УЛК 57.085.23:575.164

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *РРА Ватерания* БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВ РсG И pRb В ХОДЕ ЖИРОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2020 г. В. М. Рябов¹, Н. А. Верещагина¹, Н. С. Петров¹, М. В. Литвинова¹, Б. В. Попов^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: borisvp478@gmail.com Поступила в редакцию 02.08.2020 г. После доработки 16.08.2020 г. Принята к публикации 17.08.2020 г.

Сигнальные пути, ассоциированные с формирование фенотипа жировых клеток, сходятся на регуляции экспрессии тканеспецифического гена *PPAR*у2. В настояшей работе изучали взаимодействие белков Ezh2. Bmi1, и Utx, которые регулируют уровень метилирования сайта H3K27, и p130 (члена семейства pRb) с промотором гена *PPAR*ү2, регулятора жировой дифференцировки (ЖД), в ходе ЖД мышиных мезенхимных стволовых клеток (MCK) с помощью метода иммунопреципитации хроматина. В недифференцированных клетках промоторы *PPARy2* и контрольного гена RUNX2, регулятора костной дифференцировки, накапливали высокий уровень Bmi1, Ezh2, и низкий уровень Utx. Белок p130 выявлялся в недифференцированных клетках на высоком уровне на промоторе $PPAR\gamma 2$, но не RUNX2. Такие взаимодействия белков с ДНК изменялись при ЖД противоположным образом на промоторе *PPAR*ү2, но не изменялись на промоторе RUNX2. В клетках с инактивированным BMI1 на промоторе PPARy2 в условиях ЖД отмечали незначительное снижение уровня H3K27me3, и повышение уровня деметилазы Utx. Наши результаты предполагают, что экспрессия PPARy2 в терминальной фазе ЖД в мышиных MCK активируется Utx, но супрессируется Bmi1, Ezh2, и p130. Эти данные поддерживают гипотезу о том, что в ходе дифференцировки происходит потеря супрессивной метки H3K27me3 в бивалентных доменах регуляторных генов, включая $PPAR\gamma 2$, что способствует формированию тканеспецифического фенотипа.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, жировая дифференцировка, регуляция экспрессии РРАРу2, белки Bmi1, Ezh2, Utx, p130 DOI: 10.31857/S0041377120120044

Тканеспецифическая дифференцировка представляет собой процесс динамического репрограммирования экспрессии ряда регуляторных и эффекторных генов. Дифференцировка включает два этапа: начальный, коммитирование, в котором стволовая полипотентная клетка выбирает клеточную судьбу и теряет полипотентность, и терминальный, в котором экспрессируются индукторы и эффекторы дифференцировки, формирующие тканеспецифический фенотип (Rosen, MacDonald, 2006). Жировые клетки возникают из мезенхимных стволовых клеток (МСК), которые образуют при коммитировании три- и двупотентные клетки-прелшественники жировой, костной, мышечной, хрящевой и других тканей (Tang, Lane, 2012).

Существуют белая и бурая жировые ткани, которые возникают из разных клеток-предшественников. Белая жировая ткань (БЖТ) возникает из единых предшественников с быстро сокращающимися мышечными клетками, а бурая жировая ткань (БРЖТ) – из предшественников, общих для клеток БРЖТ и медленно сокращающихся мышечных клеток (Hallenborg et al., 2009). Семейство белков продукта гена ретинобластомы (pRb) регулирует ЖД на обоих этапах. Клетки, в которых отсутствует pRb, экспрессируют мышечные маркеры миогенин и тяжелую цепь мышечного миозина на более высоком уровне по сравнению с клетками дикого типа (Schneider et al., 1994). Введение в мезенхимные стволовые клетки (МСК) функционально активных форм экзогенного pRb активирует их дифференцировку в БЖТ (Попов и др., 2015), а функционально неактивной формы – в клетки, продуцирующие мышечные маркеры (Попов и др., 2010). Эти данные свидетельствуют о регуляторной

Принятые сокращения: БЖТ – белая жировая ткань; БРЖТ – бурая жировая ткань; БСА – бычий сывороточный альбумин; ЖД – жировая дифференцировка; КТ – комнатная температура; МСК – мезенхимные стволовые клетки, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ПРЦ-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени; СК стволовые клетки; ФБС – фетальная бычья сыворотка; Chip – иммунопреципитация хроматина; Gfp - зеленый флуоресцирующий белок; PcG - белки семейства Polycomb; pRb - продукт гена ретинобластомы, основатель семейства pRb.

роли pRb в коммитировании ЖД. В случае потери гена *RB* эмбриональные полипотентные фибробласты теряют способность дифференцироваться в жировом направлении, в основе чего лежит отсутствие активации pRb белков семейства CBP, инициирующих экспрессию гена *PPAR*ү2, который определяет ход терминальной фазы ЖД (Chen et al., 1996; Rosen et al., 2002). pRb и член его семейства p107 способствуют образованию БЖТ путем транскрипционной супрессии синтеза индукторов БРЖТ UCP1 и PGC-1α в преадипоцитах (Hansen et al., 2004; Scimè et al., 2007). С другой стороны, pRb и белок p130, входящий в состав семейства pRb, ингибируют развитие терминальной фазы ЖД путем транскрипционной супрессии продукции Ррагу2 при формировании комплекса с белком E2f4 в его промоторе (Fajas et al., 2002).

К другим факторам стволовых клеток (СК), играющих важную роль в коммитировании и терминальной дифференцировке клеток различных линий, относятся белки семейства Polycomb (PcG). Изучение генома эмбриональных СК с помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChiP) с последующим секвенированием показало, что 20% генов эмбриональных СК взаимодействуют с комплексами, в состав которых входят белки семейства PcG. Эти гены вовлечены в регуляцию клеточной судьбы и дифференцировки клеток, к ним относятся гены семейств генеральных транскрипционных факторов HOX, SOX, FOX, а также гены семейств Wnt, BMP, Notch, продукты которых регулируют клеточную дифференцировку (Boyer et al., 2006).

РсG формирует два основных репрессивных комплекса: polycomb-репрессивный комплекс 1 (PRC1), который опосредует моноубиквитинирование лизина 119 гистона H2A (H2AK119ub) (Wang et al., 2010; Gutièrrez et al., 2012), и polycomb-репрессивный комплекс 2 (PRC2), который триметилирует 27-ой лизин гистона H3 (H3K27me3) (Cao et al., 2002; Müller et al., 2002). Стабильная репрессия генов-мишеней основана на взаимодействии PRC1 и PRC2. Существует две точки зрения на механизм взаимодействия таких комплексов. В соответствии с канонической точкой зрения, сначала PRC2 триметилирует НЗК27 в промоторах генов-мишеней, создавая сайты связывания для PRC1, затем PRC1 моноубиквитинирует гистон Н2А, способствуя стабильному связыванию комплексов с хроматином (рис. 1*a*). Более современная точка зрения утверждает, что первым шагом в механизме репрессии, опосредованной PcG, является связывание с хроматином PRC1 (Blackledge et al., 2014; Cooper et al., 2014; Kalb et al., 2014), который формирует сайт связывания для PRC2 (Merini, Calonje, 2015).

