

**ПРОДУКТ ГЕНА *BMI1* — КЛЮЧЕВОЙ КОМПОНЕНТ СЕМЕЙСТВА POLYCOMB — ПОЗИТИВНО РЕГУЛИРУЕТ ЖИРОВУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

© Н. С. Петров, Н. А. Верещагина, Е. Н. Сушилова, А. В. Кропотов, Н. Ф. Михеева, Б. В. Попов<sup>1</sup>

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: borisvp478@gmail.com

Белок *Bmi1* является ключевым компонентом семейства Polycomb (PcG), которое у млекопитающих регулирует основные функции соматических стволовых клеток (СК) — самоподдержание и дифференцировку путем транскрипционной супрессии генов, связанных с клеточным циклом и дифференцировкой. Наиболее хорошо изученными мишенями *Bmi1* являются гены локуса *Ink4* — ингибитор циклинзависимых киназ *p16<sup>Ink4a</sup>* и *p14<sup>Arf</sup>*, подавление экспрессии которых при активирующих мутациях гена *BMI1* является причиной появления раковых СК и карцином в различных тканях. Инактивация *BMI1*, напротив, приводит к остановке клеточного цикла и клеточному старению. Хотя медицинские последствия гипо- и гиперфункции *BMI1* широко известны, его мишени и роль в механизме регуляции функций тканеспецифических СК не изучены. Цель настоящей работы заключалась в оценке регуляторной роли *BMI1* в жировой дифференцировке (ЖД) мышечных мезенхимных стволовых клеток (МСК). Индукция ЖД в мышечных МСК линии СЗН10Т1/2 была ассоциирована с повышением экспрессии *BMI1*, генов семейства *pRb* (*RB* и *p130*) и гена деметилазы *UTX*, но не метилтрансферазы *EZH2*, продукты которых регулируют уровень метилирования *H3K27*, играющего роль эпигенетического переключателя ЖД в МСК человека (Hemming et al., 2014). Инактивация *BMI1* с помощью специфической миРНК значительно замедляла и снижала уровень ЖД, но не отменяла формирование адипоцитов, что сочеталось с полным торможением экспрессии адипогенных маркеров — *PPAR $\gamma$ 2* и *ADIPOQ* (адипонектина), а также со значительным снижением экспрессии генов *RB* и *p130*, но не *UTX*. Полученные нами данные свидетельствуют о различиях в механизме эпигенетической регуляции ЖД в МСК мыши и человека.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, жировая дифференцировка, Polycomb, *Bmi1*, *pRb*.

Принятые сокращения: ЖД — жировая дифференцировка, КД — костная дифференцировка, МСК — мезенхимные стволовые клетки, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени, СК — стволовые клетки, ФБС — фетальная бычья сыворотка, ЭСК — эмбриональные СК, *pRb* — продукт гена ретинобластомы.

Белки семейства Polycomb (PcG) были открыты как транскрипционные супрессоры генов *HOX*, контролирующих формирование плана и сегментацию тела (гомеотические регуляторы) в ходе развития у мух *Drosophila*. Мутации генов семейства PcG сопровождаются нарушениями формирования, например появлением дополнительных половых гребешков на 2-м и 3-м торакальных сегментах у мух *Drosophila* (Kennison et al., 1995). У млекопитающих белки PcG регулируют состояние идентичности и дифференцировку стволовых клеток (СК) (Sparmann, van Lohuizen, 2006; Pietersen, van Lohuizen, 2008). Семейство PcG формирует многокомпонентные белковые комплексы (Polycomb repressive complexes, PRCs), которые тормозят транскрипцию путем модификации хроматина (Boyer et al., 2006; Bracken et al., 2006; Lee et al., 2006). В СК белки PcG связываются с промоторами дифференцировочных генов и репрессируют их активность, регулируя выбор клеточной судьбы в различных клеточных линиях (Pasini et al., 2007; Ezhkova et al., 2009).

Существующая модель транскрипционной регуляции белками PcG предполагает, что комплекс PRC2, включающий в себя три основных компонента — *Ezh2*, *Eed* и *Suz12*, триметилирует сайт *H3K27* с помощью метилтрансферазы *Ezh2*. Комплекс PRC1 распознает и связывает *H3K27me3*, вызывая транскрипционную супрессию ассоциированных с ним генов (Cao et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002). PRC1 содержит четыре основных белка — Polycomb (*Cbx*), Polyhomeotic (*Edr*), Posterior sex combs (*Bmi1*) и Ring 1, каждый из которых может быть представлен несколькими изоформами (Levine et al., 2002; Valk-Lingbeek et al., 2004). Белки *Cbx* распознают и связывают *H3K27me3*, а белки Ring 1 укрепляют связь PcG с *H3K27me3* путем моноубиквитинирования лигандина *H2AK119* (De Napoles et al., 2004). Ген *BMI1* человека (*hBMI1*, B-cell-specific Moloney leukemia virus integration site) картирован на коротком плече хромосомы 10 (10.11.23) и кодирует мРНК 3.4 кб. Продукт *hBMI1* представляет собой белок с мол. массой 37 кДа, включающий

