

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова»

На правах рукописи

Егоров Александр Дмитриевич

**УЧАСТИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PREP1 В
ПРОЦЕССАХ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва, 2017

Работа выполнена в лаборатории генных и клеточных технологий в медицине Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: Дмитрий Николаевич Пеньков, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Института Экспериментальной Кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения России

Научный консультант: Всеволод Арсеньевич Ткачук, доктор биологических наук, академик, декан Факультета фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты:

Дмитрий Владимирович Купраш, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Института Молекулярной Биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Егор Борисович Прохорчук, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Института Биотехнологии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Сергей Александрович Румянцев, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, проректор по стратегическому развитию Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения России

Защита состоится 29 июня 2017 года в 11 часов 00 минут на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.03 «Молекулярная биология» (биологические науки) и 03.02.02 «Вирусология» (биологические науки) по адресу: 119234, гор. Москва, Ленинские горы, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, д. 1 стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайтах <http://www.bio.msu.ru> и <http://www.istina.msu.ru>.

Автореферат разослан 26 мая 2017 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета, кандидат
биологических наук

И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Ожирение является одной из основных причин развития сахарного диабета второго типа и серьёзным фактором риска развития сердечнососудистых заболеваний, в частности ишемической болезни сердца [1]. Избыточное развитие жировой ткани выражается в гипертрофии (увеличенные размеры адипоцитов) и гиперплазии (увеличение количества адипоцитов), которые зависят от многих факторов и, в частности, от скорости дифференцировки адипоцитов [2]. Дифференцировка адипоцитов (также называемая адипогенезом) является процессом превращения фибробластоподобных клеток-предшественников под действием адипогенных стимуляторов (к которым относятся, в частности, инсулин и глюкокортикоидные гормоны) в терминально дифференцированные клетки.

Действие адипогенных стимуляторов приводит к активации транскрипционных факторов, вызывающих дифференцировку посредством регуляции активности соответствующих генов. Ядерный рецептор PPAR γ , связываясь с промоторами и энхансерами адипоцит-специфичных генов, играет ведущую роль в реализации адипогенной дифференцировки [3]. Полногеномные исследования показали, что на начальных стадиях адипогенеза совместно действует целый ряд транскрипционных факторов [4]. Единственным репрессорным фактором из них является Pbx1, принадлежащий к семейству гомеодомен-содержащих факторов TALE. Известно, что гомеодомен-содержащие белки важны для раннего эмбриогенеза, однако роль этих белков во взрослом организме, в частности, в качестве регуляторов адипогенеза, не изучена. В то же время, было показано участие гомеодомен-содержащего транскрипционного фактора Pbx1 в адипогенной дифференцировке. Так, подавление экспрессии Pbx1 в мезенхимных стромальных клетках из жировой ткани человека приводило к увеличению доли дифференцирующихся клеток после индукции

адипогенеза, в то время как нокаутные по Pbx1 эмбриональные клетки мыши утрачивали способность дифференцироваться в адипоцитарном направлении [5].

Pbx1 не способен связываться с ДНК в отсутствие белков-партнеров, к которым относятся белки Prep и Meis. Основным партнером Pbx1 является Prep1 – один из его ближайших гомологов. Их совместная гетеродимеризация приводит к образованию комплексов с высокой аффинностью к последовательностям ДНК вида TGANTGACAG. Кроме этого, Prep1 способен функционировать, не связываясь со своими партнерами, в качестве самостоятельного транскрипционного фактора и имеет иную специфичность связывания.

Ранее было установлено, что Prep1 необходим для развития организма: нокаутные по гену Prep1 эмбрионы мышей погибают до гастрюляции [6], он участвует в контроле выживаемости гематопоетических стволовых и прогениторных клеток [7], вовлечен в процессы развития Т-клеток на эмбриональной и постнатальной стадиях [8], а также органогенез глаза [9]. Отсутствие Prep1 приводит к спонтанному опухолеобразованию [10]. Обнаруженное участие Prep1 в регуляции чувствительности скелетной мышечной ткани к инсулину [11], а также в метаболизме глюкозы в печени [12], дало нам основание предположить, что транскрипционный фактор Prep1 может оказывать влияние на процессы адипогенеза.

В этой работе мы предприняли попытку изучить роль белка Prep1 в адипогенной дифференцировке, дополнить современное представление о влиянии транскрипционных факторов на системную чувствительность тканей к инсулину, а также на патогенез метаболических нарушений. Расшифровка механизмов развития этих процессов расширит возможности прогнозирования предрасположенности к подобным патологическим состояниям, а также позволит установить новые мишени для создания антидиабетических препаратов.

Цель работы

Целью данной работе было изучить участие Prep1 в процессе адипогенной дифференцировки.

Задачи исследования

Для выполнения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить эффект, оказываемый Prep1 на адипогенез.
2. Определить стадию дифференцировки, зависимую от фактора Prep1.
3. Определить сигнальные каскады адипогенеза, регулируемые фактором Prep1.
4. Исследовать изменения в экспрессии генов в зависимости от количества белка Prep1 в клетке.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Prep1 предотвращает преждевременную дифференцировку преадипоцитов в адипоциты.
2. Искусственное подавление Prep1 изменяет профиль экспрессии генов, переводя его в частично дифференцированный.
3. Prep1 оказывает влияние на инсулин-зависимый, глюкокортикоидный и цАМФ-опосредованный пути индукции дифференцировки
4. Prep1 вовлечен в адипогенез на самых ранних стадиях активации дифференцировки

Научная новизна и практическая ценность работы

В настоящей работе впервые показано влияние транскрипционного фактора Prep1 на адипогенную дифференцировку. Изучение эффектов Prep1 проводилось путем искусственного подавления экспрессии гена Prep1, которая приводила к увеличению дифференцировки преадипоцитов в адипоциты. Искусственное подавление экспрессии Prep1 изменяет профиль

экспрессии генов, оказывая эффекты, сходные с действием гормональных индукторов адипогенеза. Нами подробно рассмотрено влияние Prep1 на основные сигнальные пути адипогенеза: инсулин-зависимый, глюкокортикоидный и цАМФ-опосредованный пути индукции дифференцировки. Показано, что Prep1 вовлечен в адипогенез на самых ранних стадиях транскрипционной активации дифференцировки. Результаты данной диссертации расширяют представление о роли Prep1 в регуляции метаболизма и вносят вклад в понимание механизмов транскрипционной регуляции адипогенной дифференцировки. Полученные данные углубляют понимание молекулярных механизмов адипогенеза и могут представлять интерес при разработке новых лекарственных препаратов.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 102 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 161 ссылку. Диссертация содержит 25 рисунков и 1 таблицу.

Апробация полученных результатов

Результаты диссертации были доложены на IV Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина», 2011, Москва, Россия, на конференции Keystone Symposium Pathogenesis of Diabetes: Emerging Insights into Molecular Mechanisms, 2012, Санта-Фе, Нью-Мексико, США, на конференции Benzon Symposium: Adipose tissue in health and disease, 2012, Копенгаген, Дания.

