УДК 576.52/53/.54

ЗАВИСИМОСТЬ ПРИСУТСТВИЯ КЛАСТЕРИЗОВАННОГО ГАНГЛИОЗИДА GM1 В МЕМБРАНЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

© 2020 г. В. И. Чубинский-Надеждин^{1,} *, М. А. Шилина¹, А. В. Сударикова¹, О. Г. Люблинская¹, Ю. А. Негуляев¹, Е. А. Морачевская¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия *E-mail: vchubinskiy@gmail.com Поступила в редакцию 01.07.2020 г. После доработки 13.07.2020 г. Принята к публикации 15.07.2020 г.

Ганглиозиды, представляющие группу сиаловых гликосфинголипидов, являются типичными компонентами липидных рафтов клеточных мембран, играют важную роль в процессах рецепции и передачи сигнала и привлекают особое внимание как возможные регуляторы направленной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК). Ганглиозид GM1 рассматривается как маркер липидных микродоменов, а флуоресцентное мечение кластеров молекул GM1 является одним из основных методов оценки целостности или деструкции рафтов в различных типах клеток. В то же время крайне ограничены данные о присутствии и возможностях определения ганглиозида GM1 в плазматической мембране MCK. Задачей настоящей работы было выявление ганглиозида GM1 в мембране MCK эндометрия (эMCK) человека с использованием экспериментального подхода, основанного на взаимодействии с пентамером бета-субъединиц холерного токсина (СТВ). При флуоресцентном окрашивании клеток с использованием коньюгата FITC-CTB показана разнородность культуры эМСК по присутствию мембранных кластеров GM1. Эксперименты на синхронизированной культуре показали, что содержание кластеризованного GM1 в плазматической мембране эМСК зависит от фазы клеточного цикла, в которой находятся клетки: оно максимально, когда клетки остановлены на границе фаз G₀/G₁ и снижается при запуске пролиферации, достигая минимума в фазах G₂/M. Полученные данные свидетельствуют о функциональной связи GM1содержащих липидных рафтов с клеточным циклом эМСК, а также о вероятных изменениях механических свойств мембраны при подготовке клеток к делению.

Ключевые слова: плазматическая мембрана, ганглиозид GM1, липидные рафты, мезенхимные стволовые клетки, клеточный цикл

DOI: 10.31857/S0041377120100028

Ганглиозиды представляют собой группу мембранных липидов, обладающих уникальными структурно-функциональными особенностями. Их представители являются типичными компонентами внеклеточной стороны липидного бислоя мембраны, иногда их относят к так называемым минорным липидам клеток эукариот. Ганглиозиды особенно характерны для нервной ткани, откуда они были впервые выделены около 80 лет назад и тогда же получили свое оригинальное название (см. Ledeen, Wu, 2018). В мембранах нейронов их доля значительна и составляет около 10–12% от всех липидов (20–25% от липидов внешнего листка бислоя) (Tettamani, 2004). Структурно ганглиозиды являются гликосфинголипидами — амфифильными молекулами, которые имеют насыщенные жирнокислотные хвосты в гидрофобной зоне мембраны и углеводные модификации полярной головки липида, включающие ковалентно связанные остатки сиаловых кислот, экспонированные на внеклеточной поверхности.

Согласно классификации, предложенной Ларсом Свеннерхольмом (Ledeen, Wu, 2018), выделяют четыре основных семейства ганглиозидов по числу остатков сиаловых кислот — от одного до четырех: GM, GD, GT, GQ соответственно. Очевидно, что уникальные физико-химические свойства этого важнейшего класса клеточных липидов, называемых также сиаловыми сфинголипидами, сформировались в ходе комплементарной эволюции различных форм высших организмов и прокариот. Именно ганглиозиды, несущие разнообразные, но "узнаваемые" углеводные модификации на наружной стороне мембраны, являются теми молекулярными детерминантами, с которыми избирательно связываются

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки; эМСК – МСК эндометрия; СТВ – бета-субъединица холерного токсина.



