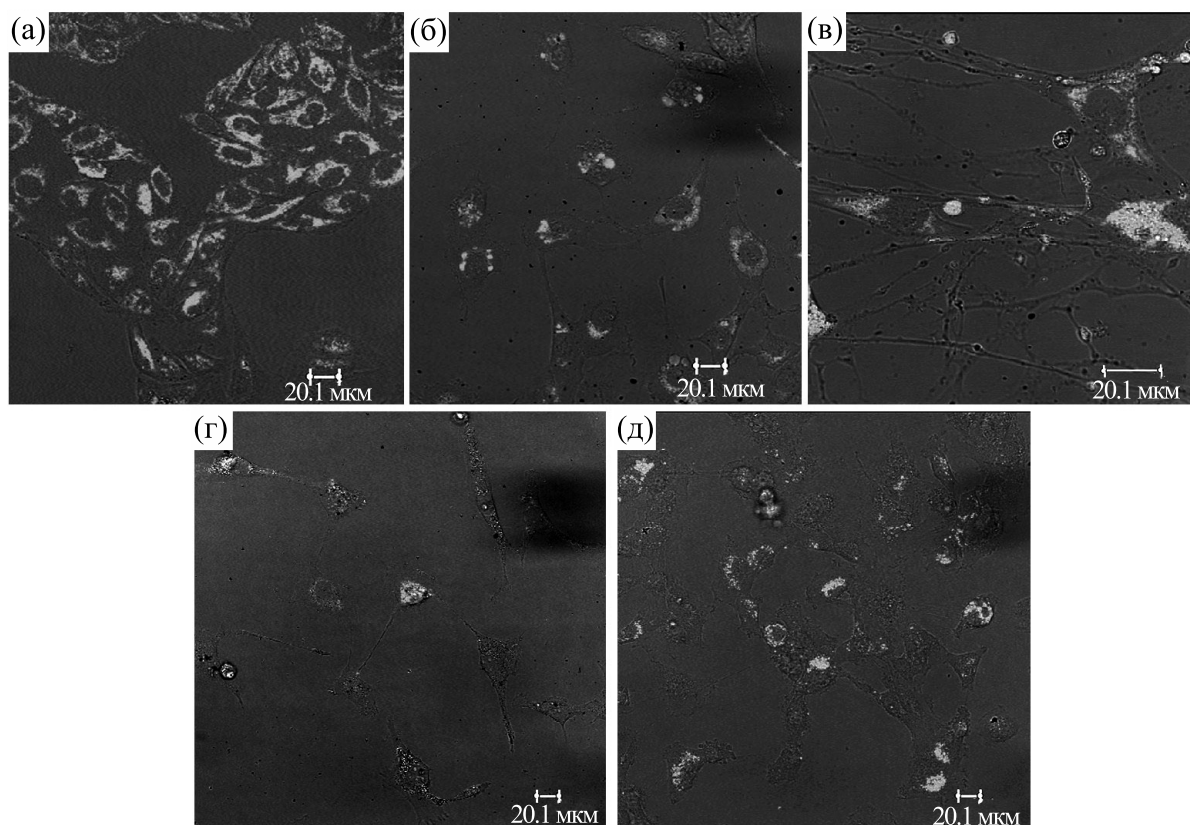


**Рис. 3.** Изменение уровня экспрессии GFP-p53ΔY126 в отобранной на сортере популяции клеток, изначально его не экспрессирующих. (а) – исходная популяция клеток с различным уровнем экспрессии GFP-p53ΔY126; (б) – отобранная на сортере популяция клеток с нулевым уровнем экспрессии GFP-p53ΔY126; (в) – уровень экспрессии GFP-p53ΔY126 спустя 17 часов после культивирования отобранных на сортере “темных” клеток; (г) – уровень экспрессии GFP-p53ΔY126 спустя 72 часа и более после культивирования отобранных на сортере “темных” клеток.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки одного организма могут отличаться количеством РНК, образующейся в результате работы одного и того же гена, а также количеством конкретных белков. Экспрессионный «шум» (случайные флуктуации экспрессии генов) возникает по разным причинам, как внешним, так и внутренним (различное количество доступных клеткам питательных веществ, разная скорость перемещения белков между рецепторами в разных клетках, ограниченное число молекул, ре-

гулирующих экспрессию генов) [5, 12, 13]. В результате транскрипция может носить характер чередующихся всплесков и затуханий различной продолжительности, что приводит к неизбежной стохастичности синтеза как мРНК, так и белка. Негенетическая гетерогенность, возникающая в результате множественных стохастических процессов, может играть значимую роль в развитии таких важных процессов, как гибель клетки, злокачественная трансформация, метастазирование и др. [14, 15].