Публикации по теме работы

По материалам работы опубликовано 3 статьи в журналах, индексирующихся Scopus и Web of Science.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание экспериментальной модели

С целью исследования эффекта, оказываемого *Prep1* на адипогенез, нами использовалась линия преадипоцитов мыши 3T3-L1, как наиболее детально изученный модельный объект процессов адипогенеза. Из линии 3T3-L1 нами были получены клетки с подавленным уровнем экспрессии гена *Prep1* (в дальнейшем *Prep1low*) с помощью несущих специфические интерферирующие РНК лентивирусных конструкций, а также контрольные клетки, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, несущей бессмысловую (scrambled) интерферирующую РНК (в дальнейшем контроль или *Prep1high*). В клетках *Prep1low* количество белка *Prep1* значительно снижено, что подтверждается вестерн-гибридизацией (рис. 1А).

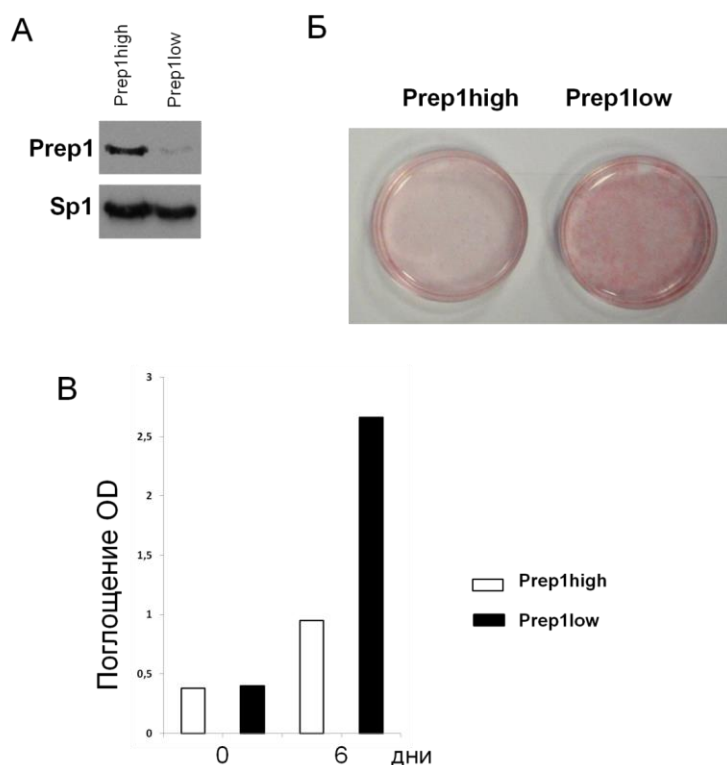


Рисунок 1. Подавление экспрессии гена *Prep1* стимулирует адипогенную дифференцировку. (А) Вестерн гибридизация с анти-*Prep1* моноклональным антителом ядерного экстракта клеток *Prep1low* и *Prep1high*. Анти-*Sp1* антитело использовалось для контроля. (Б) Культуральные чашки с клетками *Prep1low* и *Prep1high* на 6 день дифференцировки после окрашивания Oil-red O, (В) Количественная оценки степени окрашивания клеток Oil-red O (см. Материалы и Методы)

Влияние на адипогенную дифференцировку

Для индукции адипогенной дифференцировки клеток 3T3-L1 использовался адипогенный коктейль, содержащий 0.5 мМ изобутилметилксантин (IBMX), 1 мкМ дексаметазон (Dex) и 1 мкг/мл инсулина (Ins), а степень дифференцировки оценивалась по окрашиванию липидных капель красителем Oil-red O. Клетки с подавленным уровнем экспрессии (*Prep1low*) на 6 день после индукции окрашиваются более интенсивно по сравнению с контрольными клетками (*Prep1high*), что свидетельствует о более активной адипоцитарной дифференцировке (Рис.1Б, В). В результате обратной экстракции красителя из окрашенных клеток было установлено, что на 6 день количество связавшегося Oil-red O возрастает более чем в два раза по сравнению с контрольными клетками (Рис. 1В). Поскольку накопление нейтральных триацилглицеролов в липидных каплях зрелых адипоцитов связано, в том числе, с захватом глюкозы из внеклеточной среды, то одной из причин наблюдаемых нами изменений может быть возрастание скорости переноса глюкозы через мембрану.

*Подавление экспрессии *Prep1* стимулирует экспрессию *Glut4**

В клетках жировой ткани перенос глюкозы осуществляется с помощью тканеспецифичного транспортера *Glut4*. Изучение экспрессии гена *Slc2a4* (кодирующего *Glut4*) показало, что в клетках *Prep1low* происходит увеличение числа транскриптов (Рис. 2), причем различия становятся более выраженными через несколько дней после активации адипогенной дифференцировки.

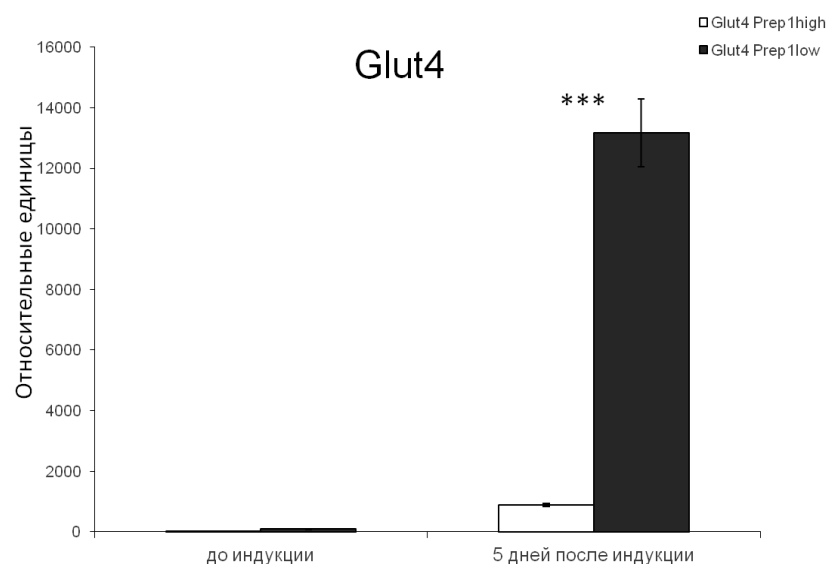


Рисунок 2. Подавление экспрессии гена *Prep1* увеличивает уровень экспрессии *Glut4*. Количественный ПЦР по определению относительных единиц РНК транскриптов гена *Glut4* проводился с использованием тотальной РНК, выделенной из клеток *Prep1low* и *Prep1high* до дифференцировки (0 день) и на пятый день после добавления дифференцировочного коктейля (5 день). *** - $P \leq 0.001$

Известно, что регуляция транскрипции гена *Slc2a4* осуществляется действием факторов $PPAR\gamma$, $C/EBP\alpha$, $PGC-1\alpha$, $MEF2$ и $FOXO1$ [13]. Анализ последовательностей гена *Slc2a4* и его регуляторных элементов не выявил сайтов, схожих по структуре с описанным ранее сайтом связывания транскрипционного фактора *Prep1* [14]. Это дало нам основания предположить, что фактор *Prep1* осуществляет непрямую регуляцию транскрипции гена *Slc2a4*, которая осуществляется без связывания с регуляторными элементами данного гена.

