

ДЕФИЦИТ РТИР В В-ЛИМФОЦИТАХ СНИЖАЕТ ЗАПАСАНИЕ ПОДКОЖНОГО ЖИРА У МЫШЕЙ

© 2021 Y. Xu¹, D. Zhu², Q. Yang², D. Su^{2*}, and Y.Q. Chen^{2,3*}

¹ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

² Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China;
e-mail: dan.su@jiangnan.edu.cn, yqchen@jiangnan.edu.cn

³ Wuxi Translational Medicine Research Center and Jiangsu Translational Medicine Research Institute Wuxi Branch, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

Поступила в редакцию 06.02.2021

После доработки 26.03.2021

Принята к публикации 08.04.2021

Исследования последних лет были по большей части сосредоточены на роли В-клеток в развитии метаболических заболеваний, в то время как функция В-клеток в гомеостазе жировой ткани остается по-прежнему неясной. Белок, взаимодействующий с доменом трансактивации Pax (Pax transactivation domain-interacting protein, РТИР), являясь одним из ключевых факторов гуморального иммунитета, необходим для развития и активации В-клеток. В настоящей работе мы исследовали роль В-клеток в гомеостазе жировой ткани при физиологических условиях на модели мышей с дефицитом РТИР в В-клетках (*Ptip*^{-/-} мыши). Запасание жира у мышей 8-недельного возраста оценивали с помощью микро-КТ; у *Ptip*^{-/-} мышей наблюдалось значительное снижение отложения подкожно-жировой ткани (ПЖТ). Ненаправленное общее профилирование липидов показало, что у *Ptip*^{-/-} мышей был изменен состав триглицеридов в ПЖТ. Тем не менее согласно результатам проточной цитометрии, разницы в количестве клеток-предшественников адипоцитов в ПЖТ мышей дикого типа (WT) и *Ptip*^{-/-} мышей обнаружено не было. Для изучения влияния устойчивых уровней антител IgM и IgG на отложение жира *Ptip*^{-/-} мышам внутривентриально вводили сыворотку от мышей WT один раз в 3–4 дня в течение 4 недель. После 4 недель инъекций масса паховой подкожно-жировой ткани мышей-реципиентов не показала значительного увеличения по сравнению с контролем. Наши результаты демонстрируют, что РТИР, контролируя состояние В-клеток, играет важную роль в регулировании размера подкожных адипоцитов, состава триглицеридов и запаса жира в физиологических условиях. Снижение отложения подкожного жира у *Ptip*^{-/-} мышей, по-видимому, не связано с количеством клеток-предшественников адипоцитов. Значения устойчивых уровней антител IgM и IgG *in vivo* также не связаны с запасанием подкожного жира.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: РТИР, В-лимфоциты, отложение подкожного жира, гомеостаз жировой ткани.

DOI: 10.31857/S0320972521070083

ВВЕДЕНИЕ

Жировая ткань, как метаболический и эндокринный орган, участвует в регуляции гомеостаза и метаболизма организма [1]. Согласно значительному числу клинических данных, размер адипоцитов и распределение жира ассоциированы с метаболическими характеристиками у людей с ожирением [2–4]. В более ранних исследованиях было выявлено влияние макрофа-

гов жировой ткани [5], Т-лимфоцитов [6] и В-лимфоцитов [7] на метаболические нарушения, связанные с ожирением. Иммуные клетки жировой ткани также участвуют в поддержании местного гомеостаза [8]. Липогенез в адипоцитах стимулируется IgM [9], IgG и Fc-фрагментом IgG [10], что позволяет предположить наличие тесной связи между иммунной средой и гомеостазом жировой ткани.

Белок, взаимодействующий с доменом трансактивации Pax (РТИР), представляет собой ядерный белок, содержащий 6 tandemных доменов BRCT и полиглутаминовый тракт (polyQ region) [11]. РТИР необходим для активации Т-лимфоцитов [12], эмбрионального развития [13] и адипогенеза [14]. В В-клетках РТИР играет важную роль в инициации транскрипции сайта переключения в локусе тяжелой цепи иммуноглобулинов [15]. Кроме того, РТИР участвует в

Принятые сокращения: БЖТ – бурая жировая ткань; ВЖТ – висцеральная жировая ткань; ПА – предшественники адипоцитов; пПЖТ – паховая подкожно-жировая ткань; ТАГ – триацилглицерид; АСН – ацетонитрил; Н/Е – гематоксилин и эозин; IPA – изопропиловый спирт; РТИР – белок, взаимодействующий с доменом трансактивации Pax; SVF – стромально-васкулярная фракция (stromal vascular fraction).

* Адресат для корреспонденции.

достижении устойчивого уровня антител, а также в постиммунной продукции антител IgG и IgM *in vivo* путем регулирования развития, активации и выживаемости групп В-клеток, частично через путь NF-κB [16]. У мышей с дефицитом РТИР наблюдается нарушение развития клеток группы В1 и В-клеток маргинальной зоны, но при этом количество фолликулярных В-клеток соответствует норме.

В патологических состояниях, например, при заболеваниях, связанных с ожирением, В-клетки способствуют развитию воспаления. Тем не менее о функции В-клеток в гомеостазе жировой ткани при нормальных физиологических условиях известно мало. В настоящем исследовании на модели мышей, нокаутных по гену *Ptip* В-клеток, мы продемонстрировали, что РТИР играет решающую роль в поддержании гомеостаза жировой ткани при физиологических условиях путем регуляции В-клеток. Дефицит РТИР в В-клетках влияет на запасание жира, размер адипоцитов и состав триглицеридов в подкожном жире мышей. Кроме того, снижение запасания подкожного жира у мышей с дефицитом РТИР, по-видимому, не зависит от количества клеток-предшественников адипоцитов и адипогенного потенциала. Значения устойчивых уровней антител IgM и IgG *in vivo* также не влияют на запасание подкожного жира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование на животных. Условно нокаутные мыши по *Ptip* В-клеток (*Cd19^{cre/+} Ptip^{fllox/fllox}*) были получены путем скрещивания *Cd19^{cre/cre}* мышей с *Ptip^{fllox/fllox}* мышами [15, 16]. Мыши *Cd19^{cre/+} Ptip^{+/+}* (дикий тип, WT) и *Cd19^{cre/+} Ptip^{fllox/fllox} (Ptip^{-/-})*, на которых проводили настоящее исследование, содержались в условиях, свободных от патогенов, при 12/12-часовом цикле свет/темнота. Мыши имели свободный доступ к пище и воде; вес мышей контролировали. Уровни триглицеридов (ТАГ) и общего холестерина (ОХС) в сыворотке крови измеряли с помощью набора реагентов в соответствии с протоколом производителя («Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute», Китай). Для исследования ожирения, вызванного питанием, 8-недельные самцы находились на диете с высоким содержанием жиров (60% kcal fat; «Research Diets», США) в течение 18 недель. В процессе исследования контролировали вес мышей и их паховой подкожной жировой клетчатки.

Анализ распределения жировой ткани в организме. Мышам в возрасте 8 недель проводили анализ распределения жировой ткани в организме с по-

мощью системы микро-КТ «QuantumGXII» («PerkinElmer», США) со следующими настройками: 70 кВ, 88 мкА и 36 нм FOV (поле зрения). Запасание подкожного и висцерального жира анализировали с помощью программного обеспечения «Analyze 12.0» («PerkinElmer»), поставленного вместе с прибором.