PRC1 формируется при взаимодействии субсемейств пяти различных белков: Cbx (белки семейство chromobox), Ring1B/Ring1A, Pcgf (PcG Ring Finger), Phc (семейство белков polyhomeotic), и Rybp

(белок связывающий Ring1/Yy1), который соединяет PRC1 с Yv1 (Tavares et al., 2012). Ring1 обладает слабой ЕЗ-лигазной активностью, тогда как гетеродимер Ring1/Pcgf убиквитинирует лизин 119 гистона H2A (H2AK119ub) со значительно более высокой активностью и формирует минимальный комплекс PRC1, в котором компонент Pcgf определяет структуру и биохимические свойства полного комплекса (Buchwald et al., 2006; Bentley et al., 2011). Гетеродимеры, формирующиеся из Bmi1/Pcgf4, образуют канонический PRC1, включающий дополнительно субъединицы Phc и Cbx. Последний содержит хромодомен и распознает триметилированный по лизину 27 гистон H3 (H3K27me3) (рис. 16). Ring1/Pcgf1, 3. 5. 6 формируют неканонический PRC1. который включает Rybp вместо Cbx и Phc. Неканонический PRC1 не способен связывать H3K27me3, однако превосходит канонический PRC1 в способности убиквитинировать H2AK119, т. к. Rybp является активной убиквитиновой трансферазой. Убиквитинированный Н2АК119 служит специфической меткой для распознавания PRC2 (Schwartz, Pirotta, 2013). После связывания H2AK119ub, PRC2 триметилирует НЗК27, создавая специфический сайт для канонического PRC1, который распознается хромодоменом Сbx (рис. 1б).

Коровый комплекс PRC2 формируется тремя основными белками: Ezh2/Ezh1, Eed и Suz12. Этот комплекс функционирует как гистоновая метилтрансфераза, способствуя триметилированию НЗК27, который служит сайтом связывания для канонического PRC1. Взаимодействие комплексов PcG необходимо для эпигенетического сайленсинга генов дифференцировки и самоподдержания СК в клетках тканей зрелых животных (Simon, Kingston, 2009; Sauvageau, Sauvageau, 2010; Surface et al., 2010). Регуляция экспрессии таких генов осуществляется при взаимодействии супрессивных доменов, формирующихся белками PcG, и активирующих доменов, формирующихся белками семейства Trithorax (TrxG). Белки TrxG триметилируют лизин 4 гистона Н3 (Н3К4ме3), который активирует промотор. Таким образом, в промоторах генов, ответственных за самоподдержание и дифференцировку СК, создаются бивалентные домены, которые тормозят экспрессию гена-хозяина (рис. 1в). При клеточной дифференцировке происходит освобождение дифференцировочных генов от репрессии, опосредованной PRC2, в основе чего лежит инактивация H3K27me3 в бивалентных доменах (рис. 1в) (Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007). Продукция Ezh2 и H3K27me3 в дифференцировочных генах снижается при мышечной и эпидермальной дифференцировке (Caretti et al., 2004; Ezhkova et al., 2009).

Существует гипотеза, что метилтрансфераза Ezh2, метилирующая сайт H3K27, и деметилаза Utx, удаляющая метильные остатки с этого сайта, формируют эпигенетический переключатель с костной дифференцировки на ЖД в общих клетках-предше-



Рис. 1. Структурная организация белков семейства Polycomb (PcG). a – Канонический механизм взаимодействия комплексов PRC1 и PRC2 семейства PcG. Метилтрансфераза, входящая в состав комплекса PRC2, включающего также Eed и Suz12, триметилирует лизин 27 гистона H3 (H3K27), который распознается белком Cbx комплекса PRC1. Убиквитиновая лигаза Ring1 в составе коровой субъединицы Ring1/Bmi1 моноубиквитинирует лизин 119 гистона H2A (H2AK119ub), создавая стабильную связь PcG с хроматином. δ – Неканонический механизм рекрутирования к ДНК и взаимодействия комплексов PRC1 и PRC2. Неканонический PRC1 (ncPRC1), содержащий связывающий ДНК белок Yy1 и вспомогательный белок Rybp, рекрутируется к хроматину и убиквитинирует H2AK119, формируя сайт связывающий ДНК белок Yy1 и вспомогательный белок Rybp, рекрутируется к хроматину и убиквитинирует H2AK119, формируя сайт связывающий ДНК белок Yy1 и вспомогательный белок Rybp, рекрутируется к хроматину и убиквитинирует H2AK119, формируя сайт связывающий ДНК белок Yy1 и вспомогательный белок Rybp, рекрутируется к хроматину и убиквитинирует H2AK119, формируя сайт связывающий ДНК белок Yy1 и вспомогательный белок Rybp, рекрутируется к хроматину и убиквитинирует H2AK119, формируя сайт связывания на хроматине для PRC2. PRC2 распознает H2AK119ub с помощью вспомогательного белка Jarid2 и, в свою очередь, триметилирует H3K27, создавая сайт связывания для канонического PRC1 (cPRC1). e – Структура бивалентных доменов в промоторах генов, регулирующих клеточную дифференцировку. Промоторы генов, поддерживающих тканеспецифическую дифференцировку, содержат "бивалентные" домены, включающи активную (H3K4me3) и репрессивную метку (H3K27me3) и репрессивную метку (H3K27me3) и репрессивную метку (H3K27me3, утрата которой при индукции дифференцировки сопровождается активацией их экспрессии.

ственниках путем регуляции уровня H3K27me3 в промоторах тканеспецифических регуляторных генов, соответственно RUNX2 и PPAR $\gamma 2$ (Hemming et al., 2014). Усиленная экспрессия EZH2 в MCK повышает уровень транскриптов EZH2, белка Ezh2 и H3K27me3, но снижает транскрипцию тканеспецифического регулятора костной дифференцировки RUNX2 и поздних маркеров костной дифференцировки остеопонтина и остеокальцина (Hemming et al., 2014). Активность Ezh2/Utx регулируется путем взаимодействия PRC1/PRC2 и включает Ezh2 и Bmil в качестве ключевых регуляторных белков этих комплексов. С другой стороны, Ezh2 и Utx находятся под контролем белков семейства pRb (рис. 1a) (Bracken et al., 2003; Herz et al., 2010). Инактивирующие мутации *RB* связаны с увеличением активности

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 12 2020

Ezh2 и Eed. Продукция этих белков так же, как и продукция Bmi1, значительно возрастает в опухолях различной тканевой специфичности (Bracken et al., 2003; Bracken, Helin, 2009; Cao et al., 2011). К тому же Ezh2 и Bmi1 способны метилировать H3K27 только в клетках с активным pRb (Kotake et al., 2007).

Клетки линии C3H10T1/2 (10T1/2) представляют собой широко используемую модель ЖД мышиных МСК (Tang, Lane, 2012), которая позволяет изучить роль регуляторных белков семейств Polycomb (PcG) и белков семейства продукта гена ретинобластомы (pRb) в ЖД путем анализа их взаимодействия с тканеспецифическим регуляторным геном *PPAR* $\gamma 2$. Экспрессия *PPAR* $\gamma 2$ необходима для дифференцировки преадипоцитов в адипоциты, и его уровень значительно повышается в ходе конечной стадии

ЖД (Rosen et al., 2002). Белки семейства РсG тормозят экспрессию тканеспецифических регуляторных генов в делящихся эмбриональных и соматических СК и, наоборот, угнетают активность генов плюрипотентности в ходе дифференцировки СК (Surface et al., 2010; Morey et al., 2012).