Подавление экспрессии Prep1 усиливает транскрипцию адипоцитарных генов

Для исследования механизма влияния *Prep1* на адипоцитарную дифференцировку был проведен полногеномный анализ транскриптома методом RNA-Seq.

Исследовались изменения экспрессии генов в результате подавления экспрессии гена *Prep1* и сравнивались с изменениями в процессе адипоцитарной дифференцировки (см. рис. 3). РНК преадипоцитов

анализировали в двух точках – до индукции и через 24 часа после индукции адипогенеза. Адипогенная дифференцировка клеток с нормальной экспрессией *Prep1* происходит на фоне активации более 1500 генов и репрессии около 1000 генов. Подавление экспрессии гена *Prep1* до дифференцировки приводит к увеличению экспрессии порядка 450 генов и уменьшению экспрессии 250 генов (Рис 3). Полученные данные согласуются с показанной ранее ролью *Prep1* в качестве суппрессора транскрипции.

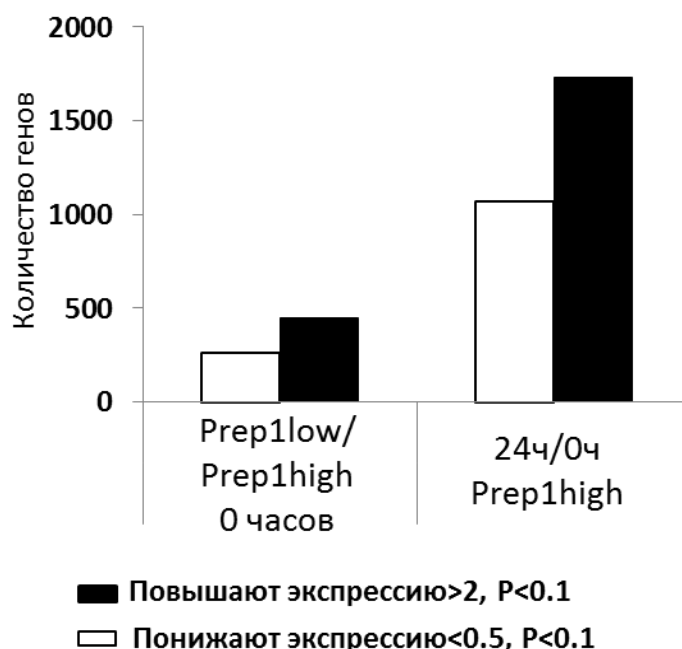


Рисунок 3. Множество генов достоверно (со значением $P < 0.1$) изменяющих свою экспрессию в результате подавления экспрессии гена *Prep1* до и через 24 часа после индукции адипоцитарной дифференцировки.

Нами были проанализированы 2 репликата контроля и 2 репликата экспериментальной группы. Для каждого гена вычислены относительные различия экспрессии. Для отображения изменения экспрессии генов мы использовали графическое представление данных в виде тепловой карты (см. рис. 4). Нами были рассмотрены изменения генов различающихся в 2 и более раза, со значением $P < 0.1$ (рис. 4А). Следует отметить сходство паттерна

изменения профиля экспрессии при подавлении *Prep1* и при индукции дифференцировки контрольных клеток (Рис 4В).

Для описания изменений экспрессии генов использовался анализ геной онтологии (GeneOntology). Для генов повышающих свою экспрессию в *Prep1low* по сравнению с *Prep1high* среди наиболее значимых категорий (GOterm) были: ответ на повышение цАМФ (response to cAMP, $P=0,003398$), ответ на глюкокортикоиды (response to glucocorticoid, $P=0,023268$), дифференцировка жировых клеток (fat cell differentiation, $P=0,030638$), дифференцировка бурых жировых клеток (brown fat cell differentiation, $P=0,048018$), дифференцировка белых жировых клеток (white fat cell differentiation, $P=0,077323$).

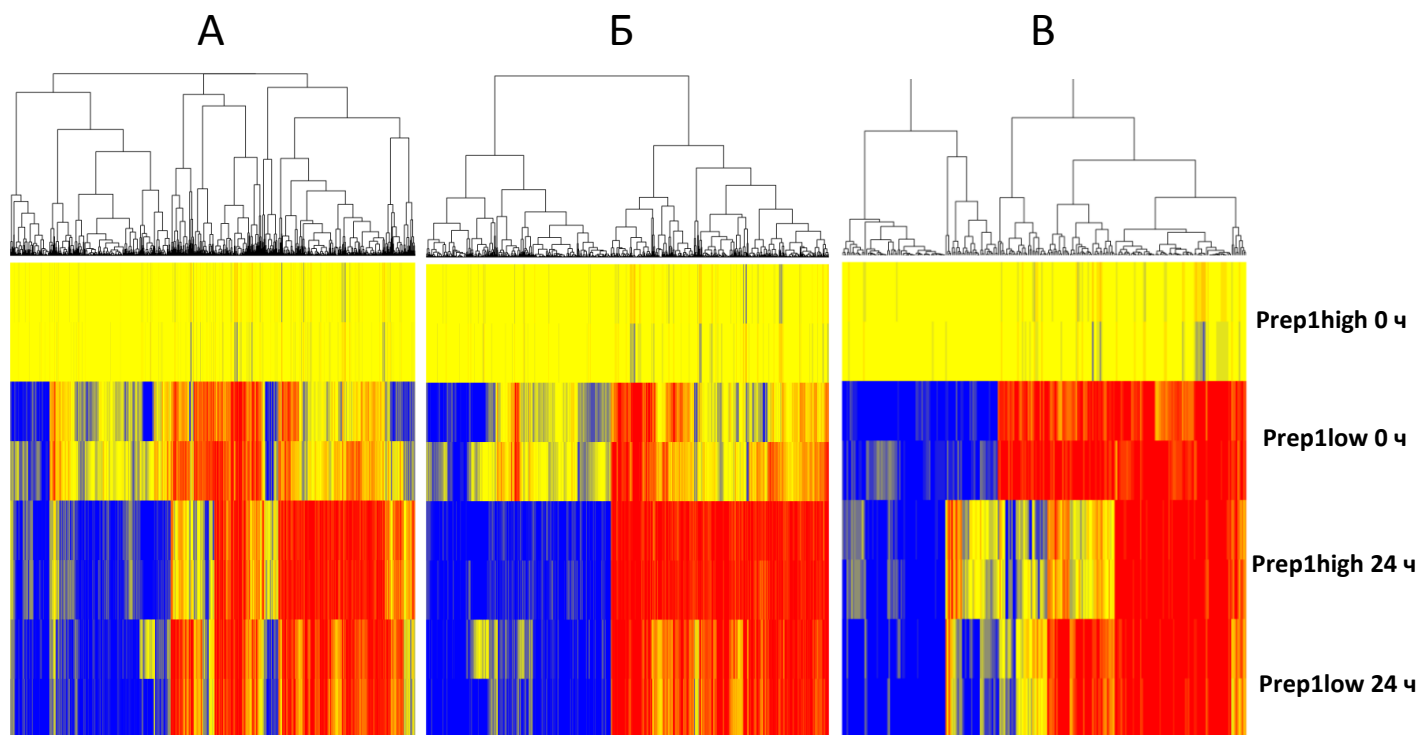


Рисунок 4. А. Тепловая карта генов, изменяющих свою экспрессию со значением $P < 0.1$