Цитозоль

Рис. 1. Схема взаимодействия пентамера бета-субъединиц холерного токсина (СТВ, коньюгирован с флуоресцентным красителем FITC) с ганглиозидами GM1 в плазматической мембране. Для связывания FITC-CTB необходимо присутствие кластера, включающего не менее пяти со-локализованных молекул GM1 в мембране.

известные бактериальные и вирусные патогены, в том числе, возбудители как ранее известных, так и новых инфекций человека и животных. В связи с этим ганглиозиды часто именуют рецепторами: так, например, ганглиозид GM1 (II³Neu5AcGg₄Cer по номенклатуре IUPAC) достаточно давно известен как рецептор холерного токсина (Majoul et al., 2002; Ledeen, Wu, 2015). В литературе обсуждаются "особенности экспрессии" ганглиозидов в различных тканях и клеточных линиях (Freund et al., 2010; Moussavou et al., 2013; Ryu et al., 2017), в связи с чем приходится отметить ошибочное употребление термина, поскольку речь идет о липидах – молекулах небелковой природы в плазматической мембране нативных клеток.

В ранних работах анализировали связывание бактериальных токсинов Шига (Shiga из Shigella dysenteriae) и Холера (Cholera из Vibrio cholerae) с ганглиозидами – рецепторами на поверхности клеток различного происхождения (Holmgren et al., 1973, 1985; Majoul et al., 2002). Сообщалось о дифференциальной экспрессии GM1 и Gb3 в астроцитах и клеточных линиях Vero и PC12, сопряженной с пролиферацией и фазами клеточного цикла. Достаточно давно обнаружено, что внеклеточное приложение GM1 промотирует нейрональную дифференцировку клеток в культуре (Ledeen et al., 1998, Moussavou et al., 2013; Ryu et al., 2017). В последующих исследованиях показана роль различных семейств ганглиозидов в эмбриогенезе и развитии эмбриональных стволовых клеток (Kwak et al., 2011). На основании исследований паттерна экспрессии ганглиозидов в стволовых клетках сделаны выводы о корреляции их синтеза с нейрональной дифференцировкой (Kwak et al., 2006; Ledeen, Wu, 2018). Обоснованы выводы о роли ганглиозидов в нейрональной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток мыши (Ryu et al., 2017).

Получены многочисленные, но неоднозначные данные о связи ганглиозидов, в том числе GM1, с процессами дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (MCK) человека (Moussavou et al., 2013; Ledeen, Wu, 2015). В частности, сообщается, что вклад ганглиозидов в остеогенную дифференцировку зависит от происхождения MCK. В настоящее время остается открытым ряд вопросов, касающихся обсуждаемой авторами функциональной роли и степени участия ганглиозидов в процессе направленной дифференцировки MCK (Moussavou et al., 2013; Ryu et al., 2017).

Физико-химические особенности и геометрия молекул ганглиозидов предопределяют их исключительное значение для клеточной механики, в первую очередь, деформируемости мембран и локальных изменений кривизны бислоя (Cantu et al., 2011). Новый этап и новый импульс в изучении ганглиозидов и их роли в жизнедеятельности клетки связан с представлениями о липилных рафтах и латеральной гетерогенности клеточных мембран (Pike, 2009; Sezgin et al., 2017). Сфинголипиды, в том числе ганглиозиды, являются типичными компонентами рафтов - мембранных микродоменов, характеризующихся более плотной упаковкой липидных молекул, что обусловлено, в первую очерель, повышенным солержанием холестерина и насыщенных жирнокислотных остатков в составе сфинголипидов. Специфическое и разнообразное участие липидных рафтов в процессах передачи сигналов, рецепции и адгезии связано, в значительной степени, с присутствием в их составе рецепторных молекул ганглиозидов (Sonnino et al., 2006).