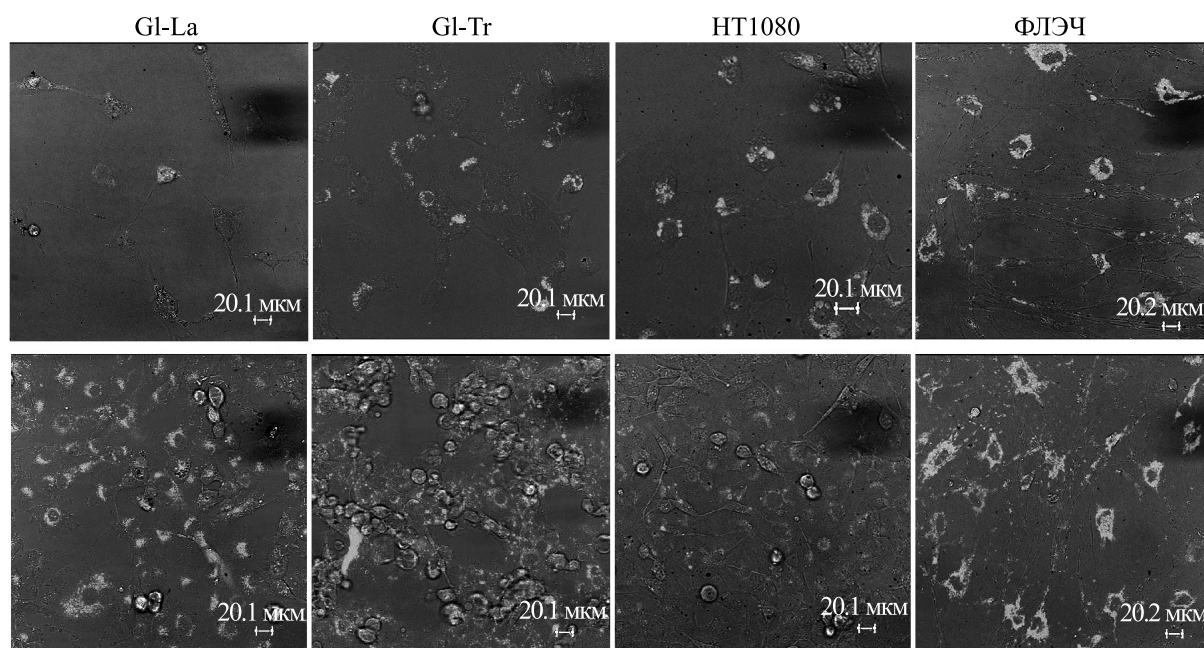


**Рис. 4.** Вариабельность экспрессии p53 для перевиваемых культур (HeLa – а, HT1080 – б, ФЛЭЧ – в), первичных культур (G1-La - г, G1-Tr - д).

В предотвращении онкогенеза огромную роль играет белок p53 [16]. В ответ на активацию онкогенов, повреждения ДНК и другие типы стресса он активирует множество сигнальных путей, таких как остановка клеточного цикла, старение, апоптоз и др. [17]. Обычно p53 инактивируется или через мутацию в самом гене, или посредством приобретения клеткой других генетических или эпигенетических изменений, которые блокируют функционирование p53 [18–21]. У гомозиготных мышей с нокаутом p53 уже через 10 недель с высокой частотой развиваются опухоли, включая лимфомы и саркомы [22]. Считается, что для выполнения функции опухолевого супрессора необходима постоянная экспрессия данного белка, которая жестко регулируется, и в нормальных клетках при физиологических условиях поддерживается на низком уровне его отрицательными регуляторами, главным образом MDM2 и MDM4 [23, 24]. Мутации в гене *p53* или его отсутствие являются признаком наследственной предрасположенности к раку и часто считаются плохим прогнозом для пациентов [25, 26]. Выключение (инактивация) гена *p53* в клетках в результате стохастичности экспрессии также может способ-

ствовать онкогенезу, метастазированию и снижать чувствительность к терапии опухолей.

