

УДК 577.21

РЕГУЛЯЦИЯ m⁶A-МЕТИЛИРОВАНИЯ РНК И ЕГО ЭФФЕКТ НА МИОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИОБЛАСТОВ МЫШИ¹

© 2019 г. J. N. Chen^{a, 2}, Y. Chen^{a, 2}, Y. Y. Wei^a, M. A. Raza^b, Q. Zou^a, X. Y. Xi^a, L. Zhu^c, G. Q. Tang^c, Y. Z. Jiang^{a, *}, X. W. Li^{c, **}

^aDepartment of Zoology, College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, 625014 China

^bDepartment of Crop Cultivation and Farming System, College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan, 611130 China

^cFarm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan, 611130 China

*e-mail: jiangyz04@163.com

**e-mail: xuwei.li@sicau.edu.cn

Поступила в редакцию 31.08.2018 г.

После доработки 03.11.2018 г.

Принята к печати 10.11.2018 г.

N⁶-метиладенозин (m⁶A), идентифицированный в качестве консервативной эпитранскриптомной модификации эукариотических мРНК, играет важную роль в регуляции метаболических процессов в клетке. Однако функция m⁶A в миогенной дифференцировке не установлена. Нами изучено влияние m⁶A-метиличирования РНК на миогенную дифференцировку миобластов мышцы *in vitro*. С этой целью путем сверхэкспрессии гена *METTL3* был изменен уровень m⁶A-метиличирования. Уровень m⁶A-метиличирования РНК регулируется также ингибитором метилирования циклолейцином (Сус) либо бетаином (Bet) — донором метильной группы. Эти реагенты использованы нами для изучения регуляторного эффекта m⁶A-метиличирования РНК на миогенную дифференцировку. Подтверждено, что сверхэкспрессия *METTL3* и бетаин увеличивают уровень m⁶A-метиличирования, а циклолейцин снижает его. Увеличение уровня метилирования стимулировало миогенную дифференцировку миобластов мышцы. Эти данные могут помочь прояснить механизмы, определяющие связь между метилированием РНК и миогенезом.

Ключевые слова: N⁶-метиладенозин, метилирование РНК, *METTL3*, миогенная дифференцировка
DOI: 10.1134/S0026898419030042

N⁶-метиличирование аденозина — самая распространенная внутриклеточная модификация полиаденилированных мРНК у высших эукариот [1]. За последнее время установлено, что m⁶A-метиличирование РНК играет важную роль в регуляции некоторых метаболических процессов в клетке, например, оно участвует в контроле дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих [2], регулирует плюрипотентность стволовых клеток мыши [3], а также судьбу стволовых клеток у *Arabidopsis* [4]. На примере эмбриональных фибробластов мыши показано, что метилзависимый процессинг РНК контролирует скорость циркадных часов млекопитающих [5]. Ранее мы построили исчерпывающую карту m⁶A-метиличирования РНК, которая послужила основой для определения потенциальных функ-

ций этой модификации в накоплении жировой ткани и росте мышечной ткани [6]. Тем не менее, роль метилирования РНК в процессе миогенной дифференцировки миобластов почти не изучена.

Известно, что m⁶A-метиличирование — это динамическая и обратимая модификация РНК в клетках млекопитающих, которая регулируется метилтрансферазоподобным белком 3 (*METTL3*) [7, 8]. Инактивация *METTL3* приводит к снижению уровня m⁶A-метиличирования примерно на 30% в клетках линии HeLa и на 20% в клетках линии 293FT [9]. Мы воздействовали на уровень m⁶A-метиличирования путем сверхэкспрессии *METTL3* и изучали влияние метилирования на миогенную дифференцировку клеток линии C2C12. При изучении эффекта m⁶A-метиличирования на миогенную дифференцировку мы использовали ингибитор метилирования циклолейцин (Сус) и донор метильной группы бетаин (Bet).

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

Развитие скелетных мышц – сложный много-ступенчатый процесс, включающий дифференцировку миобластов из миогенных клеток-предшественников, их пролиферацию, задержку клеточного цикла и, наконец, слияние миоцитов в многоядерные мышечные волокна [10, 11]. Известно, что процессы миогенеза и дифференцировки миоцитов управляются комплексом факторов транскрипции, в состав которого входят фактор миогенной дифференцировки MyoD и фактор миогенеза 5 (Myf5), участвующие в контроле пролиферации миобластов и ранней дифференцировки. В этот процесс вовлечены миогенин (MyoG) и фактор миогенеза 6 (Myf6), которые иницируют главным образом терминальные стадии дифференцировки [12–14]. Наконец, маркером поздней стадии дифференцировки миобластов считается экспрессия тяжелых цепей миозина, одного из главных компонентов мышечного волокна [15, 16]. Ранее обнаружили, что скелетные мышцы млекопитающих по большей части состоят из волокон трех типов, обозначенных 1, 2A и 2B, и различающихся содержанием тяжелых цепей миозина [17]. Эти волокна входят в состав моторных единиц с разными функциональными характеристиками: волокна типа 1 соответствуют “медленным” моторным единицам, волокна типа 2A входят в состав “быстрых неустойчивых” моторных единиц, а волокна типа 2B – в состав “быстрых утомляемых” моторных единиц [18, 19]. В дальнейшем идентифицирован еще один тип волокон, обозначенный 2X, который содержит специфическую изоформу тяжелых цепей миозина.

