

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 57.085.23

М. А. Богданова, А. А. Костарева, А. Б. Малашичева

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА*

Сигнальный путь Notch является одним из ключевых в определении направления дифференцировки клеток, а также в межклеточной сигнализации. Этот сигнальный путь обладает высокой консервативностью. В состав сигнального пути Notch входят собственно белки-рецепторы Notch, лиганды этих белков и нижележащие транскрипционные комплексы и мишени. Известно, что активация сигнального пути Notch может происходить по-разному в зависимости от типа ткани и сигнала, а разные ткани различаются по содержанию белков семейства Notch, а также их лигандов. Роль этого сигнального пути в процессе клеточной дифференцировки клеток разных типов является предметом активно ведущихся исследований. Целью данного исследования было изучение влияния активации сигнального пути Notch на адипогенную и остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани человека. Для этого в ММСК активировали сигнальный путь Notch при помощи введения внутриклеточного домена белка Notch1 (NICD) на лентивирусном носителе и индуцировали остеогенную либо адипогенную дифференцировку. Введение NICD приводило к активации генов-мишеней сигнального пути Notch — *HEY1* и *HES1* — как в дифференцированных, так и в недифференцированных клетках. При этом воздействие активированного домена NICD приводило к блокированию индуцируемой дифференцировки обоих типов: не происходило индукции специфических маркеров дифференцировки — *PPARG* и *CFD* при адипогенной, и *SPP1*, *IBSP*, *BGLAP* — при остеогенной дифференцировке. Полученные данные свидетельствуют о том, что индукция адипогенной и остеогенной дифференцировки ММСК сопровождается умеренной активацией сигнального пути Notch, но экзогенное воздействие внутриклеточным доменом белка Notch1 приводит к значительно более высокому уровню активации сигнального пути Notch и препятствует индуцируемой адипо- и остеогенной дифференцировке. Мы полагаем, что наблюдаемый эффект свидетельствует о том, что сигнальный путь Notch участвует в поддержании баланса между стволовыми свойствами ММСК и их способностью к дифференцировке. Библиогр. 31 назв. Ил. 4. Табл. 1.

Ключевые слова: сигнальный путь Notch, остеогенная дифференцировка, адипогенная дифференцировка, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

М. А. Богданова (mar-bogdanova@mail.ru): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; НИЛ Молекулярной кардиологии Института молекулярной биологии и генетики Федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, Российская Федерация, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2; А. А. Костарева (akostareva@hotmail.com): НИЛ Молекулярной кардиологии Института молекулярной биологии и генетики Федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, Российская Федерация, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2; А. Б. Малашичева (amalashicheva@gmail.com): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; НИЛ Молекулярной кардиологии Института молекулярной биологии и генетики Федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, Российская Федерация, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2.

* Исследование было поддержано ФЦП кадры, ГК П11062 и РФФИ (грант НК-14-04-01265/14).

NOTCH PATHWAY IN DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

M. A. Bogdanova^{1,2}, A. A. Kostareva², A. B. Malashicheva^{1,2}

¹ St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; mar-bogdanova@mail.ru, amalashicheva@gmail.com

² Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2, ul. Accuratova, St. Petersburg, 197341, Russian Federation; mar-bogdanova@mail.ru, akostareva@hotmail.com, amalashicheva@gmail.com

Notch is a key pathway in cell-cell communication and determining cell fate. Tissue-specific role of this signaling pathway is poorly understood. The purpose of this study was to investigate the influence of Notch pathway activation on adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) of human adipose tissue. Using lentiviral transduction we introduced activated intracellular domain of Notch1(NICD) into MSC and induced osteogenic and adipogenic differentiation. Introduction of NICD led to the activation of Notch target genes, *HEY1* and *HES1*, both in differentiated and undifferentiated cells. Simultaneous exposure to activated NICD domain and differentiation inducers led to the block of both types of differentiation. The expression of specific markers was substantially decreased: *PPARG* and adipin in adipogenic differentiation, and *SPP1*, *IBSP*, *BGLAP* in osteogenic differentiation. Thus, according to our data, induction of adipogenic and osteogenic differentiation in MSC associated with activation of Notch signaling pathway. At the same time, high nonspecific activation of the pathway prevented the differentiation of both types. The observed effect suggests that Notch pathway is involved in maintaining the balance between stemness and differentiation capacity of MSC. Refs 31. Figs 4. Tables 1.

Keywords: Notch signaling, osteogenic differentiation, adipogenic differentiation, multipotent mesenchymal stromal cells.