Гистология. Паховую подкожную жировую ткань (пПЖТ) выделяли и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида при 4 °С в течение 24 ч. Срезы пПЖТ окрашивали гематоксилином и эозином (H/E) и визуализировали с помощью микроскопа («Pannoramic MIDI», Венгрия). Для каждого образца случайным образом выбирали 3–5 полей на полученных изображениях (увеличение 200×) и определяли средний размер адипоцитов в каждом поле с помощью программного обеспечения «Image J» (NIH, США).

Цитокины и антитела в паховой подкожной жировой ткани. Свежую пПЖТ взвешивали и затем гомогенизировали с использованием среды для экстракции тканей («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 1% ингибиторов протеаз. Затем образцы центрифугировали («Eppendorf», Германия) при 12 000 об./мин в течение 20 мин при 4 °С и отбирали супернатант. Концентрации антител и цитокинов измеряли методом ИФА с использованием экспериментального протокола, описанного в нашем предыдущем исследовании [16]. Для покрытия ИФА-планшетов использовали антимишьиные антитела IgM или IgG, в каждую лунку добавляли серийные разведения образцов пПЖТ или сыворотки, инкубацию проводили в течение 1,5 ч при 37 °С. После промывания планшетов образцы инкубировали с козьими антимишьиными антителами IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c или IgG3 («Southern Biotechnology», США), конъюгированными с пероксидазой хрена. В завершение во все лунки добавляли субстратную систему Ультра ТМВ-блоттинг (Ultra TMB-Blotting substrate system, «Thermo Fisher Scientific») и измеряли абсорбцию при 450 нм с помощью планшетного ридера «Multiskan Sky» («Thermo Fisher Scientific»). В качестве стандартов использовали образцы очищенного мышинового иммуноглобулина («Biolegend», США). Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа бичинхоновой кислоты (bicinchoninic acid, BCA) производства «Beyotime Biotechnology» (Китай).

Классификация стромально-васкулярных жировых клеток и В-клеток крови методом FACS (активируемая флуоресценцией сортировка клеток). Для проведения данного эксперимента была выделена стромально-васкулярная фракция

(SVF) пПЖТ в соответствии с описанием, приведенным в предыдущих работах [17, 18]. После удаления лимфатических узлов пПЖТ взвешивали, готовили образцы одинаковой массы и измельчали их на мелкие кусочки. Образцы инкубировали с 0,1%-ным буфером, содержащим коллагеназу I типа («Sangon Biotech», Китай), при 37 °C в шейкере в течение 60–90 мин. Путем расщепления и центрифугирования из каждого образца получали SVF. Для анализа В-клеток крови отбирали образцы крови, далее проводили лизирование эритроцитов лизирующим буфером («BD Biosciences», США), процедуру выполняли два или три раза. Для окрашивания клеток использовали моноклональные антитела, такие как CD24 (клон М1/69), CD29 (клон НМβ1-1), CD31 (клон 390), CD34 (клон НМ34), CD45 (клон 30-F11), Ter-119 (клон TER-119), Sca-1 (клон D7) производства «Biolegend» (США), IgM (клон П/41), CD19 (клон 1D3) производства «eBioscience» (США) и B220 (клон RA3-6B2) производства «BD Biosciences». Клетки SVF и крови анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRFortessa («BD Biosciences»). Для идентификации В-клеток (B220⁺, IgM⁺) в крови и клеток-предшественников адипоцитов (Lin⁻: CD29⁺: CD34⁺: Sca-1⁺: CD24⁺) в пПЖТ использовали программное обеспечение FlowJo v10 («BD Biosciences»).

Культура клеток стромально-васкулярной фракции и их дифференцировка. Свежеизолированную SVF культивировали в среде DMEM («Gibco», США) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Gibco») и пеницилина/стрептомицина (P/S, «Thermo Fisher Scientific»). Для определения пролиферативной способности SVF-клеток использовали набор «MTT assay kit» («Beyotime Biotechnology»). В клетках третьего поколения индуцировали дифференцировку с применением 0,5 мМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин), 1 мкМ дексаметазона, 0,5 мкМ росиглитазона («MCE», США) и 10 мкг/мл инсулина («Sangon Biotech», Китай). Через 12 дней клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида и окрашивали жирорастворимым красным красителем «Oil Red O» (0,5%-ный раствор в изопропанол). На последнем этапе клетки окрашивали гематоксилином. Концентрацию ТАГ в адипоцитах измеряли с помощью набора реагентов в соответствии с протоколом производителя («Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute»).

Липидомика. Ненаправленное общее профилирование липидов в ткани пПЖТ было проведено в соответствии с нашим предыдущим исследованием [19] с незначительными изменениями.

Для предварительной подготовки образца 10 мг пПЖТ гомогенизировали в 40 мкл воды и 375 мкл метанола (MeOH) («Tedia», США) с использованием гомогенизатора «Tissue Cell-destroyer DS1000» («NewZongke, Viral Disease Control Bio-Tech LTD», Китай). Гомогенаты ткани переносили в новые центрифужные пробирки Eppendorf. Затем в пробирку последовательно добавляли 1250 мкл метил-трет-бутилового эфира («Tedia») и 300 мкл воды, образец тщательно перемешивали на вортексе. Смесь инкубировали в течение 10 мин, а затем центрифугировали на 15 000 g («Eppendorf»). Далее 400 мкл супернатанта лиофилизировали («Labconco Corporation», США) и заново растворяли в 50 мкл смеси CHCl₃ : MeOH (2 : 1) и 200 мкл 5 мМ ацетата аммония (AcONH₄, «Sigma-Aldrich», США) в водном растворе изопропилового спирта и ацетонитрила (IPA : ACN : H₂O в отношении 9 : 4 : 2 соответственно; «Merck», Германия). Образец для контроля качества получали путем смешивания 200 мкл супернатанта из каждого образца.

Профилирование липидов проводили с помощью хроматографической системы Thermo Vanquish, объединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap («Thermo Fisher Scientific»), используя подвижную фазу, состоящую из растворителя А (10 мМ AcONH₄ в ACN : H₂O, 60 : 40 v/v) и растворителя В (10 мМ AcONH₄ в IPA : ACN, 90 : 10 v/v). В эксперименте использовали колонку ВЕН С18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм; «Waters», США), которую выдерживали при 40 °C.

«Сырые» (необработанные) данные из объединенной системы жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (Thermo ЖХ/МС) были преобразованы в файлы формата .ABF и импортированы в MS-DIAL для выравнивания пиков. Идентификация липидов пПЖТ проводилась в основном с использованием встроенной базы данных MS-DIAL; тандемные масс-спектры, время удержания и точное отношение массы к заряду проверялись вручную.

ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из В-клеток селезенки и пПЖТ взрослых мышей экстрагировали в соответствии с протоколом производителя («CWBio», Китай). Для разделения В-клеток и спленоцитов использовали микроносители α-CD43 («Miltenyi Biotec», Германия). Обратная транскрипция проводилась в соответствии с инструкциями производителя («CWBio»). Количественную ПЦР (SYBR Green PCR Master Mix, «Yasen Biotechnology», Китай) проводили с использованием системы ПЦР в реальном времени («Roche», Швейцария); для нормализации данных экспрессии генов ис-

пользовали экспрессию *Hprt* [15, 16]. Для дальнейшего анализа было использовано пороговое число циклов (cycle threshold, Ct) каждого образца. Используемые праймеры указаны в таблице.