В представленной работе мы изменяли уровень m⁶A-метиличования РНК путем сверхэкспрессии *METTL3* и проверяли эффект метилирования на экспрессию маркеров разных стадий дифференцировки в клетках линии C2C12. Кроме того, чтобы отделить эффект модификации РНК от возможного косвенного воздействия *METTL3* на миогенную дифференцировку, мы изменяли уровень метилирования при помощи химических агентов – ингибитора метилирования Суs и донора метильных групп Вет. Таким образом, наша работа посвящена поиску механизмов, посредством которых m⁶A-метиличование РНК регулирует процессы миогенеза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры. Миобласты C2C12 получены из клеточного банка Китайской академии наук (Шанхай, Китай). Клетки линии C2C12 культивировали при 5% CO₂ и 37°C в ростовой среде DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium, “Gibco”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Gibco”). При достижении 80%-ной плотности клетки снимали с подложки 0.25%-ным раствором трипсина (“Gibco”) и

рассеивали. Для индукции дифференцировки по достижении плотности клеточной культуры более 80% ростовую среду заменяли дифференцировочной (DMEM с добавлением 2% лошадиной сыворотки (“Gibco”).

Конструирование эукариотической экспрессионной плазмиды и трансфекция клеток. Полноразмерные кДНК гена *METTL3* мыши амплифицировали при помощи обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров, перечисленных в таблице. Детали сборки генетической конструкции pEGFP/N1-METTL3 подробно описаны в Приложении (см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2019/3/supp_Chen_rus.pdf). Клетки линии C2C12 рассеивали в 6-луночные планшеты, по достижению 80%-ной плотности трансфицировали плазмидами pEGFP/N1-METTL3 с Lipofectamine™ 3000 (“Invitrogen Life Technologies”, США), следуя рекомендациям производителя. Исходный вектор pEGFP/N1-NC использовали в качестве отрицательного контроля, а “пустым” контролем служили нетрансфицированные клетки (con).

Обработка клеток циклолейцином (Суs) и бетаном (Вет). Миобласты C2C12 дифференцировались в течение 4 дней, после чего их инкубировали в течение 24 ч в присутствии Суs в концентрации 1, 5 и 10 мМ, либо Вет (0, 0.1, 0.15 и 0.2 М). Оптимальные концентрации Суs и Вет определяли по уровню метилирования РНК в присутствии разных концентраций этих веществ и использовали в дальнейших экспериментах.

Измерение суммарного уровня m⁶A-метиличования РНК. Суммарный уровень m⁶A в РНК мы определяли в клетках линии C2C12. Содержание метилированного аденозина определяли в 200 нг суммарной РНК при помощи коммерческого набора, основанного на колориметрическом измерении, в соответствии с рекомендациями производителя (кат. номер P-9005; “Epigentek”, США).

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с использованием коммерческого набора TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (“TaKaRa Biotech Co. Ltd.”, КНР) согласно [20]. Примерно 500 нг суммарной РНК использовали в реакции обратной транскрипции для синтеза кДНК при помощи набора от TaKaRa (“TaKaRa Biotech Co. Ltd.”).

Уровень мРНК определяли с использованием количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 5 мкл смеси SYBR Green Real Time PCR Master Mix (“Takara Biotech Co. Ltd.”), 30 нг кДНК-матрицы и 0.4 мкл пар праймеров с концентрацией 10 мкМ. Специфичность продуктов ПЦР подтверждали анализом кривых плавления. Количество мРНК β-актина использовали для нормиро-

Таблица. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Праймер (5' → 3')	Идентификатор	T_m , °C
Фрагмент <i>METTL3</i>	F:CCCAAGCTATGTCGGACACGTGGAGCTC	NO	61
	R:CGGGATCCCGTAAATTCTTAGGTTTAGAG	NO	61
<i>mtu-METTL3</i>	F:ATGTCGGACACGTGGAGCTC	NM_019721.2	54
	R:TAAATTCTTAGGTTTAGAG		
<i>mtu-MyHC1</i>	F:GCCTGGGCTTACCTCTCTATCAC	NM_080728.2	59
	R:CTTCTCAGACTTCCGCAGGAA		
<i>mtu-MyHCIIa</i>	F:CAGCTGCACCTTCTCGTTTG	NM_001039545.2	59
	R:CCCGAAAACGGCCATCT		
<i>mtu-MyHCIIx</i>	F:GGACCCACGGTCGAAGTTG	NM_030679.1	59
	R:CCCGAAAACGGCCATCT		
<i>mtu-MyHCIIb</i>	F:CAATCAGGAACCTTCGGAACAC	NM_010855.3	59
	R:GTCCTGGCCTCTGAGAGCAT		
<i>mtu-MyoG</i>	F:GCCCAGTGAATGCAACTCCCACA	NM_031189.2	59
	R:CAGCCGCGAGCAAATGATCTCCT		
<i>mtu-MyoD</i>	F:AGACTTCTATGATGACCCGTGTT	NM_010866.2	61.4
	R:TCAGCGTTGGTGGTCTTGC		
<i>mtu-Myf5</i>	F:CTGTCTGGTCCCGAAAGAAC	XM_006513319.2	59
	R:AAGCAATCCAAGCTGGACAC		
<i>mtu-Myf6</i>	F:AATTCTTGAGGGTGCGGATT	XM_006513320.1	59
	R:ATGGAAGAAAGGCGCTGAAG		
<i>ACTB</i>	F:CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	NM_007393.5	60
	R:ATGGAGCCACCGATCCACA		

вания уровней мРНК исследуемых генов. Последовательности праймеров подбирали, используя программное обеспечение Primer premier software v5.0 (“Premier Biosoft International”, США), синтез праймеров заказывали в “BGI Company” (Китай). Эффективность реакции с каждой парой праймеров рассчитывали при помощи двукратных серийных разведений кДНК. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1.