Notch — семейство трансмембранных белков, характеризующееся наличием EGF-повторов и специфических характерных для этого семейства доменов. Белки семейства Notch обеспечивают межклеточную сигнализацию в эмбриогенезе и взрослом организме. Сигнальный путь, за счет которого происходит передача сигналов между клетками посредством белков семейства Notch, получил одноименное название — Notch. Этот путь является консервативным и регулирует развитие и дифференцировку многих типов тканей у животных и человека, а также влияет на главные клеточные процессы: пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [1, 2]. У млекопитающих описаны четыре рецептора Notch (Notch1–4) и 7 лигандов семейства DSL (Delta/Serrate/LAG-2), входящих в сигнальный путь Notch. Рецепторы и лиганды представляют собой в основном трансмембранные формы белков и обеспечивают взаимодействие соседних клеток друг с другом [3, 4]. Взаимодействие рецептора Notch с лигандом вызывает протеолитическое отщепление внутриклеточного домена Notch рецептора (NICD, Notch Intracellular Domain), который транспортируется в ядро и взаимодействует с транскрипционными факторами семейства CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1). Комплекс NICD-CSL активирует транскрипцию генов семейств HES и HEY (альтернативное имя HERP), которые, в свою очередь, взаимодействуют с различными нижележащими мишенями [3, 5–7]. Спектр действия сигнального пути Notch затрагивает большое количество различных генов, среди которых — гены, ответственные за разнообразные клеточные функции, в том числе дифференцировку и пролиферацию [2]. Известно, что в разных тканях активация этого сигнального пути может приводить к разным последствиям, а особенности тех или иных тканей с точки зрения функционирования в них сигнального пути Notch все еще недостаточно изучены [8].

Большинство исследований роли сигнального пути Notch в дифференцировке клеток проводили на примере остеогенной дифференцировки, так как было выявлено,

что мутации в генах рецепторов Notch — *JAG1*, *DLL3* — приводят к нарушениям развития скелета. Показано, что Notch играет важную роль в созревании и функционировании остеобластов и остеокластов [9, 10].

Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), выделенные из жировой ткани являются удобной моделью для изучения процесса дифференцировки клеток, так как они способны дифференцироваться в различные клеточные линии — преимущественно остеобласты, хондроциты и адипоциты — при воздействии соответствующих индукторов [11]. Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток регулируется локальными тканевыми сигналами, при этом сигнальный путь Notch, по-видимому, может играть одну из ключевых ролей [12]. По поводу влияния компонентов Notch на дифференцировку клеток опубликованы противоречивые данные. Так, было установлено, что при введении в ММСК человека экзогенного *JAG1*, кодирующего один из лигандов пути Notch — *Jagged1*, происходила индукция остеогенной дифференцировки ММСК [13]. Но существуют работы, описывающие ситуацию, когда индукция сигнального пути Notch, напротив, ведет к подавлению остеогенной дифференцировки ММСК. Так, введение активированного домена NICD в ММСК мыши *in vitro* приводило к подавлению остеогенной дифференцировки клеток, а *in vivo* — к снижению плотности костной массы [4]. Подобные исследования были проведены на моделях трансгенных мышей, что не всегда отражает ситуацию, происходящую в человеческих клетках [14–16].

Таким образом, несмотря на то что известны мутации генов-компонентов сигнального пути Notch, приводящие к серьезным костным заболеваниям, связанным с нарушением дифференцировки клеток (синдром Алажиля, синдром Хайду—Чейни, брахидактилия, дизостоз, остеосаркома и остеопения), роль сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке стволовых клеток остается недостаточно изученной [12]. До сих пор неизвестно, как именно он влияет на это направление дифференцировки: увеличивает ли потенциал к дифференцировке или подавляет его. Кроме того, большинство проведенных работ было связано с изучением преимущественно костных заболеваний, и как следствие, с исследованием влияния Notch на остеогенное направление дифференцировки клеток, тогда как роль Notch в других направлениях клеточной дифференцировки изучена слабо.

Целью данного исследования стало изучение роли сигнального пути Notch в адипогенной и остеогенной дифференцировке ММСК жировой ткани человека. Для этого мы вводили активированный домен белка Notch1, NICD, и таким образом имитировали активацию сигнального пути Notch, при которой внутренний домен белка Notch отщепляется в результате взаимодействия его с лигандом и активируется, приобретая трансактивирующую способность. Этот способ исследования активации сигнального пути Notch описан во многих работах и общепринят. Мы анализировали, во-первых, уровень активации сигнального пути Notch по степени увеличения экспрессии специфических мишеней в недифференцированных и дифференцированных ММСК; во-вторых, влияние активации сигнального пути Notch на эффективность дифференцировки при помощи оценки уровня экспрессии специфических адипо- и остеогенных маркеров, а также на морфологическом уровне. По нашим данным, активация сигнального пути Notch происходит при запуске обоих типов дифференцировки, но прямая активация путем введения NICD в ММСК в этот момент приводит к подавлению дифференцировки обоих типов. Мы полагаем, что такое действие NICD обусловлено

свойствами сигнального пути Notch обеспечивать гомеостаз ткани за счет поддержания стволовых свойств клеток и участия в регуировке тканеспецифичной дифференцировки.