в себя 326 аминокислотных остатков, тогда как у мыши *BM11* (*mBM11*) кодирует белок с мол. массой 45—47 кДа (Cao et al., 2011; Bhattacharya et al., 2015). *Bmi1* не обладает собственной ферментной активностью, но содержит в своей структуре консервативные домены Ring finger (кольцевой палец) и НТН (helix-turn-helix), которые наделяют его способностью изменять структуру хроматина (Cao et al., 2005). К наиболее хорошо изученным мишеням *Bmi1* относятся гены локуса *Ink4* — *p16<sup>Ink4a</sup>* и *p14<sup>Arf</sup>* (Silva et al., 2006). Белок *p16<sup>Ink4a</sup>* является ингибитором циклин-зависимых киназ (Cdk4-6) фазы клеточного цикла  $G_1$ , торможение его продукции белком *Bmi1* приводит к повышению активности киназных комплексов Cdk4-6/циклины D, ингибиции белков семейства pRb и ускорению клеточной пролиферации. Функциональная роль *p14<sup>Arf</sup>* связана с торможением активности убиквитинового лигазы Mdm2, инактивирующей опухолевый супрессор p53. Торможение его продукции белком *Bmi1* сопряжено с убиквитинированием и протеасомной деградацией p53, активацией клеточного цикла и повышением чувствительности клеток к злокачественной трансформации. Снижение активности *Bmi1*, напротив, приводит к повышению продукции белков *p16<sup>Ink4a</sup>* и *p14<sup>Arf</sup>*, замедлению пролиферации и клеточному старению (Park et al., 2004).

*Bmi1* играет более важную функциональную роль в СК, чем в дифференцированных клетках, участвуя в формировании механизма, регулирующего основную функцию СК — самоподдержание. ЭСК и соматические СК характеризуются высоким уровнем *Bmi1*, который снижается в ходе дифференцировки. Повышение уровня *Bmi1* является причиной возникновения раковых СК и опухолей в различных тканях, а эктопическая экспрессия *Bmi1* ведет к иммортализации эпителиальных клеток (Dimri et al., 2002; Lessard, Sauvageau, 2003; Molofsky et al., 2005). Самоподдержание СК зависит от супрессии множества дифференцировочных генов, на промоторах которых обнаружены белки PcG. В ходе дифференцировки ЭСК и соматических СК отмечаются снижение уровня взаимодействия PcG с регуляторными областями генов дифференцировки, потеря меток H3K27me3 и H2AK119ub1 (Boyer et al., 2006; Bracken et al., 2006; Lee et al., 2006).

Хотя снижение уровня *Ezh2* в ходе клеточной дифференцировки было отмечено для различных видов СК и дифференцирующихся клеток, оно не является общей закономерностью, применимой к любым клеточным типам. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что регуляция жировой дифференцировки (ЖД) МСК человека может осуществляться путем изменения уровня метилирования H3K27 метилтрансферазой *Ezh2* и деметилазой *Utx*, формирующими эпигенетический переключатель, контролирующей обратимый переход с жировой на костную дифференцировку (КД). Повышение уровня и активности *Ezh2* в МСК человека способствует ЖД, тогда как деметилаза *Utx* действует в противоположном направлении (Hemming et al., 2014).

Цель настоящей работы заключалась в оценке регуляторной роли *BM11* в ЖД мышечных МСК. Первая задача работы заключалась в торможении экспрессии *BM11* в клетках 10T1/2 с помощью стабильной экспрессии в них миРНК против *BM11*. Вторая задача работы включала в себя индукцию ЖД и оценку ее уровня в контрольных и опытных клетках линии 10T1/2 с инактивированным *BM11*. В третью задачу работы входило определение уровня экспрессии генов *BM11*, *EZH2*, *UTX*, *RB* и *p130* в индуцированных к ЖД клетках 10T1/2 с инактивирован-

ным *BM11*. Определение уровня экспрессии указанных генов давало возможность установить их роль в ходе ЖД мышечных МСК.

## Материал и методика

Клеточные линии и культивирование клеток. Мышечные эмбриональные фибробласты линии СЗН10Т1/2 (10Т1/2) из Американской коллекции клеточных культур (АТСС) культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 50 мкг/мл гентамицина, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5 % CO<sub>2</sub> и влажность 100 %).

Индукция ЖД. Клетки ( $1 \cdot 10^4$ ) в логарифмической фазе роста культивировали на покровных стеклах для микроскопии в 35-миллиметровых культуральных чашках в 1.5 мл ростовой среды. На следующие сутки ростовую среду заменяли специальной дифференцировочной, содержащей 50 мкг/мл гентамицина, 10 % ФБС, 5 мкг/мл инсулина, 50 мкМ индометацина,  $1 \cdot 10^{-6}$  М дексаметазона и 0.5 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (Sigma, США). Жировые включения выявляли на 7, 10 и 14-е сут после индукции ЖД, фиксируя клетки в 4%-ном параформальдегиде в PBS в течение 1 ч. Фиксированные клетки промывали дважды дистиллированной водой, 1 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 масляного красного в 100%-ном изопропанолу, 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  $1.5 \cdot 10^5$  клеток выращивали в течение 10 сут на чашках 100 мм, вызывая ЖД по вышеописанной методике. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в культуральные 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 детергентом 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 в 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 флуоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флуоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлуоресцентные изображения получали на электронном сканирующем микроскопе Leica (Carl Zeiss, Германия), используя лазеры с длинами волн 488 и 633 нм.