Введение сыворотки. Сыворотку собирали у WT-мышей в возрасте 6–8 недель. Учитывая период полураспада антител (20–23 дня для IgG, 2 дня для IgM и 17–22 ч для IgA) [20], сыворотку вводили внутривенно *Ptip*^{-/-} мышам один раз каждые 3–4 дня в течение 4 недель. Для обеспечения адекватной концентрации антител в сыворотке забор крови у каждой WT-мыши проводили не более двух раз, а частота сбора крови составляла один раз в две недели. Перед инъекцией свежую сыворотку помещали на лед и подвергали воздействию ультрафиолетового света в течение 15 мин.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 7, данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для определения значимости различий между группами применяли двусторонний непарный *t*-критерий с использованием поправки Уэлча.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дефицит РТИР в В-клетках влияет на запасы жира у мышей при нормальных физиологических условиях. В проведенных ранее исследованиях по изучению роли В-клеток при нарушениях метаболизма, связанных с ожирением, мышам давали корм с высоким содержанием жиров. Однако такая диета считается внешним стимулом [21], в то время как ожирение является хроническим воспалительным состоянием низкой степени тяжести [22]. Для изучения роли В-клеток в гомеостазе жировой ткани при нормальных физиологических условиях мы использовали модель мышей с гомозиготной делецией гена *Ptip* в В-клетках, при этом мышам давали стандартный корм. Согласно мониторингу массы тела самцов мышей, результаты не отличались между группами WT (дикий тип) и *Ptip*^{-/-} (рис. 1, *a*). Тем не менее по результатам микро-КТ, отложение подкожной жировой ткани (ПЖТ) у мышей *Ptip*^{-/-} заметно уменьшилось на ~ 36% по сравнению с контролем, в то время как в отложениях висцеральной жировой ткани (ВЖТ) различия не наблюдалось (рис. 1, *b* и *в*). Иссеченная паховая подкожная жировая ткань (пПЖТ, наиболее репрезентативная форма ПЖТ) была на ~ 26% меньше у *Ptip*^{-/-} мышей (рис. 1, *в* и *г*). Масса эпидиди-

Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

| Ген | Последовательность 5'–3' |
|-------------|--|
| <i>Ptip</i> | GCAGCAGCAGCAGCTTTTGG TGCTCGGGATAGTCCGCAAT |
| <i>Hprt</i> | TGCCGAGGATTTGGAAAAAGTG CACAGAGGGCCACAATGTGATG |

альной жировой ткани (ЭЖТ, наиболее репрезентативная форма ВЖТ) была меньше у *Ptip*^{-/-} мышей, хотя эта разница не достигала статистической значимости. Те же результаты были получены и у самок мышей 8-недельного возраста (рис. S1a в Приложении). Таким образом, роль РТИР в регулировании запаса жира не зависела от пола. Более того, отложения пПЖТ все еще были заметно меньше у 19-месячных *Ptip*^{-/-} мышей, чем у WT-мышей (рис. S1b в Приложении). Примечательно, что подобной характеристики не наблюдалось у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, т.е. различия в запасах пПЖТ по сравнению с контролем обнаружено не было (рис. 1, *e*). Кроме того, окрашивание Н/Е пПЖТ (рис. 1, *ж*) показало, что у *Ptip*^{-/-} мышей было значительно меньше адипоцитов по сравнению с WT-мышью. Данные результаты показывают, что при нормальных физиологических условиях РТИР участвует в регуляции запаса ПЖТ и размеров адипоцитов, контролируя функционирование В-клеток.

Дефицит РТИР в В-клетках изменяет триглицеридный состав подкожной жировой ткани. Основываясь на вышеизложенных наблюдениях, мы измерили показатели липидов крови и не обнаружили различий между двумя генотипами в уровне ТАГ или ОХС в сыворотке крови (рис. 2, *a* и *б*). Жировая ткань является основным органом запаса ТАГ [23], поэтому мы проанализировали состав ТАГ в пПЖТ методом ненаправленного общего профилирования липидов. Результаты демонстрируют очевидные изменения в составе различных ТАГ с определенной длиной углеродной цепи у мышей *Ptip*^{-/-} по сравнению с мышью дикого типа (рис. 2, *в*), хотя общее количество ТАГ было неизменным (рис. 2, *г*). Следует отметить, что уровни отдельных ТАГ, связанных с адипогенным потенциалом и прогрессированием заболеваний [24], включая ТАГ56:3, ТАГ56:4, ТАГ56:7 и ТАГ57:4, у мышей *Ptip*^{-/-} были заметно ниже (рис. 2, *д*). Количество разновидностей основных свобод-