GM1 привлекает особое внимание как регулятор важнейших сигнальных и транспортных процессов в клетке; данные суммированы в замечательном обзоре Ledeen, Wu (2015). Кроме того, именно флуоресцентное мечение кластеризованных молекул GM1 на поверхности клетки представляет один из наиболее доступных и обоснованных экспериментальных подходов для оценки изменения функциональной организации клеточной мембраны и целостности рафтов (схема представлена на рис. 1). Ганглиозид GM1 рассматривается как маркер липидных рафтов в различных типах клеток, включая фибробласты, нейроны и клетки крови (Simons, Ikonen, 1997; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011, 2013, 2017); в то же время для MCK такие данные крайне ограничены.

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия (эМСК) человека являются относительно новым источником МСК и имеют перспективы для использования в клеточной терапии благодаря доступности и неинвазивным протоколам выделения. Задача настоящей работы состоит в оценке возможностей выявления кластеризованного ганглиозида GM1 в плазматической мембране эМСК человека с использованием экспериментального подхода, основанного на связывании пентамеров бета-субъединиц холерного токсина (рис. 1).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. эМСК человека (линии 2304 и 2804) были получены и охарактеризованы (Земелько и др., 2011) в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в соответствии со стандартным протоколом в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1% раствора антибиотика-антимикотика и 1% Gluta-MAX (Gibco, США). Клетки рассевали с плотностью 1: 3—1: 4 два раза в неделю, используя 0.05%-ный раствор трипсин/ ЭДТА (Invitrogen, США).

Синхронизация эМСК и анализ их распределения по фазам клеточного цикла. Клетки синхронизировали на границе фаз G₀/G₁ клеточного цикла посредством перевода на среду без сыворотки на 28 ч. Пролиферацию клеток стимулировали добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. После инициации пролиферации распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали через разные временные интервалы (см. раздел "Результаты"). Клетки промывали 1-кратным раствором PBS, открепляли от чашек с помощью раствора трипсина/ЭДТА и ресуспендировали в культуральной среде. Клетки пермеабилизовывали 0.1%-ным Тритоном Х-100 (Sigma-Aldrich, США) и окрашивали в течение 5 мин красителем DAPI (2 мкг/мл). Распределение клеток по фазам клеточного цикла оценивали с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter; лазер 405 нм) и анализировали с использованием программного обеспечения CytExpert 2.0. Флуоресценцию регистрировали от 10000 клеток.

Флуоресцентная микроскопия. Эксперименты по выявлению ганглиозида GM1 в эМСК (посеянных на покровные стекла) проводили на несинхронизованных клетках и после их синхронизации с последующей индукцией пролиферации параллельно с анализом клеточного цикла. Для флуоресцентного мечения ганглиозида GM1 использовали конъюгат пентамера нетоксичных бета-субъединиц холерного токсина (СТВ) с FITC (FITC-CTB, Sigma-Aldrich, США). Клетки фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида и инкубировали в присутствии FITC-CTB (5 мкг/мл, 10 мин, 4°С). Ядра клеток окрашивали красителем DAPI (2 мг/мл, 30 мин при комнатной температуре, что позволяло красителю проникнуть в фиксированные клетки без пермеабилизации). Покровные стекла с клетками приклеивали к предметным стеклам, используя специальный реагент для предотвращения выгорания флуоресценции препаратов (Vectashield Anti-Fade Reagent, Vector Labs, CIIIA).