Мы не отметили значимых различий в концентрации РНК, кодирующей p53 между клетками нормальных фибробластов человека ФЛЭЧ, как не было достоверных вариаций в экспрессии данного гена и в клетках перевиваемых опухолевых линий, таких как HeLa и HT1080 (рис. 4а–в). Однако мы обнаружили значительную вариабельность экспрессии p53, вплоть до полного ее отсутствия, в клетках первичных глиобластом G1-La и G1-Tr (рис. 4г,д). Также мы показали, что при введении в клетки HEK293 плазмиды содержащей последовательность *GFP-p53ΔY126*, мутантный белок p53ΔY126 экспрессируется стохастически. Концентрация белка GFP-p53ΔY126 меняется с течением времени от полного отсутствия наблюдаемого белка в клетке к высокой его концентрации через несколько часов и наоборот (рис. 3). Можно предположить, что экспрессия генов, как в нормальных клетках, так и клетках перевиваемых опухолевых линий, сбалансирована в большей степени по сравнению с клетками первичных опухолей и клетками с введенной генетической конструкцией.



**Рис. 5.** Вариабельность экспрессии РНК, кодирующей  $p53$  в клетках первичных линий (глиом G1-La и G1-Tr), и перевиваемых HT1080 и ФЛЭЧ при разной густоте посева: верхний ряд – редкий посев, нижний ряд – густой посев.

Мы обнаружили, что вариабельность экспрессии  $p53$  в клетках и G1-La и G1-Tr зависит от густоты посева клеток (рис. 5). Так, при редком посеве наблюдаются значительные отличия в уровнях экспрессии между клетками, но при дальнейшем уплотнении популяции эти различия сглаживаются, и в монослое клетки выглядят относительно однородно по уровню РНК  $p53$ . Эти результаты согласуются с немногочисленными литературными данными на эту тему. Межклеточные взаимодействия стабилизируют и поддерживают относительную однородность экспрессионных паттернов близлежащих клеток во время развития и дифференцировки [15, 27]. В тканях гипофиза взрослого человека клеточные контакты обеспечивают локальную координацию экспрессии гена пролактина [28]. Нарушение межклеточных взаимодействий и потеря контактного торможения ответственны за повышенный шум экспрессии, который может быть причиной возникновения и прогрессии опухоли [6, 15].

Профиль экспрессии гена  $p53$  не отличался между клетками перевиваемых линий. Однако при нарушении нормального функционирования клеток, а именно подавлении транскрипции актиномицином Д или с использованием РНК-интерференции с дальнейшей заменой среды на полную, мы отметили стохастическое восстановление уровня экспрессии гена  $p53$  в клетках (рис. 6). Вероятно, после остановки транскрипции и снижения уровня РНК клеткам требуется

время для ее наработки и стабилизации клеточных процессов, причем в разных клетках одной популяции накопление РНК проходит стохастически. Предполагается, что в регуляции стохастической экспрессии генов участвует микроРНК [29, 30], и мы видим, что после обработки короткой интерферирующей РНК с последующей отмывкой, клеткам также требуется значительное время, чтобы ситуация стабилизировалась и прекратились экспрессионные колебания.

Таким образом, можно заключить, что характер экспрессии гена  $p53$  в клетках перевиваемых клеточных линий существенно не различается между клетками одной популяции. Однако при внесении возмущения и нарушении нормального функционирования клеток наблюдается экспрессионная вариабельность.

