

УДК 576.5

DOI 10.17802/2306-1278-2021-10-3-44-55

АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ZBTB16 ПРИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМНОГО РЯДА

Д.С. Семенова^{1,2,3}, А.М. Киселев², А.Б. Малашичева^{1,2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034; ² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук», Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064; ³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

Основные положения

• Чрезвычайно важная задача регенеративной медицины – нахождение решения эффективного наращивания и восстановления костной ткани, в том числе при помощи остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. Понимание того, какие молекулярные компоненты и каким образом они принимают участие на разных стадиях остеодифференцировки, является первым шагом к возможности управлять процессами остеогенеза. Способность модуляции клеточных сигналов, в том числе за счет активации или подавления работы ZBTB16, возможно, приблизит нас к умению усиливать остеогенез либо предотвращать нежелательную остеогенную дифференцировку в местах эктопической оссификации. Это станет уникальным решением для лечения множества заболеваний.

Цель

Кальцинированный стеноз аортального клапана является третьей ведущей причиной сердечно-сосудистых заболеваний. Механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются неясными, однако известно, что они во многом схожи с формированием костной ткани во время эмбрионального развития, а также в постнатальном периоде при регенерации. Существует множество подтверждений участия ZBTB16 в развитии скелета. При этом данные ряда исследований, проведенных на разных типах клеточных культур, свидетельствуют о противоречивом и неоднозначном влиянии ZBTB16 на экспрессию RUNX2. Понимание сходства и различий в механизмах, опосредующих остеогенную дифференцировку клеток во время физиологического формирования кости и патологической оссификации тканей может дать предпосылки для возможности управления процессами остеогенной дифференцировки в организме человека. Таким образом, цель данного исследования состояла в изучении динамической вариабельности экспрессии ZBTB16, а также его роли в кальцификации клапана аорты.

Материалы и методы

В исследовании использованы разные типы клеточных культур мезенхимального происхождения – интерстициальные клетки аортального клапана, мезенхимальные стволовые клетки пупочного канатика, стволовые клетки связок и пульпы зуба. С помощью метода ПЦР в реальном времени анализировали изменения уровней экспрессии ZBTB16 и RUNX2 под влиянием остеогенных стимулов, а также при экзогенной активации ZBTB16. В интерстициальных клетках аортального клапана проанализированы уровни экспрессии некоторых остеогенных маркеров – BMP2,4, COL1A1, IBSP, DLX2, PDK4.

Результаты

Значительное повышение экспрессии ZBTB16 наблюдается при индукции остеогенной дифференцировки различных клеточных культур – интерстициальных клеток аортального клапана, мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика, стволовых клеток связок и пульпы зуба. Получены данные о том, что процессы остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана при использовании в среде для культивирования дексаметазона осуществляются посредством RUNX2-зависимого сигналинга, что необходимо для последующей активации остеогенных маркеров.

Для корреспонденции: Дарья Сергеевна Семенова, daria.semenova1994@gmail.com; адрес: Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, Россия, 199034

Corresponding author: Daria S. Semenova, daria.semenova1994@gmail.com; address: 7-9, Universitetskaya nab., Saint Petersburg, Russia, 199034

Заключение Изучение модуляции клеточных сигналов посредством ZBTB16 при активации либо подавлении работы транскрипционного фактора в будущем может приблизить нас к умению усиливать регенеративные способности клеток костной ткани или, напротив, предотвращать кальцификацию тканей аортального клапана.

Ключевые слова Мезенхимальные стволовые клетки • Интерстициальные клетки клапана аорты • ZBTB16 • RUNX2 • Остеогенная дифференцировка

Поступила в редакцию: 09.07.2021; поступила после доработки: 26.08.2021; принята к печати: 05.09.2021

ACTIVATION OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR ZBTB16 EXPRESSION DURING OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

D.S. Semenova^{1,2,3}, A.M. Kiselev², A.B. Malashicheva^{1,2,3}

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”, Universitetskaya nab., 7-9, Saint Petersburg, Russian Federation, 199034; ² Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”, Tikhoretskiy Ave., 4, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064; ³ Federal State Budgetary Institution “V.A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Akkuratova St., 2, Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

Highlights

• Regenerative medicine strives to find a way to stimulate effective bone tissue regeneration with the help of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Comprehensive understanding of molecular components and their role in different stages of osteodifferentiation is the first step to being able to control the processes of osteogenesis. Modulating cellular signals by either activating or suppressing ZBTB16 transcriptional factor may bring us closer to the ability to enhance the regenerative abilities of bone tissue cells or, conversely, prevent calcification of the aortic valve tissues. This could be a unique treatment modality for various diseases.

Aim Calcified aortic valve stenosis is the third leading cause of cardiovascular disease. The mechanisms underlying this process remain unclear, however, it is known that they are largely similar to the formation of bone tissue during embryonic development, as well as in the postnatal period during regeneration. There is evidence for the involvement of Zinc Finger and BTB Domain Containing 16 (ZBTB16) in skeletal development. At the same time, a number of studies carried out on different types of cell cultures indicate a contradictory and ambiguous effect of ZBTB16 on RUNX2 expression. Thus, the aim of this study was to investigate the dynamic variability of ZBTB16 expression, as well as its role in aortic valve calcification.

Methods The study used different types of mesenchymal cells cultures – aortic valve interstitial cells, umbilical cord mesenchymal stem cells, ligament stem cells and dental pulp stem cells. Changes in ZBTB16 and RUNX2 expression levels under the influence of osteogenic stimuli, as well as during exogenous activation of ZBTB16, were analyzed using real-time PCR. Expression levels of some osteogenic markers – BMP2,4, COL1A1, IBSP, DLX2, PDK4 – were analyzed in the interstitial cells of the aortic valve.

Results The results of the study indicate that a significant increase in the expression of ZBTB16 is observed during the induction of osteogenic differentiation of various cell cultures – interstitial cells of the aortic valve, mesenchymal stem cells of the umbilical cord, stem cells of the ligaments and dental pulp. Apparently, the processes of osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cells, in the presence of dexamethasone in cultivation medium, are provided through RUNX2-dependent signaling for the further activation of osteogenic markers.

Conclusion The study of modulation of cellular signals by ZBTB16, when activating or suppressing the work of a transcriptional factor, in the future may bring us closer

to the ability to enhance the regenerative abilities of bone tissue cells or, conversely, prevent calcification of the aortic valve tissues.

Keywords

Mesenchymal stem cells • Aortic valve interstitial cells • ZBTB16 • RUNX2 • Osteogenic differentiation

Received: 09.07.2021; received in revised form: 26.08.2021; accepted: 05.09.2021

Список сокращений

ИКАК – интерстициальные клетки аортального клапана человека	МСК – мезенхимальные стволовые клетки
кМСК – мезенхимальные стволовые клетки почечного канатика	ПЦР – полимеразная цепная реакция
	СК – стволовые клетки

Введение

Кальцинированный стеноз аортального клапана входит в тройку ведущих причин сердечно-сосудистых заболеваний. Единственным существующим на сегодняшний день вариантом лечения является операция на сердце с имплантацией протеза клапана. Риск кальцификации сердечного клапана увеличивается с возрастом [1]. Главной особенностью заболевания служит прогрессивная минерализация ткани клапана. Механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются неясными, однако принципы, обуславливающие патологические процессы, которые опосредуют развитие кальцификации аортального клапана человека, во многом имеют сходство с формированием костной ткани скелета во время эмбрионального развития, а также в постнатальном периоде при регенерации [2]. Оссификация – процесс закладки нового костного материала, в то время как кальцификация представляет собой процесс, посредством которого соли кальция накапливаются в мягких тканях, что заставляет их затвердевать. Многие ключевые игроки, принимающие участие в кальцификации сосудов (моноциты, факторы транскрипции, костные морфогенетические белки (BMP) и т. д.), также являются регуляторами формирования костной ткани в осевом скелете [3].