Статистический анализ. Уровни мРНК нормировали относительно уровня мРНК гена β -актина по формуле $Ct (2^{-\Delta\Delta Ct})$ [21]. Все данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ ANOVA проводили при помощи программного обеспечения SPSS 20.0 software (“SPSS Inc.”, США). $p < 0.05$ принимали в качестве значимого.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эндогенный уровень m^6A -метилирования РНК возрастает в процессе миогенной дифференцировки миобластов C2C12

На начальном этапе изучения связи между m^6A -метилированием РНК и миогенной дифференцировкой мы определили профиль эндогенного m^6A -метилирования в процессе дифференцировки клеток линии C2C12, а именно, во время двух переходных стадий от миобластов к многоядерным мышечным трубочкам. Условия культивирования клеток описаны в Экспериментальной части. С момента достижения нужной плотности (день 0), миобласты C2C12 дифференцировались в удлиненные скелетные мышечные трубки (2–8 дни культивирования, рис. S1, см. Приложение http://www.molecbio.ru/downloads/2019/3/supp_Chen_engl.pdf). Уровень m^6A -метилирова-

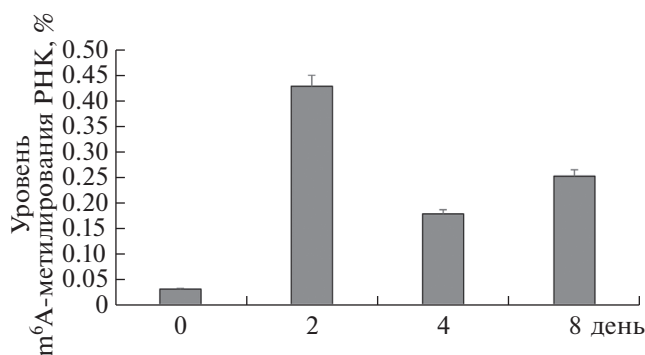


Рис. 1. Уровень m⁶A-метилирования РНК во время миогенной дифференцировки скелетных миобластов линии C2C12.

ния РНК значительно возрастал в промежутке между точкой отсчета и днем 2, затем снижался и на 4-й день был ниже, чем на 2-й (рис. 1). Это означает, что данная модификация может играть значимую роль в регуляции дифференцировки миобластов.

Сверхэкспрессия METTL3 приводит к увеличению уровня m⁶A-метилирования РНК в миобластах мыши и стимулирует миогенную дифференцировку

Чтобы исследовать эффект m⁶A-метилирования РНК на миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, мы увеличили степень метилирования путем сверхэкспрессии METTL3. С этой целью миобласты трансфицировали плазмидой pEGFP/N1-METTL3 либо контрольным вектором pEGFP/N1-NC. Контролем успешной трансфекции служило появление флуоресцирующих клеток (рис. S1). Присутствие плазмиды pEGFP/N1-METTL3 привело к значительному увеличению экспрессии гена METTL3 в клетках C2C12 на 2-, 4- и 8-й день дифференцировки ($p < 0.01$, рис. 2a). Сверхэкспрессия METTL3 в миобластах, в свою очередь, привела к значительному увеличению уровня m⁶A-метилирования РНК (рис. 2б), что указывает на положительную регуляцию модификации данного типа белком METTL3. В предыдущих исследованиях установлено, что факторы MyoD и Myf5 являются маркерами ранней стадии миогенной дифференцировки, в то время как MyoG, Mrf4 (Myf6) и MyHC считаются маркерами поздней стадии [15, 22]. В данной работе нами оценена экспрессия генов, ассоциированных с миогенной дифференцировкой. Установлено, что экспрессия MyoD, Myf5, MyoG и Myf6 значительно возрастает в процессе дифференцировки миобластов на 2- и 4-й день (рис. 2в, г). Кроме того, мы проверили экспрессию генов, ассоциированных с различными типами мышечного волокна (MyHC1, MyHCIIa, MyHCIIb и MyHCIIx), на про-

межуточной (4-й день) и поздней (8-й день) фазах дифференцировки. Обнаружено, что уровни мРНК генов, ассоциированных с волокнами типа I и II, значительно увеличились ($p < 0.05$, рис. 2д, е). Эти результаты позволяют предположить, что увеличение уровня m⁶A-метилирования РНК путем сверхэкспрессии METTL3 стимулирует миогенную дифференцировку и формирование мышечных волокон.

Экзогенная регуляция m⁶A-метилирования РНК и ее влияние на миогенную дифференцировку

Чтобы подтвердить регуляторный эффект m⁶A-метилирования РНК в миобластах, мы обработали миобласты мыши ингибитором метилирования Sус либо донором метильной группы Bet. *In vitro* Sус действует как конкурентный ингибитор АТР: L-метионин-S-аденозилтрансферазы, которая участвует в синтезе S-аденозилметионина – внутриклеточного донора метильной группы [23]. В нашей работе обработка миобластов мыши Sус в различных концентрациях приводила к значимому и дозозависимому снижению уровня m⁶A-метилирования РНК ($p < 0.05$, рис. 3a). Обработка клеток 1, 5 или 10 мМ Sус снижала уровень метилирования на 19, 27 и 40% ($p < 0.05$), соответственно, по сравнению с контролем (рис. 3a). В эксперименте с дифференцирующимися клетками C2C12 мы измеряли уровень метилирования на 2-, 4- и 8-й дни в присутствии Sус в концентрации 10 мМ (рис. 3б). Показано, что 10 мМ Sус приводит к значительному снижению уровня m⁶A-метилирования на всех стадиях дифференцировки ($p < 0.05$, рис. 3б). Эту концентрацию ингибитора (Sус10) мы использовали в дальнейшем для определения экспрессии генов, ассоциированных с миогенной дифференцировкой. Показано, что на 2-й и 4-й день дифференцировки миобластов относительный уровень мРНК генов MyoD, MyoG и Myf6 значительно снизился по сравнению с контролем ($p < 0.01$, рис. 3в, г), как и экспрессия гена Myf5 ($p < 0.05$, рис. 3в, г). Кроме того, экспрессия генов MyHC1, MyHCIIa, MyHCIIb и MyHCIIx, ассоциированных с различными типами мышечных волокон, также снизилась на промежуточной (день 4) и поздней (день 8) стадии дифференцировки ($p < 0.05$, рис. 3д, е).