Последовательности праймеров для ПЦР-РВ

Ген	Прямой праймер (5'—3')	Обратный праймер (5'—3')
<i>β-актин</i>	CATCCGTAAGACCTCTATGCC	GACTCATCGTACTCCTGCTTG
<i>BM11</i>	GGAGACCAGCAAGTATTGTCC	TTCTCCTCGGTCTTCATTGG
<i>EZH2</i>	GCAATTTAGAAAACGGAAATGC	GTACAAAACACTTTGCAGCTGG
<i>UTX</i>	CGGGCGACAAAAGAAGAAC	AGATGAGGCGGATGGTAATG
<i>RB</i>	CATCTAATGGACTTCCAGAG	CATAACAGTCCTAACTGGAG
<i>p130</i>	TTGGACTCTGTCTCGGTGTGTCTAAG	AATGCGTCATGCTCCAGAACCAG
<i>PPARγ2</i>	TGACCCAGAGCATGGTGCCTTC	TGTGGCATCCGCCCAAACC
<i>ADIPOQ</i>	GGAGAGAAAGGAGATGCAGGTCT	GGTAGTTGCAGTCAGTTGGTATCAT

Нокдаун гена *BM11*. Лентивирусный вектор FUGW-H1 *BM11* shRNA1 был получен в дар от д-ра Sally Temple (компания Addgene, плаزمид № 21576) (Fasano et al., 2007). Вектор экспрессирует зеленый флуоресцирующий белок (GFP) и малую шпилечную РНК (миРНК), содержащую 19-мерную последовательность GAGATA-ATAAGCTTGTCTA, направленную против открытой рамки считывания гена *BM11*. Для упаковки лентивирусных частиц клетки линии 293T были котрансфицированы при помощи кальций-фосфатного метода плазмидами FUGW-H1 *BM11* shRNA1, psPAX2 и pMD2.G (Tronolab, США) в количестве 11, 8 и 4 мкг на 1 100-миллиметровую чашку соответственно. На следующий день после трансфекции среду заменяли на свежую. Среду, содержащую вирусные частицы, собирали на 2-е и 3-и сут после трансфекции и фильтровали через фильтр с размером пор 45 нм. Титр вируса определяли на клетках 293T при их инфицировании вирусом в 10-кратных разведениях содержащей его среды с последующим цитофлуориметрическим измерением доли клеток, экспрессирующих Gfp, на цитометре Beckman Coulter (США). Используемая нами среда содержала  $2 \cdot 10^6$  вирусных единиц в 1 мл среды. Клетки линии 10T1/2 высевали в количестве  $2 \cdot 10^5$  на 60-миллиметровые чашки. На следующий день ростовую среду заменяли 2 мл среды, содержащей вирусные частицы, и инкубировали в ней клетки 18 ч, после чего среду заменяли на свежую. Цитофлуориметрический анализ экспрессии GFP проводили через 2 сут после инфицирования.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Обще-клеточную РНК выделяли из  $2 \cdot 10^6$  клеток с помощью набора реагентов GeneJET RNA (Thermo Scientific, США). Очищенную РНК обрабатывали ДНКазой I (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 50 мМ раствора 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 РНК 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 в течение 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 и 0.5 мкл ингибитора РНКаз 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 Applied Biosystems 7300 со

следующими параметрами реакции: иницирующее плавление — 5 мин при 95 °С, плавление — 15 с при 95 °С, отжиг — 30 с при 58 °С, синтез — 20 с при 72 °С; 40 циклов. Реакционная смесь состояла из 8 мкл 2.5-кратного раствора, содержащего дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP), ПЦР-буфер, MgCl<sub>2</sub>, Taq ДНК-полимеразу, SYBR Green I и ROX (Синтол, Россия), 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров (см. таблицу), 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 была проведена в 3 биологических повторах.

Антитела. В работе использовали кроличьи поликлональные антитела против *Bmi1* (Santa Cruz, Inc., США) и Gfp (Sigma, США), а в качестве вторых антител — Alexa Fluor® 633 Fab-фрагмент козлиных антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика (Invitrogen, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием средней арифметической величины и стандартного отклонения, определяемых с помощью программы Microsoft Office Excel, 2010. Для оценки достоверности различий использовали критерий Стьюдента. Каждый эксперимент повторяли трижды. Интенсивность флуоресценции в препаратах, полученных на сканирующем лазерном микроскопе Leica, определяли с помощью программы Zeiss LSM.

## Результаты

Инактивация *BM11* в МСК линии 10T1/2. После инфицирования лентивирусной конструкцией, содержащей миРНК для инактивации *BM11* и ген *GFP*, 80 % клеток 10T1/2 выявлялись цитометрически по продукции Gfp в отличие от контрольных неинфицированных клеток (рис. 1, а). Иммунофлуоресцентная оценка продукции клетками Gfp путем регистрации нативной флуоресценции, возбуждаемой лазером 488 нм, и флуоресценции, опосредованной специфическими антителами к Gfp и вторыми антителами, конъюгированными с красителем Cy5, возбуждаемой лазером 633 нм, подтвердила цитометрические данные (рис. 1, б). Большинство инфицированных клеток продуцировало Gfp, хотя уровень его экспрессии, соответствующий интенсивности естественной и индуцированной флуоресценции, был различен в разных клетках. Эндогенный *Bmi1* выявлялся в клетках 10T1/2 с помощью специфических антител и вторых антител с красной флуоресценцией в большинстве клеток