Цель настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия Ezh2, Bmi1, Utx, и p130 – члена семейства pRb, с промотором гена $PPAR\gamma 2$ в ходе ЖД мышиных МСК. Первая задача заключалась в инлукции ЖЛ в клетках 10Т1/2 и количественной оценке ее уровня через 10 сут после индукции. Вторая задача — инактивировать ген BMI1, используя специфическую шпилечную РНК (siRNA), и оценить уровень и динамику ЖД в условиях инактивашии *BMI1*. Третья задача заключалась в оценке vpoвня РНК и регуляторных белков Ppary2, Bmi1, Ezh2, Utx, p130 в клетках, индуцированных к ЖД, в условиях инактивации BMI1. Наконец, наш план включал изучение взаимодействия перечисленных выше белков, с промоторами PPARy2 и RUNX2 с помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChiP) в ходе ЖД.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Мышиные эмбриональные фибробласты линии СЗН10Т1/2 (10Т1/2), полученные из Американской коллекции клеточных культур (АТСС), культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 50 мкг/мл гентамицина в СО2-инкубаторе (5% СО2 и влажность 100%).

Индукция и количественная оценка ЖТ. Клетки 10T1/2 в количестве 10⁴ кл./чашка в логарифмической фазе роста культивировали на покровных стеклах для микроскопии в культуральных чашках 35 мм в 1.5 мл ростовой среды. На следующие сутки ростовую среду заменяли специальной дифференцировочной (ЖД), содержащей 50 мкг/мл гентамицина, 10% ФБС, 5 мкг/мл инсулина, 50 мкМ индометацина, 1×10^{-6} М дексаметазона, 0.5 мкМ 3-изобутил-1метилксантина (Sigma, США). Жировые включения выявляли на 7-, 10- и 14-е сут после индукции ЖД. Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в PBS в течение 1 ч. Фиксированные клетки промывали дважды дистиллированной водой, один раз 60%-ным изопропанолом (Вектон, Россия), высушивали, окрашивали 10 мин красителем масляным красным (Sigma, США) и промывали 4 раза дистиллированной водой. Раствор красителя готовили. смешивая 6 частей раствора, содержащего 35 мкг/мл красителя в 100%-ном изопропаноле, с 4 частями дистиллированной воды. Перед нанесением на клетки краситель фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. ЖД оценивали в проходящем свете на микроскопе Pascal (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 10×. Для количественной оценки ЖД краситель экстрагировали в 1 мл 100%-ного изопропанола и его содержание в растворе определяли по оптической плотности на спектрофотометре Nanodrop (США) при длине волны 520 нм. Для получения РНК 1.5×10^5 клеток культивировали в течение 10 сут на чашках 100 мм и индушировали ЖД по вышеописанной методике. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Нокдаун гена *ВМІ1*. Лентивирусный вектор FUGW-H1. содержаший малую интерферирующая РНК против BMI1 (siBMI1) был получен от д-ра Sally Temple (компания Addgene, плазмида № 21576, США) (Fasano et al., 2007). Вектор экспрессирует зеленый флюоресцирующий белок (Gfp) и малую интерферирующую РНК против BMI1 (siBMI1), содержащую 19-мерную последовательность GAGATAATA-АGCTTGTCTA. направленную против открытой рамки считывания гена ВМП. Для упаковки лентивирусных частиц клетки линии 293Т были котрансфецированы при помощи кальций-фосфатного метода плазмидами FUGW-H1 siBMI1, psPAX2 и pMD2.G (Tronolab, США) в количестве 11, 8 и 4 мкг на одну 100-миллиметровую культуральную чашку соответственно. На следующий день после трансфекции среду заменяли на свежую. Среду, содержащую вирусные частицы, собирали на 2 и 3-и сут после трансфекции и фильтровали через фильтр с размером пор 45 нм. Титр вируса определяли на клетках 293Т, инфицируя их средой с вирусом в 10-кратных разведениях и определяя долю клеток, экспрессирующих Gfp, цитофлюориметрически на цитометре Beckman Coulter (США). Используемая нами среда содержала 2×10^6 вирусных единиц в 1 мл среды. Клетки линии 10T1/2 высевали в количестве 2 × 10^5 на чашки 60 мм. На следующий день ростовую среду заменяли 2 мл среды, содержащей вирусные частицы, и инкубировали в ней клетки в течение 18 ч. после чего среду заменяли на свежую. Цитофлюориметрический анализ экспрессии GFP проводили через 2 сут после инфицирования.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Общеклеточную РНК выделяли из 2 × 10⁶ клеток с помощью набора реагентов GeneJET RNA (Thermo Scientific, США). Очищенную РНК обрабатывали ДНКазой І (Thermo Scientific, США): 3 ед. в реакционном объеме 35 мкл в течение 1 ч при 37°С, после чего реакцию останавливали путем добавления на 10 мин 3.5 мкл раствора 50 мМ ЭДТА при 65°С. Количество РНК определяли спектрометрически при длине волны 260 нм, а ее целостность – при помощи электрофореза в денатурирующем агарозном геле с формальдегидом по наличию полос PHK 28S и 18S. Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 0.5 мкг праймера олиго-дТ18, объем смеси доводили до 12.5 мкл и инкубировали при 65°С 5 мин, реакционную смесь охлаждали, добавляли к ней 4 мкл 5-кратного буфера, 1 мкл (200 ед.) обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific, США), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP

цитология

870

том 62 № 12 2020

Ген	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')					
Для ПЦР							
β-актин	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC	GACTCATCGTACTCCTGCTTG					
BMI1	GGAGACCAGCAAGTATTGTCC	TTCTCCTCGGTCTTCATTGG					
EZH2	GCAATTTAGAAAACGGAAATGC	GTACAAAACACTTTGCAGCTGG					
UTX	CGGGCGACAAAAGAAGAAC	AGATGAGGCGGATGGTAATG					
RB	CATCTAATGGACTTCCAGAG	CATAACAGTCCTAACTGGAG					
p130	TTGGACTCTGTCTCGGTGTGTCTAAG	AATGCGTCATGCTCCAGAACACCAG					
PPARy2	TGACCCAGAGCATGGTGCCTTC	TGTGGCATCCGCCCAAACC					
ADIPOQ	GGAGAGAAAGGAGATGCAGGTCT	GGTAGTTGCAGTCAGTTGGTATCAT					
Для иммунопреципитации хроматина							
PPARy2	CTGGCGAGACAATGTAGCAA	TTTGGGAGAGGTGGGAATAAA					
RUNX2	CTCCAGAGGCTTAACCTTACAG	CTCTCCCTTTCTCCCTCTGAC					

Таблица 1.	Последовательности праймерс	∙в для ОТ-ПЦР и ПЦ	Р в реальном времени	, а также для иммунопрец	ипита-
ции хромат	гина				