На сегодняшний день мнение о пассивном процессе дегенерации, лежащем в основе развития кальцификации аортального клапана, сменилось на наличие динамического сложно регулируемого клеточно-молекулярного патологического процесса, который приводит к описываемому дефекту. Кальцификация сосудов развивается в ответ на хронические воспалительные стимулы, которые в избытке присутствуют в организме людей, страдающих диабетом, гипертонией, гиперлипидемией и хронической болезнью почек [4]. Механизмы оссификации сосудов все еще находятся на стадии исследования, но, как было показано, они варьируют в зависимости от лежащих в основе данной патофизиологии процессов кальцификации, предшествующих оссификации тканей [5].

Во множестве лабораторий по всему миру занимаются исследованиями, направленными на идентификацию молекулярных участников ранних механизмов остеогенной трансформации клеток. Существует несколько вариантов протоколов и методик моделирования прокальцифицирующих условий *in vitro* [6–9]. Однако наиболее часто используемым и стандартным подходом является добавление в среду для культивирования клеточных культур трех специфичных остеогенных факторов: аскорбиновой кислоты, бета-глицерофосфата и дексаметазона. Каждый из компонентов играет незаменимую роль в индукции остеогенной трансформации клеток мезенхимного ряда, способных к дифференцировке в данном направлении [10]. Показано, что дексаметазон индуцирует экспрессию RUNX2 посредством активации транскрипции FHL2/ β -катенина, а также повышает активность RUNX2 за счет усиления TAZ и MKP1 [11]. Применение аскорбиновой кислоты ведет к увеличению секреции коллагена I типа (COL1), что в свою очередь приводит к усилению COL1/ α 2 β 1-интегрин-опосредованной внутриклеточной передачи сигнала [12]. β -глицерофосфат служит источником фосфата в гидроксилатапите и, кроме того, влияет на внутриклеточные сигнальные молекулы [13].

Осуществление остеогенной дифференцировки регулируется различными факторами транскрипции, в том числе такими как RUNX2, OSTERIX и β -катенин. RUNX состоит из runt-домена (ДНК-связывающий домен) и белка RUNX, которые образуют гетеродимеры с основным связывающим фактором β (Cbf β). Во множестве исследований показано, что RUNX2 необходим для остеогенной дифференцировки. Фактор транскрипции RUNX2 является важным регулятором образования костей и остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК); заставляет МСК дифференцироваться в преостеобласты и подавляет адипо- и хондрогенную дифференцировку [14].

В рамках исследования молекулярно-генетических механизмов, играющих инициаторные роли

в индукции кальцификации аортального клапана, проведен транскриптомный анализ клеточных культур, полученных от пациентов с кальцинированным аортальным стенозом и здоровых людей. Выявлены данные, свидетельствующие об изменении экспрессии большого количества генов в ответ на индукцию остеогенной дифференцировки в клетках аортального клапана. Одним из наиболее ярких маркеров, экспрессия которого значимо повышалась во всех анализируемых образцах после запуска дифференцировки, являлся ген *ZBTB16*. В отличие от множества описанных в литературе генов и сигнальных путей, связанных с процессами остеогенеза, таких как *RUNX2*, *BMP2*, *BMP4*, *ALP*, *BGLAP*, *COL1A1*, *IBSP*, *OPN*, *TNFRSF11B* (*OPG*), *SPRY1*, а также многих других известных маркеров остеогенной дифференцировки, кроме того, генов, связанных с сигнальными путями Notch, Wnt/В-катенин, роль гена *ZBTB16* в процессах остеогенной трансформации клеток остается невыясненной [15].

ZBTB16 является транскрипционным фактором с N-концевым ВТВ/POZ-доменом для белок-белкового взаимодействия и девятью С-концевыми доменами типа цинковый палец для связывания ДНК [16]. В литературе представлены свидетельства об участии *ZBTB16* в развитии скелета [17]. Показано, что *ZBTB16* играет роль в спецификации паттернов аксиального скелета и конечности. Кроме того, экспрессия *ZBTB16* повышена в клетках пациентов, страдающих эктопическим формированием костной ткани [18]. Известно, что *ZBTB16* модулирует экспрессию *COL1A1*, *BGLAP* и *ALP* [18]. Существует ряд исследований, проведенных на разных типах клеточных культур, результаты которых демонстрируют противоречивое влияние *ZBTB16* на экспрессию *RUNX2*. В исследованиях показана важность функциональной активности *ZBTB16* в дифференцировке стволовых клеток (СК) в остеобласты [19]. По всей видимости, *ZBTB16* работает как важный маркер на более поздних стадиях остеобластической дифференцировки СК. Работа, проведенная на МСК, полученных из костного мозга, свидетельствует о том, что экспрессия *ZBTB16* имеет решающее значение для индукции *RUNX2* и прохождения остеогенной дифференцировки [20]. Однако одновременно с этим исследования, проведенные на клетках дентальных фолликулов, показали независимые от *RUNX2* процессы остеогенеза с вовлечением индукции *ZBTB16* [15, 21]. Вероятно, *ZBTB16* необходим для активации более поздних маркеров остеогенной дифференцировки в клетках, таких как *BGLAP* и *NR4A3* [22].

Цель данного исследования состояла в изучении динамической вариабельности экспрессии *ZBTB16*, а также его роли в кальцификации клапана аорты. Понимание сходств и различий в механизмах, опосредующих остеогенную дифференци-

ровку клеток во время физиологического формирования кости и патологической оссификации тканей, может дать предпосылки для возможности управления процессами остеогенной дифференцировки в организме человека.

Таким образом, изучение динамической вариабельности и изменений в экспрессии *ZBTB16* при кальцификации клапана аорты, а также в процессах остеогенной дифференцировки СК мезенхимного ряда является новым и актуальным направлением.

Материалы и методы

Клеточные культуры. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям.

В качестве основного материала исследования использованы четыре типа клеточных культур мезенхимального происхождения:

1. Интерстициальные клетки аортального клапана человека (ИКАК). Фрагменты аортальных клапанов пациентов с кальцифицированным аортальным стенозом ($n = 2$) получали в ходе плановых операций по замене клапана аорты, осуществляемых в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Для получения интерстициальных клеток фрагмент створки аортального клапана оставляли в растворе коллагеназы IV типа при температуре 37 °C на 24 ч. После этого раствор с клапаном тщательно ресуспендировали, промывали свежим раствором PBS. Затем интерстициальные клетки перемещали в чашку Петри. Клетки культивировали до появления характерных мезенхимных колоний. Среда для рутинного культивирования интерстициальных клеток клапана содержала DMEM (Gibco, США), 15% FBS (Hyclone, США), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogen, США) и 1% L-глутамин (Invitrogen, США).