Отношение >2 и <0.5

Б. Отображены гены, изменяющиеся со значением $P < 0.1$

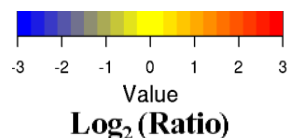
Отношение >2 и <0.5

Для *Prep1high* 0 по отн. к *Prep1high* 24

В. Отображены гены, изменяющиеся со значением $P < 0.1$

Отношение >2 и <0.5

Для *Prep1high* по отн. к *Prep1low*



Таким образом, при подавлении *Prep1* клетки 3T3-L1 приобретают "преддифференцированный" профиль экспрессии генов, возможно позволяющий им дифференцироваться более эффективно после индукции адипогенным коктейлем.

Детальное рассмотрение генов, составляющих вышеупомянутые категории, выявило наличие транскрипционных регуляторов адипогенеза, в частности, *Pparg*, *Cebpa*, *Cebpb*. Влияние фактора *Prep1* на их экспрессию при адипогенной дифференцировке было исследовано нами более детально.

Подавление экспрессии гена Prep1 приводит к увеличению доли вовлеченных в адипогенез клеток

Изучение числа транскриптов методом количественной ПЦР позволяет определять изменения, происходящие на уровне популяции клеток. Для определения возможных изменений в единичных клетках нами использовалась проточная цитометрия. Экспрессия PPAR γ оценивалась с помощью специфических антител 48 часов после индукции адипогенной дифференцировки. Нами было выявлено увеличение количество PPAR γ^+ (в области P4 на рис. 5А) среди *Prep1*^{low} клеток по сравнению с клетками контроля. При подавлении экспрессии *Prep1* происходит более чем четырехкратное увеличение числа PPAR γ^+ клеток на ранней стадии дифференцировки (Рис 5Б). Именно PPAR γ^+ клетки считаются непосредственными предшественниками жировых клеток [15]. Среднее значение интенсивности окрашенных клеток остается постоянным. Это указывает на то, что в клетках с подавленной экспрессией *Prep1* не происходит увеличения экспрессии гена *Pparg* в единичных клетках, что является косвенным подтверждением влияния *Prep1* на более ранней стадии адипогенеза.

Увеличение доли PPAR γ^+ клеток в популяции преадипоцитов со сниженной экспрессией *Prep1*, может являться следствием активации сигнальных путей

индукторов адипогенеза. Исходя из имеющихся данных об увеличении чувствительности к инсулину у гипоморфных *Prep1* мышей, одной из причин установленного фенотипа могут быть изменения чувствительности клеток к инсулину.

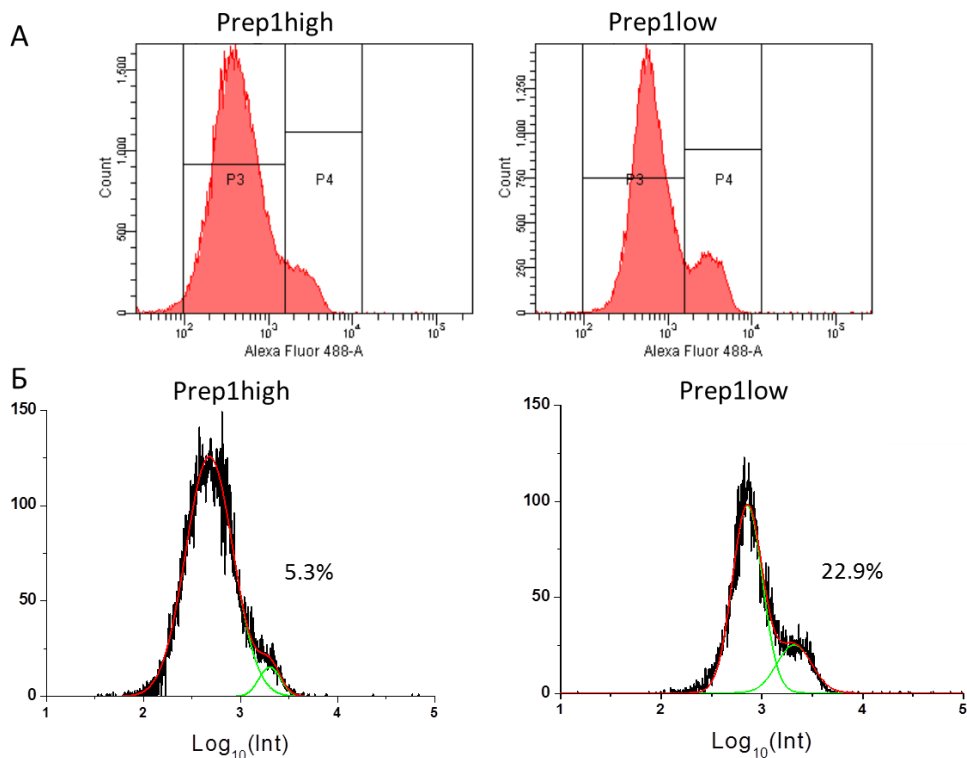


Рисунок 5: А. Гистограммы цитофлуориметрии клеток 3T3-L1 с нормальным уровнем экспрессии *Prep1* и подавленной экспрессией этого гена окрашенных мышиными антителами к *PPAR* γ , козьими анти-мышиными IgG AlexaFluor-488.

Б. Разделение популяций неокрашенных и окрашенных клеток и подсчёт доли *PPAR* γ ⁺ среди клеток *Prep1*^{high} и *Prep1*^{low}.

Prep1 оказывает негативное действие на инсулиновую сигнализацию в преадипоцитах

Сигнальный путь PI3K/Akt, активация которого происходит в результате связывания инсулина с тирозинкиназным рецептором инсулина (или инсулинподобных факторов роста), регулирует посредством фосфорилирования транскрипционного фактора Foxo1 активацию транскрипции гена *Pparg* (см. рис. 6). Соответственно, при изменении чувствительности клеток-предшественников жировой ткани к инсулину изменяется порог активации транскрипции мастер-гена адипогенной

дифференцировки. Существует две основные контрольные точки инсулиновой сигнализации – уровень фосфорилирования субстрата инсулинового рецептора (IRS) и фосфорилирование Akt (протеинкиназы B) по двум остаткам – треонина в положении 308 и серина в положении 473, которое необходимо для её активации.

