

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.27

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ГОМЕОДОМЕНСОДЕРЖАЩЕГО
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PREP1
В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЕРДЦА

© 2021 г. Ю. С. Стафеев^а, Е. К. Шевченко^а, М. А. Болдырева^а, Д. Н. Пеньков^а. *

^аНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 121552 Россия

*e-mail: dpenkov@yahoo.com

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 11.05.2021 г.

Принята к публикации 11.05.2021 г.

Гомеодоменсодержащие транскрипционные факторы играют важную роль в мезенхимальных стромальных клетках (МСК). Ранее была установлена роль Meis1, Pbx1 и Prep1, белков из семейства TALE (Three Amino acid Loop Extension), в адипоцитарной и остеогенной дифференцировке МСК мышцы. Используя метод иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq) и биоинформатический анализ, мы исследовали паттерн связывания PREP1 с геномной ДНК МСК сердца человека, идентифицировали близлежащие гены и проанализировали их онтологию. На основании полученных результатов обсуждается возможное участие фактора транскрипции PREP1 в прямом репрограммировании фибробластов в кардиомиоциты.

Ключевые слова: кардиомиоцит, мезенхимальные стромальные клетки, транскрипционный фактор, PREP1

DOI: 10.31857/S0026898421060124

Большинство заболеваний сердца связано с гибелью клеток миокарда и образованием в нем очагов фиброза [1]. Одна из проблем лечения пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда, связана с замещением кардиомиоцитов фибробластами в месте инфаркта сердечной мышцы (фиброза миокарда), что ведет к нарушению ее функции и развитию сердечной недостаточности. В решении этой проблемы может помочь перспективное направление медицины, основанное на терапии с использованием клеток, полученных с помощью кардиомиоцитарной дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток [2–4], а также прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты [5–8]. Вместе с тем эффективность прямого репрограммирования в настоящее время остается слишком низкой, а образующиеся клетки в большинстве своем гетерогенны. В качестве исходных клеток в этих методах можно использовать фибробласты непосредственно из очагов фиброза, а также мезенхимальные стромальные клетки (МСК), содержащиеся в сердце. В ряде работ была исследована роль различных кардиомиоцитспецифических транскрипционных факторов в этом процессе – на уровне как клеточных популяций, так и единичных кле-

ток [5, 9]. В результате проведенных исследований показано, что те факторы транскрипции, которые играют центральную роль в процессе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в кардиомиоциты, необходимы также для прямого репрограммирования.

Белок PREP1 относится к гомеодоменсодержащим факторам, играющим ключевую роль в дифференцировке различных клеток посредством регуляции ряда генов [10, 11]. Его участие в процессах развития сердца обсуждают в связи с тем, что мыши с нокаутом гена *Prep1* в предшественниках клеток сердца летальны в эмбриональном развитии [12]. Белок PREP1 высокоэкспрессирован в кардиомиоцитах, однако его связывание с хроматином на уровне полного генома ранее не изучалось.

В представленной работе исследована возможная роль транскрипционного фактора PREP1 в процессе репрограммирования клеток. Мы определили полногеномный профиль связывания фактора PREP1 в сердечных МСК и описали распределение связывания PREP1 с ДНК в зависимости от расположения регуляторных элементов (промоторов, энхансеров) в геноме. Биоинформатический анализ использован для выяснения возможной ро-

ли фактора PREP1 в репрограммировании мезенхимальных клеток в кардиомиоциты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Биоптаты клеток получены из биобанка здоровых доноров после смерти в течение не более 24 ч (любезно предоставлены Dr. Elena Sommariva из Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan, Италия). Во всех экспериментах использована ткань из стенки правого желудочка. Во время транспортировки биоптаты хранили в среде TMES при 4°C. TMES представляет собой среду Дульбекко в модификации Искова (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM; "Hyclone", США) с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки (FBS; "Hyclone", США) и 10 нг/мл фактора роста фибробластов (basic FGF; "R&D Systems", США).