Раковые клетки характеризуются дестабилизированным паттерном экспрессии генов [6, 31]. Кроме того, экспрессия некоторых генов радикально отличается на разных стадиях прогрессии опухоли, что также может вносить важный вклад в увеличение негенетической гетерогенности популяции опухолевых клеток [32]. Степень гетерогенности первичных глиобластом, у которых наблюдаются субпопуляции с различными транскрипционными профилями [33], существенно влияет на результаты лечения. Мы показали, что первичные клетки глиобластом могут демонстрировать значительное различие уровня экспрессии гена  $p53$  (рис. 4г,д). Представленные нами результаты позволяют предположить, что стоха-

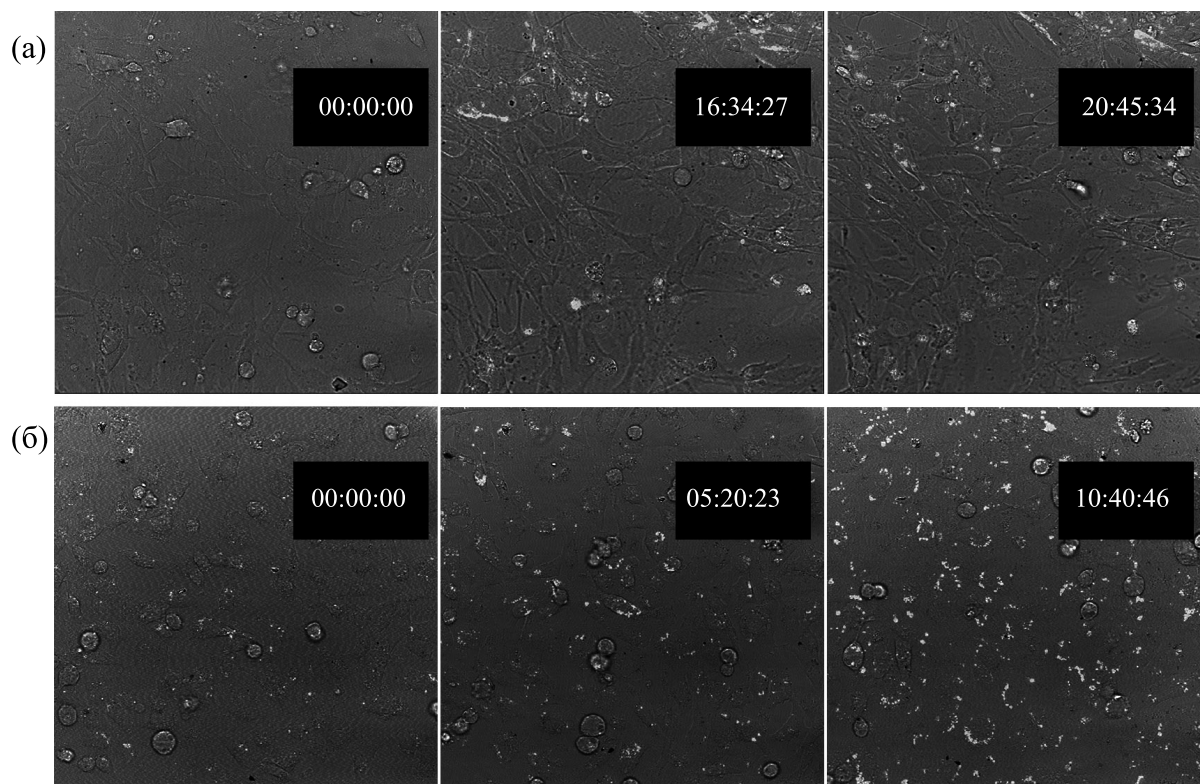


Рис. 6. Восстановление транскрипции РНК после прекращения воздействия актиномицином D (а) и siRNA (б).

стичность экспрессии p53 в первичных опухолевых клетках может обуславливать их общую нестабильность и влиять на опухолевую трансформацию и метастазирование, а также, возможно, чувствительность к гамма- и химиотерапии, поскольку известно, что экспрессионный шум в опухолевых клетках усиливается при низких дозах ионизирующей радиации [34] и способствует лекарственной устойчивости [35].