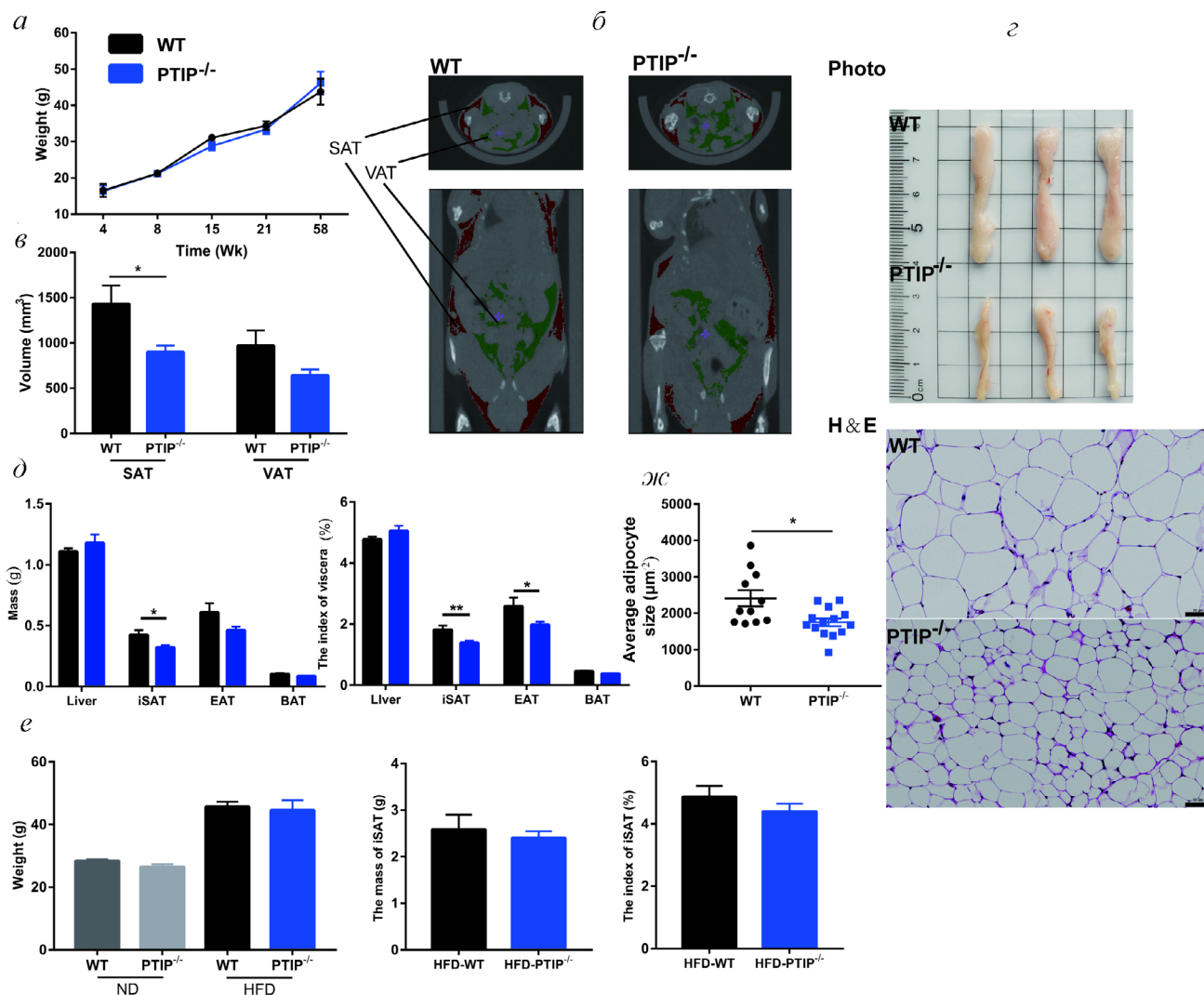


Рис. 1. Дефицит РТИР в В-клетках снижает запасы подкожного жира у мышей. *a* – Изменение массы самцов мышей ($n = 9–12$); *б, в* – распределение жира в организме самцов мышей 8-недельного возраста, данные получены с помощью микро-КТ ($n = 9–12$, красная область – ПЖТ (SAT), зеленая область – ВЖТ (VAT)); *г, д* – репрезентативные изображения пПЖТ (iSAT), массы висцеральной ткани и висцерального индекса (отношение массы висцеральной ткани к массе тела) у самцов мышей 8-недельного возраста ($n = 9–12$, EAT – эпидидимальная жировая ткань, BAT – бурая жировая ткань); *е* – масса тела, масса пПЖТ и индекс пПЖТ у мышей, находившихся на диете с высоким содержанием жиров на протяжении 18 недель (HFD, high-fat diet; $n = 6$); *ж* – изображения ткани пПЖТ с окрашиванием Н/Е (масштаб – 50 мкм) самцов мышей 8-недельного возраста и средний размер пахового подкожного адипоцита ($n = 11–14$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ных жирных кислот (FFA, free fatty acid) в пПЖТ не различалось между двумя генотипами (рис. 2, *е*). Чтобы исключить возможность того, что наблюдаемые изменения в гомеостазе жировой ткани у мышей *Ptip*^{-/-} были вызваны измененной экспрессией РТИР в ПЖТ, мы измерили экспрессию *Ptip* на уровне мРНК в пПЖТ и не обнаружили разницы между WT и мышами *Ptip*^{-/-} (рис. S2a в Приложении). В совокупности эти результаты показывают, что дефицит РТИР в В-клетках не изменяет общее содержа-

ние ТАГ, депонированных в пПЖТ, но значительно влияет на состав ТАГ.

Профиль антител и клетки-предшественники адипоцитов в паховой подкожной жировой ткани. В предыдущем исследовании [16] мы продемонстрировали, что РТИР необходим для развития групп В-лимфоцитов, он усиливает постиммунные и устойчивые уровни сывороточных антител IgM и IgG *in vivo*. В дальнейшем мы исследовали уровни антител в пПЖТ у неиммунизированных мышей. Так же, как и в случае снижения уровня

антител в сыворотке крови [16], у мышей с дефицитом РТИР наблюдалось снижение уровня IgM в 2,98 раза, а также значительное снижение уровней IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 и IgA в пПЖТ (рис. 3, а). Эти данные демонстрируют, что устойчивые уровни антител в пПЖТ у мышей *Ptip*^{-/-} оказались отличными от WT-мышей. Однако уровни нескольких важных цитокинов у мышей *Ptip*^{-/-} оставались неизменными (рис. 3, б). Анализ В-клеток в пПЖТ и в крови продемонстрировал, что *Ptip*^{-/-} мыши имеют аналогичную частоту и количество В-клеток по сравнению с WT-мышью (рис. S2b в Приложе-

нии; данные для В-клеток в пПЖТ не показаны). Клетки-предшественники адипоцитов (ПА) в стромально-васкулярной фракции (SVF) жировой ткани отвечают за адипогенез, а возможность наращивания жировых депо определяется числом и активностью ПА-клеток [25]. Чтобы определить, регулирует ли РТИР отложение жира путем изменения количества ПА-клеток в пПЖТ, мы проанализировали ПА-клетки с помощью FACS и обнаружили, что их количество, как правило, увеличивалось у мышей *Ptip*^{-/-} по сравнению с мышью WT, но эта разница не достигала статистической значимости (рис. 3, в и г).