2. Мезенхимальные СК пупочного канатика человека (кМСК). После забора материала – пупочный канатик, полученный от донора ($n = 2$) – осуществлялось ферментативное выделение МСК. Для подтверждения принадлежности полученных культур к МСК на проточном цитометре GuavaEasyCyte6 (Millipore, США) проводили иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител против CD73, CD90, CD105 и CD166 (BD, США) [23]. Среда для культивирования содержала α -MEM (Панэко, Москва, Россия), 10% FBS (Hyclone), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogen, США) и 1% L-глутамин (Invitrogen, США).

3. СК периодонтальной пульпы человека (СК пульпы). Первичные культуры СК пульпы зуба получали от доноров ($n = 2$) без системных заболеваний и заболеваний периодонта. Клетки выделяли ферментативным методом из фрагментов пульпы

зуба, срезаемых с удаляемых зубов (третьих моляров, показания к удалению – ретенция и/или дистопия) [24]. Среда для культивирования СК пульпы содержала α -MEM (Панэко), 10% Nuclone (Gibco), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogene) и 1% L-глутамин (Invitrogene).

4. СК периодонтальных связок человека (СК связок). Первичные культуры СК связок получали от доноров ($n = 2$) без системных заболеваний и заболеваний периодонта. Клетки выделяли ферментативным методом из фрагментов периодонтальных связок, срезаемых с удаляемых зубов (третьих моляров, показания к удалению – ретенция и/или дистопия). Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США) с использованием полупроводниковых диодных лазеров 488 и 638 нм. Применяли следующие панели моноклональных антител (Beckman Coulter) для определения положительных и отрицательных маркеров иммунофенотипа мезенхимальных стромальных клеток, характерного и для СК связок: CD44-FITC/CD73-PE/CD9-PC5/CD105-PC7 и CD34-FITC/CD117-PE/CD14-PC5/CD45-PC7 [24]. Среда для культивирования СК связок содержала α -MEM (Панэко), 10% Nuclone (Gibco), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogene) и 1% L-глутамин (Invitrogene).

Индукция остеогенной дифференцировки в клетках. Для дифференцировки в остеогенном направлении использовали клетки 2–5 пассажей, находящиеся в логарифмической фазе роста. За сутки до индукции дифференцировки клетки сеяли на 12-луночные или 24-луночные планшеты в необходимой плотности (70×10^3 клеток/см²). Для запуска остеогенной дифференцировки клеток использовали следующие факторы: 0,1 мкМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицеролфосфата (Sigma, США). Кроме того, остеогенную дифференцировку запускали в отсутствие дексаметазона с внесением в среду для культивирования 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицеролфосфата; напротив, в отсутствие аскорбиновой кислоты и β -глицеролфосфата – с добавлением только 0,1 мкМ дексаметазона. Дифференцировка клеток проходила в течение 18–21 дня. Смену дифференцировочной среды проводили каждые 3 дня.

В качестве контроля в экспериментах использовали клетки, в которых не была запущена дифференцировка.

Клонирование гена ZBTB16. С помощью коммерческой плазмиды TetO-FUW (Addgene, <https://www.addgene.org/61543/>) с необходимой вставкой, ZBTB16, проведена наработка продукта методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров к ZBTB16, содержащих специфические рестрикционные сайты. После этого осуществлено переосаждение ПЦР-продукта. Затем проводили

рестрикцию необходимого вектора pCig3 (Addgene, <https://www.addgene.org/78264/>) с помощью рестриктаз BamHI и EcoRI. После этого выполнили лигирование вышеуказанного фрагмента в плазмиду pCIG3. В завершение проведена проверка конструкции при помощи ПЦР с использованием праймеров, специфических к вектору, рестрикция, а также секвенирование по Сэнгеру. Внедрение данной конструкции в клетки аортального клапана и МСК выполнено при помощи лентивирусной трансдукции.

Производство лентивирусных частиц. В основе метода по производству лентивирусных частиц лежит протокол, разработанный в лаборатории Д. Тронно и модифицированный в нашей лаборатории [33]. Нарботка лентивирусных частиц осуществлялась в клетках линии HEK293T. Клетки данной линии культивировали в среде DMEM (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogen), 1% L-глутамин (Invitrogen, США) в инкубаторе с 5% CO₂ при 37 °C.

Первый этап производства лентивирусных частиц осуществлен с использованием реагента PEI. К 15 мкг векторной плазмиды, содержащей ген интереса ZBTB16, добавляли 9,73 мкг psPAX2 и 5,27 мкг pMD2.G, перемешивали и добавляли к 500 мкл DMEM с добавлением 60 мкл PEI. Инкубировали смесь 10–15 мин при комнатной температуре, затем раствор по каплям добавляли к клеткам. Клетки инкубировали в течение 12–17 ч, после чего среду меняли на 7 мл свежей. Через сутки проводили центрифугирование вирусных частиц путем ультрацентрифугирования. После чего осажденные частицы ресуспендировали в 1% BSA / PBS и замораживали в аликвотах при -80 °C. Титр вируса определяли по количеству Green Fluorescent Protein (GFP) – экспрессирующих клеток в культуре при трансдукции вирусом, несущим ген, кодирующий ZBTB16, а также последовательность гена GFP в том же векторе. Эффективность трансдукции клеток составила 85–90%.

ПЦР в реальном времени. РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Тотальная РНК (1 мкг) была обратно транскрибирована при помощи набора MMLV RT («Евроген»). ПЦР в реальном времени проводили в термоциклере ABI 7500 (Applied Biosystems, США) со следующими температурными условиями: 10 мин при 95 °C, 15 с при 95 °C и 1 мин при 60 °C в течение 40 циклов с охлаждением в конце до 4 °C. Для проведения ПЦР использованы специфичные прямые и обратные праймеры на гены-мишени (ZBTB16, BMP2, BMP4, COL1A1, IBSP, DLX2, PDK4, последовательность праймеров предоставляется по требованию). Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. Данные проанализированы с помощью программного обеспечения 7500 Software v2.0.6,

получены значения C_t для каждого гена. Построение кривой плавления выполнено, чтобы убедиться, что продукт состоял из одного ампликона. Пороги и базовые показатели установлены в соответствии с инструкциями производителя (SABiosciences, Qiagen, США). Данные обработаны с использованием программного обеспечения Qiagen. Изменение уровней экспрессии генов (по сравнению с контрольными образцами) рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$. Все эксперименты выполнены в трех биологических повторах, то есть в трех независимых экспериментах.

Расчет и обработка данных. Информация, полученная при помощи метода ПЦР в реальном времени, обработана с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft, США) и GraphPad Prism (GraphPad, США). Данные в результатах представлены в виде среднего по всем проведенным экспериментам. Также указаны показатели стандартного отклонения, рассчитанные исходя из полученных данных по трем выполненным биологическим повторам экспериментов. Таким образом, указан разброс данных вокруг среднего значения. В программе GraphPad Prism проводили расчет достоверности отличий при помощи непараметрического сравнения.