Для получения изображений использовали конфокальный микроскоп "Leica TCS SP5" (Leica Microsystems, GmBH) с иммерсионным объективом 40×/1.25 N.A. Флуоресценцию возбуждали лазерами с длинами волн 405 и 488 нм для DAPI и FITC-CTB соответственно. Для обработки изображений ис-

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 10 2020

пользовали программные пакеты Leica LAS AF Lite и Image J. Среднюю долю (в %) и стандартную ошибку среднего для GM1-окрашенных и GM1-неокрашенных клеток в каждой временной точке эксперимента вычисляли по меньшей мере из 10 конфокальных изображений (суммарно более 120 клеток на 1 точку). Достоверность различий оценивали с использованием парного *t*-критерия Стьюдента (значение P < 0.05 считали значимым).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ изображений эМСК обеих клеточных линий (2304 и 2804), окрашенных одновременно FITC-СТВ и DAPI, позволил нам обнаружить значительную вариабельность интенсивности флуоресценции отдельных клеток (рис. 2). Наблюдаемая картина означает, что клеточная популяция эМСК неоднородна, имеют место существенные различия в отношении связывания СТВ с его рецептором на поверхности мембраны – кластером, содержащим, по крайней мере, пять молекул ганглиозида GM1 (рис. 1). У части клеток в экспоненциально растущей популяции не регистрируется флуоресцентный сигнал от FITC-CTB (нет свечения), что указывает на отсутствие в плазматической мембране кластеризованного ганглиозида GM1; такие клетки обозначены как "GM1-отрицательные" (рис. 2). Выявление GM1-отрицательных и GM1-положительных клеток потенциально может быть обусловлено несколькими факторами, приводящими к разнородности клеточной культуры эМСК, включая статус дифференцировки или присутствие апоптотических клеток в популяции. Однако мы подтвердили низкий уровень апоптоза и не выявили разнородности клеточной культуры в отношении стандартных маркеров мультипотентности и дифференцировки в соответствии с минимальными критериями определения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток Международного общества клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy, Dominici et al., 2006); соответствующие данные для исследуемых культур эМСК опубликованы нами ранее (Chubinskiv-Nadezhdin et al., 2019).

Мы предположили, что присутствие в популяции эМСК клеток, не окрашивающихся FITC-CTB на кластеризованный GM1, потенциально может быть объяснено нахождением клеток в различных фазах клеточного цикла. Имеющиеся в литературе данные (Majoul et al., 2002) дают основания для предположений о связи уровня ганглиозидов в мембране и активности их синтеза от клеточного цикла MCK. Для проверки рабочей гипотезы мы провели эксперименты по синхронизации клеточной культуры эMCK путем выдерживания в среде без сыворотки в течение 28 ч для получения максимального количества клеток, остановленных на границе фаз клеточного цикла G_0/G_1 .



Рис. 2. Разнородность культуры эМСК, выявленная по флуоресценции маркера липидных рафтов ганглиозида GM1 при окрашивании с помощью FITC-CTB. Представлены репрезентативные изображения клеток линий 2304 и 2804. Ядра окрашены DAPI. При совмещении изображений видно, что в популяции присутствуют клетки без флуоресценции – GM1-отрицательные (GM1–, показаны *стрелками*) и клетки флуоресцирующие – GM1+. *Масштабный отрезок*: 100 мкм.

Пролиферацию инициировали стандартным способом — добавлением 10% сыворотки в культуральную среду. Распределение эМСК по фазам клеточного цикла оценивали с помошью проточной цитометрии через 18 и 22.5 ч после инлукции пролиферации, в параллельных экспериментах окрашивали клетки на ганглиозид GM1. Временные точки были подобраны на основании исследования, в котором впервые охарактеризованы используемые линии эМСК, в том числе определена их скорость пролиферации (Земелько и др., 2011). На рис. 3 представлены репрезентативные изображения эМСК (линия 2304), окрашенных стандартным способом (FITC-CTB и DAPI) для выявления кластеризованного ганглиозида GM1 в плазматической мембране: до запуска пролиферации (синхронизированная культура, 28 ч без сыворотки), затем через 18 и 22.5 ч после добавления сыворотки. По ходу цикла (через 18 и 22.5 ч) наблюдается снижение связывания FITC-CTB; доля GM1отрицательных клеток (отмечены белыми стрелками) значительно возрастает через 22.5 ч после индукции пролиферации.