Уровень m⁶A-метилирования РНК также изменяется под действием различных концентраций Bet. Мы обрабатывали миобласты мыши 0.1, 0.15 или 0.2 М Bet и измеряли уровень метилирования после инкубации в течение 24 ч. Показано, что Bet дозозависимым образом увеличивает уровень m⁶A-метилирования РНК (рис. 4a). Чтобы определить оптимальную концентрацию Bet и подтвердить отсутствие негативного влияния высоких концентраций на рост клеток, миобласты

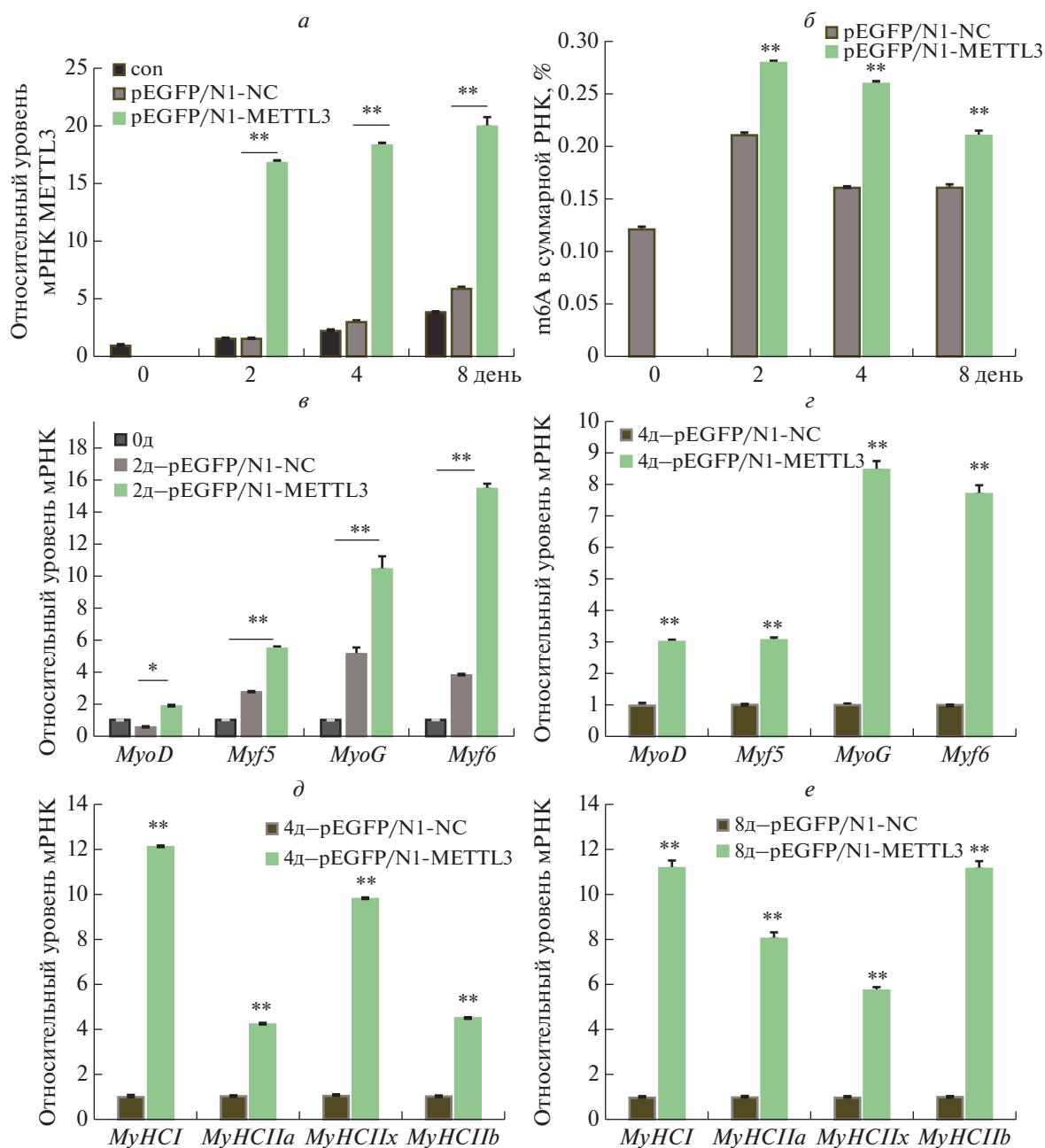


Рис. 2. Влияние сверхэкспрессии *METTL3* на m^6A -метилование РНК и миогенную дифференцировку. *а* – Трансфекция миобластов плазмидой pEGFP/N1-METTL3 приводит к значительному увеличению экспрессии *METTL3* на 2-, 4- и 8-й дни ($p < 0.01$). *б* – Сверхэкспрессия *METTL3* в миоблестах мыши приводит к значимому увеличению уровня m^6A -метилования РНК. *в*, *г* – Сверхэкспрессия *METTL3* приводит к значимому увеличению относительных уровней мРНК генов *MyoD*, *Myf5*, *MyoG* и *Myf6* ($p < 0.05$) по ходу дифференцировки миобластов на 2- и 4-й дни. *д*, *е* – Сверхэкспрессия *METTL3* приводит к увеличению относительных уровней мРНК генов, ассоциированных с развитием мышечных волокон типа I и II.