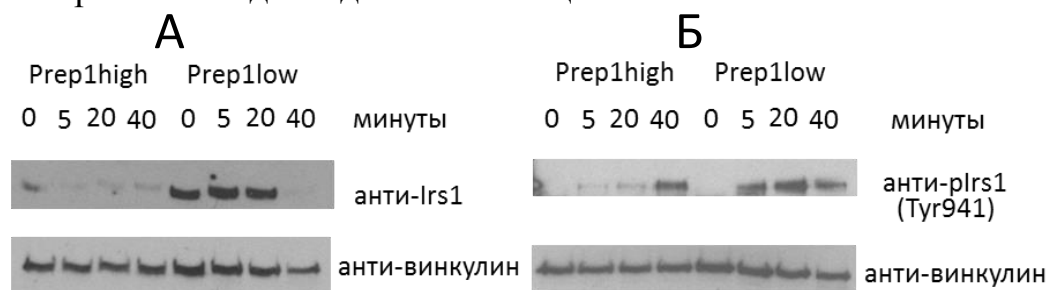


Рисунок 6: Вестерн-блот гибридизация с антителами к субстрату инсулинового рецептора 1 (А) и его фосфорилированной форме (Б) белковых экстрактов клеток 3Т3-L1 с подавленной экспрессией *Prep1* (Prep1low) и с нормальным уровнем экспрессии этого гена (Prep1high) после стимуляции инсулином.

Проведенный нами анализ с использованием вестерн гибридизации показал значительное увеличение базального уровня IRS (см. рис. 6А) после подавления экспрессии *Prep1*. Кроме того, отмечено повышение фосфорилирования IRS по остатку тирозина в положении 941 (см. рис. 6Б).

Также, нами показано значительное увеличение фосфорилирования протеинкиназы Akt по остаткам серина в положении 473 (см. рис. 7А) и треонина в положении 308 (см. рис. 7Б) при подавленной экспрессии *Prep1*.



Рисунок 7: Вестерн-блот гибридизация с антителами к протеинкиназе Akt (panAkt) и её фосфорилированным по остатку серина в положении 473 (А) и треонина в положении 308 (Б) белковых экстрактов клеток 3Т3-L1 с подавленной экспрессией *Prep1* (Prep1low) и с нормальным уровнем экспрессии этого гена (Prep1high) после стимуляции инсулином.

Таким образом, нами обнаружено негативное влияние транскрипционного фактора Prep1 на сигнальный путь PI3K/Akt, которое может приводить к наблюдаемому подавлению транскрипционным фактором Prep1 адипогенной дифференцировки клеток. Для оценки комплексного влияния транскрипционного фактора Prep1 на адипогенез нами был поставлен эксперимент, позволяющий оценить эффекты на глюкокортикоид-зависимый и цАМФ-зависимый пути стимуляции.

Prep1 снижает уровень PPAR γ и C/EBP α

Как было отмечено выше, при подавлении экспрессии Prep1 нами было обнаружено увеличение доли PPAR γ^+ клеток в популяции преадипоцитов. Для определения стадии, на которой фактор Prep1 осуществляет влияние на адипогенную дифференцировку, нами был проведен следующий эксперимент.

Клетки с нормальной и подавленной экспрессией Prep1 подвергали раздельному воздействию стимуляторов адипогенеза: фетальной бычьей сыворотки (FBS), дексаметазона (Dex), инсулина (Ins), изобутилметилксантина (IBMX), а также их комбинаций (Dex/Ins, Dex/IBMX, Ins/IBMX и полный коктейль). Анализ количества PPAR γ и C/EBP α проводили с использованием метода вестерн-блот гибридизации через 72 часа после индукции.

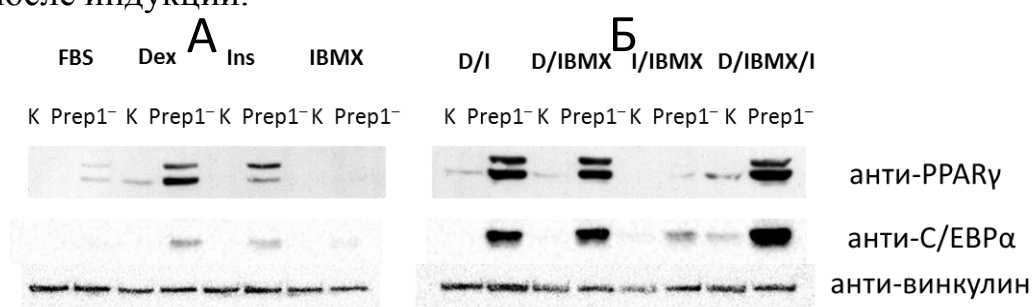


Рисунок 8: Вестерн-блот гибридизация с антителами к PPAR γ и C/EBP α белковых экстрактов клеток 3T3-L1 Prep1^{low} (Prep1⁻) и Prep1^{high} – нормальным уровнем экспрессии этого гена (K) через 48 часов после раздельного добавления индукторов адипогенеза (А): фетальной бычьей сыворотки (FBS), дексаметазона (Dex), инсулина (Ins), изобутилметилксантина (IBMX), а также их комбинаций (Б).

Нами было обнаружено значительное увеличение количества PPAR γ после подавления экспрессии Prep1, причем как первой изоформы, так и специфичной для жировой ткани второй, тогда как в клетках без подавления Prep1 нами через 72 часа после индукции не детектировалось значительного количества PPAR γ 2.

Характерно, что при подавлении Prep1 детектируется возрастание количества PPAR γ в ответ на инсулин, изобутилметилксантин, дексаметазон и даже фетальную бычью сыворотку (см. рис. 8А). Ни одно из входящих в адипогенный коктейль веществ индивидуально не способно вызвать продукцию C/EBP α в контрольных клетках 3Т3-L1 (см. рис. 8А), его активация происходит только в ответ на совместное действие всех стимуляторов (см. рис. 8Б). В то же время при подавлении экспрессии Prep1 мы наблюдали продукцию C/EBP α в случае стимуляции индивидуальными веществами из адипогенного коктейля, что демонстрирует усиление эффектов каждого из стимуляторов.

Из входящих в адипогенный коктейль веществ только глюкокортикоидный гормон дексаметазон *per se* способен вызывать экспрессию PPAR γ (см. рис. 8А), что подтверждает экспериментально эффект комбинаций Dex/Ins и Dex/IBMX и полного адипогенного коктейля (см. рис. 8Б). Значительное увеличение количества PPAR γ после стимуляции дексаметазоном при подавленном уровне экспрессии Prep1 представляет особый интерес. Дело в том, что связывание глюкокортикоидного рецептора с лигандами приводит к его транслокации в ядро и непосредственной транскрипционной активации. Таким образом, наблюдаемое нами увеличение эффектов дексаметазона при снижении экспрессии Prep1 может быть следствием изменения состава транскрипционных комплексов, обеспечивающих активацию PPAR γ или структуры хроматина.