Суспензионную культуру клеток получали обработкой ткани раствором коллагеназы (NB4; "Thermo Fisher Scientific", США) в TMES по нижеприведенной методике. Биоптаты дважды промывали 3 мл стерильного PBS. Образцы помещали в двухмиллилитровые пробирки с 1 мл раствора 3 мг/мл коллагеназы в TMES и разрезали стерильными ножницами на кусочки размером 0.5–1 мм³, которые инкубировали в том же буфере в течение 1.5 ч при 37°C при постоянном перемешивании и затем центрифугировали при 400 × g в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученный осадок после промывки ресуспендировали в TMES, переносили в стерильную 60-миллиметровую чашку и добавляли TMES до объема 3 мл. Планшет инкубировали при 37°C в течение 24 ч, после чего клетки промывали стерильным PBS и среду заменяли на новую [13].

Иммунопреципитация хроматина и секвенирование (ChIP-seq). Иммунопреципитацию хроматина проводили с использованием стандартного метода с антителом к PREP1 (N-15; "Santa Cruz Biotechnology", США). Клетки фиксировали в течение 10 мин в среде DMEM с 10% FBS и 1% формальдегида. Реакцию останавливали добавлением глицина (конечная концентрация 125 мМ). Фиксированные клетки промывали трижды по 5 мин холодным PBS и лизировали в буфере LB1, содержащем 0.5% NP-40 и 0.25% Triton X-100. Полученные ядра промывали в буфере LB2 (10 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 200 мМ NaCl) для удаления детергентов и ресуспендировали в буфере LB3, содержащем 0.1% дезоксихолата натрия и 0.5% натриевой соли *N*-лаурилсаркозина. Полученный хроматин дробили ультразвуком в аппарате Covaris ("COVARIS", США) до фрагментов размером 150–250 п.о. и инкубировали с магнитными частицами Dynabeads ("Invitrogen", США), предварительно конъюгиро-

ванными с антителами к PREP1 ("Invitrogen"). Для каждой иммунопреципитации использовали 20 мкг антитела. Иммунопреципитацию с IgG кролика использовали в качестве отрицательного контроля. После инкубации в течение ночи при 4°C частицы со связанными комплексами дважды промывали в растворах WB1 (50 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, 140 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% дезоксихолат натрия), дважды в WB2 (50 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% дезоксихолат натрия) и дважды в LiCl-WB (10 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 250 мМ LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% дезоксихолат натрия, 1 мМ EDTA). Иммунопреципитированные комплексы элюировали с частиц буфером для элюции: Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 2% SDS – в течение 30 мин при 65°C, после чего элюат инкубировали еще 12 ч при 65°C. ДНК очищали с помощью набора для очистки фрагментов ПЦР ("QIAGEN", Нидерланды).

Около 10 нг иммунопреципитированной ДНК использовали для секвенирования. После подготовки библиотеки по стандартной методике ДНК секвенировали с использованием системы Ion Torrent ("Thermo Fisher Scientific"). Артефакты устраняли с помощью программы FASTX-Toolkit v.0.0.13.2 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/), фрагменты собирали с использованием генома человека hg19 с использованием Bowtie v.0.12.8 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net>). Повторяющиеся фрагменты ДНК удаляли с помощью Samtools v 0.1.18.

Сайты связывания фактора PREP1 с геномом идентифицировали с использованием программы MACS 2.0 (<https://github.com/macs3-project/MACS>) с $p < 10^{-5}$. Для анализа использовались BAM-файлы после иммунопреципитации (IP) и до иммунопреципитации (input). Обнаружение новых мотивов связывания для идентификации последовательностей ДНК, обогащенных в выбранных областях, по сравнению со всем геномом проводили с использованием MEME-SUITE (<https://meme-suite.org>) в качестве алгоритма поиска мотива *de novo*.

Анализ онтологии генов. Для анализа геной онтологии использовали программу GREAT (<http://great.stanford.edu/public/html>) [14] и инструмент PANTHER overrepresentation test (<http://www.pantherdb.org>) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Связывание фактора PREP1 с хроматином в мезенхимальных стромальных клетках сердца

МСК получали из биоптатов эндомиокарда двух доноров (Био1, Био2), не имевших сердечно-сосудистых заболеваний, по методу, описанному