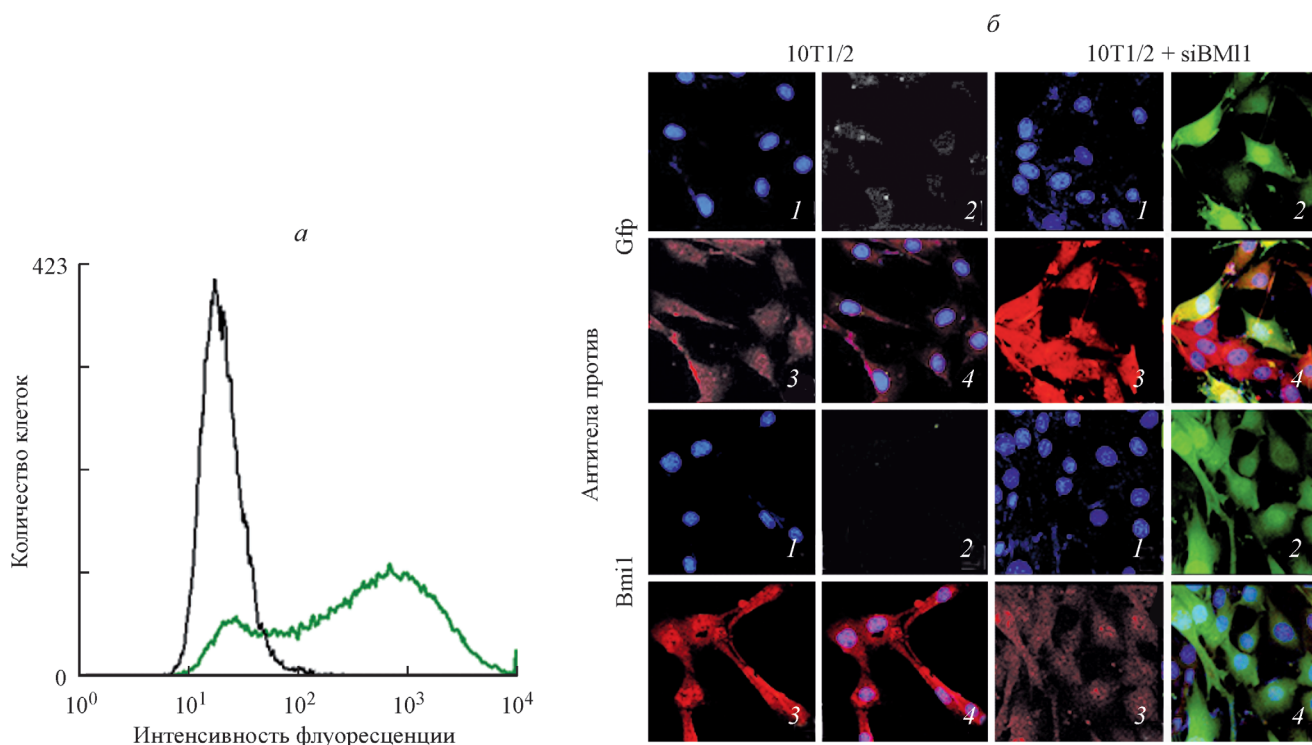


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции GFP (а) и иммунофлуоресценция клеток линии 10T1/2, экспрессирующих GFP и Bmi1 (б).

а — гистограммы распределения клеток неинфицированных (черная кривая) и инфицированных лентивирусом FUGW-H1 BMI1 shRNA1, кодирующим миРНК против *BMI1* и ген *GFP* (зеленая кривая). б: 1 — окрашивание DAPI, 2 — нативная флуоресценция GFP, 3 — связывание специфическими антителами и вторыми антителами, конъюгированными с красителем Cy5, 4 — совмещенное изображение. Об.: 40×.