На рис. 4 показаны суммированные данные параллельных экспериментов: при подсчете средней доли окрашенных и неокрашенных клеток в популяции (рис. 4a) и при анализе распределения клеток культуры по фазам клеточного цикла (рис. 4δ) в выбранных временных точках. Таким образом, результаты экспериментов по выявлению мембранных кластеров GM1 и анализу клеточного цикла позволяют заключить, что увеличение доли GM1-отрицательных клеток наблюдается при максимальной доле клеток в фазах G₂/M.

Таким образом, после запуска пролиферации при прохождении клетками фаз клеточного цикла значительно снижается количество кластеризованного ганглиозида GM1 в плазматической мембране; его содержание максимально на границе фазе G₀/G₁.

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших экспериментах при флуоресцентном окрашивании клеток с использованием пентамеров СТВ впервые показана разнородность культуры эМСК человека в отношении присутствия кластеров GM1 на поверхности клеток. Надо отметить, что СТВ-коньюгаты с флуоресцентными метками широко используются для выявления GM1 как маркера рафтов и биологически значимого липидного компонента мембраны. Однако для МСК различного происхождения сведения крайне ограничены, имеются лишь единичные разнонаправленные работы. включающие данные флуоресцентной микроскопии с окраской GM1 в клеточной мембране (Freund et al., 2010; von Erlach et al., 2018). Малое количество таких работ – некоторая неожиданность для нас, поскольку ганглиозиды семейств GM и GD достаточно давно рассматриваются как потенциальные маркеры и модуляторы направленной дифференцировки ство-



Без сыворотки, 28 ч

+ сыворотка, 18 ч

+ сыворотка, 22.5 ч

Рис. 3. Рост количества не флуоресцирующих эМСК (GM1-отрицательных, *стрелки*) по мере приближения клеток к фазам клеточного цикла G₂/M. Представлены репрезентативные совмещенные изображения клеток (окрашенных FITC-CTB и DAPI) после синхронизации (28 ч без сыворотки в среде культивирования) и через 18 и 22.5 ч после стимуляции пролиферации добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки в культуральную среду. Минимальное количество клеток GM1- наблюдается после синхронизации в G₀/G₁ фазах. *Масштабный отрезок*: 100 мкм.

ловых клеток (см. выше); однако внимание большинства авторов традиционно ограничивалось биохимическими подходами. Тем более интересно, что при исследовании мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека, полученных из костного мозга, обнаружена дифференциальная экспрессия ганглиозидов GM1 (с помощью коньюгата FITC-CTB) и GM3 (с помощью антител), не зависящая от варьирования стандартных условий культивирования, а также от формы и размеров клеток (Freund et al., 2010). Авторы делают вывод о фенотипической разнородности культуры МСК именно по наличию GM1, а также GM3, в то же время подтверждая ее однородность по связыванию неспецифичных лектинов и не анализируя другие возможные механизмы.

Таким образом, феноменологическая картина разнородности культуры МСК в отношении мембранных кластеров GM1, по данным из литературы (Freund et al., 2010), близка к нашим результатам (см. рис. 2). Наши эксперименты на синхронизированной культуре показали. что уровень кластеризованного GM1 в плазматической мембране МСК связан с нахождением клеток в определенной фазе цикла: он максимален, когда клетки остановлены на границе фаз G_0/G_1 и снижается при запуске пролиферации, достигая минимума в фазах цикла G₂/M. Интересно отметить, что аналогичные данные, послужившие предпосылкой нашей подтвердившейся рабочей гипотезы для МСК, были получены ранее на клеточных линиях Vero и PC12 (Majoul et al., 2002) вне связи с исследованиями стволовых клеток и новыми данными о роли ганглиозидов.