Иммуноблоттинг. Для подтверждения содержания ZBTB16 в клеточных культурах использовали стандартный метод иммуноблоттинга. Сначала клетки культивировали 96 ч, промывали PBS, затем лизировали в 75 мкл лизирующего буфера (50мМ TrisHCl (pH = 8,0), 150мМ NaCl, 1% дезоксихолат, 1% тритон, 0,1%, коктейль ингибиторов протеаз Rouch), инкубировали 30 мин на льду и осаждали на центрифуге (4 °C, 10 мин, 14 000 g). К супернатанту добавляли 25 мкл буфера для нанесения (4×SDS буфер) с меркаптоэтанолом (1,7 мкл). Далее пробы нагревали при 95 °C на термостате 5 мин и наносили на электрофорез в 10% полиакриламидном геле с использованием электрофоретической камеры (BioRad) при

режиме: 20 μ A – 10 мин, 40 μ A – >20 мин. Затем при помощи метода полусухого переноса в камере прибора BioRadTurbo пробы переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью электродов и буфера для переноса (трис-глициновый буфер с метанолом) при 25V 30 мин, мембрану отмывали в PBS. Все последующие отмывки проводили в растворе PBS/0,1% Tween 20. Для блокирования неспецифического окрашивания использовали раствор для забивки (5% молоко на PBS/0,1% Tween 20). Мембрану инкубировали в течение ночи на качалке при 4 °C с первичными антителами к белку ZBTB16 и В-актину – в качестве проверки успешности методики (Santa Cruz, США; 1:250) и час при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (BioRad; 1:10000). После окрашивания детекцию осуществляли с помощью системы усиленной хемиллюминесценции (ThermoScientific, США) согласно инструкции производителя на приборе ChemiDoc (BioRad).

Результаты

Известно, что процессы, протекающие во время остеогенной дифференцировки при нормальном развитии костной ткани, близки по механизмам и молекулярным участникам с процессами формирования очагов оссификации тканей при различных патологиях. МСК различного происхождения способны к дифференцировке в остеогенное направление [26]. На первом этапе работы получены данные о том, что индукция остеогенной дифференцировки путем культивирования клеток в присутствии аскорбиновой кислоты, β -глицерофосфата и дексаметазона приводит к значительному усилению экспрессии транскрипционного фактора ZBTB16 в различных культурах клеток мезенхимального происхождения (рис. 1). Полученные данные подтверждают гипотезу о сходствах между процессами остеогенной трансформации клеток в различных

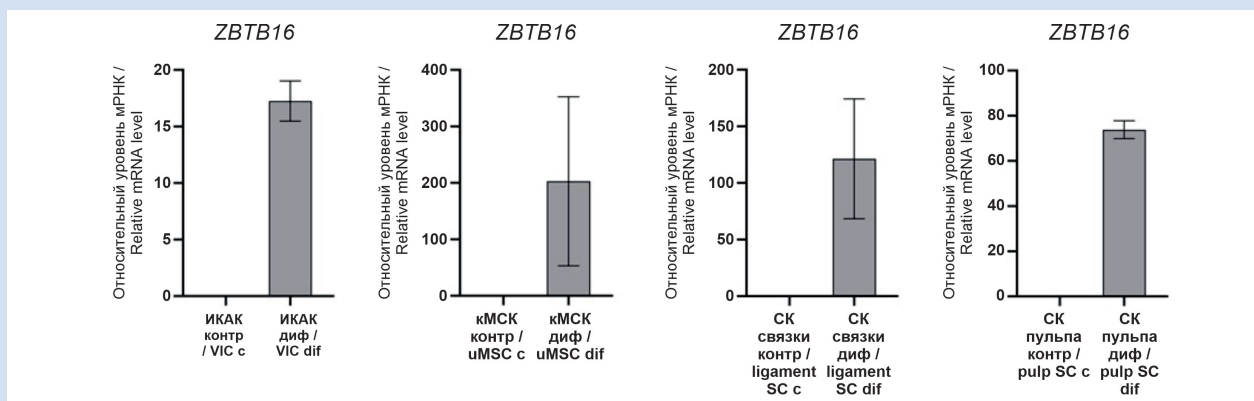


Рисунок 1. Экспрессия ZBTB16 значительно повышается через 96 ч в ответ на индукцию остеогенной дифференцировки в клеточных культурах ИКАК, кМСК, СК связки, СК пульпы

Примечание: ИКАК – интерстициальные клетки аортального клапана человека; кМСК – мезенхимальные стволовые клетки пупочного канатика; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; СК – стволовые клетки.

Figure 1. Expression of ZBTB16 significantly increased after 96 hours in response to the induction of osteogenic differentiation in VIC, uMSC, ligament SC, pulp SC cell cultures

Note: mRNA – messenger ribonucleic acid; SC – stem cells; uMSC – umbilical cord mesenchymal stem cells; VIC – valve interstitial cell.

тканях организма: физиологическими процессами образования кости или эктопическим формированием очагов оссификации.

Существуют данные, свидетельствующие о том, что изменения экспрессии ZBTB16 связаны с ответом на воздействие глюкокортикоидов, индуцируемое дексаметазоном в лимфоидных клетках [27]. Следующим этапом работы стояла задача выяснить, существует ли связь между воздействием на клетки дексаметазона во время индукции остеогенной дифференцировки и изменениями экспрессии транскрипционного фактора ZBTB16 именно в клетках аортального клапана человека. Кроме того, задачей эксперимента являлось изучение того, существует ли связь между активацией ZBTB16, изменением экспрессии RUNX2 и запуском остеогенной дифференцировки в клетках аортального клапана.

Это находит подтверждение в повышении экспрессии специфических остеогенных маркеров. Для более глубокого изучения вопроса необходимо было создать плазмиду, несущую ген ZBTB16, после чего был сконструирован лентивирус, кодирующий данную последовательность, для доставки экзогенного генетического материала в клеточные культуры. В результате отмечено значительное усиление продукции белка ZBTB16 через 96 ч после добавления вируса к культурам интерсти-

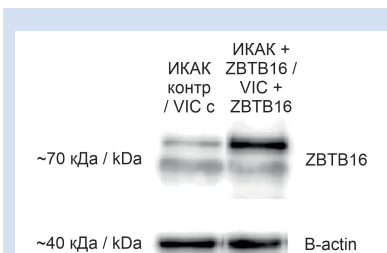


Рисунок 2. Выявление экзогенного ZBTB16 в недифференцированных ИКАК, трансдуцированных вирусом, несущим последовательность, кодирующую транскрипционный фактор ZBTB16. В качестве контроля – детекция белка В-актин

Примечание: ИКАК – интерстициальные клетки аортального клапана человека.

Figure 2. Detection of exogenous ZBTB16 in undifferentiated VIC transduced with a virus bearing the sequence encoding the transcription factor ZBTB16. Detection of B-actin protein was used as a control

Note: VIC – valve interstitial cell; ZBTB16 – Zinc Finger and BTB Domain Containing 16.

циальных клеток аортального клапана (рис. 2).

Полученная конструкция использована в экспериментах, направленных на изучение того, каким образом осуществляется регуляция активности одного из основных транскрипционных факторов, принимающих участие в остеогенной трансформации клеток, – RUNX2.