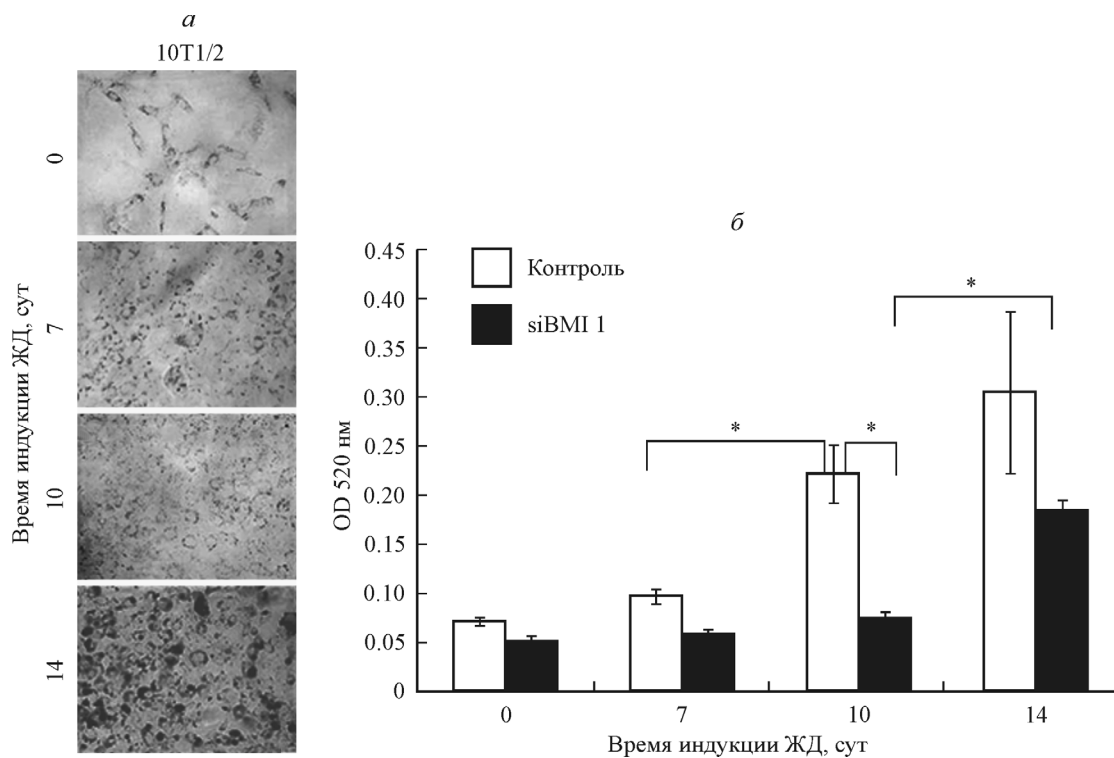


Рис. 2. Влияние нокдауна *BMI1* (siBMI1) на накопление жировых вакуолей в клетках 10T1/2 при индукции жировой дифференцировки (ЖД).

а — окраска клеток масляным красным на различных сроках ЖД. б — спектрофотометрическая оценка количества красителя, связываемого адипоцитами на различных сроках дифференцировки; показаны средние значения оптической плотности (OD) при 520 нм и их ошибка.  $n = 3$ , звездочка показывает статистически значимые различия при  $P < 0.05$ .

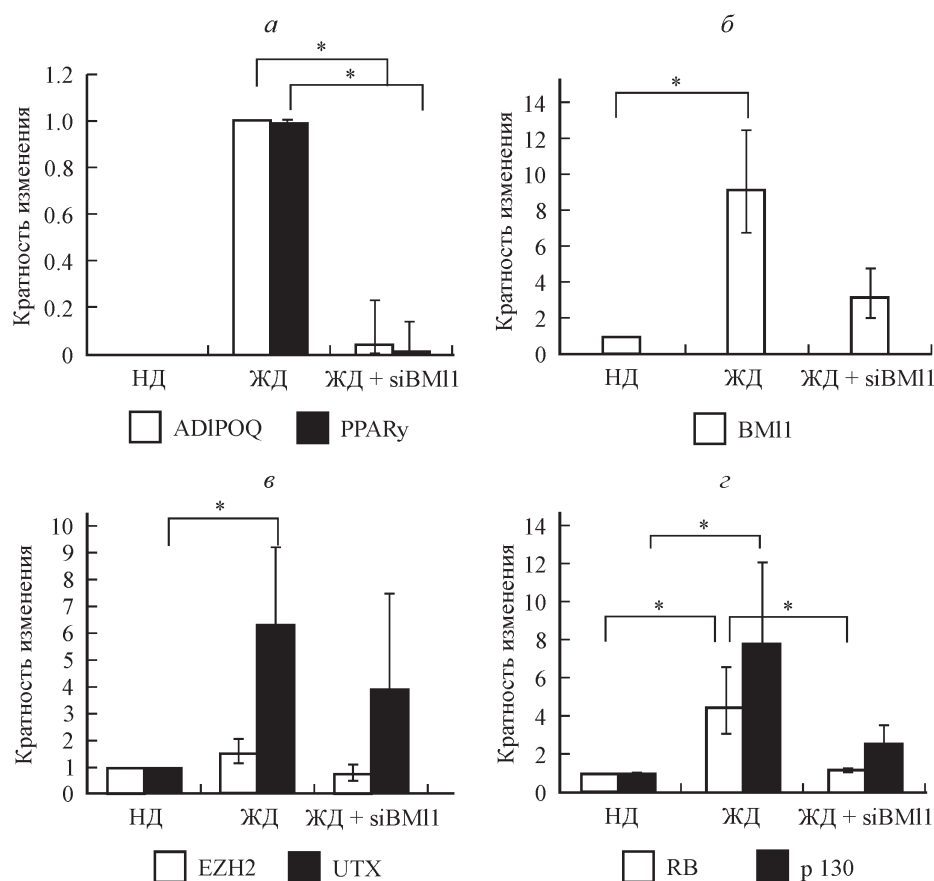


Рис. 3. Изменение экспрессии регуляторных генов в недифференцированных (НД), дифференцированных (ЖД) клетках линии 10T1/2 через 10 сут после индукции ЖД и при нокдауне *BM11* (ЖД + siBM11).

*a* — *PPAR $\gamma$*  и *ADIPOQ* (адипонектин), *б* — *BM11*, *в* — *EZH2* (ген метилтрансферазы) и *UTX* (ген деметилазы), *г* — *RB* и *p130*. Данные ПЦР-РВ представляют собой средние арифметические величины и их ошибки,  $n = 3$ , звездочка показывает достоверность различий при  $P < 0.05$ .

показывал смешанную ядерно-цитоплазматическую локализацию (рис. 1, б). В инфицированных клетках специфическая флуоресценция, опосредованная антителами к *Bmi1*, значительно снижалась, в препаратах выявлялись лишь единичные окрашенные на *Bmi1* клетки, тогда как нативная флуоресценция *Gfr* не изменялась (рис. 1, б).

Инактивация *BM11* тормозит индуцированную ЖД в МСК. Клетки линии 10T1/2 высокочувствительны к индукции ЖД и к 14-м сут после ее начала значительная часть клеток в популяции накапливала жировые вакуоли, окрашивающиеся красителем масляным красным (рис. 2, а). Инактивация *BM11* замедляла развитие ЖД и уменьшала ее уровень, что следовало из количественной оценки ЖД с помощью спектрометрического определения количества красителя, экстрагированного из дифференцированных клеток. В нормальных клетках увеличение накопления жировых включений выявлялось между 7-ми и 10-ми сут после индукции ЖД. В эти же сроки наблюдали различия между опытной и контрольной группами по уровню накопления жировых включений (рис. 2, а). В клетках с инактивированным *BM11* увеличение накопления жира отмечали только между 10-ми и 14-ми сут ЖД (рис. 2, б).