Ганглиозид GM1 рассматривается как маркер липидных микродоменов, а флуоресцентное мечение кластеров молекул GM1 является одним из ведущих подходов для подтверждения целостности или деструкции рафтов в клеточной мембране (рис. 1). Предположение о недостаточной специфичности холерного токсина в отношении GM1 не вполне аргументировано (Blank et al., 2007) и, что существенно, не подвергает сомнению наши результаты и выводы (возможные артефакты привели бы к завышенным оценкам связывания СТВ с мембраной). Важно также отметить, что наши данные, полученные ранее с использованием FITC-CTB, полностью согласуются с анализом изменений упорядоченности бислоя плазматической мембраны независимым методом, основанным на оценке поляризации флуоресценции липидного красителя di-4-ANEPPDHQ (Owen et al., 2011; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2020). В то же время результаты настоящего и предшествующих исследований с использованием пентамера СТВ не претендуют на какие-либо оценки реальных размеров мембранных микродоменов.

Полученные нами результаты необходимо учитывать при определении изменений липидного бислоя и микродоменов в клеточной мембране МСК (и, возможно, других клеточных популяций) после частичной экстракции холестерина метил-бета-циклодекстрином (von Erlach et al., 2018). Фактически, картина, которую мы наблюдали в пролиферирующей культуре, соответствует минимальному присутствию GM1-содержащих рафтов в плазматической мембране клеток в G_2/M -фазах (рис. 3 и 4). Это может быть обусловлено как снижением уровня ганглиозида вследствие изменений его синтеза и транслокации к поверхности клетки (Majoul et., 2002), так и нарушением его кластеризации в плазматической мембране при изменении структуры или целостности рафтов. Эти предположения не альтернативны, скорее, наоборот, могут отражать взаимно дополняющие физиологические механизмы, включающие изменения функциональной организации мембраны и механики пролиферирующих клеток в ходе клеточного цикла.

Присутствие ганглиозидов, в частности GM1, в составе наружного листка бислоя плазматической



Рис. 4. Изменение соотношения GM1-отрицательных (GM1-) и GM1-положительных (GM1+) эМСК по мере прохожления клетками фаз клеточного никла. Прелставлены результаты параллельных экспериментов по флуоресцентному мечению ганглиозида GM1 (a) и анализу распределения эМСК по фазам клеточного цикла по данным проточной цитометрии (б). Клетки оценивали после синхронизации (28 ч в среде без сыворотки) на границе фаз клеточного цикла G₀/G₁ и через 18 ч и 22.5 ч после индукции пролиферации. (а) – Даны средние значения и их ошибки; усреднение проводили минимум по 10 полям зрения (суммарное число клеток более 120) для каждой временной точки; различия между соответствующими столбцами (*, #) достоверны при P < 0.05). (б) – Распределение эМСК по фазам цикла (по данным проточной цитометрии, показан репрезентативный результат из 3 повторов).