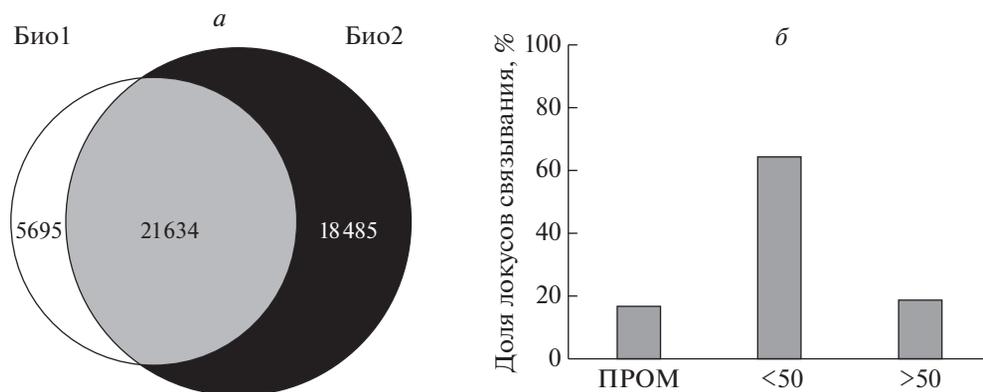


Рис. 1. Распределение локусов связывания PREP1 с ДНК в геноме мезенхимальных стромальных клеток сердца. *а* – Диаграммы Венна, показывающие распределения локусов связывания PREP1 в геноме МСК сердца, выделенных из биоптатов 1 (Био1) и 2 (Био2); цифрами показано число локусов; *б* – распределение локусов связывания PREP1 по расстоянию от старта транскрипции: менее 1 тыс.п.о. (ПРОМ), в интервале 1–50 тыс.п.о. (< 50) и более 50 тыс.п.о. (>50).

ранее [13]. Суспензионную клеточную культуру получали обработкой биоптата раствором коллагеназы. Клетки высевали на культуральные чашки, адгезивные клетки собирали для последующих пассажей и, получив необходимое количество, использовали в экспериментах ChIP-seq. Для анализа профиля связывания фактора PREP1 с хроматином использовали поликлональные антитела против PREP1 [16]. Результаты секвенирования выложены в базу данных GEO под номером GSE160286.

Установлено, что PREP1 связывается с большим числом локусов в геноме человека: 27 329 и 40 119 мест для Био1 и Био2 соответственно, что значительно больше их числа в клетках HeLa, как показано нами ранее [17]. Эти различия могут быть обусловлены особенностями трансформированных клеток HeLa, а также “глубиной” секвенирования. Важно, что полученные результаты согласуются с данными других авторов [18] по связыванию фактора PBX1 – основного кофактора PREP1 – с ДНК. Расположение локусов связывания PREP1 в клетках двух биоптатов совпадало с точностью до 60% (рис. 1*а*), что свидетельствует о статистической значимости полученных данных. Дальнейшие исследования проведены на общих для двух биоптатов локусах связывания PREP1. В результате проведенного биоинформатического анализа их распределения в геноме выявлена низкая локализацию в промоторах генов – 18% на расстоянии менее 1 тыс.п.о. от старта транскрипции. Большинство участков связывания PREP1 располагается далеко от старта транскрипции: около 65% на расстоянии от 1 до 50 тыс.п.о. и около 18% на расстоянии больше 50 тыс.п.о. (рис. 1*б*). Такой паттерн связывания PREP1 в геноме МСК сердца отличается от других исследованных типов клеток, для которых около половины локусов связывания

PREP1 расположено в промоторах [16, 17]. Среди генов, с которыми связывается PREP1, имеется значительное число генов-мишеней, идентифицированных нами ранее в других типах клеток [16].

Для определения расположения энхансеров в МСК сердца мы провели анализ ChIP-seq этих же клеток с использованием антител к модификации гистона H3 – H3K4me1, – которая считается маркером энхансеров [19]. В результате идентифицировано 135 886 энхансерных элементов. Как видно из диаграммы, представленной на рис. 2*а*, большинство сайтов связывания PREP1 в геноме МСК сердца расположено в энхансерных элементах. Это косвенное свидетельство важной роли PREP1 в этих клетках.