Жировая дифференцировка в клетках 10T1/2 сопряжена с индукцией экспрессии *BM11*, *RB*, *p130* и *UTX*, но не *EZH2*. В ходе ЖД в клетках индуцировалась экспрессия генов ее тканеспецифических маркеров — *PPAR $\gamma$ 2* и *ADIPOQ* (адипонекти-

на), уровень которых повышался в десятки раз по сравнению с недифференцированными клетками (рис. 3, а). Инактивация *BM11* практически полностью предотвращала экспрессию адипогенных маркеров, уровень их индукции при ЖД (рис. 3, а) уменьшался в таких клетках в десятки раз по сравнению с нормальными клетками. Степень снижения индукции адипогенных маркеров при ЖД в клетках с нокдауном *BM11* значительно превышала таковую для *BM11*, экспрессия которого возрастала в тех же условиях в 3 раза по сравнению с недифференцированными клетками (рис. 3, а, б). Интересно, что индукция ЖД в клетках 10T1/2 была сопряжена с повышением уровня экспрессии генов белкового семейства *pRb* — *RB*, *p130* (рис. 3, г) и деметилазы *H3K27* *UTX*, но не метилтрансферазы *EZH2* (рис. 3, в), продукт которой триметилирует тот же сайт. Инактивация *BM11* предотвращала повышение уровня экспрессии генов *RB* и *p130* (рис. 3, г), но не отменяла активацию экспрессии *UTX* (рис. 3, в).

## Обсуждение

Цель настоящей работы заключалась в оценке регуляторной роли семейства *PcG* в механизме ЖД мышечных МСК. Литературные данные свидетельствуют о том, что консервативная роль белков этого семейства заключается в регуляции самоподдержания СК путем сопряжения ее с дифференцировкой. Белки *PcG* обратимо репрессируют

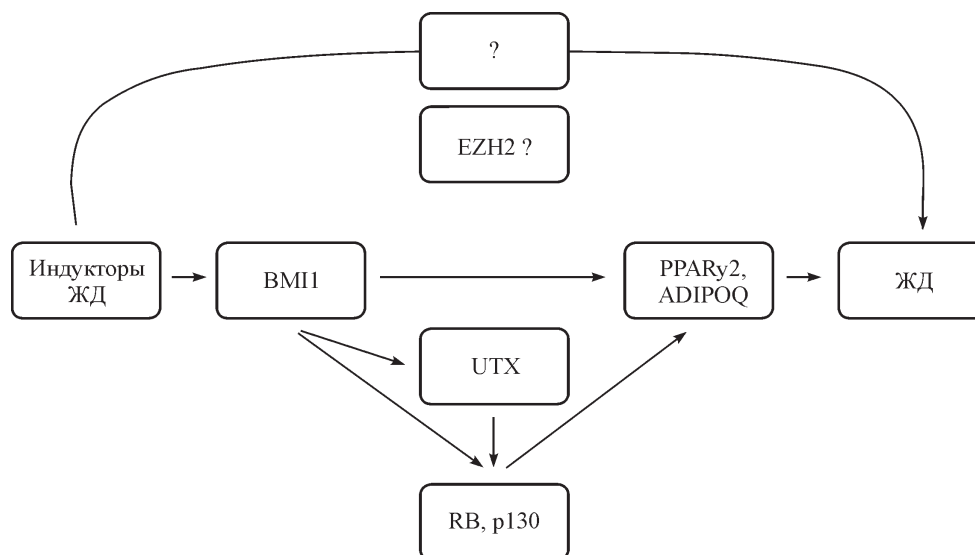


Рис. 4. Схематическое изображение взаимодействия генов *BM11*, *UTX*, *RB* и *p130* в ходе ЖД мышечных МСК линии 10T1/2.

Индукция ЖД основана на механизме, включающем в себя повышение экспрессии *BM11*, продукт которого входит в состав семейства PcG, а также активации других неидентифицированных в настоящей работе факторов. Опосредованная *BM11* активация *PPARγ2* (тканеспецифического индуктора ЖД) и *ADIPOQ* (терминального маркера ЖД) может поддерживаться через дополнительный механизм, включающий в себя *RB*, *p130* и *UTX*. Положительное влияние *UTX* на экспрессию маркеров ЖД, по-видимому, опосредуется через *RB* и *p130*, которые, по данным литературы, взаимодействуют с PcG на основе положительной обратной связи. Роль *EZH2* в ЖД мышечных МСК остается непонятной.

промоторы дифференцировочных генов, способствуя выбору клеточной судьбы в случае их избирательной депрессии. В ходе развития и дифференцировки белки PcG осуществляют транскрипционный контроль альтернативных регуляторов в любой клеточной линии, а нарушение этого процесса ведет к возникновению опухолей различных тканей (Bracken, Helin, 2009). Процесс тканеспецифической дифференцировки представляет собой динамичное репрограммирование профиля экспрессии множества генов с участием белков PcG, однако механизмы этих процессов для многих типов дифференцировок, включая ЖД, не изучены.