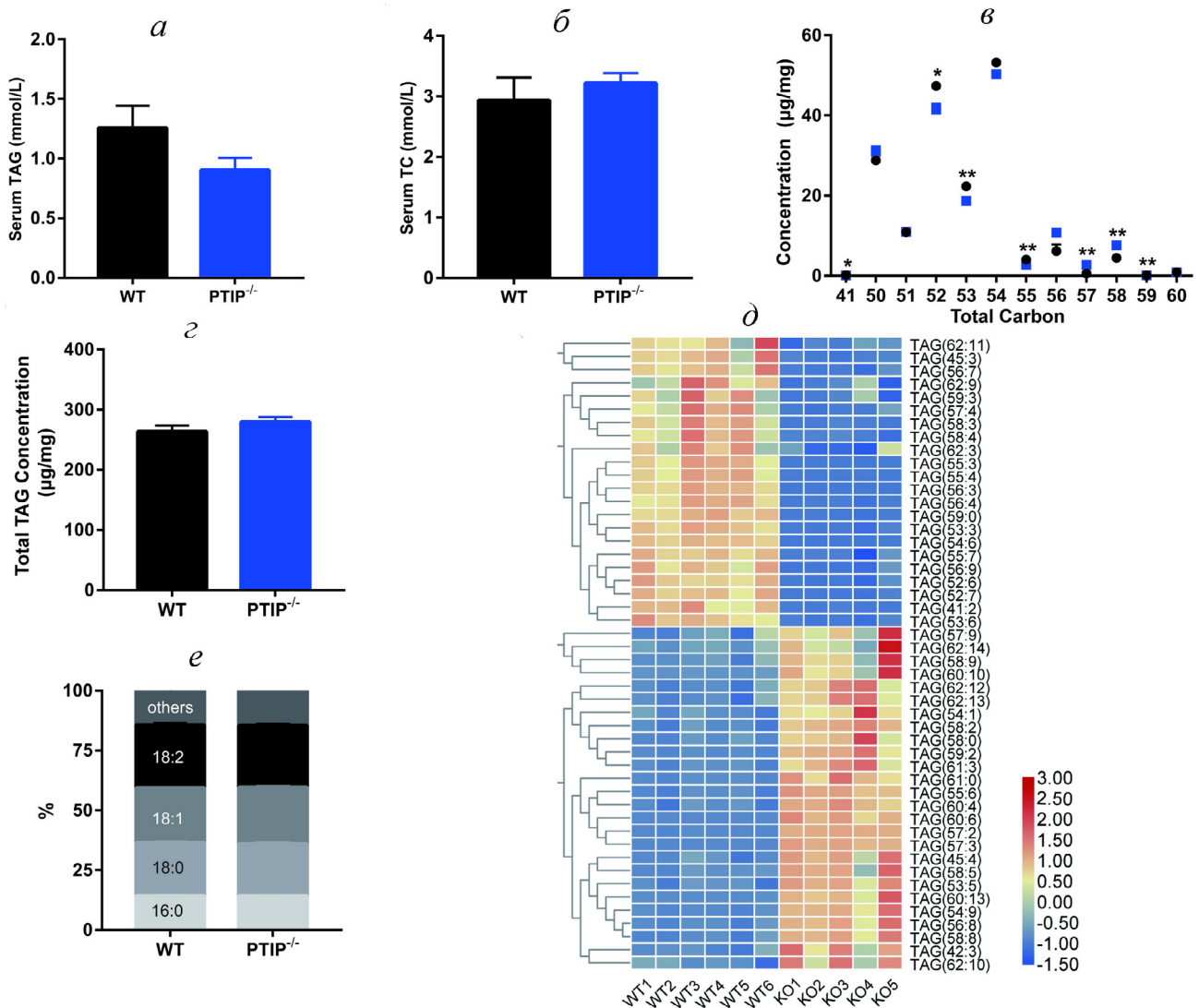


Рис. 2. Дефицит РТИР в В-клетках приводит к изменению состава ТАГ в ПЖТ. Уровни сывороточных ТАГ (TAG, а) и ОХС (ТС, б) у 8-недельных мышей ($n = 5-7$); в – изменение количества общего углерода (total carbon) анализировали на основе общей концентрации ТАГ ($n = 5-6$); г – общая концентрация ТАГ в пПЖТ ($n = 5-6$); д – тепловая карта по сравнению типов ТАГ между двумя группами, демонстрирующая ТАГ с кратным изменением > 2 и $< 0,5$. Красным отмечены типы ТАГ, уровень которых значительно увеличен у мышей *Ptip*^{-/-} по сравнению с контролем; синим – уменьшен по сравнению с контролем ($n = 5-6$; КО (knockout) обозначает *Ptip*^{-/-}); е – состав свободных жирных кислот пПЖТ ($n = 5-6$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Выделенные SVF-клетки мышей WT и *Ptip*^{-/-} показали сходную способность к пролиферации и дифференцировке в адипоциты (рис. S2, с и d в Приложении). Эти результаты показывают, что снижение запаса подкожного жира у мышей *Ptip*^{-/-} вызвано не изменением числа ПА-клеток или адипогенного потенциала ПЖТ.

Устойчивые уровни антител IgM и IgG *in vivo* не связаны с регуляцией запаса подкожного жира. Одна из основных функций В-клеток состоит в регуляции гуморального иммунного ответа путем выработки антител; для обеспечения быстрого ответа на распространенные патогены в стабильном состоянии организм имеет широкий спектр естественных антител [26]. Дефицит РТИР в В-клетках вызывает значительное снижение уровня антител в пПЖТ (рис. 3, а) и в сыворотке крови [16]. Снижение устойчивого уровня антител в сыворотке крови у мышей *Ptip*^{-/-} связано с дефицитом естественных антител [16]. Устойчивые уровни антител у мышей *Ptip*^{-/-} *in vivo* значительно отличались от таковых у мышей WT; поэтому мы исследовали наличие зависимости между снижением уровня устойчивых антител у мышей *Ptip*^{-/-} с уменьшением отложений в пПЖТ. Для повышения уровня устойчивых антител, включая естественные антитела, *Ptip*^{-/-}

мышам в течение 4 недель внутрибрюшинно вводили сыворотку, полученную от WT-мышей. Инъекция сыворотки не оказала влияния на массу тела (рис. 4, а). Через две недели после инъекции у мышей-реципиентов наблюдалось значительное повышение уровней IgG1, IgG3 и IgM в сыворотке крови (рис. 4, б и в). Через 4 недели после инъекции уровни IgG2b и IgG2c в сыворотке крови также были заметно повышены (рис. 4, б и в). Затем мы проанализировали уровень антител в пПЖТ: у мышей-реципиентов наблюдалось значительное повышение уровня антител IgG. Полученные результаты показывают, что сывороточные антитела IgG, перенесенные от WT-мышей, были успешно доставлены в пПЖТ мышей-реципиентов (рис. 4, з). В предыдущих исследованиях мы продемонстрировали, что у мышей *Ptip*^{-/-} были нарушены реакции антител на тимус-зависимые (ТД) и тимус-независимые (ТИ) антигены [16]. В данном исследовании повышенные уровни антител в сыворотке и ПЖТ мышей-реципиентов были получены путем их добавления из сыворотки мышей дикого типа. Таким образом, устойчивые уровни антител у мышей-реципиентов были успешно изменены. Тем не менее каких-либо существенных изменений в массе пПЖТ или индексе пПЖТ