Ассоциация полученных PREP1-содержащих энхансеров с генами проведена методом “ближайшего гена”. Для определения возможной роли PREP1 в МСК сердца мы проанализировали онтологию тех генов, с регуляторными элементами которых связывается фактор PREP1. Для анализа регуляторные элементы разделили на 2 группы: промоторы (расположенные на расстоянии менее 1 тыс.п.о. от старта транскрипции) и идентифицированные нами энхансеры (табл. 1*С*, см. Дополнительные материалы). Результаты анализа геной онтологии представлены в табл. 1.

Число расположенных в энхансерах локусов ДНК, с которыми связывается PREP1, в 5 раз превышает связывание PREP1 с промоторами. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что промоторные элементы в МСК сердца, с которыми связывается PREP1, регулируют базовые биохимические функции клеток, что согласуется с полученными нами ранее результатами [16]. В отличие от этого, энхансерные элементы регулируют процессы, необходимые для дифференцировки МСК в кардиомиоциты (сигнальный путь Wnt, диффе-

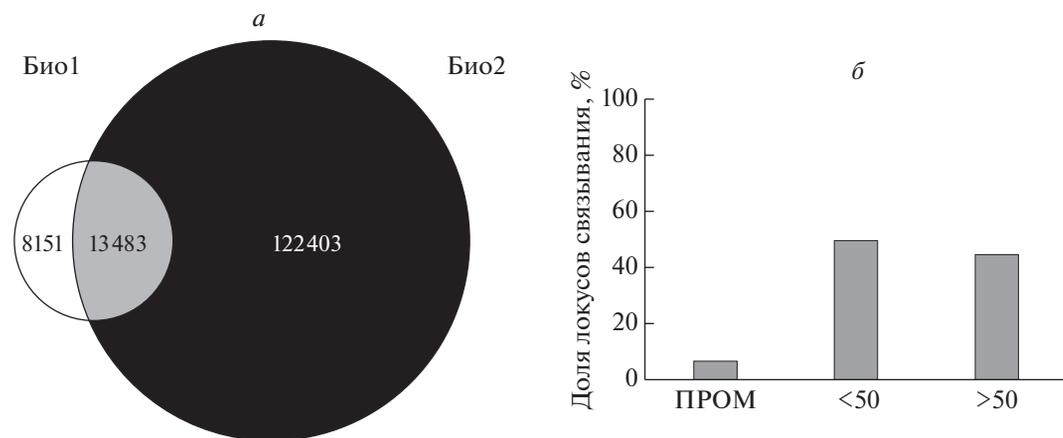


Рис. 2. Распределение энхансерных элементов, с которыми связывается PREP1 в геноме мезенхимальных стромальных клеток сердца. *a* – Диаграммы Венна, показывающие число локусов связывания PREP1, располагающихся в энхансерах генома МСК сердца (H3K4Me1⁺); цифрами показано число локусов; *b* – распределение локусов связывания PREP1 с энхансерными элементами по расстоянию от старта транскрипции: менее 1 тыс.п.о. (ПРОМ), в интервале 1–50 тыс.п.о. (< 50) и более 50 тыс.п.о. (>50).

ренцировка энтодермальных клеток, сигнальный путь рецептора фактора роста эндотелия сосудов, сигнальный путь рецептора трансформирующего фактора роста-бета, регуляция пролиферации гладкомышечных клеток), а также определяют морфологию кардиомиоцитов (регуляция формы клеток, положительная регуляция сборки стрессовых волокон, адгезия клеточного матрикса). Некоторые из них напрямую участвуют в развитии сердца и сосудов (развитие сердечного клапана, васкулогенез). Полный список категорий геной онтологии идентифицированных нами генов представлен в табл. 2S (см. Дополнительные материалы). Таким образом, связывание фактора PREP1 с ДНК в МСК сердца может быть одним из механизмов кардиомиоцитарной регуляции.

Исследование ДНК-фрагментов, связанных с PREP1, в хроматине МСК сердца

С целью определения мотивов связывания PREP1 с ДНК мы провели анализ коротких сайтов связывания PREP1 в промоторных областях, вне промоторных областей, а также в энхансерах МСК сердца. Как показано на рис. 3, в большинстве случаев (во всех трех группах элементов) PREP1 связывается с DECA-мотивами, что согласуется с ранее опубликованными данными [16]. Кроме того, наблюдается ассоциация с NFY-мотивом, что дополнительно подтверждает показанное ранее свойство PREP1 образовывать комплексы с факторами NFY. В промоторных областях обнаружены сайты связывания SP-факторов транскрипции, для которых ранее выявлено связывание с промоторами TALE-факторов [20].