и 0.5 мкл ингибитора PHKa3 RiboLock (Thermo Scientific, США), инкубировали 1 ч при 42°С. Реакцию останавливали нагреванием до 70°С в течение 10 мин. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе Арplied Biosystems 7300 со следующими параметрами реакции: инициирующее плавление – 5 мин 95°С, плавление – 15 с 95°С, отжиг – 30 с 58°С, синтез – 20 с 72°С, 40 циклов. Реакционная смесь состояла из 8 мкл 2.5-кратного раствора, содержащего дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP), ПЦР-буфер, MgCl₂, Тад ДНК-полимеразу, SYBR Green I и ROX (Синтол, Россия), 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров (табл. 1), синтезированных в компании Beagle (Россия), 0.2 мкл кДНК и воду до объема 20 мкл. В качестве контрольного гена использовали β-актин; относительную экспрессию генов рассчитывали по формуле $R = 2^{-\Delta\Delta C(T)}$. Для всех генов РВ-ПЦР проводили 3 раза.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 1 мкл праймера олиго-дТ18, объем смеси доводили до 12.5 мкл и инкубировали 5 мин при 65°С, затем охлаждали и добавляли 4 мкл 5-кратного буфера для обратной транскриптазы (Thermo Scientific, США), 0.5 мкл обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific, США), 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ и 0.25 мкл ингибитора PHKaз RiboLock (Thermo Scientific, США), инкубировали 1 ч при 42°С. Реакцию останавливали нагреванием до 70°С в течение 10 мин. Полученную кДНК хранили при -20°С. Для амплификации с помощью ПЦР на 1 реакцию использовали 0.5 мкл 10 мМ смеси дНТФ, 2.5 мкл 10-кратного буфера для Таq-полимеразы, по 0.1 мкл прямого и обратного праймеров (табл. 1), 0.125 мкл Таq-полимеразы и воду до 25 мкл общего объема реакционной смеси. кДНК брали в количестве 0.5 мкл. Ген GAPDH амплифицировали в ходе 25 циклов, а все экспериментальные гены – в ходе 35 циклов. Продукты ампли-

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 12 2020

фикации подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле.

Иммунофлюоресцентное окрашивание. Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в чашки 35 мм, однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4°С; обрабатывали 0.2%-ным Тритоном X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3% бычьего сывороточного альбумина и 0.1% Твина 20. Затем на клетки наносили специфические антитела (разведение 50-200 раз) в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре вторыми антителами, конъюгированными с флюоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флюоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлюоресцентные изображения получали на электронном сканирующем микроскопе Leica (Carl Zeiss, Германия), используя лазеры с длиной волны 405, 488, 543 и 633 нм, а также объектив 40×.

Электрофорез белков и иммуноблотинг. Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Объем пробы брали из расчета 50 мкг общеклеточного белка на дорожку. Пробы переносили в пробирки, содержащие равный объем буфера для нанесения проб на гель (4% SDS, 20% глицерина, 1% β-меркаптоэтанола, 120 мМ Трис-СІ (pH 6.8), 0.002% бромфеноловый синий), инкубировали в термостате 5 мин при 95°С и наносили на гель. Электрофоретическое разделение белков проводили при постоянном токе 12 мА. Белки, разделенные электрофоретически, переносили с геля на мембрану PVDF (Millipore, США) с помощью

полусухого электропереноса в камере Hoefer Semiphor ТЕ 77 (Швеция) при постоянной силе тока 70 мА. Буфер для переноса содержал 47.9 мМ Трис-HCl, 38.6 мМ глицина, 10% метанола. Для блокировки сайтов неспецифического связывания мембрану инкубировали 1 ч в блокирующем растворе (5% обезжиренного молока в TBST (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 0.05% Tween 20). Антитела для гибридизации разводили в блокирующем растворе. В качестве вторых антител использовали видоспецифичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, которую визуализировали на мембране с помощь реактива Clarity[™] Western ECL Substrate (BioRad, США). Для этого компоненты набора смешивали в соотношении 1:1 из расчета 0.1 мл раствора на 1 см² мембраны, наносили на мембрану и инкубировали 5 мин. Изображения препаратов, активированных с помощью хемилюминесценции, получали на приборе ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, CIIIA).

Иммунопреципитация хроматина (ChiP). Клетки линии 10Т1/2, растущие на 100 мм чашках с плотностью насыщения 70-80%, дважды отмывали PBS, добавляли на чашку 7.5 мл PBS и 2.5 мл 4%-ного параформальдегида (ПФА; Sigma, США) до конечной концентрации 1%. Клетки инкубировали 10 мин при комнатной температуре (КТ) и постоянном врашении. Для инактивации ПФА в чашку добавляли 560 мкл 2.5 М глицина до конечной концентрации 0.125 мМ, клетки инкубировали 15 мин при КТ и постоянной ротации. Затем глицин удаляли, клетки дважды отмывали PBS, отделяли от пластика лифтером, ресуспендировали в 3 мл PBS и переносили в пробирку 15 мл, центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин и 4°С. Клеточный осадок лизировали в 10 мл буфера № 1 (0.25% Тритона Х-100, 10 мМ EDTA, 10 мМ Tris-Cl (pH 8.0), 1 мМ PMSF) при перемешивании в течение 15 мин на ротаторе при 4°С и затем центрифугировали 10 мин при 2500 об./мин и 4°С, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 10 мл лизирующего буфера № 2 (200 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-СІ (рН 8.0), 1 мМ РМЅF) в течение 15 мин при 4°С и постоянном вращении. Клеточный лизат центрифугировали 10 мин при 2500 об./мин, супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера для иммунопреципитации (200 мМ NaCl, 0.5% Тритона X-100, 0.5% NP40, 0.05% дезоксихолата натрия, 20 мМ Трис-Сl (pH 8.0), 1 мМ PMSF), и обрабатывали 20 мин на соникаторе Q Sonica (США), используя 70%-ную амплитуду в формате 10 с включено/выключено. Пробы центрифугировали 15 мин при 16000 g и 4°С.

Для оценки качества и количества ДНК 50 мкл каждой пробы переносили в отдельные микропробирки и смешивали с равным объемом буфера для элюции (1% SDS, 100 мМ NaHCO₃). Добавляли РНКазу A и протеиназу K до конечной концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали пробы 1 ч при 45°С.

Разделение ДНК и белков происходило при добавлении NaCl до конечной концентрации 200 мМ с последующей инкубацией 15 мин при 100°С. ДНК очищали путем обработки фенолом. К пробе добавляли 0.5 мл фенола, смешивали и центрифугировали 2 мин при 16000 g. Этот шаг повторяли дважды, используя равные объемы смеси фенола с хлороформом и хлороформа. Для преципитации ДНК смешивали с двумя объемами 98%-ного этанола и ацетата натрия до конечной концентрации 300 мМ. Пробы инкубировали 30 мин при КТ и центрифугировали 15 мин при 4°С и 16000 g. Супернатант удаляли, осадок отмывали этанолом 70%, высушивали при КТ и растворяли в 20 мкл ТЕ (10 мМ Трис-Cl, 0.1 мМ ED-ТА). Концентрацию ДНК в пробах определяли на спектрофотомотре NanoDrop, а ее качество – при электрофорезе в 0.8%-ном агарозном геле.