Prep1 оказывает эффект на функционирование глюкокортикоидного рецептора

Одним из основных действующих на начальных этапах адипогенной дифференцировки является глюкокортикоидный рецептор (GR). Классическим (и, до недавнего времени, чуть ли не единственным известным) примером действия GR в адипогенезе является репрессия преадипоцитарного фактора Pref1. Pref1 – секретируемый преадипоцитами белок, известный также как Dlk1. Этот белок относится к семейству Notch/Delta/Serrate и содержит повторы эпидермального ростового фактора. Он высокоспецифичен для предшественников жировых клеток и способен предотвращать адипогенную дифференцировку. Pref1 экспрессируется на высоком уровне в преадипоцитарной линии клеток 3T3-L1, однако после стимуляции адипогенным коктейлем его экспрессия снижается и в ходе дифференцировки исчезает из-за транскрипционной репрессии, оказываемой GR [16].

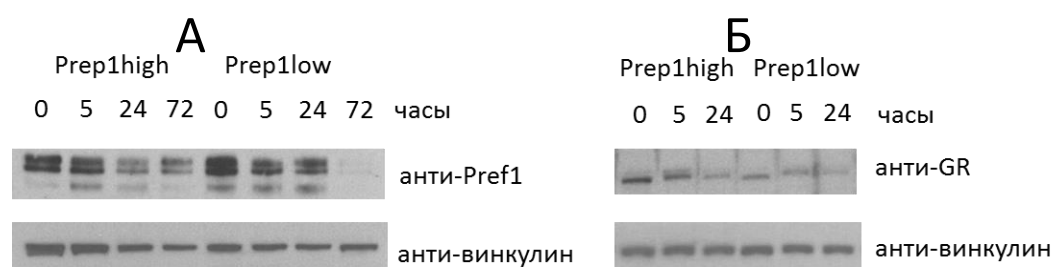


Рисунок 9. А: Вестерн-блот гибридизация с антителами к Pref1 белковых экстрактов клеток 3T3-L1 с подавленной экспрессией *Prep1* (Prep1low) и с нормальным уровнем экспрессии этого гена (Prep1high) до стимуляции адипогенным коктейлем (0 часов) и через 5, 24 и 72 часа после добавления индукторов адипогенеза.

Б: Вестерн-блот гибридизация с антителами к GR белковых экстрактов клеток 3T3-L1 с подавленной экспрессией *Prep1* и с нормальным уровнем экспрессии этого гена до стимуляции адипогенным коктейлем (0 часов) и через 5 и 24 часа после добавления индукторов адипогенеза

Используя метод вестерн гибридизации мы определили (см. рис. 9Б) изменение количества фактора Pref1, которое происходит в результате снижения уровня экспрессии *Prep1*. После индукции адипогенеза в клетках с нормальной экспрессией *Prep1* мы наблюдаем постепенное снижение

количества *Prep1*, в то время как при подавленном *Prep1* через 72 часа после стимуляции адипогенеза в *Prep1low* клетках происходит резкое снижение уровня *Prep1*. Исходя из данных литературы это может свидетельствовать как об уменьшении количества клеток-предшественников, так и о снижении *Prep1*-опосредованного ингибирования дифференцировки.

Наблюдаемый комплексный эффект *Prep1* на сигнальные каскады адипогенеза характеризует его как фактор, вовлеченный в ранние процессы адипогенеза.

Prep1 участвует в активации транскрипции факторов адипогенеза «первой волны»

Кроме глюкокортикоидного рецептора известен целый кластер транскрипционных факторов «первой волны» адипогенной дифференцировки. К таковым относят активируемые посредством повышения внутриклеточного цАМФ KLF4, Krox20, C/EBP β , а также C/EBP δ .

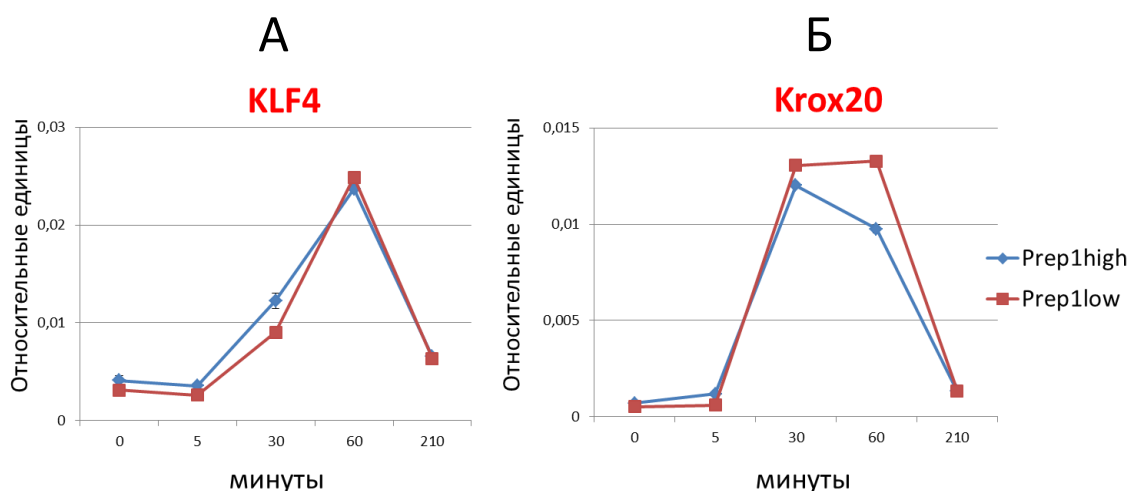


Рисунок 10: Изменение количества транскриптов KLF4 (А) и Krox20 (Б) в клетках с подавленной экспрессией *Prep1* (*Prep1low*) и с нормальным уровнем экспрессии этого гена (*Prep1high*) до и через 5-210 минут после индукции дифференцировки.

Факторы транскрипции KLF4 и Krox20 – самые ранние факторы запускающие адипогенез. Их активация происходит непосредственно при повышении внутриклеточного уровня цАМФ. Связываясь с промоторной

областью гена *Cebpb*, они активируют его транскрипцию, что приводит к последующим процессам дифференцировки [17].

При помощи ПЦР в реальном времени мы проанализировали экспрессию генов *Klf4* и *Krox20*. Нами не было обнаружено серьезных отличий между количеством транскриптов KLF4 и Krox20 (рис. 10А, 10Б), в сравнении с контролем KLF4 и Krox20 являют собой промежуточную ступень в цепи активации транскрипционных факторов «первой волны», тогда как активируемые ими факторы С/ЕВР принимают участие в инициации адипогенных программ. Анализ данных ПЦР в реальном времени показал, что подавление экспрессии *Prep1* вызывает увеличение количества транскриптов С/ЕВР β и С/ЕВР δ (см. рис. 11). При этом уровень экспрессии С/ЕВР β отличается незначительно, лишь в пиковом значении, тогда как экспрессия С/ЕВР δ в результате подавления *Prep1* возрастает значительно. В данном эффекте *Prep1* четко проявляется синергизм действия индукторов адипогенеза, так как известно, что в активации экспрессии С/ЕВР δ помимо цАМФ-активируемого CREB значительную роль играют глюкокортикоиды.