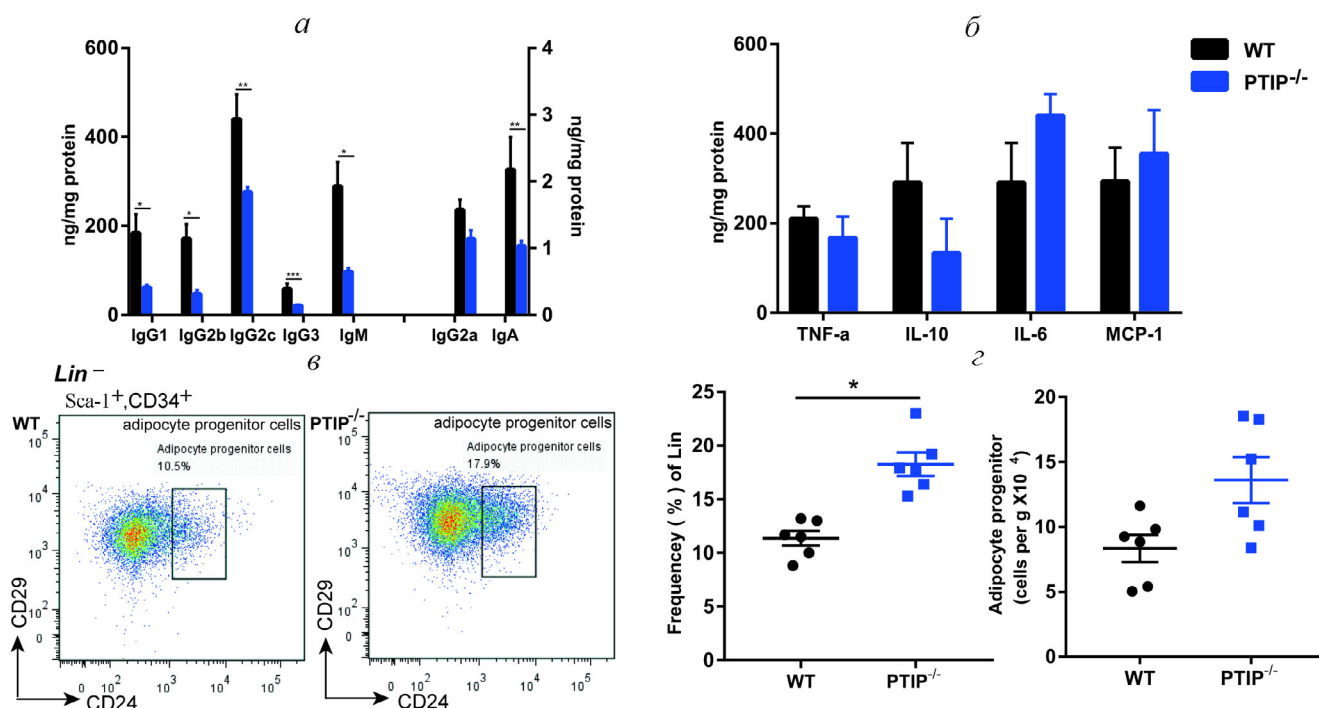


Рис. 3. Профиль антител и клетки-предшественники адипоцитов в пПЖТ. а – Уровни антител в пПЖТ у мышей 8-недельного возраста ($n = 6-14$; правая ось Y – для IgG2a и IgA; WT – черные столбцы, *Ptip*^{-/-} – синие столбцы); б – концентрация цитокинов в пПЖТ у мышей 8-недельного возраста ($n = 3-6$); в – данные проточной цитометрии; г – частота и количество клеток-предшественников адипоцитов из пПЖТ (Lin^-) у мышей 6–8-недельного возраста ($n = 6$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

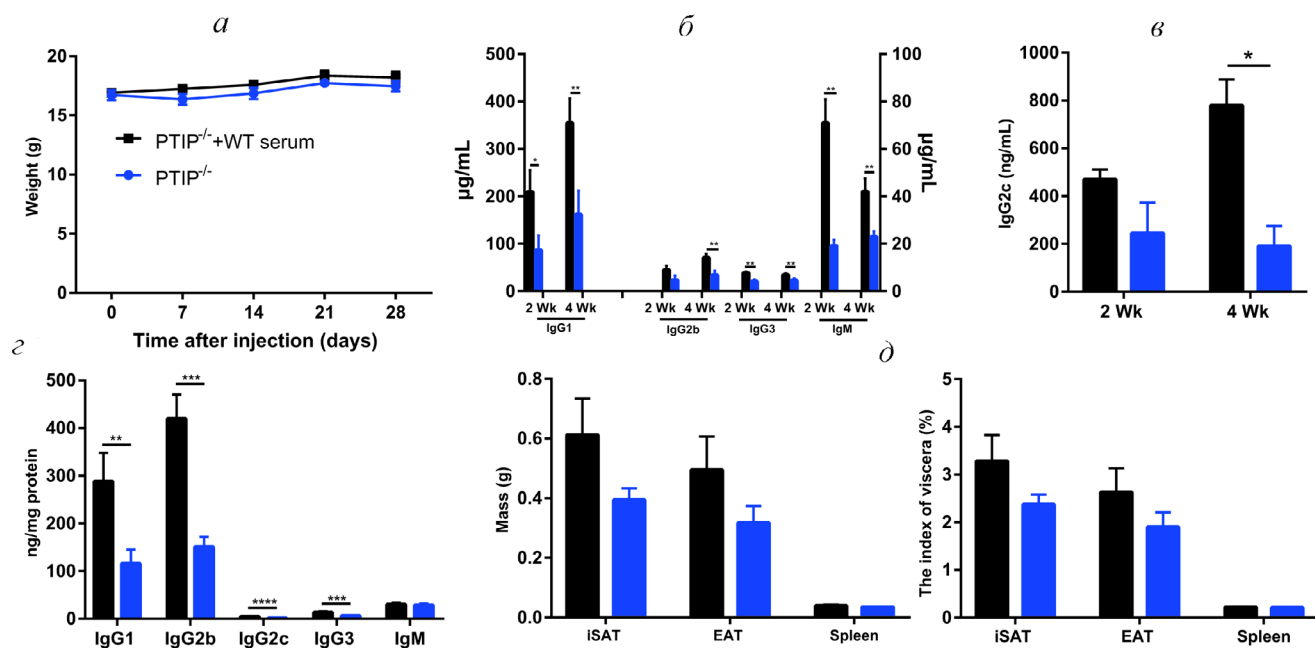


Рис. 4. Устойчивые уровни антител IgM и IgG *in vivo* не связаны с регуляцией запасаения подкожного жира. *a* – Изменение массы тела мышей в течение 4 недель инъекций; *б, в* – уровни антител IgG и IgM в сыворотке крови после 2 и 4 недель инъекций (левая ось Y – для данных по IgG1); *г* – уровни антител IgG и IgM в пПЖТ после 4 недель инъекций; *д* – висцеральная масса и висцеральные индексы мышей после 4 недель инъекций (iSAT – пПЖТ, EAT – эпидидимальная жировая ткань, spleen – селезенка). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) ($n = 5-12$; WT – черные столбцы, *Ptip*^{-/-} – синие столбцы; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

по сравнению с контрольной группой у мышей-реципиентов заметно не было (рис. 4, *д*). В совокупности эти результаты указывают на то, что значения устойчивых уровней антител IgM и IgG *in vivo* не связаны с регуляцией запасаения подкожного жира.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Распределение жира и дисфункция жировой ткани считаются решающими факторами при прогнозировании развития метаболических нарушений, связанных с ожирением [27, 28]. Важность поддержания жировой массы в пределах нормы также подтверждается исследованиями о взаимосвязи избытка или дефицита жира с метаболическими нарушениями [29]. Согласно некоторым исследованиям [30], у мышей, страдающих ожирением, В1-клетки и антитела IgM в ВЖТ способствуют развитию воспалительного процесса в жировой ткани и непереносимости глюкозы. В настоящем исследовании мы впервые демонстрируем, что В-клетки регулируют гомеостаз жировой ткани и в физиологических условиях. Дефицит РТИР в В-клетках нарушает гомеостаз жировой ткани, что приводит к значительному снижению запасаения подкожного жира и размера адипоцитов.

Увеличение жировых депо из-за избыточного потребления энергии может происходить либо за счет повышения количества липидов в зрелых адипоцитах (гипертрофия), либо за счет увеличения количества зрелых адипоцитов путем стимуляции дифференцировки клеток ПА (гиперплазия) [31, 32]. Считается, что увеличение ПЖТ опосредовано гипертрофией адипоцитов, т.е. именно морфология ПЖТ является наиболее уязвимой [33]. В нашем исследовании запасаение пПЖТ и размер адипоцитов у мышей *Ptip*^{-/-}, получавших нормальную диету, были значительно снижены по сравнению с контролем. Тем не менее не было обнаружено никаких различий в запасаении пПЖТ у мышей *Ptip*^{-/-}, получавших диету с высоким содержанием жиров, по сравнению с WT-мышьями. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что регуляторное влияние РТИР на запасаение подкожного жира различается у животных в нормальном физиологическом состоянии и при патологии.