В данном эксперименте проанализированы уровни экспрессии ZBTB16 и RUNX2 на восьми временных точках: 12, 24, 48, 72, 96 ч и 9, 15, 19 дней после индукции остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках аортального клапана. Изучены изменения в уровнях экспрессии генов в трех различных условиях: 1) после индукции в клетках остеогенной дифференцировки с применением стандартного протокола, в который входит аскорбиновая кислота, дексаметазон, β -глицерофосфат (рис. 3, а);

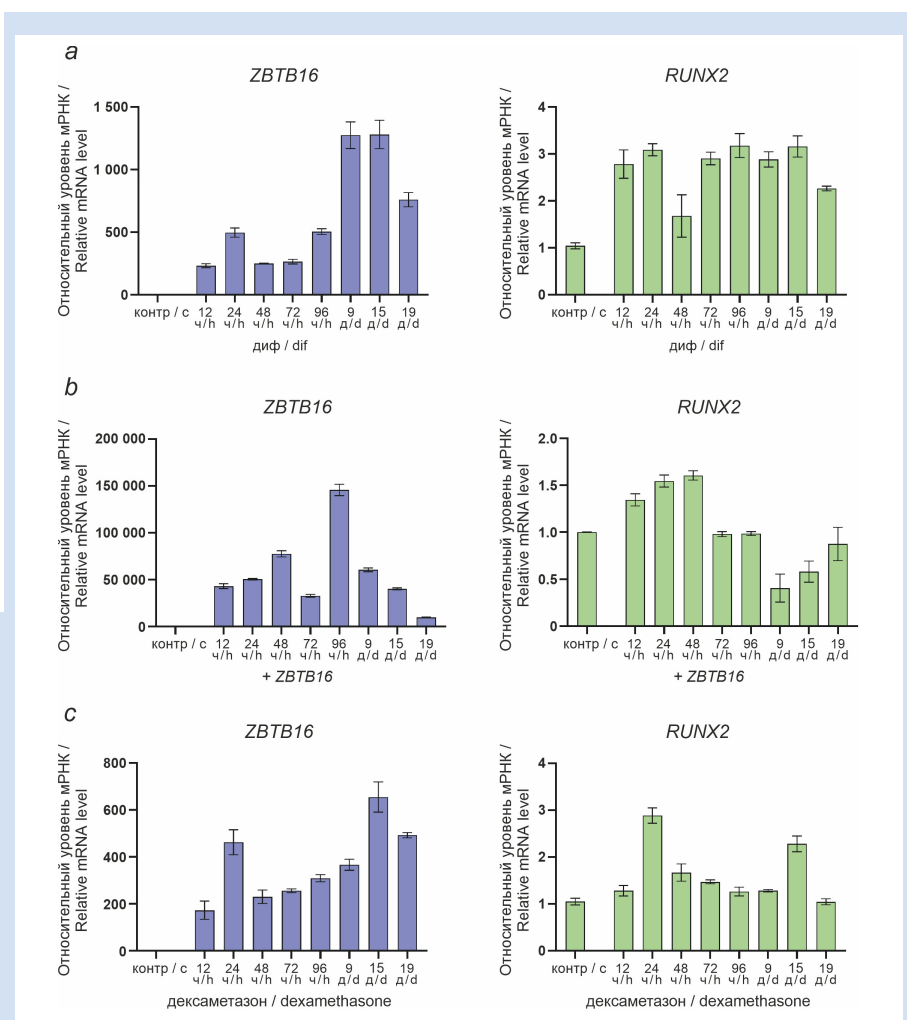


Рисунок 3. Экспрессия ZBTB16 и RUNX2 в ИКАК на разных временных точках (12, 24, 48, 72, 96 ч; 9, 15 и 19-й дни) после индукции в клетках остеогенной дифференцировки в присутствии полной остеогенной среды (аскорбиновая кислота, дексаметазон, β -глицерофосфат) (а); при индукции чрезмерной экспрессии ZBTB16 в клетках в отсутствие остеогенных индукторов (б); при добавлении в среду для культивирования только дексаметазона (с)

Примечание: мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.

Figure 3. Expression of ZBTB16 and RUNX2 in VIC at different time points (12, 24, 48, 72, 96 hours, 9, 15 and 19 days) after induction of osteogenic differentiation in cells in the presence of a full osteogenic medium (ascorbic acid, dexamethasone, β -glycerophosphate) (a). Induction of overexpression of ZBTB16 in cells without osteogenic inductors (b). In the presence of dexamethasone in cultivation medium (c).

Note: mRNA – messenger ribonucleic acid.

2) после индукции в клетках чрезмерной экспрессии ZBTB16 (см. рис. 3, b); 3) после обработки клеток средой для культивирования, содержащей дексаметазон (см. рис. 3, c).

Отмечено значительное усиление экспрессии ZBTB16 во всех трех условиях культивирования в зависимости от временной точки. Также показано усиление экспрессии RUNX2. Полученные в данном эксперименте результаты свидетельствуют о том, что экспрессия RUNX2 связана с индукцией и повышением экспрессии ZBTB16 в интерстициальных клетках аортального клапана (см. рис. 3). ZBTB16, вероятно, является вышестоящим регулятором транскрипционного фактора RUNX2.

В свою очередь, активированный RUNX2 впоследствии приводит к индукции некоторых известных маркеров остеогенной дифференцировки и генов, ответственных за реорганизацию метаболических процессов в клетках: *BMP2*, *BMP4*, *COL1A1*, *IBSP*, *DLX2*, *PDK4* (рис. 4, a).

Следующие эксперименты подтвердили, что активация экспрессии ZBTB16 напрямую связана с ответом клеток на воздействие глюкокортикостероидов. Среда, содержащая в составе дексаметазон или лентивирусную конструкцию, непосредственно влияла на сверхэкспрессию ZBTB16, что в свою очередь приводило к индукции транскрипционного фактора RUNX2 (см. рис. 4, b) и далее – к активации специфичных для остеогенеза генов: *BMP2*, *BMP4*, *COL1A1*, *IBSP*, *DLX2*, *PDK4*.