В энхансерных регуляторных элементах, а также в элементах, расположенных далеко от старта транскрипции, найдены мотивы ДНК, с которыми связывается AP1-комплекс, а значит можно предполагать и связывание с ними таких белков как Jun/Fos, что показано нами ранее [21].

В результате углубленного анализа мотивов энхансерных элементов, с которыми связывается PREP1, обнаружены сайты связывания SMAD, из чего можно предположить формирование здесь мультимерных комплексов факторов транскрипции, в которые вовлечен и PREP1.

Проведенное нами полногеномное исследование профиля связывания транскрипционного фактора PREP1 с хроматином МСК сердца выявило его возможную роль как в функционировании МСК сердца, так и кардиомиоцитов. Это позволяет предположить возможность использования этого фактора в методе прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты.

Таким образом, на МСК сердца человека нами проведен полногеномный анализ сайтов связывания ДНК с фактором PREP1, идентифицированы гены и биологические процессы, в регуляции которых этот фактор может быть вовлечен, а также структурные мотивы ДНК, с которыми преимущественно связывается PREP1. На основании полученных результатов можно строить гипотезы о возможном составе комплексов, образуемых фактором транскрипции PREP1 на геномной ДНК. Нами обнаружено связывание PREP1 с генами, вовлеченными в вышеперечисленные процессы, из чего можно предполагать участия в них этого фактора.

Таблица 1. Анализ онтологии генов (GO), с которыми фактор PREP1 связывается в промоторах и энхансерах

GO – Биологический процесс (номер категории генной онтологии)	DR ^a	p-value	FDR
<i>Промоторы</i>			
Негативная регуляция ответа несвернутых белков ЭПР (GO:1900102)	4.14	6.94×10^{-4}	3.01×10^{-2}
Сигнальный путь ядер ЭПР ^b (GO:0006984)	2.93	4.16×10^{-4}	1.93×10^{-2}
Убиквитинзависимый путь ERAD (GO:0030433)	2.65	1.19×10^{-5}	8.24×10^{-4}
Трансмембранный транспорт белков (GO:0071806)	2.41	7.66×10^{-4}	3.24×10^{-2}
Ответ несвернутых белков ЭПР (GO:0030968)	2.35	1.30×10^{-5}	8.90×10^{-4}
Сигнальный путь Smoothened (GO:0007224)	2.23	1.03×10^{-3}	4.10×10^{-2}
Положительная регуляция протеасомного катаболизма убиквитинзависимых белков (GO:0032436)	2.21	2.36×10^{-4}	1.17×10^{-2}