мембраны значимо для целого спектра важнейших функций живой клетки, от рецепции до механотрансдукции (Ledeen, Wu, 2015; Cantu et al., 2011). Вклад GM1 в механику бислоя клеточных мембран определяется, в первую очередь, геометрическими параметрами молекул и взаимодействием с холестерином, в том числе, в составе рафтов (Pike, 2009; Sezgin et al., 2017). Полученные нами результаты указывают на вероятное снижение жесткости и, соответственно, повышение деформируемости липидного бислоя плазматической мембраны эМСК в фазах G₂/M. Очевидно, что при этом надо учитывать и вклад структур кортикального цитоскелета в механические свойства мембраны и клетки, воздерживаясь от упрощенных трактовок. В частности, ранее показано, что деструкция рафтов при снижении уровня мембранного холестерина инициирует перестройки актиновой сети, что может приводить к результирующему повышению жесткости комплекса мембрана–цитоскелет и клетки в целом (Чубинский-Надеждин и др., 2012; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011, 2013). В настоящее время механические факторы, включая параметры биомолекул и клеточных структур, рассматриваются как важнейшие детерминанты направленной дифференцировки мультипотентных стволовых клеток (von Erlach et al., 2018), что усиливает значимость результатов выполненного исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00106).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводили экспериментов на животных или людях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В. В., Кирсанов А.А., Бичевая Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 6. P. 1.)
- Чубинский-Надеждин В.И., Няпшаев И.А., Морачевская Е.А., Анкудинов А.В. 2012. Оценка изменений жесткости клеточной мембраны после частичной экстракции мембранного холестерина. Цитология. Т. 54. № 9. С. 714.
- Blank N., Schiller M., Krienke S., Wabnitz G., Ho A.D., Lorenz H-M. 2007. Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. Immunol. Cell Biol. V. 85. P. 378.
- *Cantu L., Del Favero E., Sonnino S., Prinetti A.* 2011. Gangliosides and multiscale modulation of membrane structure. Chem. Phys. Lipids. V. 164. P. 796.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Efremova T.N., Khaitlina S.Y., Morachevskaya E.A. 2013. Functional impact of cholester-

ol sequestration on actin cytoskeleton in normal and transformed fibroblasts. Cell Biol. Int. V. 37. P. 617.

- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2011. Suppression of mechanosensitive channels after cholesterol depletion is mediated via actin rearrangement. Biophys. Biochem. Res. Com. V. 412. P. 80.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2017. Simvastatin induces actin cytoskeleton disassembly in normal and transformed fibroblasts without affecting lipid raft integrity. Cell Biol. Int. V. 41. P. 1020.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Sudarikova A.V., Shilina M.A., Vasileva V.Y., Grinchuk T.M., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A. 2019. Cell cycle-dependent expression of Bk channels in human mesenchymal endometrial stem cells. Sci. Rep. V. 9. P. 4595.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2020. Functional clustering and coupling of ion channels is independent on lipid raft integrity in the plasma membrane. BBA Mol. Cell Biol. 119764. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118764
- Dominici, M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini Fc., Krause Ds., Deans Rj., Keating A., Prockop Dj., Horwitz Em. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. V. 8. P. 315.
- Freund D., Fonseca A-V, Janich P., Bornhauser M., Corbeil D. 2010. Differential expression of biofunctional GM1 and GM3 gangliosides within the plastic-adherent multipotent mesenchymal stromal cell population. Cytotherapy. V. 12. P. 131.
- Holmgren J., Lindblad M., Fredman, P., Svennerholm L., Myrvold H. 1985. Comparison of receptors for cholera and Escherichia coli enterotoxins in human intestine. Gastroenterol. V. 89. P. 27.
- Holmgren J., Lonnroth I., Svennerholm L. 1973. Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids. Infect. Immun. V. 8. P. 208.
- Kwak D.-H., Kweon Yu.K., Kim S.-M., Lee D.-H., Kim S.-M., Jung J.-U., Seo J.-W., Kim N., Seoul Lee S., Jung K.-Y., Hyung-Keun You H.-K., Kim H.-A., Choo Y.-K. 2006. Dynamic changes of gangliosides expression during the differentiation of embryonic and mesenchymal stem cells into neural cells. Exp. Mol. Med. V. 38. P. 668.