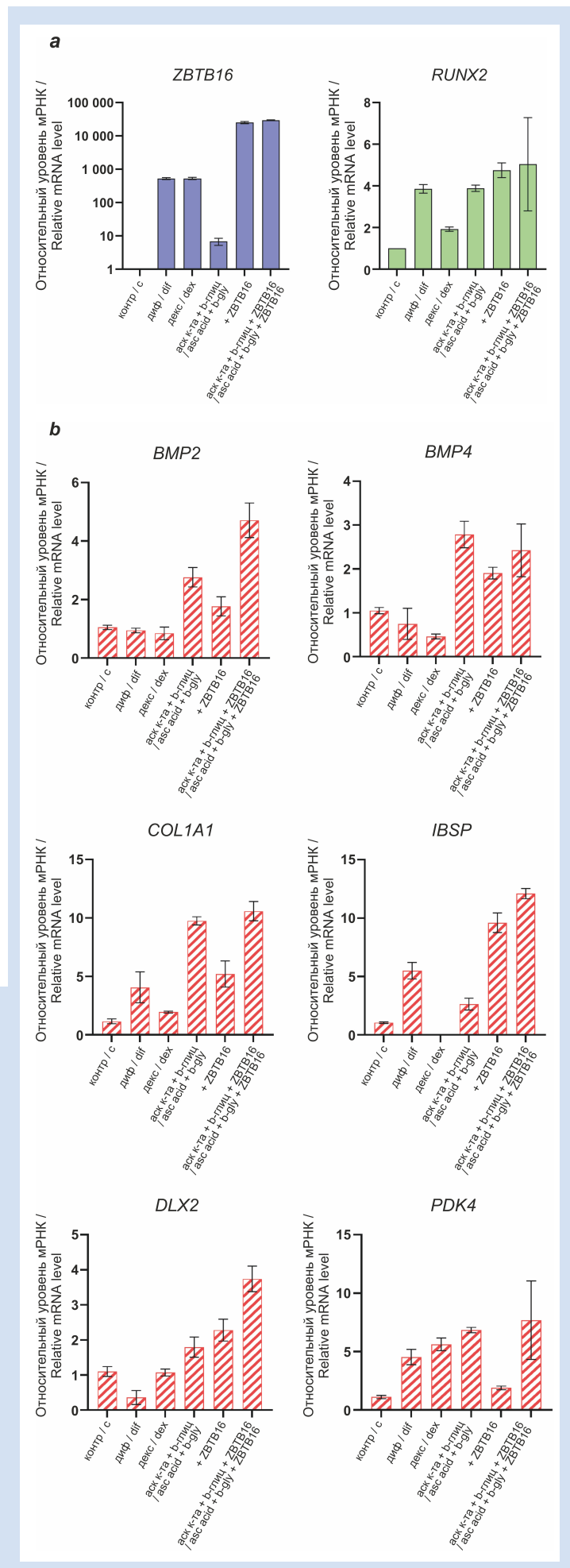
Проведенные исследования показали важность функциональной активности ZBTB16 в дифференцировке интерстициальных клеток

Рисунок 4. Изменение уровней экспрессии ZBTB16, RUNX2 (a) и остеогенных маркеров *BMP2*, *BMP4*, *COL1A1*, *IBSP*, *DLX2*, *PDK4* (b) под влиянием различных условий культивирования в ИКАК через 96 ч после начала эксперимента: 1 – культивирование с использованием полной дифференцировочной среды; 2 – культивирование с использованием дексаметазона; 3 – культивирование с использованием аскорбиновой кислоты и β-глицерофосфата; 4 – индукция сверхэкспрессии ZBTB16 в клетках после лентивирусной трансдукции; 5 – культивирование с использованием аскорбиновой кислоты, β-глицерофосфата с одновременной трансдукцией клеток лентивирусными частицами, несущими ZBTB16

Примечание: мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.

Figure 4. Changes in the expression levels of ZBTB16, RUNX2 (a) and osteogenic markers – *BMP2*, *BMP4*, *COL1A1*, *IBSP*, *DLX2*, *PDK4* (b) various cultivation conditions in VIC 96 hours after the start of the experiment: 1. Cultivation using full differentiation medium; 2. Cultivation using dexamethasone; 3. Cultivation using ascorbic acid, β-glycerophosphate; 4. Induction of ZBTB16 overexpression in cells after lentiviral transduction; 5. Cultivation using ascorbic acid, β-glycerophosphate with simultaneous transduction of cells with lentiviral particles carrying ZBTB16

Note: mRNA – messenger ribonucleic acid.



аортального клапана человека. В частности изучена его роль в усилении работы RUNX2 при остеогенной дифференцировке клеток аортального клапана. По всей видимости, ZBTB16 функционирует как важный маркер на различных стадиях остеобластической дифференцировки клеток.

Обсуждение

Данное исследование направлено на выявление сходств и различий в механизмах, опосредующих остеогенную дифференцировку клеток во время физиологического формирования кости и патологической оссификации тканей. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что значительное повышение экспрессии ZBTB16 наблюдается при индукции остеогенной дифференцировки различных клеточных культур – интерстициальных клеток аортального клапана, МСК пупочного канатика, СК связок и пульпы зуба. Таким образом, мы можем подтвердить мнение о том, что транскрипционный фактор ZBTB16 вовлечен в процессы остеогенной дифференцировки клеток, а также то, что эти процессы, по всей видимости, сходны в различных клеточных культурах.

Модуляция уровней экспрессии транскрипционных факторов важна для управления и регулирования экспрессии генов. Множество исследований, направленных на изучение различных физиологических процессов, протекающих в организме показали, что транскрипционный фактор ZBTB16 является важным репрессором и активатором транскрипции в зависимости от ткани, клеточного и временного контекста, при котором осуществляется его экспрессия [28]. Экспрессию ZBTB16 связывают с участием в различных онтогенетических и биологических процессах, таких как миелопоэз, сперматогенез, формирование скелетных образований задних конечностей, клеточный апоптоз, противоопухолевый эффект [29]. ZBTB16 также играет роль в регулировании судьбы и гомеостаза гемопоэтических СК [30]. Существуют доказательства того, что ZBTB16 необходим при развитии костной ткани. ZBTB16 активируется в клетках, полученных от пациентов, страдающих заболеванием, которое характеризуется эктопическим образованием оссификации тканей [18]. Кроме того, полная потеря ZBTB16 приводит к серьезной дисфункции в развитии скелета [17]. При изучении функциональ-

ной роли транскрипционного фактора ZBTB16 в дифференцировке остеобластов МСК подвергали остеобластической дифференцировке. Экспрессия ZBTB16 была значительно повышена в случае добавления к клеткам остеогенной среды или только дексаметазона. Также показано, что дексаметазон приводит к усилению экспрессии маркеров остеобластов в культурах стромальных клеток костного мозга животных и человека, однако не вызывает полноценной дифференцировки остеобластов [31]. Следовательно, экспрессия ZBTB16, по-видимому, является маркером первоначального этапа дифференцировки остеобластов.

При помощи ПЦР в реальном времени нами получены данные, свидетельствующие о том, что процессы остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана при использовании в среде для культивирования дексаметазона осуществляются посредством RUNX2-зависимого сигналинга, необходимого для дальнейшей активации остеогенных маркеров.

Заключение

С одной стороны, чрезвычайно важной задачей регенеративной медицины является нахождение решения эффективного наращивания и восстановления костной ткани, в том числе при помощи остеогенной дифференцировки МСК. Понимание того, какие молекулярные компоненты и каким образом они участвуют на разных стадиях остеодифференцировки, является предпосылкой для возможности управлять процессами остеогенеза. С другой стороны, способность модуляции клеточных сигналов, в том числе управляя экспрессией ZBTB16, возможно, приблизит нас к умению предотвращать нежелательную остеогенную дифференцировку в местах эктопической оссификации.

Конфликт интересов

Д.С. Семенова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.М. Киселев заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Б. Малашичева заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-315-90051.