В качестве рабочей гипотезы при изучении механизма ЖД в мышечных МСК линии 10T1/2 мы использовали идею о том, что метилтрансфераза *Ezh2* и деметилаза *Utx*, определяющие уровень метилирования H3K27me3, могут формировать эпигенетический переключатель, контролирующий обратимый переход с КД на ЖД (Hemming et al., 2014). По данным этих исследователей, при ЖД в МСК человека отмечаются высокий уровень *Ezh2*, низкий уровень *Utx* и связывание метилированного H3K27 с промоторами тканеспецифических регуляторов ЖД, в частности с *PPARγ2*. Мы учитывали, что активность переключателя *Ezh2/Utx* контролируется комплексом PRC1 и может передаваться через белок *Bmi1*, а также тот факт, что оба компонента переключателя находятся под контролем белков семейства pRb. Инактивирующие мутации *RB* сопряжены с повышением активности белков *Ezh2* и *Eed*, продукция которых, как и *Bmi1*, значительно возрастает при различных формах рака (Bracken et al., 2003; Bracken, Helin, 2009; Cao et al., 2011). С другой стороны, *Ezh2* и *Bmi1* эффективно метилируют H3K27 и супрессируют продукцию *p16<sup>Ink4a</sup>* только в клетках с активными белками семейства pRb, т. е. действуют в pRb-зависимой манере (Kotake et al., 2007).

Для решения поставленной в настоящей работе задачи мы стабильно экспрессировали в полипотентных МСК линии 10T1/2 лентивирусный вектор, содержащий

миРНК против *Bmi1*, и получили клетки с инактивированным *Bmi1* (рис. 1, а, б). В клетках 10T1/2 после индукции ЖД отмечается накопление жировых вакуолей, окрашивающихся красителем масляным красным, экстракция которого давала возможность количественно оценить динамику ЖД в норме, а также замедление и снижение ее уровня в клетках с инактивированным *Bmi1* (рис. 2, а, б).

С помощью ПРЦ-РВ мы нашли, что при ЖД происходит индукция экспрессии генов ее маркеров — *PPARγ2* и *ADIPOQ*, которая полностью отменяется при инактивации *Bmi1* в дифференцированных клетках (рис. 3, а), в которых на 10-е сут после индукции ЖД образуется в 3 раза меньше адипоцитов по сравнению с контролем (рис. 2, б). Эти результаты позволяют предположить, что *Bmi1* не является единственным медиатором ЖД (рис. 4). Поскольку, по данным РВ-ПЦР, уровень снижения экспрессии маркеров ЖД в дифференцированных клетках с инактивацией *Bmi1* более выражен, чем степень инактивации *Bmi1* (рис. 3, а, б), мы предполагаем существование добавочного к *Bmi1* механизма, опосредующего торможение продукции *PPARγ2* и *ADIPOQ*. Такое предположение находит подтверждение в других результатах настоящей работы. В частности, индукция ЖД в клетках 10T1/2 сопряжена с увеличением экспрессии *UTX*, которая остается на высоком уровне в дифференцированных клетках с инактивированным *Bmi1* (рис. 3, в). Эти данные дают возможность предположить, что экспрессия *UTX* при ЖД напрямую вызывается *Bmi1*, уровень которой в дифференцированных клетках, экспрессирующих si*Bmi1*, превышает таковой в недифференцированных клетках (рис. 3, б). С другой стороны, современные публикации показывают, что активность *Utx* необходима для поддержания состояния пролиферативного покоя клеток, которое обеспечивается сигнальным путем pRb (Herz et al., 2010).

В экспериментальной модели, используемой в настоящей работе, *Utx* может осуществлять свое действие путем активации экспрессии *RB* и *p130*, которые, как уста-

новлено, активируют жировую дифференцировку МСК (Hallenborg et al., 2009; Calo et al., 2010; Popov, Petrov, 2014; Попов и др., 2015). Схема взаимодействия сигнальных путей PcG и pRb в регуляции ЖД, соответствующая результатам настоящей работы, представлена на рис. 4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31115).