Для ChiP каждую пробу разделяли на несколько пробирок, содержащих 20 мкг ДНК. Одну пробирку из каждой пробы использовали в качестве контроля (Input). В каждую пробирку добавляли 500 мкл буфера для ИП и 1 мкг специфических антител. пробирки инкубировали в течение ночи при 4°C и постоянной ротации. В каждую пробу вносили по 20 мкл протеин-А сефарозы, в которой предварительно блокировали неспецифические сайты связывания, добавляя 20 мкл ДНК спермы лосося (Millipore, США) и 40 мкл 5%-ного БСА (Sigma, США) на 2 ч. Если специфические антитела были мышиные, то к протеин-А сефарозе добавляли по 30 мкг кроличьих антимышиных Ig (Sigma, США) на 2 ч при 4°С и постоянной ротации. Несвязавшиеся с протеин-А сефарозой антитела отмывали путем стандартного центрифугирования в буфере для ИП. Затем по 20 мкл подготовленной протеин-А сефарозы (BioRad, США) добавляли к пробам с хроматином на 3 ч при 4°С и постоянном вращении. После ИП пробы центрифугировали 1 мин при 2000 g, осадки переносили в новые микропробирки и отмывали по следующей схеме: один раз в 700 мкл буфера, содержащего 0.1% SDS, 1% Тритона X-100, 2 мМ EDTA, 20 мМ Tris-Cl (pH 8.0), 150 мМ NaCl; один раз в 700 мкл буфера, содержащего 0.1% SDS, 1% Тритона X-100, 2 мМ EDTA, 20 мМ Tris-Cl (pH 8.0), 500 мМ NaCl; один раз в 700 мкл буфера, содержащего 250 мМ LiCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолата натрия, 1 мМ EDTA, 10 мМ Tris-Cl (рН 8.0); один раз в 700 мкл буфера, содержащего 10 мМ Tris-Cl и 1 мМ EDTA. После последней отмывки к осадкам добавляли 100 мкл (к Input – 150 мкл) буфера для элюции (1% SDS, 100 мМ NaHCO₃), пробы инкубировали 30 мин при 65°С. Комплексы ДНК-белки осаждали 5 мин при 16000 g, добавляли NaCl до конечной концентрации 200 мМ и инкубировали ночь при 65°С в водяной бане для разделения белков и ДНК. Затем к пробам добавляли РНКазу и протеиназу К на 1 ч при 45°С. ДНК очищали, используя смесь фенола с хлороформом как описано выше.

Антитела. В качестве первых антител использовали кроличьи поликлональные антитела против Pparγ2 (Abcam, Великобритания), H3K27me3 (Millipore, США), Bmi1, Utx (Cell Signaling, Inc., США), p130 (Santa Cruz Inc., США) и моноклональные мышиные антитела против Ezh2 (Cell Signaling, Inc., США) и актина (Sigma, США). В качестве вторых антител – Alexa Fluor® 633 Fab-фрагмент козлиных антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика (Invitrogen, США) и Alexa Fluor® 543 Fab-фрагмент кроличьих антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши (Invitrogen, США).

Статистическая обработка результатов. Среднюю арифметическую величину и стандартное отклонение определяли с помощью программы Microsoft Office Excel, 2010. Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Каждый эксперимент повторяли трижды. Интенсивность флюоресценции на изображениях препаратов в сканирующем лазерном микроскопе (Leica, Germany) определяли с помощью программы Zeiss LSM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инактивация **ВМІ1** лентивирусным вектором siBMI1 тормозит, но не предотврашает ЖЛ мышиных МСК линии 10Т1/2. Материнские клетки линии 10Т1/2 чувствительны к индукции ЖД при добавлении к ростовой среде специфических факторов. К 14-м сут после начала индукции большинство клеток накапливают жировые вакуоли, видимые при окраске красителем масляным красным О (рис. 2*a*). Количественная оценка накопления жировых включений (с помощью экстракции красителя из клеток) показала, что клетки начинают прогрессивно дифференцироваться в адипоциты через 7 сут после индукции, однако аккумуляция жира в начале дифференцировки происходит очень медленно, но прогрессивно возрастает в течение 7 сут после индукции (рис. 2б).

Инактивация BMI1 замедляет накопление жировых вакуолей в адипоцитах до 10 сут после начала индукции. После этой точки скорость накопления жировых включений в клетках с инактивированным BMI1 и контроле была сходной (рис. 26). Цитометрический анализ, проведенный ранее (Петров и др., 2016), показал, что 80% клеток, инфицированных лентивирусным вектором, содержащим малую интерферирующую РНК для инактивирования BMI1 (siBMI1), продуцировали Gfp, ген которого включен в структуру вектора. Эти результаты соответствуют данным иммунофлюоресцентной оценки продукции Gfp. Клетки 10T1/2, инфицированные ретровирусом siBMI1, содержащим ген GFP, флюоресцируют при облучении лазером с длиной волны 488 нм, вызывающим флюоресценцию клеток, продуцирующих Gfp. Такие клетки также позитивны в иммунофлюоресценции после обработки антителами к Gfp и вторыми антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 633 нм (рис. 2c). Эндогенный Bmil определяется в ядре и цитоплазме материнских клеток 10T1/2, но его продукция значительно снижается в инфицированных клетках, которые показывают только флюоресценцию Gfp, связанную с экспрессией экзогенного гена *GFP* (рис. 2c).

Жировая дифференцировка клеток 10Т1/2 связана с повышенной продукцией Ррагу2 и других белков, регулирующих ЖД. Белок Ppary2, тканеспецифический регулятор ЖД, не продуцировался в недифференцированных клетках 10Т1/2, но уровень экспрессии материнского гена РРАРу2, выявляемый с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ, значительно возрастал поле индукции ЖД. Инактивация BMI1 полностью отменяла повышение экспрессии РРАРу2 в клетках 10Т1/2, индуцированных к ЖД (рис. 3а). ЖД клеток 10Т1/2 была также связана с повышением уровня экспрессии BMI1, UTX, p130, но не EZH2 (рис. 3б). Инактивация ВМІ1 тормозила повышение экспрессии BMI1, UTX, p130, но в противоположность $PPAR\gamma 2$, уровень экспрессии этих генов, снижался не так значительно в клетках 10Т1/2 с инактивированным *BMI1* при индукции их к ЖД (рис. 36). Ррагу2 не определялся при иммунофлюоресцентном исследовании в недифференцированных клетках 10Т1/2, но ясно выявлялся в ядрах дифференцированных клеток (рис. 3г). Уровень Bmil также возрастал после индукции ЖД (рис. 3г). Utx ясно продуцировался в ядрах недифференцированных клеток, однако индукция ЖД вызывала снижение уровня ядерной локализации Utx и его транслокацию в цитоплазму (рис. 3г). В противоположность деметилазе Utx, белок p130 имел ядерно-цитоплазматическую локализацию в недифференцированных клетках, но транслоцировался в ядро после индукции дифференцировки (рис. 3г). Единственным из исследованных белков, уровень которого снижался в ходе дифференцировки, был Ezh2 (рис. 3г). Результаты иммуноблотинга полностью соответствовали данным иммунофлюоресценции. Ppary2 не определялся в недифференцированных клетках, но его уровень значительно повышался после индукции ЖД (рис. 3в). Продукция Bmil, Utx и p130 также повышалась в условиях дифференцировки, при этом существенно возрастала электрофоретическая подвижность Bmil, что свидетельствует о появлении низкофосфорилированных форм этого белка при дифференцировке (рис. 3в). Продукция Ezh2, выявляемая в иммуноблотинге (рис. 3в), уменьшалась в дифференцированных клетках подобно тому, как это было найдено при иммунофлюоресценции (рис. 3г).