обрабатывали Vet в указанных концентрациях и анализировали клетки под микроскопом. Обнаружено, что в концентрации 0.15 и 0.2 М Vet не оказывает значимого влияния на клеточный рост. В то же время, 0.2 М Vet вызывает значительное увеличение уровня m^6A -метилования РНК на всех стадиях миогенной дифференцировки (рис. 4б), и

эту концентрацию мы применяли в дальнейших экспериментах. Показано, что относительный уровень мРНК гена *Myf5* значительно вырос по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (рис. 4в) на ранней стадии дифференцировки (день 2), а экспрессия генов *MyoG* и *Myf6* увеличилась на промежуточной стадии (день 4) ($p < 0.05$) (рис. 4г). Кроме того,

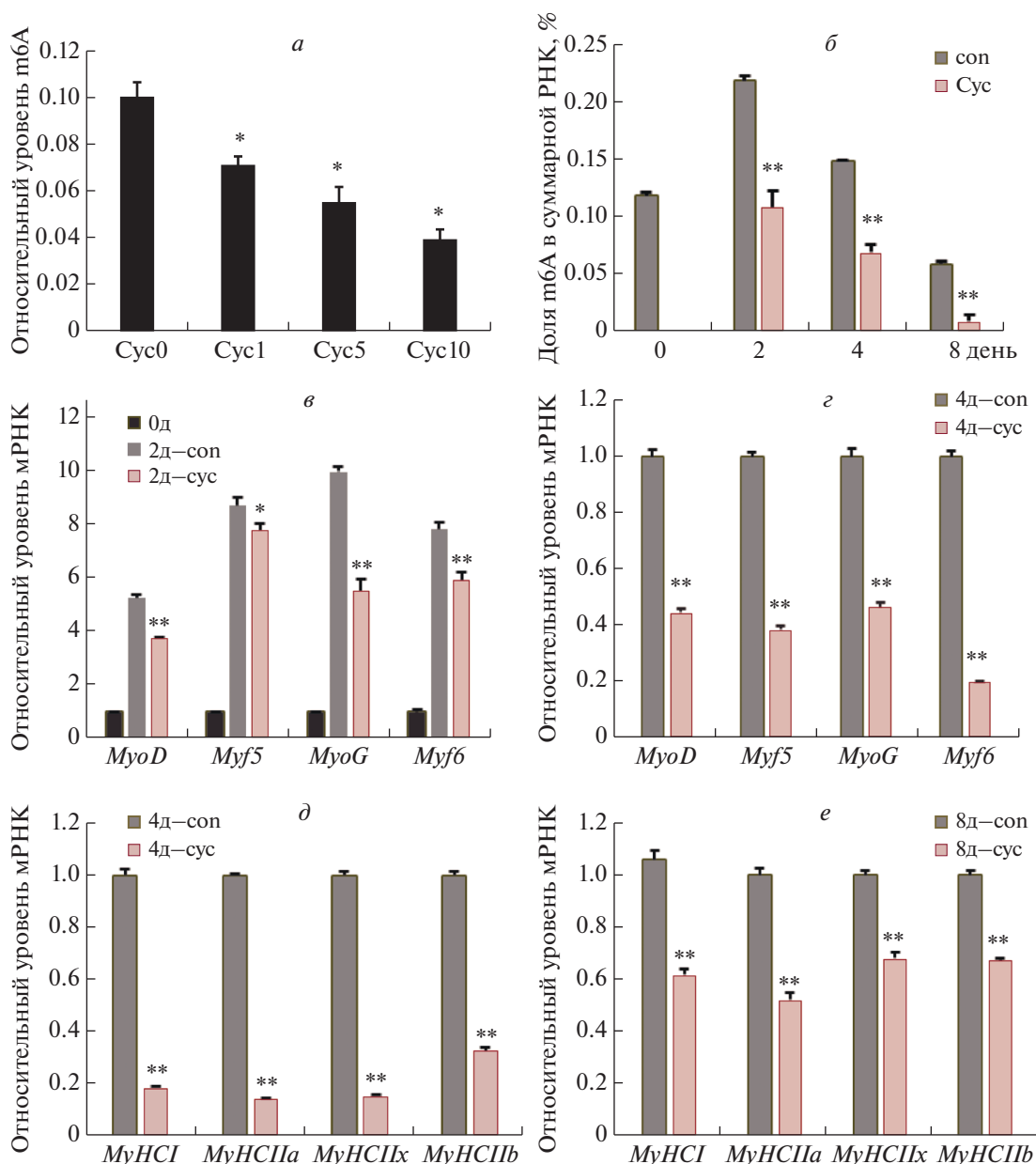


Рис. 3. Влияние обработки миобластов экзогенным ингибитором метилирования циклолейцином (Cyc) на уровень m⁶A-метилирования РНК и миогенную дифференцировку. *а* – Обработка миобластов мыши различными концентрациями Cyc приводит к дозозависимому снижению уровня m⁶A-метилирования РНК ($p < 0.05$). *б* – Обработка клеток C2C12 10 мМ Cyc приводит к снижению уровня m⁶A-метилирования РНК на всех стадиях дифференцировки. *в, г* – Обработка клеток 10 мМ Cyc приводит к снижению экспрессии генов *MyoD* и *MyoG* ($p < 0.05$). *д, е* – Обработка клеток 10 мМ Cyc приводит к снижению экспрессии генов *MyHC1*, *MyHC1a*, *MyHC1b* и *MyHC1x* ($p < 0.05$).