Информация об авторах

Дарья Сергеевна Семенова, инженер-исследователь федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация; младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург,

Author Information Form

Semenova Daria S., Research Engineer at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”, Saint Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”, Saint Petersburg, Russian Federation; Laboratory Assistant at the Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics, Federal

Российская Федерация; лаборант-исследователь лаборатории молекулярной кардиологии и генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6123-8096

Артём Михайлович Киселев, научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5524-6900

Анна Борисовна Малашичева, кандидат биологических наук заведующая лабораторией регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук»; заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной кардиологии и генетики института молекулярной биологии и генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; доцент кафедры эмбриологии биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация; руководитель лаборатории регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0820-2913

State Budgetary Institution “V.A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6123-8096

Kiselev Artem M., Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”, Saint Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5524-6900

Malashicheva Anna B., PhD, Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”; Head of the Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal State Budgetary Institution “V.A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation; Associate Professor at the Department of Embryology, Faculty of Biology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”, Saint Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0820-2913

Вклад авторов в статью

СДС – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАМ – вклад в концепцию и дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МАБ – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

SDS – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAM – contribution to the concept and design of the study, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MAB – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart B.F., Siscovick D., Lind B.K., Gardin J.M., Gottdiener J.S., Smith V.E., Kitzman D.W., Otto C.M. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:630–4.
2. Mathieu P., Boulanger M.-C. Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease. *Can J Cardiol.* 2014;30(9):982–93. doi: 10.1016/j.cjca.2014.03.029.
3. Fuery M.A., Liang L., Kaplan F.S., Mohler E.R. Vascular ossification: Pathology, mechanisms, and clinical implications. *Bone* 2018r;109:28–34. doi: 10.1016/j.bone.2017.07.006.
4. Soor G.S., Vukin I., Leong S.W., Oreopoulos G., Butany J. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology* [Internet]. 2008;40:385–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516323650> [cited 2018 Feb 28]
5. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory , metabolic , and genetic mechanisms of vascular calcification . *PubMed Commons. Arter Thromb Vasc Biol.* 2014;34:715–23.
6. Li C.J., Madhu V., Balian G., Dighe A.S., Cui Q. Cross-Talk Between VEGF and BMP-6 Pathways Accelerates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *J Cell Physiol.* 2015;230(11):2671–82. doi: 10.1002/jcp.24983
7. Kroeze R.J., Knippenberg M., Helder M.N. Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;702:233–48. doi: 10.1007/978-1-61737-960-4_17
8. Khanna-Jain R., Vuorinen A., Sándor G.K., Suuronen R., Miettinen S. Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010t;122(4):133–41. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.08.001.1
9. Elashry M.I., Baulig N., Heimann M., Bernhardt C., Wenisch S., Arnhold S. Osteogenic differentiation of equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells using CaCl₂. *Res Vet Sci.* 2018;117:45–53. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.11.0102/

10. Langenbach F., Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. BioMed Central; 2013;4:117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24073831> [cited 2018 Nov 21]
11. Hamidouche Z., Haÿ E., Vaudin P., Charbord P., Schüle R., Marie P.J., Fromigüé O. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J*. 2008;22(11):3813-22. doi: 10.1096/fj.08-106302/
12. Franceschi R.T., Iyer B.S. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*; [1992;7(2):235-46. doi: 10.1002/jbmr.5650070216./
13. Fatherazi S., Matsa-Dunn D., Foster B.L., Rutherford R.B., Somerman M.J., Presland R.B. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res* [Internet]. Intern. and American Associations for Dental Research; 2009; 88(1): 39–44. doi: 10.1177/0022034508328072
14. Almalki S.G., Agrawal D.K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016;92(1-2):41-51. doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005./
15. Felthaus O., Gosau M., Morszeck C. ZBTB16 Induces Osteogenic Differentiation Marker Genes in Dental Follicle Cells Independent From RUNX2 . *J Periodontol*. 2014;85(5):e144-51. doi: 10.1902/jop.2013.130445.
16. Zhang T., Xiong H., Kan L.X., Zhang C.K., Jiao X.F., Fu G., Zhang Q.-H., L L. u., Tong J.-H, B.-W.Gu, M.Yu, Liu J.-X., Licht J., Waxman S., Zelent A., Chen E., Chen S.-J. Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences Sep 1999*, 96 (20) 11422-11427; DOI: 10.1073/pnas.96.20.11422
17. Fischer S., Kohlhase J., Böhm D., Schweiger B., Hoffmann D., Heitmann M., Horsthemke B., Wiczorek D. Biallelic loss of function of the promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) gene causes severe skeletal defects and genital hypoplasia. *J Med Gene*. 2008;45(11):731-7. doi: 10.1136/jmg.2008.059451.3
18. Inoue I., Ikeda R., Tsukahara S. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) and tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 (TSG-6) identified by gene expression analysis play roles in the pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament. *J. Pharmacol. Sci*. 2006;100(3):205-10. doi: 10.1254/jphs.fmj05004x5.
19. Hemming S., Cakouros D., Vandyke K., Davis M.J., Zannettino A.C.W., Gronthos S. Identification of novel EZH2 targets regulating osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2016;25(12):909-21. doi: 10.1089/scd.2015.0384
20. Morszeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2006;78(2):98-102. doi: 10.1007/s00223-005-0146-0.
21. Kato M., Patel M.S., Levasseur R., Lobov I., Chang B.H., Glass D.A. 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*. 2002;157(2):303-14. doi: 10.1083/jcb.200201089.
22. Morszeck C., Schmalz G., Reichert T.E., Völlner F., Saugspier M., Viale-Bouroncle S., Driemel O. Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*. 2009;13(4):383-91. doi: 10.1007/s00784-009-0260-x.
23. Bilibina A.A., Anisimov S.V., Zaritsky A.Y., Dmitrieva R.I., Minullina I.R., Tarasova O.V. Bone marrow and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Differences and similarities. [Internet]. *Cell Cycle*. 2012;11:1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189711>[cited 2020 Apr 27]
24. Семенова Д.С., Костина А.С., Мустаева А.М., Клаузен П.Е., Добрынин М.А., Боярская Н.В., Домбровская Ю.А., Малашичева А.В., Енукашвили Н.И. Notch-зависимая активация остеогенного потенциала клеток периодонта. *Трансляционная медицина*. 2020;7(2):21-32. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2020-7-2-21-32>
25. Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis*. 2007;45(7):456-9. doi: 10.1002/dvg.20313.
26. Heo J.S., Choi Y., Kim H.-S., Kim H.O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):115-25. doi: 10.3892/ijmm.2015.2413.
27. Wasim M., Carlet M., Mansha M., Greil R., Ploner C., Trockenbacher A., Rainer J., Kofler R. PLZF/ZBTB16, a glucocorticoid response gene in acute lymphoblastic leukemia, interferes with glucocorticoid-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120(4-5):218-27. doi: 10.1016/j.jsmb.2010.04.019.
28. Kolesnichenko M., Vogt P.K. Understanding PLZF: Two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle*. 2011; 1;10(5):771-5. doi: 10.4161/cc.10.5.14829.
29. Felicetti F., Bottero L., Felli N., Mattia G., Labbaye C., Alvino E., Peschle C., Colombo M.P., Carè A. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene*. 2004;23(26):4567-76. doi: 10.1038/sj.onc.120759 /
30. Vincent-Fabert C, Platet N, Vandeveld A, Poplineau M, Koubi M, Finetti P, et al. PLZF mutation alters mouse hematopoietic stem cell function and cell cycle progression. *Blood*. 2016;127(15):1881-5. doi: 10.1182/blood-2015-09-666974
31. Ikeda R., Yoshida K., Tsukahara S., Sakamoto Y., Tanaka H., Furukawa K., Inoue I. The promyelocytic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8523-30. doi: 10.1074/jbc.M409442200.