### Список литературы

- 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. Бюл. эксперим. биол. мед. 159 : 258—263. (Popov B. V., Shilo P. S., Zhidkova O. V., Zaichik A. M., Petrov N. S. 2015. Experimental model to study the role of pRb in determination of adipocyte differentiation. Bull. Exp. Biol. Med. 159 : 289—292.)
- Bhattacharya R., Mustafi S. B., Street M., Dey A., Dwivedi S. K. 2015. Bmi-1 at the crossroads of physiological and pathological biology. Genes Dis. 2 : 225—239.
- 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. 441 : 349—353.
- Bracken A. P., Dietrich N., Pasini D., Hansen K. H., Helin K. 2006. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. Genes Develop. 20 : 1123—1136.
- Bracken A. P., Helin K. 2009. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. Nat. Rev. Cancer. 9 : 773—784.
- 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. 22 : 5323—5335.
- 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. 466 : 1110—1114.
- 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. 112 : 2729—2741.
- Cao R., Tsukada Y., Zhang Y. 2005. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. Mol. Cell. 20 : 845—854.
- 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. 298 : 1039—1043.
- De Napoles M., Mermoud J. E., Wakao R., Tang Y. A., Endoh M., Appanah R., Nesterova T. B., Silva J., Otte A. P., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N. 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. Dev. Cell. 7 : 663—676.
- Dimri G. P., Martinez J. L., Jacobs J. J., Keblusek P., Itahana K., Van Lohuizen M., Campisi J., Wazer D. E., Band V. 2002. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. Cancer Res. 62 : 4736—4745.
- Ezhkova E., Pasolli H. A., Parker J. S., Stokes N., Su I. H., Hannon G., Tarakhovskiy A., Fuchs E. 2009. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. Cell. 136 : 1122—1135.
- 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. 1 : 87—99.
- 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. 13 : 235—246.
- Hemming S., Cakouros D., Isenmann S., Cooper L., Menicannin D., Zannettino A., Gronthos S. 2014. EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. Stem Cells. 32 : 802—815.
- 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. 30 : 2485—2497.
- Kennison J. A. 1995. The Polycomb and trithorax group proteins of Drosophila: trans-regulators of homeotic gene function. Annu. Rev. Genet. 29 : 289—303.
- 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. 21 : 49—54.
- Kuzmichev A., Nishioka K., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of Zeste protein. Genes Dev. 16 : 2893—2905.
- Lee T., Jenner R. G., Boyer L. A., Guenther M. G., Levine S. S., Kumar R. M., Chevalier B., Johnstone S. E., Cole M. F., Isono K., Koseki H., Fuchikami T., Abe K., Murray H. L., Zucker J. P., Yuan B., Bell G. W., Herbolsheimer E., Hannett N. M., Sun K., Odom D. T., Otte A. P., Volkert T. L., Bartel D. P., Melton D. A., Gifford D. K., Jaenisch R., Young R. A. 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. Cell. 125 : 301—313.
- Lessard J., Sauvageau G. 2003. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature. 423 : 255—260.
- Levine S. S., Weiss A., Erdjument-Bromage H., Shao Z., Tempst P., Kingston R. E. 2002. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. Mol. Cell. Biol. 22 : 6070—6078.
- Molofsky A. V., He S., Bydon M., Morrison S. J., Pardoll R. 2005. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. Genes Develop. 19 : 1432—1437.
- Park I. K., Morrison S. J., Clarke M. F. 2004. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. J. Clin. Invest. 113 : 175—179.
- Pasini D., Bracken A. P., Hansen J. B., Capillo M., Helin K. 2007. The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. Mol. Cell. Biol. 27 : 3769—3779.
- Pietersen A. M., van Lohuizen M. 2008. Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. Curr. Opin. Cell Biol. 20 : 201—207.
- Popov B., Petrov N. 2014. pRb-E2F signaling in life of mesenchymal stem cells: cell cycle, cell fate, and cell differentiation. Genes Dis. 1 : 174—187.
- Silva J., Garcia J. M., Pena C., Garcia V., Dominguez G., Suárez D., Camacho F. I., Espinosa R., Provencio M., Espana P., Bonilla F. 2006. Implication of polycomb members Bmi-1, Mel-18, and Hpc-2 in the regulation of p16INK4a, p14ARF, h-TERT, and c-Myc expression in primary breast carcinomas. Clin. Cancer Res. 12 : 6929—6936.
- Sparmann A., van Lohuizen M. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. Nat. Rev. Cancer. 6 : 846—856.
- Valk-Lingbeek M. E., Bruggeman S. W., van Lohuizen M. 2004. Stem cells and cancer; the polycomb connection. Cell. 118 : 409—418.

PRODUCT OF THE *BMI1* — A KEY COMPONENT OF POLYCOMB — POSITIVELY REGULATES ADIPOCYTE DIFFERENTIATION OF MOUSE MESENCHYMAL STEM CELLS

N. S. Petrov, N. A. Vereschagina, E. N. Sushilova, A. V. Kropotov, N. F. Miheeva, B. V. Popov<sup>1</sup>

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

<sup>1</sup> e-mail: borisvp478@gmail.com

Bmi1 is a key component of Polycomb (PcG), which in mammals controls the basic functions of mammalian somatic stem cells (SSC) such as self-renewal and differentiation. Bmi1 supports SSC via transcriptional suppression of genes associated with cell cycle and differentiation. The most studied target genes of Bmi1 are the genes of Ink4 locus, CdkI *p16<sup>Ink4a</sup>* and *p14<sup>Arf</sup>*, suppression of which due to activating mutations of the *BMI1* results in formation of cancer stem cells (CSC) and carcinomas in various tissues. In contrast, inactivation of *BMI1* results in cell cycle arrest and cell senescence. Although clinical phenomena of hypo- and hyperactivation of *BMI1* are well known, its targets and mechanisms of regulation of tissue specific SSC are still obscure. The goal of this study was to evaluate the regulatory role of *BMI1* in adipocyte differentiation (AD) of mouse mesenchymal stem cells (MSC). Induction of AD in mouse MSC of the C3H10T1/2 cell line was associated with an increase in the expression levels of *BMI1*, the genes of pRb family (*RB*, *p130*) and demethylase *UTX*, but not methyltransferase *EZH2*, whose products regulate the methylation levels of H3K27. It was observed earlier that H3K27me3 may play the role of the epigenetic switch by promoting AD of human MSC via activating expression of the *PPAR $\gamma$ 2*, the master gene of AD (Hemming et al., 2014). Here we show that inactivation of *BMI1* using specific siRNA slows and decreases the levels of AD, but does not abolish it. This is associated with a complete inhibition of the expression of adipogenic marker genes — *PPAR $\gamma$ 2*, *ADIPOQ* and a decrease in the expression of *RB*, *p130*, but not *UTX*. The results obtained give evidence that the epigenetic mechanism regulating AD differentiation in mouse and human MSC is different.

Key words: mesenchymal stem cells, adipocyte differentiation, Polycomb, Bmi1, pRb.