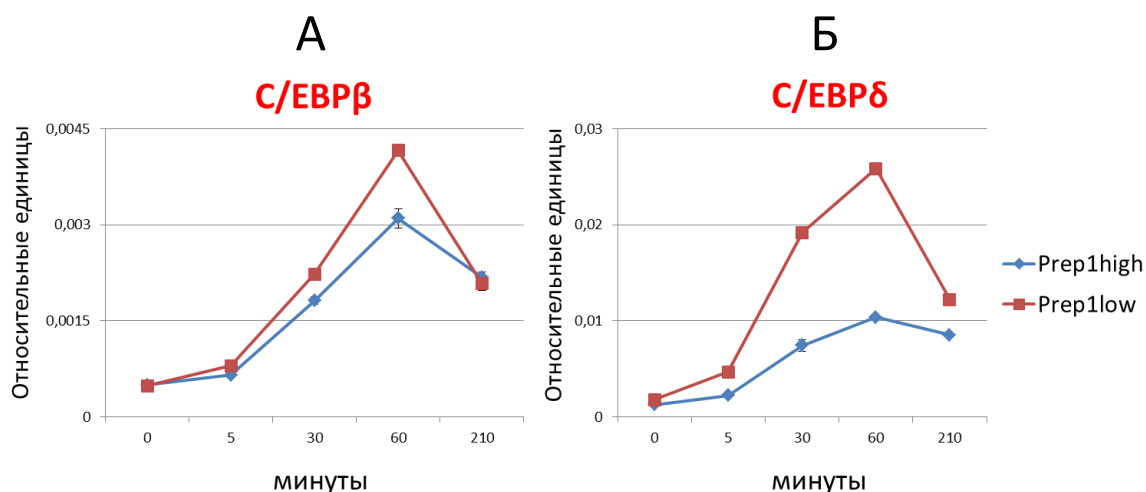


Рисунок 11: Изменение количества транскриптов С/ЕВР β (А) и С/ЕВР δ (Б) в клетках с подавленной экспрессией *Prep1* (*Prep1low*) и с нормальным уровнем экспрессии этого гена (*Prep1high*) до и через 5-210 минут после индукции дифференцировки.

В результате совместного действия С/ЕВР β и С/ЕВР δ происходит активация не только гена *Pparg*, но также и *Klf5*. KLF5 так же как и

упоминавшийся выше фактор транскрипции KLF4 относится к семейству Krüppel-подобных факторов, однако, в отличие от предыдущего в ходе адипогенеза экспрессируется позже. Мы анализировали экспрессию гена *Klf5* и количество белка в клетках 3T3-L1 с подавленной экспрессией *Prep1* и с нормальным уровнем экспрессии этого гена для того, чтобы подтвердить функциональную значимость обнаруженных ранее изменений в количестве транскриптов C/EBP β и C/EBP δ .

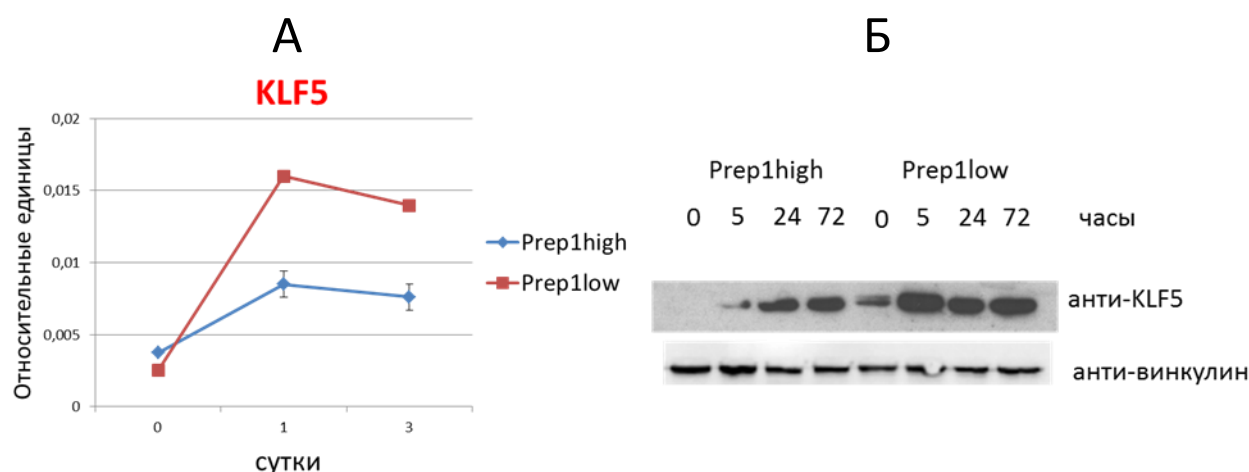


Рисунок 12. (А) Изменение количества транскриптов KLF5 в клетках с подавленной экспрессией *Prep1* и с нормальным уровнем экспрессии этого гена до и через 1 и 3 дня после индукции дифференцировки. (Б) Вестерн-блот гибридизация с антителами к KLF5 белковых экстрактов клеток 3T3-L1 с подавленной экспрессией *Prep1* (Prep1low) и с нормальным уровнем экспрессии этого гена до стимуляции адипогенным коктейлем (0 часов) и через 5, 24 и 72 часа после добавления индукторов адипогенеза.

Ввиду того, что KLF5 – поздний фактор транскрипции адипогенеза, мы анализировали экспрессию его гена и количество белка в иных временных рамках, нежели у представленных выше факторов.

Наблюдаемое увеличение количества транскриптов *Klf5* (см. рис. 12А) в результате подавления *Prep1*, а также значительное увеличение количества KLF5 по вестерн-блоту (см. рис. 12Б) указывает на функциональную значимость ранее обнаруженных изменений в экспрессии генов *Cebpb* и *Cebpd*.

Нами был обнаружен этап адипогенной дифференцировки, на котором ярко проявляется эффект подавления *Prep1*, что позволяет нам сделать вывод о том, что *Prep1* играет свою репрессорную роль в адипогенных процессах уже на стадии активации транскрипционных факторов «первой волны».

Анализ данных RNA-seq с использованием баз данных

Мы проанализировали гены, изменяющие свою экспрессию в клетках *Prep1*^{low} по сравнению с клетками контроля до индукции дифференцировки, используя базу данных ChEA, созданную на основе результатов экспериментов по ChIP-X млекопитающих и описывающих связывание 92 транскрипционных факторов с 31932 генами-мишенями [18].