Наиболее распространенным типом липидов в жировых депо здорового организма являются ТАГ, их состав влияет на уровень FFA в сыворотке крови, регулируя их высвобождение из жировой ткани [34]. В настоящем исследовании общий уровень ТАГ в пПЖТ мышей *Ptip*^{-/-} не претерпел изменений, в то время как уровни конкретных типов ТАГ с разной длиной углерод-

ной цепи заметно отличались. В пПЖТ мышей *Ptip*^{-/-} были значительно снижены такие ТАГ, как C56:7 (C20:4, C18:1, C18:2), C56:4 (C18:1, C18:2, C20:1) и C56:3 (C18:1, C18:1, C20:1), которые, как известно, ассоциированы с диабетом 2-го типа [24, 35]. Данный результат свидетельствует о том, что В-клетки участвуют в регуляции состава ТАГ в ПЖТ, и риск развития метаболических заболеваний у *Ptip*^{-/-} мышей может быть ниже по сравнению с WT-мышцами. Уровни ТАГ, ассоциированных с адипогенным потенциалом ПЖТ (C56:4 и C57:4, содержащие C18:2 и C16:0), были ниже в пПЖТ мышей *Ptip*^{-/-} [24]. В проведенном ранее исследовании также было показано, что отсутствие РТИР в бурой жировой ткани заметно снижает массу жировой ткани и что РТИР влияет на адипогенез в бурой жировой ткани, регулируя экспрессию *PPARγ* и *C/EBPα* [14]. В настоящем исследовании различий в экспрессии РТИР в ПЖТ у мышей WT и *Ptip*^{-/-} обнаружено не было. Учитывая тот факт, что клетки SVF пПЖТ мышей WT и *Ptip*^{-/-} демонстрировали сходный адипогенный потенциал и способность к пролиферации (рис. S1c в Приложении), мы предположили, что снижение запаса подкожного жира может быть не связано с адипогенным потенциалом. Кроме того, было обнаружено, что количество ПА-клеток у мышей *Ptip*^{-/-} было нормальным, что исключает возможность того, что снижение запаса подкожного жира у *Ptip*^{-/-} мышей вызвано недостаточным количеством ПА-клеток в пПЖТ.

Антитела гуморального иммунитета позвоночных подразделяются на постиммунные и естественные. Постиммунные антитела вырабатываются В2-клетками (FO/фолликулярными В-клетками), в то время как естественные антитела в основном вырабатываются подобными врожденным В1-клетками. В настоящем исследовании продемонстрировано, что уровень запаса ПЖТ оставался неизменным, несмотря на значительное повышение уровней устойчивых антител IgG и IgM в сыворотке крови у мышей *Ptip*^{-/-} после инъекции сыворотки от WT-мышей. Это означает, что при нормальных физиологических условиях устойчивые уровни антител IgG и IgM не влияют на запаса ПЖТ. Мыши с дефицитом РТИР имели нормальное количество В2-клеток, однако важно отметить, что эти клетки не подвергаются BCR- и CD40-индуцированной стимуляции пролиферации [16]. Поэтому, предположительно, влияние РТИР на запаса подкожного жира связано в основном с изменением некоторых функций В-клеток, таких как презентация эндогенных липидных антигенов в жировой ткани [8] или регуляцией всасывания липидов в кишеч-

нике путем изменения иммунной среды кишечника [36]. Для проверки этих гипотез требуются дополнительные исследования.

Таким образом, впервые было продемонстрировано на мышах, получавших стандартный корм, что при нормальных физиологических условиях делеция *Ptip* в В-клетках приводит к изменению отложения жира, состава триглицеридов и размеров подкожных адипоцитов. Мы обнаружили неожиданное влияние РТИР на регуляцию гомеостаза жировой ткани через В-клетки. Полученные нами результаты дают ценную информацию для дальнейшего изучения метаболизма при различных физиологических условиях. Дефицит РТИР в В-клетках приводит к нарушению выработки устойчивых и постиммунных IgM и IgG антител у мышей. Подобный первичный дефицит антител является отличительной чертой общей варибельной иммунной недостаточности (ОВИН) у человека. Пациенты с ОВИН или приобретенным иммунодефицитом (таким как следствие ВИЧ-инфекции) также имеют симптомы идиопатической мальабсорбции и низкой прибавки в весе [36]. Таким образом, наши исследования вносят вклад в понимание причин аномального запаса жира, наблюдаемого у пациентов с иммунодефицитными расстройствами.