уровни мРНК генов *MyHC1*, *MyHC1a*, *MyHC1x* и *MyHC1b*, ассоциированных с различными типами мышечных волокон, также заметно увеличилось ($p < 0.05$) (рис. 4д, е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

m⁶A-метилирование, представляющее собой важную модификацию РНК у всех эукариотических организмов, начиная от дрожжей, растений и

насекомых, заканчивая млекопитающими, встречается даже в вирусных РНК в ядерной фазе инфекции. Тем не менее, конкретные биологические функции этой модификации до сих пор не определены. Они могут касаться процессов транскрипции, процессинга РНК, транспорта, трансляции, деградации, клеточной дифференцировки и деления [24, 25]. Динамические изменения уровня метилирования в клетках млекопитающих могут

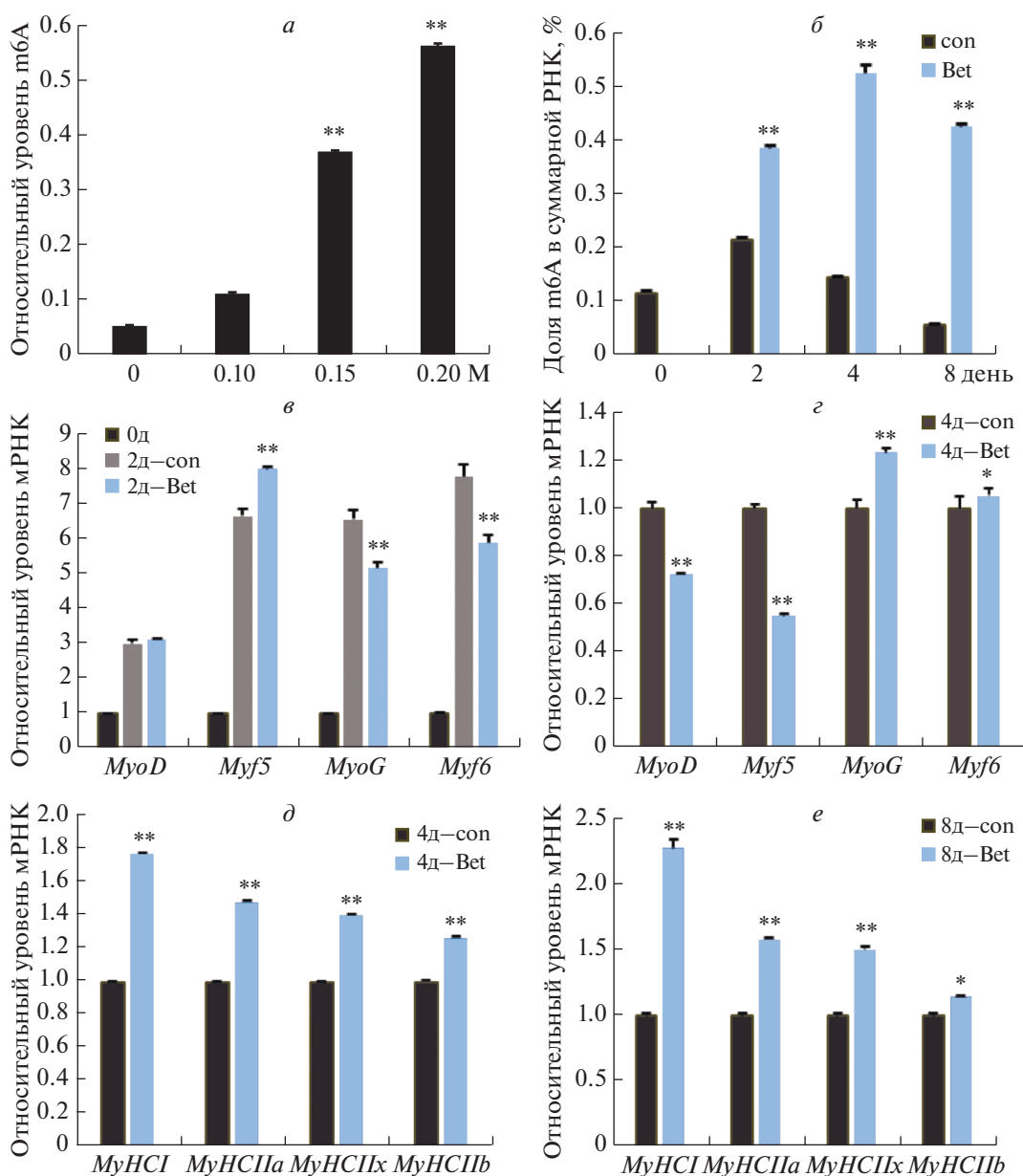


Рис. 4. Влияние обработки миобластов донором метильной группы бетаином на уровень m⁶A-метилирования РНК. *а* – Обработка бетаином приводит к дозозависимому увеличению уровня метилирования. *б* – Бетаин в концентрации 0.2 М значительно увеличивает уровень метилирования РНК на всех стадиях дифференцировки миобластов мыши ($p < 0.01$). *в, г* – Обработка Bet приводит к увеличению экспрессии гена *Myf5* ($p < 0.05$) на ранней стадии дифференцировки (день 2), и увеличению экспрессии генов *MyoG* и *Myf6* в промежуточную фазу (день 4) ($p < 0.05$). *д, е* – Обработка Bet приводит к увеличению экспрессии генов *MyHC1*, *MyHC1a*, *MyHC1x*, *MyHC1b*, ассоциированных с различными типами мышечных волокон ($p < 0.05$).

быть связаны с изменением экспрессии генов и даже программы дифференцировки за счет регуляции клеточных сигнальных путей, в которых участвуют молекулы РНК. Показано, что в эмбриональных стволовых клетках m⁶A может влиять на метаболизм мРНК. m⁶A участвует в поддержании способности популяции клеток к восстановлению и служит маркером уровня транскрипции, необходимого для разворачивания программы диффе-

ренцировки эмбриональных клеток [26]. По этой причине мы предположили, что m⁶A-метилирование может играть важную роль в процессе миогенной дифференцировки. Нами показано, что m⁶A участвует в регуляции миогенной дифференцировки путем прямого воздействия на экспрессию соответствующих генов. Высокий уровень m⁶A-метилирования ускоряет дифференцировку ми-

областов, в то время как низкий уровень метилирования замедляет темп миогенеза.