REFERENCES

1. Stewart B.F., Siscovick D., Lind B.K., Gardin J.M., Gottdiener J.S., Smith V.E., Kitzman D.W., Otto C.M. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. *J Am Coll Cardiol*; 1997;29:630–4.
2. Mathieu P., Boulanger M.-C. Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease. *Can J Cardiol*. 2014;30(9):982-93. doi: 10.1016/j.cjca.2014.03.029.
3. Fuery M.A., Liang L., Kaplan F.S., Mohler E.R. Vascular ossification: Pathology, mechanisms, and clinical implications. *Bone* 2018r;109:28-34. doi: 10.1016/j.bone.2017.07.006.
4. Soor G.S., Vukin I., Leong S.W., Oreopoulos G., Butany J. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology* [Internet]. 2008;40:385–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516323650> [cited 2018 Feb 28]
5. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory , metabolic , and genetic mechanisms of vascular calcification . *PubMed Commons. Arter Thromb Vasc Biol*. 2014;34:715–23.
6. Li C.J., Madhu V., Balian G., Dighe A.S., Cui Q. Cross-Talk Between VEGF and BMP-6 Pathways Accelerates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *J Cell Physiol*. 2015;230(11):2671-82. doi: 10.1002/jcp.24983
7. Kroeze R.J., Knippenberg M., Helder M.N. Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem

cells. *Methods Mol Biol.* 2011;702:233-48. doi: 10.1007/978-1-61737-960-4_17

8. Khanna-Jain R., Vuorinen A., Sándor G.K., Suuronen R., Miettinen S. Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;122(4):133-41. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.08.001. 1

9. Elashry M.I., Baulig N., Heimann M., Bernhardt C., Wenisch S., Arnold S. Osteogenic differentiation of equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells using CaCl₂. *Res Vet Sci.* 2018;117:45-53. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.11.0102/

10. Langenbach F., Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. *BioMed Central*; 2013;4:117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24073831> [cited 2018 Nov 21]

11. Hamidouche Z., Haÿ E., Vaudin P., Charbord P., Schüle R., Marie P.J., Fromigüé O. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J.* 2008;22(11):3813-22. doi: 10.1096/fj.08-106302/

12. Franceschi R.T., Iyer B.S. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*;[1992;7(2):235-46. doi: 10.1002/jbmr.5650070216./

13. Fatherazi S., Matsa-Dunn D., Foster B.L., Rutherford R.B., Somerman M.J., Presland R.B. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res* [Internet]. Intern. and American Associations for Dental Research; 2009; 88(1): 39–44. doi: 10.1177/0022034508328072

14. Almalki S.G., Agrawal D..K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2016;92(1-2):41-51. doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005./

15. Felthaus O., Gosau M., Morszeck C. ZBTB16 Induces Osteogenic Differentiation Marker Genes in Dental Follicle Cells Independent From RUNX2 . *J Periodontol.* 2014;85(5):e144-51. doi: 10.1902/jop.2013.130445.

16. Zhang T., Xiong H., Kan L.X., Zhang C.K., Jiao X.F., Fu G., Zhang Q.-H., L L u., Tong J.-H, B.-W.Gu, M.Yu, Liu J.-X., Licht J., Waxman S., Zelent A., Chen E., Chen S.-J.Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences Sep 1999, 96 (20) 11422-11427; DOI: 10.1073/pnas.96.20.11422*

17. Fischer S., Kohlhasse J., Böhm D., Schweiger B., Hoffmann D., Heitmann M., Horsthemke B., Wiczorek D. Biallelic loss of function of the promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) gene causes severe skeletal defects and genital hypoplasia. *J Med Gene.* 2008;45(11):731-7. doi: 10.1136/jmg.2008.059451. 3

18. Inoue I., Ikeda R., Tsukahara S. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) and tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 (TSG-6) identified by gene expression analysis play roles in the pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament. *J. Pharmacol. Sci.* 2006;100(3):205-10. doi: 10.1254/jphs.fmj05004x5.

19. Hemming S., Cakouros D., Vandyke K., Davis M.J., Zannettino A.C.W., Gronthos S. Identification of novel EZH2 targets regulating osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2016;25(12):909-21. doi: 10.1089/scd.2015.0384

20. Morszeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(2):98-102. doi: 10.1007/s00223-005-0146-0.

21. Kato M., Patel M.S., Lévassieur R., Lobov I., Chang B.H., Glass D.A. 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* 2002;157(2):303-14. doi: 10.1083/jcb.200201089.

22. Morszeck C., Schmalz G., Reichert T.E., Völlner F., Saugspier M., Viale-Bouroncle S., Driemel O. Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 2009;13(4):383-91. doi: 10.1007/s00784-009-0260-x.

23. Bilibina A.A., Anisimov S.V., Zaritsky A.Y., Dmitrieva R.I., Minullina I.R., Tarasova O.V. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Differences and similarities. [Internet]. *Cell Cycle.* 2012;11:1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189711>[cited 2020 Apr 27]

24. Semenova D.S., Kostina A.S., Mustaeva A.M., Klauzen P.E., Dobrynin M.A., Boyarskaya N.V., Dombrovskaya Yu.A., Malashicheva A.B., Erukashvily N.I. Notch-dependent activation of periodontal cells osteogenic potential. *Translational Medicine.* 2020;7(2):21-32. (In Russian) <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2020-7-2-21-32>

25. Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis.* 2007;45(7):456-9. doi: 10.1002/dvg.20313.

26. Heo J.S., Choi Y., Kim H.-S., Kim H.O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med.* 2016;37(1):115-25. doi: 10.3892/ijmm.2015.2413.

27. Wasim M., Carlet M., Mansha M., Greil R., Ploner C., Trockenbacher A., Rainer J., Kofler R. PLZF/ZBTB16, a glucocorticoid response gene in acute lymphoblastic leukemia, interferes with glucocorticoid-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;120(4-5):218-27. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.04.019.

28. Kolesnichenko M., Vogt P.K. Understanding PLZF: Two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle.* 2011; 1;10(5):771-5. doi: 10.4161/cc.10.5.14829.

29. Felicetti F., Bottero L., Felli N., Mattia G., Labbaye C., Alvino E., Peschle C., Colombo M.P., Carè A. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene.* 2004;23(26):4567-76. doi: 10.1038/sj.onc.120759 /

30. Vincent-Fabert C, Platet N, Vandeveldel A, Poplineau M, Koubi M, Finetti P, et al. PLZF mutation alters mouse hematopoietic stem cell function and cell cycle progression. *Blood.* 2016;127(15):1881-5. doi: 10.1182/blood-2015-09-666974

31. Ikeda R., Yoshida K., Tsukahara S., Sakamoto Y., Tanaka H., Furukawa K., Inoue I. The promyelocytic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8523-30. doi: 10.1074/jbc.M409442200.

Для цитирования: Семенова Д.С., Киселев А.М., Малашичева А.Б. Активация экспрессии транскрипционного фактора ZBTB16 при остеогенной дифференцировке стволовых клеток мезенхимного ряда. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(3): 44-55. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-44-55

To cite: Semenova D.S., Kiselev A.M., Malashicheva A.B. Activation of transcriptional factor ZBTB16 expression during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(3): 44-55. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-44-55