- *Kwak D.-H., Seo B.B., Chang K.T., Choo Y.K.* 2011. Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. Exp. Mol. Med. V. 43. P. 379.
- *Ledeen R.W., Wu G.* 2015. The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. Trends Biochem. Sci. V. 40. P. 407.
- Ledeen R.W., Wu G., Lu Z.H., Kozireski-Chuback D., Fang Y. 1998. The role of GM1 and other gangliosides in neuronal differentiation. Overview and new finding. Ann. N. Y. Acad. Sci. V. 845. P. 161.
- Ledeen R.W., Wu G. 2018. Gangliosides of the nervous system. In: Gangliosides: Methods and protocols. Methods Mol. Biol. (Springer). V. 1804. P. 19.
- Majoul I., Schmidt T., Pomasanova M., Boutkevich E., Kozlov Y., Soling H.-D. 2002. Differential expression of receptors for Shiga and Cholera toxin s regulated by the cell cycle. J. Cell Sci. V. 115. P. 817.
- Moussavou G., Kwak D.H. Lim M.-U., Kim J.-S., Kim S.-U., Chang K.-T., Choo Y.-K. 2013. Role of gangliosides in the differentiation of human mesenchymal-derived stem cells into osteoblasts and neuronal cells. BMB Rep. V. 46. P. 527.
- *Owen D.M., Rentero C., Magenau A., abu-Siniyeh A., Gaus K.* 2011. Quantitative imaging of lipid order in cells and organisms. Nat. Protoc. V. 7. P. 24.
- *Pike L.J.* 2009. The challenge of lipid rafts. J. Lipid Res. V. 50. P. 323.
- Ryu J.- S., Ko K., Ko K., Kim J.-S., Kim S.-U., Chang K.-T., Choo Y.-K. 2017. Roles of gangliosides in the differentiation of mouse pluripotent stem cells to neural stem cells and neural cells (Review). Mol. Med. Rep. V. 16. P. 987.
- Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18: 361–374.
- Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature. V. 387. P. 569.
- Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A. 2006. Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiol. V. 17. P. 1.
- *Tettamani G.* 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. Glycoconjugate J. V. 20. P. 301.
- Von Erlach T., Bertazzo S., Wozniak M.A., Horejs C-M., Maynard S.A., Attwood S., Robinson B.K., Autefage H., Kallepitis C., del Rio Hernandes A., Chen C.S., Goldoni S., Stevens M.M. 2018. Cell-geometry-dependent changes in plasma membrane order direct stem cell signaling and fate. Nat. Mater. V. 17. P. 237.

Presence of Clustered GM1 Ganglioside in the Membrane of Endometrial Mesenchymal Stem Cells is Dependent on Cell Cycle Stage

V. I. Chubinskiy-Nadezhdin^{*a*, *}, M. A. Shilina^{*a*}, A. V. Sudarikova^{*a*}, O. G. Lyublinskaya^{*a*}, Yu. A. Negulyaev^{*a*}, and E. A. Morachevskaya^{*a*}

> ^a Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia *e-mail: vchubinskiy@gmail.com

Gangliosides, representing of the group of sialic glycosphingolipids, are typical components of lipid rafts of cell membranes that play an important role in the processes of reception and signal transduction. Gangliosides attract specific attention as possible regulators of directed differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). GM1 ganglioside is considered as a marker of lipid microdomains, and fluorescence labeling of clusters of GM1 molecules is

ЧУБИНСКИЙ-НАДЕЖДИН и др.

one of the main methods for assessing the integrity or destruction of rafts in various types of cells. At the same time, data on the presence and possibility of determining GM1 ganglioside in the plasma membrane of MSCs are extremely limited. The objective of this work was to identify the ganglioside GM1 in the membrane of human endometrial MSC (eMSC) using an experimental approach based on interaction with the pentamer of the beta subunits of cholera toxin (CTB). Fluorescence staining of cells using FITC-CTB conjugate revealed the heterogeneity of the eMSC culture by the presence of GM1 membrane clusters. Experiments on synchronized culture have shown that the amount of clustered GM1 in the eMSC plasma membrane depends on the phase of the cell cycle: it is maximum when the cells are stopped at the G0/G1 phase boundary and decreases when proliferation starts, reaching a minimum in the G2/M phases. The data suggest the functional role of GM1-containing lipid rafts in cell cycle of eMSCs and possible changes in the mechanical properties of the membrane during preparation of the cells for division.

Keywords: plasma membrane, ganglioside GM1, lipid rafts, mesenchymal stem cells, cell cycle

760