Регуляция инициации трансляции (GO:0006446)	2.20	5.60×10^{-4}	2.49×10^{-2}
Регуляция мРНК-сплайсинга через сплайсосому (GO:0048024)	2.18	1.26×10^{-4}	6.79×10^{-3}
Положительная регуляция модификации гистонов (GO:0031058)	2.12	6.33×10^{-4}	2.77×10^{-2}
G2/M-переход митотического клеточного цикла (GO:0000086)	1.93	2.82×10^{-4}	1.36×10^{-2}
<i>Энхансеры</i>			
Негативная регуляция миграции гладкомышечных клеток (GO:0014912)	2.93	1.65×10^{-3}	4.29×10^{-2}
Сигнальный путь Wnt (GO:0007223)	2.84	9.51×10^{-5}	3.90E-03
Регуляция дифференцировки эндотелиальных клеток (GO:0045601)	2.47	1.41×10^{-3}	3.77×10^{-2}
Дифференцировка энтодермальных клеток (GO:0035987)	2.42	1.35×10^{-3}	3.65×10^{-2}
Формирование энтодермы (GO:0001706)	2.39	4.98×10^{-4}	1.58×10^{-2}
Регулирование проницаемости сосудов (GO:0043114)	2.35	1.15×10^{-3}	3.21×10^{-2}
Положительная регуляция сборки стресс-волокна (GO:0051496)	2.32	3.32×10^{-4}	1.12×10^{-2}
Клеточный ответ на стимулы фактора роста эндотелия сосудов (GO:0035924)	2.29	1.36×10^{-3}	3.67×10^{-2}
Положительная регуляция адгезии клеточного матрикса (GO:0001954)	2.23	6.23×10^{-4}	1.91×10^{-2}
Регулировка сборки фокальной адгезии (GO:0051893)	2.21	3.30×10^{-4}	1.12×10^{-2}
Сигнальный путь рецептора фактора роста эндотелия сосудов (GO:0048010)	2.16	2.50×10^{-4}	8.79×10^{-3}
Регуляция формы клеток (GO:0008360)	2.11	2.16×10^{-7}	1.69×10^{-5}
Сигнальный путь рецептора трансформирующего фактора роста-бета (GO:0007179)	2.06	4.36×10^{-5}	1.97×10^{-3}
Адгезия клеточного матрикса (GO:0007160)	2.05	6.39×10^{-6}	3.60×10^{-4}
Развитие сердечного клапана (GO:0003170)	2.05	1.73×10^{-3}	4.45×10^{-2}
Клеточный ответ на механическое воздействие (GO:0071260)	2.04	4.64×10^{-4}	1.50×10^{-2}
Васкулогенез (GO:0001570)	1.99	1.36×10^{-3}	3.67×10^{-2}
Регуляция пролиферации гладкомышечных клеток (GO:0048660)	1.94	3.06×10^{-5}	1.45×10^{-3}
Опосредованный интегрином сигнальный путь (GO:0007229)	1.94	3.41×10^{-4}	1.15×10^{-2}
Организация фибрилл коллагена (GO:0030199)	1.92	3.13×10^{-4}	1.07×10^{-2}
Регуляция миграции эндотелиальных клеток кровеносных сосудов (GO:0043535)	1.91	7.15×10^{-4}	2.16×10^{-2}
Регуляция эпителиально-мезенхимального перехода (GO:0010717)	1.89	1.05×10^{-3}	2.97×10^{-2}