METTL3 представляет собой субъединицу мультикомпонентного m⁶A-метилтрансферного комплекса [9]. Установлено, что нокадаун гена *METTL3* приводит к снижению уровня m⁶A-метилирования РНК в клетках линий HeLa и 293FT [8]. Кроме того, нами показано, что сверхэкспрессия *METTL3* в значительной степени увеличивает уровень m⁶A-метилирования РНК. Таким образом N⁶-аденозин-метилтрансфераза METTL3 вовлечена в регуляцию m⁶A-метилирования РНК. Количество метилированной РНК увеличивалось после *in vitro* инкубации РНК с белком METTL3, очищенным из клеток линии НЕК293 [27]. Показано также, что дефицит METTL3 приводит к пролиферации популяции эмбриональных стволовых клеток мыши [28], в то время как в клетках линии HeLa нокадаун гена *METTL3* запускает процесс апоптоза [29]. По этим причинам мы предположили, что роль METTL3 в регуляции жизнеспособности клеток должна зависеть от типа клеток. Показано, что METTL3 локализуется в ядерных гранулах, обогащенных факторами процессинга мРНК, что позволяет предположить участие этого белка в сплайсинге [30]. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия *METTL3* стимулирует миогенную дифференцировку и увеличивает относительные уровни мРНК генов-маркеров мышечных волокон разного типа. Возможно, эти эффекты объясняются влиянием METTL3 на сплайсинг РНК. Тем не менее, молекулярный механизм воздействия сверхэкспрессии *METTL3* на миогенную дифференцировку еще предстоит выяснить.

Кроме этого, для установления связи между m⁶A-метилированием и миогенной дифференцировкой миообластов мыши мы использовали вещества, влияющие на метилирование. Сус – ингибитор метионин-аденозилтрансферазы [31] – снижал внутриклеточную концентрацию S-аденозилметионина, влияя таким образом на уровень метилирования нуклеиновых кислот. В другой работе показано, что Сус снижает уровень m⁶A-метилирования РНК дозозависимым образом. Нами установлено, что обработка клеток Сус привела к снижению уровня m⁶A-метилирования РНК. Bet – производное глицина, содержащее три метильных группы, играет две основные физиологические роли: (1) действует как осмопротектор, который накапливается в тканях для регуляции объема клетки и поддержания ее целостности в условиях гиперосмолярного стресса; (2) является донором метильной группы, который участвует в цикле метионингомоцистеин [32, 33]. Превращение гомоцистеина в метионин необходимо для поддержания постоянного внутриклеточного уровня метионина, нейтрализации токсичного гомоцистеина и синтеза уни-

версального метильного донора S-аденозилметионина [34]. За последнее время установлено, что Bet может дозозависимо изменять уровень m⁶A-метилирования РНК. Например, обнаружено, что Bet снижает количество подкожного жира у свиней, и этот эффект обусловлен, по-видимому, изменением уровня m⁶A [35]. Кроме того, Bet стимулирует дифференцировку мышечного волокна и увеличивает размер мышечных трубок путем активации IGF-1-зависимого пути, что позволяет рассматривать это вещество как новое лекарственное средство, эффективное как в спортивной, так и в клинической практике, связанной с дисфункцией мышц [36]. Нами показано, что Bet в концентрации 0.2 М увеличивает уровень m⁶A-метилирования, что, в свою очередь, стимулирует миогенез и миогенную дифференцировку.

Можно заключить, что m⁶A-метилирование РНК – это динамическая модификация, представленность которой можно регулировать при помощи метилтрансферазы METTL3 и химических веществ.

Это исследование поддержано National Key R&D Program of China (2018YFD0501204), Key Program of National Science Foundation of China (грант № 31530073) и Chengdu Local Good Varieties of Livestock and Poultry Resources Protection and Exploitation and Utilization of Construction Projects.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grosjean H. (2005) Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. In: *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing. Topics in Current Genetics*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, **12**, 1–22.
2. Batista P.J., Molinie B., Wang J. (2014) m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. **15**, 707–719.
3. Zhao B.S., He C. (2015) Fate by RNA methylation: m⁶A steers stem cell pluripotency. *Genome Biol*. **16**, 1–3.
4. Shen L., Liang Z., Gu X., Chen Y., Teo Z.W., Hou X., Cai W.M., Dedon P.C., Liu L., Yu H. (2016) N⁶-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. **38**, 186–200.
5. Fustin J.M., Doi M., Yamaguchi Y., Hida H., Nishimura S., Yoshida M., Isagawa T., Morioka M.S., Kakeya H., Manabe I. (2013) RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*. **155**, 793–806.
6. Tao X., Chen J., Jiang Y. (2017) Transcriptome-wide N⁶-methyladenosine methylome profiling of porcine muscle and adipose tissues reveals a potential mechanism for transcriptional regulation and differential methylation pattern. *BMC Genomics*. **18**, 336.