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный № 121060200125-2).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Mitosch, G. Rieckh, and T. Bollenbach, *Cell Syst.* **4** (4), 393 (2017).
2. A. Raj and A. van Oudenaarden, *Cell* **135** (2), 216 (2008).
3. K. H. Kim and H. M. Sauro, *PLoS Comput. Biol.* **8** (1), e1002344 (2012).
4. М. В. Головкин, Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *Биофизика* **54**, 581 (2009).
5. P. Dong and Z. Liu, *Open Biol.* **7** (5), 170030 (2017).
6. J. P. Capp, *Int. J. Cancer* **140** (11), 2408 (2017).
7. A. J. Levine and M. Oren, *Nat. Rev. Cancer* **9**, 749 (2009).
8. A. F. Ramos, J. E. Hornos, and J. Reintz, *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **91** (2), 020701 (2015).
9. N. T. Ingolia and A. W. Murray, *Curr. Biol.* **17** (8), 668 (2007).
10. V. S. Burdakov, R. A. Kovalev, R. A. Pantina, et al., *Cell Tissue Biol.* **12** (1), 20 (2018).
11. E. M. Makarov, T. A. Shtam, R. A. Kovalev, et al., *PLoS One* **12**, e0185126 (2017).
12. H. Xu, L. A. Sepulveda, L. Figard, et al., *Nat. Methods* **12**, 739 (2015).
13. C. J. Zopf, K. Quinn, J. Zeidman, and N. Maheshri, *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003161 (2013).
14. P. W. S. Hill, R. Amouroux, and P. Hajkova, *Genomics* **104**, 324 (2014).
15. L. Ho and G. R. Crabtree, *Nature* **463**, 474 (2010).
16. K. H. Vousden and C. Prives, *Cell* **137**, 413 (2009).



17. Y. Liang, J. Liu, and Z. Feng, *Cell Biosci.* **3**, 9 (2013).
18. P. Hainaut, T. Hernandez, A. Robinson, et al., *Nucl. Acids Res.* **26**, 205 (1998).
19. R. Saldana-Meyer and F. Recillas-Targa, *Epigenetics* **6**, 1068 (2011).
20. C. Kandoth, M. D. McLellan, F. Vandin, et al., *Nature* **502** (7471), 333 (2013).
21. C. J. Brown, S. Lain, C. S. Verma, et al., *Nat. Rev. Cancer* **9**, 862 (2009).
22. L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle, et al., *Nature* **356**, 215 (1992).
23. P. Hainaut, *Curr. Opin. Oncol.* **7**, 76 (1995).
24. A. Leonardo, S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl, *Genes Dev.* **8**, 2540 (1994).
25. M. Olivier, M. Hollstein, and P. Hainaut, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (1), a001008 (2010).
26. D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong, et al. *Science* **250**, 1233 (1990).
27. C. V. Harper, K. Featherstone, S. Semprini, et al., *J. Cell Sci.* **123**, 424 (2010).
28. K. Featherstone, K. Hey, H. Momiji, et al., *Elife* **5**, e08494 (2016).
29. M. Del Giudice, S. Bo, S. Grigolon, and C. Bosia, *PLoS Comput. Biol.* **14** (4), e1006063 (2018).
30. L. Laurenti, A. Csikasz-Nagy, M. Kwiatkowska, and L. Cardelli, *Biophys. J.* **114** (12), 3000 (2018).
31. A. Brock, H. Chang, and S. Huang, *Nat. Rev. Genet.* **10**, 336 (2009).
32. G. Martello and A. Smith, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **30** (1), 647 (2014).
33. A. P. Patel, I. Tirosh, J. J. Trombetta, et al., *Science* **344**, 1396 (2014).
34. L. Bodgi, A. Canet, A. Granzotto, et al., *Cancer Radiother.* **20** (4), 314 (2016).
35. K. S. Farquhar, D. A. Charlebois, M. Szenk, et al., *Nature Commun.* **10** (1), 2766 (2019).

## Stochasticity in p53 Protein Expression in Human Primary Cells and Overpassed Cell Lines

**R.A. Kovalev, N.D. Fedorova, R.A. Pantina, E.V. Semenova, M.V. Filatov, and E.Yu. Varfolomeeva**

*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Orlova Roscha 1, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia*

Stochastic gene expression can have an important impact on fate of any single cell as well as on the whole cell population. In this work, we demonstrate significant variability in p53 expression, up to its complete absence, in primary glioblastoma cells from human tumor specimens, that does not happen in cells of normal human fibroblasts and tumour cell lines, such as HeLa and HT1080. At the same time, variability in p53 expression in cells depends on the density of the cell layer. We show that when the transcription is suppressed with actinomycin D or p53 gene expression is knocked down by RNA interference, the level of p53 gene expression in cells is restored and this process proceeds stochastically.

*Keywords: stochastic cell heterogeneity, expression noise, p53, primary glioblastoma cells*