Мы обнаружили, что наиболее близки к наблюдаемым изменениям – элементы Polycomb репрессорного комплекса *Suz12* и *Ezh2*. *Ezh2* – гистонметилтрансфераза, осуществляющая репрессию генов дифференцировки в широком спектре организмов, от растений до млекопитающих, тогда как *Suz12* – белок необходимый для гистонметилтрансферазной активности и сайленсинга осуществляемого Polycomb репрессорным комплексом PRC2 (EED-EZH2). Кроме того, с использованием программного поиска при помощи TargetScan [19] было обнаружено, что несмотря на отсутствие близкой гомологии *Prep1* и *Ezh2* имеют общий набор регуляторных миРНК, а именно миРНК-101 и миРНК-144. Считаем целесообразным в дальнейшем исследовать изменения, происходящие с элементами репрессорного комплекса Polycomb при подавлении экспрессии *Prep1*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена выявлению механизмов дифференцировки жировых клеток, основного процесса при образовании жировой ткани. Избыточное накопление жировой ткани широко распространено у жителей экономически развитых стран, а так как это

приводит к сердечнососудистым, онкологическим заболеваниям и диабету, то является актуальной проблемой. Для изучения роли транскрипционного фактора *Prep1* в адипогенной дифференцировке была создана экспериментальная система и впервые показано участие этого белка в образовании жировых клеток. Установлено, что *Prep1* влияет на экспрессию не только генов, непосредственно приводящих к формированию зрелых адипоцитов, но и на экспрессию целого ряда генов, вовлеченных в процесс дифференцировки. Впервые было показано влияние фактора транскрипции *Prep1* на активацию сигнальных путей на ранних стадиях дифференцировки, приводящих к активации *C/EBPβ* и *C/EBPδ*.

Отдельной частью исследования было полногеномное изучение изменения экспрессии генов при помощи RNA-Seq. В результате анализа экспрессии генов было показано, что подавление *Prep1* вызывает изменения сходные с начальными стадиями дифференцировки. Это может приводить к более эффективной дифференцировке клеток под действием гормонов. Полногеномное изучение изменения экспрессии генов позволило определить вероятных партнеров *Prep1*, участвующих в его влиянии на адипогенез.

Таким образом, результаты данного исследования доказывают участие транскрипционного фактора *Prep1* в процессе адипогенной дифференцировки и описывают механизм его действия на этот процесс, как на уровне проведения сигналов от адипогенных гормонов, так и на уровне взаимодействия с хроматином.

ВЫВОДЫ

1. *Prep1* приостанавливает дифференцировку преадипоцитов в адипоциты.
2. *Prep1* оказывает подавляющее влияние на инсулин-зависимый, глюкокортикоидный и цАМФ-опосредованный пути индукции дифференцировки клеток.

3. Prep1 вовлечен в адипогенез на самых ранних стадиях индукции дифференцировки клеток, что подтверждают изменения в экспрессии генов адипогенных факторов «первой волны».
4. Искусственное подавление Prep1 приводит к такой экспрессии генов, которая характерна для частично дифференцированных клеток.

ПУБЛИКАЦИИ

- 1) Penkov D.N., **Egorov A.D.**, Mozgovaya M.N., Tkachuk V.A. «Insulin resistance and adipogenesis: role of transcription and secreted factors» в журнале Biochemistry (Moscow), 2013, том 78, № 1, с. 8-18.
- 2) **Егоров А.Д.**, Пеньков Д.Н., Ткачук В.А. «Молекулярные клеточные механизмы адипогенеза» в журнале Сахарный диабет, 2015, том 18, № 2, с. 12-19.
- 3) Penkov D.N., Акopyan Zh. A., Kochegura T.N., **Egorov A.D.** «Transcriptional control of insulin-sensitive glucose carrier Glut4 expression in adipose tissue cells» в журнале Doklady Biochemistry and Biophysics, 2016, том 467, № 1, с. 145-149.

ПУБЛИКАЦИИ ТЕЗИСОВ

- 1) **Egorov A.D.**, Penkov D.N. Potential role of Prep1 transcription factor in adipogenic differentiation. Keystone Symposia J7-J8 Abstract book, 2012, с. 206.
- 2) Penkov D.N., **Egorov A.D.**, Tkachuk V.A. Role of homeodomain transcription factor Prep1 in mouse adipocyte development. Benzon Symposium No. 58 Abstract book, 2012, с. 8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad. Med.* 2009;**121**(6):21-33.
2. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput. Biol.* 2009;**5**(3):e1000324.
3. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 2008;**77**:289-312.
4. Siersbæk R, Rabiee A, Nielsen R et al. Transcription factor cooperativity in early adipogenic hotspots and super-enhancers. *Cell Rep.* 2014;**7**(5):1443-55.
5. Monteiro MC, Sanyal M, Cleary ML et al. PBX1: a novel stage-specific regulator of adipocyte development. *Stem Cells.* 2011;**29**(11):1837-48
6. Fernandez-Diaz LC, Laurent A, Girasoli S et al. The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells. *Development.* 2010;**137**(20):3393-403.
7. Di Rosa P, Villaescusa JC, Longobardi E et al. The homeodomain transcription factor Prep1 (pKnox1) is required for hematopoietic stem and progenitor cell activity. *Dev. Biol.* 2007;**311**(2):324-34.
8. Penkov D, Di Rosa P, Fernandez Diaz L et al. Involvement of Prep1 in the alphabeta T-cell receptor T-lymphocytic potential of hematopoietic precursors. *Mol. Cell. Biol.* 2005;**25**(24):10768-81.
9. Rowan S, Siggers T, Lachke SA et al. Precise temporal control of the eye regulatory gene Pax6 via enhancer-binding site affinity. *Genes Dev.* 2010;**24**(10):980-5.
10. Longobardi E, Iotti G, Di Rosa P et al. Prep1 (pKnox1)-deficiency leads to spontaneous tumor development in mice and accelerates EmuMyc lymphomagenesis: a tumor suppressor role for Prep1. *Mol. Oncol.* 2010;**4**(2):126-34.
11. Oriente F, Fernandez Diaz LC, Miele C et al. Prep1 deficiency induces protection from diabetes and increased insulin sensitivity through a p160-mediated mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 2008;**28**(18):5634-45.

12. Oriente F, Iovino S, Cabaro S et al. Prep1 controls insulin glucoregulatory function in liver by transcriptional targeting of SHP1 tyrosine phosphatase. *Diabetes*. 2011;**60**(1):138-47.
13. Karnieli E, Armoni M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008;**295**(1):E38-45.
14. Penkov D, Mateos San Martín D, Fernandez-Díaz LC et al. Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. *Cell Rep.* 2013;**3**(4):1321-33.
15. Tang W, Zeev D, Suh JM et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*. 2008;**322**(5901):583-6.
16. Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J. Nutr.* 2006;**136**(12):2953-6.
17. Park YK, Wang L, Giampietro A et al. Distinct roles of transcription factors KLF4, Krox20 and PPAR γ in adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2016. pii: MCB.00554-16.
18. Lachmann A, Xu H, Krishnan J et al. ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics*. 2010;**26**(19):2438-44.
19. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 2015; 4: e05005.