7. Bokar J.A., Rathshambaugh M.E., Ludwiczak R., Narayan P., Rottman F. (1994) Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol. Chem.* **269**, 17697–17704.
8. Bokar J.A., Shambaugh M.E., Polayes D., Matera A.G., Rottman F.M. (1997) Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA*. **3**, 1233–1247.
9. Liu J., Yue Y., Han D., Wang X., Fu Y., Zhang L. (2014) A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 93–95.
10. Kuang S., Kuroda K., Grand F.L. (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. **129**, 999.
11. Tapscott S.J. (2005) The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development*. **132**, 2685.
12. Haldar M., Karan G., Tvrdik P., Capocchi M.R. (2008) Two cell lineages, Myf5 and Myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis. *Develop. Cell*. **14**, 437–445.
13. Singh K., Dilworth F.J. (2013) Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J.* **280**, 3991–4003.
14. Sabourin L.A., Rudnicki M.A. (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* **57**, 16.
15. Tidyman W.E., Moore L.A., Bandman E. (1997) Expression of fast myosin heavy chain transcripts in developing and dystrophic chicken skeletal muscle. *Develop. Dynamics*. **208**, 491.
16. Sant'ana Pereira J.A., Wessels A., Nijtmans L. (1995) New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types. *J. Muscle Res. Cell Motility*. **16**, 21.
17. Brooke M.H., Kaiser K.K. (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives Neurol.* **23**, 369–379.
18. Edström L., Kugelberg E. (1968) Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **31**, 424–433.
19. Burke R.E., Levine D.N., Tsairis P. (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.* **234**, 723–748.
20. Xu H., Tao X., Wei Y., Chen J., Xing S. (2015) Cloning of porcine GPIHBP1 gene, its tissue expression pattern and genetic effect on adipose traits. *Gene*. **557**, 146–153.
21. Kenneth J., Livak T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods*. **25**, 402–408.
22. Sabourin L.A., Rudnicki M.A. (2010) The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* **57**, 16–25.
23. Lombardini J.B., Talalay P. (1973) Effect of inhibitors of adenosine triphosphate: L-methionine S-adenosyltransferase on levels of S-adenosyl-L-methionine and L-methionine in normal and malignant mammalian tissues. *Mol. Pharmacol.* **9**, 542–560.
24. Niu Y., Zhao X., Wu Y.S., Li M.M., Wang X.J., Yang Y.G. (2012) N⁶-methyl-adenosine (m⁶ A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. **11**, 8–17.
25. Chen T., Hao Y.J., Zhang Y., Li M.M., Wang M., Han W. (2015) m⁶A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*. **16**, 289–301.
26. Batista P.J., Molinie B., Wang J., Qu K., Zhang J., Li L. (2014) m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. **15**, 707–719.
27. Wang Y., Li Y., Toth J.I., Petroski M.D. (2014) N⁶-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **16**, 191–198.
28. Batista P.J., Molinie B., Wang J., Qu K., Zhang J., Li L. (2014) m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. **15**, 707–719.
29. Bokar J.A. (2005) The biosynthesis and functional roles of methylated nucleosides in eukaryotic mRNA. In: *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing. Topics in Current Genetics*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, **12**, 141–177.
30. Bokar J.A., Shambaugh M.E., Polayes D., Matera A.G., Rottman F.M. (1997) Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA*. **3**, 1233.
31. Lin D.W., Chung B.P., Kaiser P. (2014) S-adenosylmethionine limitation induces p38 mitogen-activated protein kinase and triggers cell cycle arrest in G1. *J. Cell Sci.* **127**, 50–59.
32. Zhang F., Warskulat U., Wettstein M., Häussinger D. (1996) Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology*. **110**, 1543–1552.
33. Natalello A., Liu J., Ami D., Doglia S.M., De M.A. (2009) The osmolyte betaine promotes protein misfolding and disruption of protein aggregates. *Proteins Structure Function Bioinformatics*. **75**, 509–517.
34. Allison S.P. (1987) Annual review of nutrition. *Postgraduate Med. J.* **63**, 513.
35. Wang X., Zhu L., Chen J., Wang Y. (2015) mRNA m⁶A-methylation downregulates adipogenesis in porcine adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **459**, 201–207.
36. Senesi P., Luzi L., Montesano A., Mazzocchi N., Teruzzi I. (2013) Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation. *J. Translat. Med.* **11**, 1–12.

REGULATION OF m⁶A RNA METHYLATION AND ITS EFFECT ON MYOGENIC DIFFERENTIATION IN MURINE MYOBLASTS**J. N. Chen¹, Y. Chen¹, Y. Y. Wei¹, M. A. Raza², Q. Zou¹, X. Y. Xi¹, L. Zhu³,
G. Q. Tang³, Y. Z. Jiang¹, *, and X. W. Li³, ****¹*Department of Zoology, College of Life Science, Sichuan Agricultural University,
Ya'an, Sichuan, 625014 China*²*Department of Crop Cultivation and Farming System, College of Agronomy, Sichuan Agricultural University,
Chengdu, Sichuan, 611130 China*³*Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province,
Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan, 611130 China***e-mail: jiangyz04@163.com****e-mail: xuwei.li@sicau.edu.cn*

N⁶-Methyladenosine (m⁶A) has been identified as a conserved epitranscriptomic modification of eukaryotic mRNAs, and plays important biological roles in the regulation of cellular metabolic processes. However, its role in myogenic differentiation is unclear. Here, we altered the m⁶A RNA methylation level by overexpression of METTL3, and explored the effect of m⁶A RNA methylation on myogenic differentiation of murine myoblasts *in vitro*. The m⁶A RNA methylation level is regulated by exogenous methylation inhibitor cycloleucine (Cyc) and methyl donor betaine (Bet). Therefore, chemical reagents of Cyc and Bet were used to test the regulatory effect of m⁶A RNA methylation on myogenic differentiation. Results showed that METTL3 and Bet positively regulated the m⁶A RNA methylation levels, and Cyc negatively regulated m⁶A RNA methylation levels. In addition, m⁶A methylation positively regulated myogenic differentiation in murine myoblasts. These findings provide insight in the mechanisms underlying the effect of m⁶A RNA methylation on myogenesis.

Keywords: m⁶A RNA methylation, METTL3, myogenic differentiation