Иммунопреципитация хроматина (ChiP) выявляет взаимодействие Ezh2, Bmi1 и p130 с промотором гена *PPAR*ү2 при ЖД. ChiP с антителами к белкам, регулирующим ЖД, показала, что в недифференцированных клетках на промоторе *PPAR*ү2 аккумулировалось большое количество p130, Ezh2 и Bmi1 в противоположность деметилазе Utx, которая определялась в



Рис. 2. Гистохимическая и иммунофлюоресцентная оценка жировой дифференцировки в мезенхимных стволовых клетках (MCK) 10T1/2 до и после инактивации *BMI1. а* – Клетки 10T1/2, окрашенные красителем масляным красным O на 0, 7 и 10 сут после индукции ЖД. δ – Спектрофотометрическая оценка аккумуляции красителя масляныю красныю O в клетках 10T1/2, индуцированных к ЖД. (OD – оптическая плотность); данные представляют собой среднюю арифметическую величину и ее ошибку, n = 3, *p < 0.05 при сравнении накопления красителя в той же группе в предшествующей точке наблюдения, **p < 0.05 при сравнении с накоплением красителя в клетках, трансфицированных siBMI1, в той же точке наблюдения. c – Окраска клеток 10T1/2 дикого типа (WT) и трансфицированных siBMI1, красителем DAPI (голубой цвет), антитела к Gfp (зеленый цвет), или Bmi1 (красный цвет). Имиджи получены на конфокальном микроскопе Leica (Германия), об. 40×.

следовых количествах (рис. 4*a*, 4*a1*). В ходе ЖД связывание этих белков с промотором *PPAR* γ 2 изменялось противоположным образом: связывание p130, Ezh2 и Bmi1 уменьшалось, а Utx – увеличивалось (рис. 4*a*, *a1*). Контрольный промотор гена *RUNX2* в недифференцированных клетках накапливал подобно промотору *PPAR* γ 2 высокий уровень Ezh2 и Bmi1, но низкий уровень Utx и p130 (рис. 4*b*, *b1*). Связывание регуляторных белков с промотором *RUNX2* в ходе ЖД не изменялось (рис. 4*b*, *b1*).

В клетках с инактивированным *BMI1* мы определяли вместо Ezh2 его мишень – уровень триметилированного H3K27 (H3K27me3). Мы нашли, что в недифференцированных клетках уровень H3K27me3 был высоким, что соответствует большому количеству Ezh2 и Bmi1, связанным с этим промотором. В условиях дифференцировки уровень H3K27me3 на промоторе *PPAR* γ 2 снижался, а уровень Utx повышался не так значительно, как в клетках с активным *Bmi1* (рис. 4 ϵ). Уровни H3K27me3 и Utx не изменя-



Рис. 3. Экспрессия генов *PPAR* γ 2, *BM11*, *EZH2*, *UTX*, *p130* и уровень их продуктов в MCK 10T1/2 дикого типа (WT) и MCK с инактивированным геном *BM11* (siBM11). *a* – Оценка с помощью ОТ-ПЦР экспрессии *PPAR* γ 2 в недифференцированных (HД), дифференцированных (ЖД), и дифференцированных клетках 10T1/2 с инактивированным геном *BM11* (siBM11, ЖД). *б* – Графическое представление экспрессии *BM11*, *EZH2*, *UTX* и *p130* в клетках HД, дифференцированных (ЖД), и дифференцированных клетках 10T1/2 с инактивированных (НД) и дифференцированных (КД), и дифференцированных (КД), и дифференцированных клетках 10T1/2 с инактивированных (НД) и дифференцированных (КД), и диференцированных (КД), и диференцированци (КД), и диференцированках (КД), и диференцированка

лись при дифференцировке клеток с инактивированным *BMI1* на промоторе *RUNX2* (рис. 4*в*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основная задача настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия четырех белков: Ezh2, Bmi1, Utx и p130, регулирующих терминальную фазу ЖД, на одной платформе – промоторе гена *PPAR*γ2, тканеспецифического индуктора терминальной фазы ЖД. Ezh2 и Bmi1 – ключевые белки комплексов PRC1 и PRC2 семейства PcG, которое поддерживает клеточный фенотип путем регуляции дифференцировки СК. Механизм такой регуляции связан с бивалентными доменами, формирующимися на промоторах регуляторных генов дифференцировки в самообновляющихся СК (рис. 1*в*). Бивалентные домены включают активирующий H3K4me3 и супрессирующий H3K27me3 домены и в самообновляющихся СК

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 12 2020

супрессируют гены дифференцировки, например $PPAR\gamma^2$, в МСК. В ходе терминальной стадии ЖД супрессивный домен H3K27me3 инактивируется на промоторе $PPAR\gamma^2$, что разрешает экспрессию этого гена.

Деметилирование H3K27me3 вызывается деметилазой Utx, которая в соответствии с современной гипотезой (Hemming et al., 2014) формирует вместе с Ezh2 эпигенетический переключатель, регулирующий приобретение потомками MCK того или иного типа дифференцировки, т.е. регулирующий наследование судьбы клетками-потоками CK. Результаты работы (Hemming et al., 2014) свидетельствуют, что активация Ezh2 сопровождается супрессией Utx и вызывает ЖД, тогда как повышение уровня Utx сопряжено с супрессией Ezh2 и активацией костной дифференцировки. Нетрудно заметить, что эта элегантная гипотеза противоречит предшествующей точке зрения о том, что терминальная дифференци-



Рис. 4. Иммунопреципитация хроматина (ChiP) в MCK 10T1/2 дикого типа (WT) и MCK с инактивированным геном *BM11* (siBM11) выявляет взаимодействия регуляторных белков Pparγ2, Bmi1, Ezh2, Utx, p130 с промотором генов *PPAR*γ2 и *RUNX2* соответственно в ходе жировой дифференцировки. *a1*, *б1* – Электрофоретические полосы последовательностей промоторов *PPAR*γ2 и *RUNX2* соответственно, амплифицированные после ChiP антителами к указанным белкам; Input – контроль. *a2*, *б2* – Графическое изображение интенсивности полос соответствующих блотов. *в* – Уровни триметилированного по лизину 27 гистона H3 (H3K27me3) и деметилазы Utx, связанных с промоторами *PPAR*у2 и *RUNX2* в MCK с инактивированным *BM11* через 10 сут после индукции ЖД. Для всех вариантов преципитацию проводили 3 раза. Условные обозначение такие же, как и на рис. 2.