^a Степень представленности (Degree of Representativeness). ^b ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

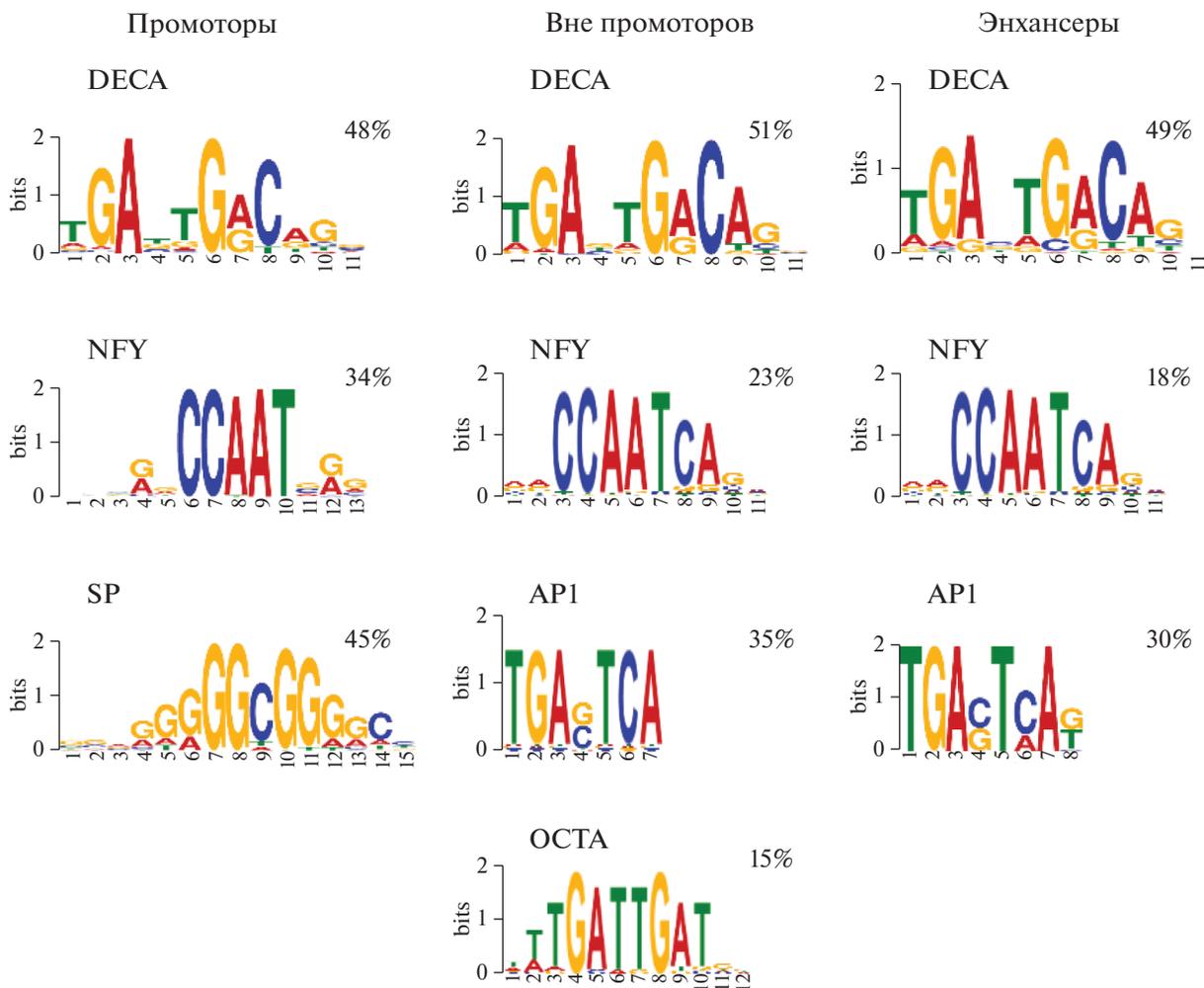


Рис. 3. ДНК-мотивы связывания фактора PREP1 в промоторах генов (менее 1000 п.о. от старта транскрипции), вне промоторов и в энхансерах. Приведено процентное содержание связанных с PREP1 локусов ДНК с указанными мотивами для каждой группы от общего числа локусов соответствующей группы.

Авторы выражают признательность д-ру Елене Соммарива (Elena Sommariva) из Кардиологического центра Монзино (Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan, Италия) за предоставленные нам клетки из биоптатов сердца, а также сотрудникам Genomics Unit (IFOM, Milan, Италия) за секвенирование образцов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках следующих научных проектов: “Механизмы участия гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов в кардиомиоцитарной дифференцировке и репрограммировании фибробластов в кардиомиоциты” (№ 19-29-04112) и “Роль фактора Prep1 в получении и адипоцитарной дифференцировке индуцированных стволовых клеток” (№ 18-015-00465).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институтского комитета по исследовательской этике и

Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Travers J.G., Kamal F.A., Robbins J., Yutzey K.E., Blaxall B.C. (2016) Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens. *Circ. Res.* **118**, 1021–1040.
2. Yoshida Y., Yamanaka S. (2017) Induced pluripotent stem cells 10 years later: for cardiac applications. *Circ. Res.* **120**, 1958–1968.
3. Kadota S., Shiba Y. (2019) Pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for heart disease treatment. *Curr. Cardiol. Rep.* **21**, 73.
4. Nakamura K., Hirano K., Wu S.M. (2013) iPS cell modeling of cardiometabolic diseases. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **6**, 46–53.