Финансирование. Исследование было поддержано Национальным фондом естественных наук Китая (грант № 31872794), Фондом естественных наук провинции Цзянсу (№ BK20181346), Национальной программой ключевых исследований и разработок Китая (2017YFD0400200) и Национальным фондом естественных наук Китая (грант № 31771539).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или любой другой сфере.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты, проведенные на животных в этом исследовании, были одобрены Комитетом по этике при работе с лабораторными животными Университета Цзяннань (разрешение JN № 20200710c0440930 [167]). Соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные руководящие принципы по уходу за лабораторными животными и работе с ними.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 7, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murawska-Ciałowicz, E. (2017) Adipose tissue – morphological and biochemical characteristic of different depots, *Postepy Higieny Med. Doswiad. (Online)*, **71**, 466-484, doi: 10.5604/01.3001.0010.3829.
2. Mundi, M. S., Karpyak, M. V., Koutsari, C., Votruba, S. B., O'Brien, P. C., and Jensen, M. D. (2010) Body fat distribution, adipocyte size, and metabolic characteristics of nondiabetic adults, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, 67-73, doi: 10.1210/jc.2009-1353.
3. Abate, N., Garg, A., Peshock, R. M., Stray-Gundersen, J., Adams-Huet, B., and Grundy, S. M. (1996) Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM, *Diabetes*, **45**, 1684-1693, doi: 10.2337/diab.45.12.1684.
4. Weyer, C., Wolford, J. K., Hanson, R. L., Foley, J. E., Tataranni, P. A., et al. (2001) Subcutaneous abdominal adipocyte size, a predictor of type 2 diabetes, is linked to chromosomal 1q21–q23 and is associated with a common polymorphism in LMNA in Pima Indians, *Mol. Genet. Metab.*, **72**, 231-238, doi: 10.1006/mgme.2001.3147.
5. Dalmas, E. (2019) Role of innate immune cells in metabolism: from physiology to type 2 diabetes, *Semin. Immunopathol.*, **41**, 531-545, doi: 10.1007/s00281-019-00736-5.
6. Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., et al. (2008) T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1304-1310, doi: 10.1161/atvbaha.108.165100.
7. Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., et al. (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies, *Nat. Med.*, **17**, 610-617, doi: 10.1038/nm.2353.
8. Kane, H., and Lynch, L. (2019) Innate immune control of adipose tissue homeostasis, *Trends Immunol.*, **40**, 857-872, doi: 10.1016/j.it.2019.07.006.
9. Khokher, M. A., Woods, R. J., and Dandona, P. (1984) Human immunoglobulin M stimulates adipocyte lipogenesis, *Metab. Clin. Exp.*, **33**, 208-211, doi: 10.1016/0026-0495(84)90037-4.
10. Khokher, M. A., Janah, S., and Dandona, P. (1983) Human immunoglobulin G stimulates human adipocyte lipogenesis, *Diabetologia*, **25**, 264-268, doi: 10.1007/bf00279941.
11. Cho, E. A., Prindle, M. J., and Dressler, G. R. (2003) BRCT domain-containing protein PTIP is essential for progression through mitosis, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1666-1673, doi: 10.1128/mcb.23.5.1666-1673.2003.
12. Callen, E., Faryabi, R. B., Luckey, M., Hao, B., Daniel, J. A., et al. (2012) The DNA damage- and transcription-associated protein paxip1 controls thymocyte development and emigration, *Immunity*, **37**, 971-985, doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.007.
13. Kim, D., Patel, S. R., Xiao, H., and Dressler, G. R. (2009) The role of PTIP in maintaining embryonic stem cell pluripotency, *Stem Cells*, **27**, 1516-1523, doi: 10.1002/stem.79.
14. Cho, Y. W., Hong, S., Jin, Q., Wang, L., Lee, J. E., et al. (2009) Histone methylation regulator PTIP is required for PPARgamma and C/EBPalpha expression and adipogenesis, *Cell Metab.*, **10**, 27-39, doi: 10.1016/j.cmet.2009.05.010.
15. Daniel, J. A., Santos, M. A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K. R., et al. (2010) PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination, *Science*, **329**, 917-923, doi: 10.1126/science.1187942.
16. Su, D., Vanhee, S., Soria, R., Gyllenbäck, E. J., Starnes, L. M., et al. (2017) PTIP chromatin regulator controls development and activation of B cell subsets to license humoral immunity in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9328-E9337, doi: 10.1073/pnas.1707938114.
17. Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., and Friedman, J. M. (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*, *Cell*, **135**, 240-249, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.036.
18. Cho, K. W., Morris, D. L., and Lumeng, C. N. (2014) Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages, *Methods Enzymol.*, **537**, 297-314, doi: 10.1016/b978-0-12-411619-1.00016-1.
19. Yang, Q., Sun, J., and Chen, Y. Q. (2016) Multi-dimensional, comprehensive sample extraction combined with LC-GC/MS analysis for complex biological samples: application in the metabolomics study of acute pancreatitis, *RSC Adv.*, **6**, 25837-25849, doi: 10.1039/c5ra26708k.
20. Vieira, P., and Rajewsky, K. (1988) The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice, *Eur. J. Immunol.*, **18**, 313-316, doi: 10.1002/eji.1830180221.
21. Li, D., Zhang, L., Xu, L., Liu, L., He, Y., et al. (2017) WIP1 phosphatase is a critical regulator of adipogenesis through dephosphorylating PPARγ serine 112, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 2067-2079, doi: 10.1007/s00018-016-2450-4.
22. Saltiel, A. R., and Olefsky, J. M. (2017) Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease, *J. Clin. Invest.*, **127**, 1-4, doi: 10.1172/jci92035.
23. Kotronen, A., Seppänen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., et al. (2010) Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum, *Obesity*, **18**, 937-944, doi: 10.1038/oby.2009.326.
24. Al-Sulaiti, H., Diboun, I., Banu, S., Al-Emadi, M., Amani, P., et al. (2018) Triglyceride profiling in adipose tissues from obese insulin sensitive, insulin resistant and type 2 diabetes mellitus individuals, **16**, 175, doi: 10.1186/s12967-018-1548-x.
25. Joe, A. W., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W., and Rossi, F. M. (2009) Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet, *Stem Cells*, **27**, 2563-2570, doi: 10.1002/stem.190.
26. Hardy, R. R., Wei, C. J., and Hayakawa, K. (2004) Selection during development of VH11⁺ B cells: a model for natural autoantibody-producing CD5⁺ B cells, *Immunol. Rev.*, **197**, 60-74, doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0100.x.
27. Goossens, G. H. (2017) The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function, *Obesity Facts*, **10**, 207-215, doi: 10.1159/000471488.
28. Bracht, J. R., Vieira-Potter, V. J., and De Souza Santos, R. (2020) The role of estrogens in the adipose tissue milieu, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1461**, 127-143, doi: 10.1111/nyas.14281.
29. Zhang, R., Gao, Y., Zhao, X., Gao, M., Wu, Y., et al. (2018) FSP1-positive fibroblasts are adipogenic niche and regulate adipose homeostasis, *PLoS Biol.*, **16**, e2001493, doi: 10.1371/journal.pbio.2001493.
30. Harmon, D. B., Srikakulapu, P., Kaplan, J. L., Oldham, S. N., McSkimming, C., et al. (2016) Protective role for B-1b B cells and IgM in obesity-associated inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **36**, 682-691, doi: 10.1161/atvbaha.116.307166.
31. Jeffery, E., Church, C. D., Holtrup, B., Colman, L., and Rodeheffer, M. S. (2015) Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 376-385, doi: 10.1038/ncb3122.
32. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., and Scherer, P. E. (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue

- development, expansion and regeneration, *Nat. Med.*, **19**, 1338-1344, doi: 10.1038/nm.3324.
33. Hou, Y., Liu, Z., Zuo, Z., Gao, T., Fu, J., et al. (2018) Adipocyte-specific deficiency of Nfe2l1 disrupts plasticity of white adipose tissues and metabolic homeostasis in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 264-270, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.013.
34. Perona, J. S., Portillo, M. P., Teresa Macarulla, M., Tueros, A. I., and Ruiz-Gutiérrez, V. (2000) Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue, *Br. J. Nutr.*, **84**, 765-774.
35. Hou, B., Zhao, Y., He, P., Xu, C., Ma, P., et al. (2020) Targeted lipidomics and transcriptomics profiling reveal the heterogeneity of visceral and subcutaneous white adipose tissue, *Life Sci.*, **245**, 117352, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117352.
36. Shulzhenko, N., Morgun, A., Hsiao, W., Battle, M., Yao, M., et al. (2011) Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut, *Nat. Med.*, **17**, 1585-1593, doi: 10.1038/nm.2505.

PTIP DEFICIENCY IN B LYMPHOCYTES REDUCES SUBCUTANEOUS FAT DEPOSITION IN MICE

Yaqin Xu¹, Doudou Zhu², Qin Yang², Dan Su^{2*}, and Yong Q. Chen^{2,3*}

¹ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

² Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China;
e-mail: dan.su@jiangnan.edu.cn, yqchen@jiangnan.edu.cn

³ Wuxi Translational Medicine Research Center and Jiangsu Translational Medicine Research Institute Wuxi Branch, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

Recent studies have predominantly focused on the role of B cells in metabolic diseases, yet the function of B cells in adipose homeostasis remains unclear. Pax transactivation domain-interacting protein (PTIP), a licensing factor for humoral immunity, is necessary for B cell development and activation. Here, using mice that lack PTIP in B cells (*Ptip*^{-/-} mice), we explored the role of B cells in adipose homeostasis under physiological conditions. Fat deposition in 8-week-old mice was measured by micro-CT, and *Ptip*^{-/-} mice presented a marked decrease in the deposition of subcutaneous adipose tissue (SAT). Untargeted lipidomics revealed that the triglyceride composition in SAT was altered in *PTIP*^{-/-} mice. In addition, there was no difference in the number of adipocyte progenitor cells in the SAT of wild-type (WT) and *Ptip*^{-/-} mice as measured by flow cytometry. To study the effects of steady-state IgM and IgG antibody levels on fat deposition, *Ptip*^{-/-} mice were injected intraperitoneally with serum from WT mice once every 3-4 days for 4 weeks. The iSAT mass of the recipient mice showed no significant increase in comparison to the controls after 4 weeks of injections. Our findings reveal that PTIP plays an essential role in regulating subcutaneous adipocyte size, triglyceride composition, and fat deposition under physiological conditions by controlling B cells. The decreased subcutaneous fat deposition in *Ptip*^{-/-} mice does not appear to be related to the number of adipocyte progenitor cells. The steady-state levels of IgM and IgG antibodies *in vivo* are not associated with the subcutaneous fat deposition.

Keywords: PTIP, B lymphocytes, subcutaneous fat deposition, adipose homeostasis