ровка связана с удалением супрессивной метки H3K27me3 с промоторов дифференцировочных генов (Bernstein et al., 2006; Boyer et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007), в основе чего лежит уменьшение уровня Ezh2 при любом типе дифференцировки.

В настоящей работе при оценке связывания Ezh2, Bmi1, Utx, и p130 с промотором *PPAR* γ 2 в ходе ЖД мышиных MCK мы нашли, что в недифференцированных клетках Ezh2, Bmi1 и белок p130 семейства pRb накапливаются, а Utx практически отсутствует на промоторе *PPAR* γ 2. В дифференцированных клетках связывание указанных белков с промотором *PPAR* γ 2 инвертируется. В недифференцированных мышиных MCK линии 10T1/2 определяется высокий уровень связывания Ezh2 и Bmi1 и низкий уровень связывания Utx и p130 с промотором *RUNX2*, что не изменяется при ЖД. В условиях инактивации *BMI1* в недифференцированных клетках отмечали гиперметилирование промотора *PPAR* γ 2 по H3K27me3, которое незначительно уменьшалось при ЖД. Связывание Utx с промотором *PPAR* γ 2 после инактивации *BMI1* сохраняло ту же направленность, но было значительно менее выражено (рис. 4*б*).

Наши данные свидетельствуют о том, что гипотеза бивалентных доменов (Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007) эффективна при интерпретации данных по регуляции ЖД мышиных МСК. Гипотеза о роли эпигенетического переключателя, образованного белками Ezh2 и Utx, в выборе клеточной судьбы МСК, вероятно не учитывает того, что регуляция активности *PPAR* γ 2 этими белками происходит в коммитированных преадипоцитах, уже избравших направление дифференцировки. Роль эпигенетических переключателей в выборе клеточной судьбы МСК, по-видимому, нужно рассматривать в других модельных системах.

Результаты нашей работы находятся в соответствии с данными из литературы о супрессорной роли белков семейства pRb в терминальной фазе ЖД, отмена которой, в частности при уменьшении связывания белка p130 с промотором PPAR у2, способствует экспрессии этого гена и ЖД (Fajas et al., 2002; Calo et al., 2010). Результаты нашей работы также показывают, что при ЖД существует прямое соответствие между изменениями обшеклеточных уровней РНК и пролуктов генов EZH2 и UTX. с одной стороны, и связыванием их продуктов с промотором PPAR у2, с другой, хотя уровень *EZH2* понижается, а *UTX* – возрастает. Повышение общеклеточных уровней РНК и продуктов BMI1 и p130 сопряжено со снижением связывания этих белков с промотором *PPAR* 2 при ЖД. По-видимому, белки Bmil и p130 регулируют в дифференцирующихся жировых клетках активность и других генов, что сопряжено с увеличением общеклеточного уровня этих белков. Известно, что регуляторный белок может вызывать противоположные изменения уровней и активности своих мишеней, например, повышение уровня и активности Utx белками семейства pRb связано с инактивированием Ezh2 и Bmil в тех же клетках (Bracken et al., 2003; Herz et al., 2010).

В целом, результаты нашей работы свидетельствуют о регуляторной роли белков семейств PcG и pRb при формировании фенотипа адипоцитов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Коллективного центра микроскопии Института цитологии РАН за помощь в оценке иммунофлюоресцентного окрашивания клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института цитологии РАН № 0124-2019-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Петров Н.С., Верещагина Н.А., Сушилова Е.Н., Кропотов А.В., Михеева Н.Ф., Попов Б.В. 2016. Продукт гена ВМІ1 – ключевой компонент семейства Polycomb – позитивно регулирует жировую дифференцировку мезенхимных стволовых клеток. Цитология. Т. 58. № 2. С. 83. (Petrov N.S., Vereschagina N.A., Sushilova E.N., Kropotov A.V., Miheeva N.F., Popov B.V. 2016. Product of the BMI1 – a key component of Polycomb family positively regulates ad-

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 12 2020

ipocyte differentiation of mouse mesenchymal stem cells. Tsitologiia. V. 58. № 2. P. 83.)

- Попов Б.В., Ватт С.М., Розанов Ю.М., Чанг Л.-С. 2010. Мутация в области структурного кармана pRb вызывает повышение его сродства к E2F4, сопряженное с активацией мышечной дифференцировки. Мол. биол. Т. 44. С. 323. (Popov B.V., Watt S.M., Rozanov Iu.M., Chang L.-S. 2010. A pocket pRb mutation induces the increase in its affinity to E2F4 coupled with activation of muscle differentiation. Mol. Biol. (Mosk). V. 44. P. 323.)
- Попов Б.В., Шило П.С., Жидкова О.В., Зайчик А.М., Петров Н.С. 2015. Экспериментальная модель для изучения роли pRb в детерминировании жировой дифференцировки. Бюлл. эксп. биол. мед. Т. 159. С. 258. (Popov B.V., Shilo P.S., Bentley M.L., Corn J.E., Dong K.C., Phung Q., Cheung T.K., Cochran A.G. 2011. Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. EMBO J. V. 30. P. 3285.)
- Bentley M.L., Corn J., Dong K.C., Phung Q., Cheung T.K., Cochran A.G. 2011. Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. EMBO J. V. 30. P. 3285.
- Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S.L., Lander E.S. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell. V. 125. P. 315.
- Blackledge N.P., Farcas A.M., Kondo T., King H.W., McGouran J.F., Hanssen L.L., Ito S., Cooper S., Kondo K., Koseki Y., Ishikura T., Long H.K., Sheahan T.W., Brockdorff N., Kessler B.M., Koseki H., Klose R.J. 2014. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. Cell. V. 157. P. 1445.
- Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L.A, Lee T.I., Levine S.S., Wernig M., Tajonar A., Ray M.K., Bell G.W., Otte A.P., Vidal M., Gifford D.K., Young R.A., Jaenisch R. 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. Nature. V. 441. P. 349.
- Bracken A.P., Pasini D., Capra M., Prosperini E., Colli E., Helin K. 2003. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. EMBO J. V. 22. P. 5323.
- Bracken A.P., Helin K. 2009. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. Nat. Rev. Cancer. V. 9. P. 773.
- Buchwald G., van der Stoop P., Weichenrieder O., Perrakis A., van Lohuizen M., Sixma T.K. 2006. Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. EMBO J. V. 25. P. 2465.
- *Caretti G., Di Padova M., Micales B., Lyons G.E., Sartorelli V.* 2004. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. Genes Dev. V. 18. P. 2627.
- Calo E., Quintero-Estades J.A., Danielian P.S., Nedelcu S., Berman S.D., Lees J.A. 2010. Rb regulates fate choice and lineage commitment *in vivo*. Nature. V. 466. P. 1110.
- Cao L., Bombard J., Cintron K., Sheedy J., Weetall M.L., Davis T.W.
 2011. BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer.
 J. Cell. Biochem. V. 112. P. 2729.

- Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science. V. 298. P. 1039.
- *Chen P.L., Riley D.J., Chen Y., Lee W.H.* 1996. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. Genes Dev. V. 10. P. 2794.
- Cooper S., Dienstbier M., Hassan R., Schermelleh L., Sharif J., Blackledge N.P., De Marco V., Elderkin S., Koseki H., Klose R., Heger A., Brockdorff N. 2014. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. Cell Rep. V. 7. P. 1456.
- Ezhkova E., Pasolli H.A., Parker J.S., Stokes N., Su I.H., Hannon G., Tarakhovsky A., Fuchs E. 2009. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissuespecific stem cells. Cell. V. 136. P. 1122.
- Fajas L., Landsberg R.L., Huss-Garcia Y., Sardet C., Lees J.A., Auwerx J. 2002. E2Fs regulate adipocyte differentiation. Dev. Cell. V. 3. P. 39.
- Fasano C.A., Dimos J.T., Ivanova N.B., Lowry N., Lemischka I.R., Temple S. 2007. shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. Cell Stem Cell. V. 1. P. 87.
- Gutiérrez L., Oktaba K., Scheuermann J.C., Gambetta M.C., Ly-Hartig N., Müller J. 2012. The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression. Development. V. 139. P. 117.
- Hansen J.B., Jørgensen C., Petersen R.K., Philip Hallenborg P., De Matteis R., Bøye H.A., Petrovic N., Enerbäck S., Nedergaard J., Cinti S., te Riele H., Kristiansen K. 2004. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 101. P. 4112.
- Hallenborg P., Feddersen S., Madsen L., Kristiansen K. 2009. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. Expert Opin. Ther. Targets. V. 13. P. 235.
- Hemming S., Cakouros D., Isenmann S., Cooper L., Menicanin D., Zannettino A., Gronthos S. 2014. EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. Stem Cells. V. 32. P. 802.
- Herz H., M., Madden L., D., Chen Z., Bolduc C., Buff E., Gupta R., Davuluri R., Shilatifard A., Hariharan I.K., Bergmann A. 2010. The H3K27me3 demethylase dUTX is a suppressor of Notch- and Rb-dependent tumors in Drosophila. Mol. Cell. Biol. V. 30. P. 2487.
- Kalb R., Latwiel S., Baymaz H.I., Jansen P.W., Müller C.W., Vermeulen M., Müller J. 2014. Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. Nat. Struct. Mol. Biol. V. 21. P. 569.
- Kotake Y., Cao R., Viatour P., Sage J., Zhang Y., Xiong Y. 2007. pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. Genes Dev. V. 21. P. 49.
- *Merini W., Calonje M.* 2015. PRC1 is taking the lead in PcG repression. Plant J. V. 83. P. 110.

- Mikkelsen T.S., Ku M., Jaffe D.B., Issac B., Lieberman E., Giannoukos G., Alvarez P., Brockman W., Kim T.-K., Koche R.P., Lee W., Mendenhall E., O'Donovan A., Presser A., Russ C., Xie X., Meissner A., Wernig M., Jaenisch R., Nusbaum C., Lande E.S., Bernstein B.E. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. Nature. V. 448. P. 553.
- Morey L., Pascual G., Cozzuto L., Roma G., Wutz A., Benitah S.A., Di Croce L. 2012. Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells. Cell Stem Cell. V. 10. P. 47.
- Müller J., Hart C.M., Francis N.J., Vargas M.L., Sengupta A., Wild B., Miller E.L., O'Connor M.B., Kingston R.E., Simon J.A. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. Cell. V. 111. P. 197.
- Rosen E.D., Hsu C.H., Wang X., Rosen E.D., Hsu C.-H., Wang X., Sakai S., Freeman M.W., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M. 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. Genes Dev. V. 16. P. 22.
- Rosen E.D., MacDougald O.A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 7. P. 885.
- Sauvageau M., Sauvageau G. 2010. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. Cell Stem Cell. V. 7. P. 299.
- Schneider J.W., Gu W., Zhu L., Mahdavi V., Nadal-Ginard B. 1994. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. Science. V. 264. P. 1467.
- *Schwartz Y.B., Pirrotta V.* 2013. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. Nat. Rev. Genet. V. 14. P. 853.
- Scimè A., Grenier G., Huh MS, Mark A Gillespie M.A., Bevilacqua L., Harper M.A., Rudnicki M.A. 2005. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. Cell Metab. V. 2. P. 283.
- Simon J.A., Kingston R.E. 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. V. 10. P. 697.
- *Surface L.E., Thornton S.R., Boyer L.A.* 2010. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. Cell Stem Cell. V. 7. P. 288.
- Tang Q.Q., Lane M.D. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. Annu. Rev. Biochem. V. 81. P. 715.
- Tavares L., Dimitrova E., Oxley D., Webster J., Poot R., Demmers J., Bezstarosti K., Taylor S., Ura H., Koide H., Wutz A., Vidal M., Elderkin S., Brockdorff N. 2012. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. Cell. V. 148. P. 664.
- Wang R., Taylor A.B., Leal B.Z., Chadwell L.V., Ilangovan U., Robinson A.K., Schirf V., Hart P.J., Lafer E.M., Demeler B., Hinck A.P., McEwen D.G., Kim C.A. 2010. Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. Structure. V. 18. P. 966.

REGULATION OF THE *PPARgamma2* EXPRESSION BY PcG AND pRb FAMILIES PROTEINS IN THE COURSE OF ADIPOCYTE DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

V. M. Ryabov^a, N. A. Verechshagina^a, N. S. Petrov^a, M. V. Litvinova^a, and B. V. Popov^{a, *}

^aInstitute of Cytology RAS, St.Petersburg, 194064 Russia *e-mail: borisvp478@gmail.com

The signal pathways associated with formation of the phenotype of adipocytes converge on the regulation of expression of the tissue specific gene *PPAR* γ 2. Here we studied the interaction of key proteins of the PcG family – Ezh2, Bmi1, as well as H3K27Me3 demethylase Utx, and p130 – a member of the pRb family, with the *PPAR* γ 2 gene promoter in the course of adipocyte differentiation (AD) of mouse MSCs of the 10T1/2 cell line using the chromatin immunoprecipitation assay (ChiP). We found that in undifferentiated MSCs the *PPAR* γ 2 and control *RUNX2* genes promoters accumulated high levels of Bmi1, Ezh2 and low level of Utx. The p130 in undifferentiated cells showed low level binding to the *RUNX2* promoter. Under differentiation conditions the above described interactions of proteins inversed on the *PPAR* γ 2 promoter but did not change on the *RUNX2* promoter. In the differentiated cells with inactivated *BMI1* we detected on the *PPAR* γ 2 promoter unsubstantial decrease in the levels of H3K27Me3 which is the target of Ezh2 and Utx. Our results suggest that the *PPAR* γ 2 expression in the terminal phase of AD in mouse MSCs is activated by Utx, but inactivated by Bmi1, Ezh2, and 130 proteins. These data support the hypothesis that the loss of suppressive mark H3K27Me3 in the bivalent domains of regulatory genes including the *PPAR* γ 2 in the course of adipocyte differentiation regulates formation of the tissue specific phenotypes.

Keywords: mesenchymal stem cells, adipocyte differentiation, regulation of *PPAR* γ 2 expression, Bmi1, Ezh2, Utx, and p130 proteins