5. Tani H., Sadahiro T., Ieda M. (2018) Direct cardiac reprogramming: a novel approach for heart regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2629.
6. Sadahiro T. (2019) Cardiac regeneration with pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and direct cardiac reprogramming. *Regen. Ther.* **11**, 95–100.
7. Chen Y., Yang Z., Zhao Z.A., Shen Z. (2017) Direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 118.
8. Engel J.L., Ardehali R. (2018) Direct cardiac reprogramming: progress and promise. *Stem Cells Int.* **2018**, 1435746.
9. Stone N.R., Gifford C.A., Thomas R., Pratt K.J.B., Samse-Knapp K., Mohamed T.M.A., Radzinsky E.M., Schricker A., Ye L., Yu P., van Bommel J.G., Ivey K.N., Pollard K.S., Srivastava D. (2019) Context-specific transcription factor functions regulate epigenomic and transcriptional dynamics during cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell.* **25**, 87–102.
10. Blasi F., Bruckmann C., Penkov D., Dardaei L. (2017) A tale of TALE, PREP1, PBX1, and MEIS1: interconnections and competition in cancer. *Bioessays.* **39**, 5.
11. Longobardi E., Penkov D., Mateos D., De Florian G., Torres M., Blasi F. (2014) Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Dev. Dyn.* **243**, 59–75.
12. Fernandez-Diaz L.C., Laurent A., Girasoli S., Turco M., Longobardi E., Iotti G., Jenkins N.A., Fiorenza M.T., Copeland N.G., Blasi F. (2010) The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells. *Development.* **137**, 3393–3403.
13. Pilato C.A., Stadiotti I., Maione A.S., Saverio V., Catto V., Tundo F., Dello Russo A., Tondo C., Pompilio G., Casella M., Sommariva E. (2018) Isolation and characterization of cardiac mesenchymal stromal cells from endomyocardial bioptic samples of arrhythmogenic cardiomyopathy patients. *J. Vis. Exp.* **132**, 57263.
14. McLean C.Y., Bristol D., Hiller M., Clarke S.L., Schaar B.T., Lowe C.B., Wenger A.M., Bejerano G. (2010) GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat. Biotechnol.* **28**, 495–501.
15. Mi H., Muruganujan A., Thomas P.D. (2013) PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* **41**, D377–D386.
16. Penkov D., Mateos San M.D., Fernandez-Díaz L.C., Rosselló C.A., Torroja C., Sánchez-Cabo F., Warnatz H.J., Sultan M., Yaspo M.L., Gabrieli A., Tkachuk V., Brendolan A., Blasi F., Torres M. (2013) Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. *Cell Rep.* **3**, 1321–1333.
17. Palmigiano A., Santaniello F., Cerutti A., Penkov D., Purushothaman D., Makhija E., Luzi L., di Fagagna F.D., Pelicci P.G., Shivashankar V., Dellino G.I., Blasi F. (2018) PREP1 tumor suppressor protects the late-replicating DNA by controlling its replication timing and symmetry. *Sci. Rep.* **8**, 3198.
18. Siersbæk R., Rabiee A., Nielsen R., Sidoli S., Traynor S., Loft A., Poulsen L.C., Rogowska-Wrzęsinska A., Jensen O.N., Mandrup S. (2014) Transcription factor cooperativity in early adipogenic hotspots and super-enhancers. *Cell Rep.* **7**, 1443–1455.
19. Kimura H. (2013) Histone modifications for human epigenome analysis. *J. Hum. Genet.* **58**, 439–445.
20. Völkel S., Stielow B., Finkernagel F., Berger D., Stiewe T., Nist A., Suske G. (2018) Transcription factor Sp2 potentiates binding of the TALE homeoproteins Pbx1:Prep1 and the histone-fold domain protein Nf-y to composite genomic sites. *J. Biol. Chem.* **293**, 19250–19262.
21. Dardaei L., Penkov D., Mathiasen L., Bora P., Morelli M.J., Blasi F. (2015) Tumorigenesis by Meis1 overexpression is accompanied by a change of DNA target-sequence specificity which allows binding to the AP-1 element. *Oncotarget.* **6**, 25175–25187.

POSSIBLE ROLE OF PREP1 HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR IN CARDIAC MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Y. S. Stafeev¹, E. K. Shevchenko¹, M. A. Boldireva¹, and D. N. Penkov¹, *

¹ National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia

*e-mail: dpenkov@yahoo.com

Homeodomain transcription factors play a significant role in mesenchymal stromal cells (MSCs). Previously, the role of Meis1, Pbx1 and Prep1 proteins from the TALE (Three Amino acid Loop Extension) family in adipocytic and osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stromal cells was established. In this work, using ChIP-seq and bioinformatic analysis we investigated the binding pattern of PREP1 with the genomic DNA of human heart MSCs, identified nearby genes, and analyzed their ontology. The target genes of the PREP1 factor in cardiac MSCs have been established, and results obtained allow us to suppose involvement of the transcription factor PREP1 in the direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes.

Keywords: cardiomyocyte, mesenchymal stromal cells, transcription factor, PREP1