Материалы и методы

Генетические конструкции. Лентивирусный вектор, несущий внутриклеточный домен гена *NOTCH1* (NICD), был любезно предоставлен А. Н. Томилиным (Институт цитологии РАН). Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, несущие пакующие и функциональные гены вируса иммунодефицита человека, как это было описано ранее [17].

Культуры клеток МСК ЖТ, трансдукция и дифференцировка. В исследовании использованы культуры МСК 3–6 пассажа, полученные от здоровых доноров (критерий включения в группу здоровых доноров — отсутствие значимых заболеваний, возраст до 50 лет, мужской пол) по стандартной методике [18]. При культивировании использовали пластиковые чашки Петри (Corning, США) в среде α -MEM (Панэко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Для подтверждения принадлежности полученных культур к ММСК на проточном цитометре GuavaEasyCyte6 (Millipore, США) проводили иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител против CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146 и CD166 (BD, США) по стандартной методике [18].

Трансдукцию проводили следующим образом. Через час после посева к среде культивирования ММСК добавляли концентрат лентивирусных частиц, несущих NICD. На следующий день после трансдукции в клетках индуцировали остеогенную или адипогенную дифференцировку, как это было описано ранее [19, 20]. Для остеогенной дифференцировки к стандартной среде культивирования добавляли следующие факторы: 50 мкМ аскорбиновой кислоты, 1 мкМ дексаметазона и 10 мМ бета-глицеролфосфата (Sigma, США). Адипогенную дифференцировку индуцировали добавлением к стандартной среде культивирования 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксатина, 1 мкМ дексаметазона и 1 мкМ инсулина (Sigma, США).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Для количественного анализа изменения уровня экспрессии исследуемых генов применяли коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия). Праймеры синтезировали в компании Синтол, Россия. Последовательности использованных праймеров приведены в таблице.

Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления относительной экспрессии гена использован сравнительный Ct метод (2- $\Delta\Delta$ CT метод), в модификации «относительное количество», при котором оценка экспрессии гена интереса производится относительно экспрессии внутреннего контрольного гена. В ходе анализа для каждой реакции рассчитывали следующие показатели: значение Ct (Δ CT), значение Δ Ct ($\Delta\Delta$ CT) для репликатов, показатель $2\Delta\Delta$ CT, кратность отношения уровней экспрессии в образцах (в сравнении индивидуальных экспериментальных групп со средним значением для

внутреннего контрольного образца) [21, 22]. Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали на уровень экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. Серии экспериментов повторяли трижды (биологические репликаты), для каждого эксперимента проверку уровня экспрессии соответствующего гена повторяли дважды (физические репликаты). Данные на рисунках представлены в виде среднего по всем проведенным экспериментам, указаны стандартные отклонения для каждой исследованной точки. Достоверность различий между группами оценивали при помощи критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при уровне значимости $P < 0,05$. На рисунках достоверные различия отмечены звёздочками.

Использованные в работе праймеры

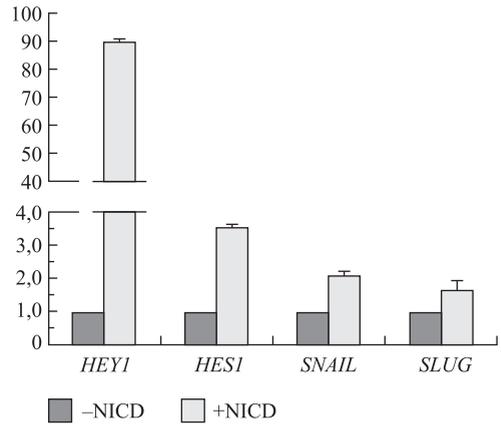
Название праймера	Последовательность (5'→3')
Hey1 F	TGGATCACCTGAAAATGCTG
Hey1 R	CGAAATCCCAAACCTCCGATA
Hes1 F	AGCACAGAAAGTCATCAAAG
Hes1 R	AGGTGCTTCACTGTCATTTTC
Snail F	CTCTTTCCTCGTCAGGAAGC
Snail R	GGCTGCTGGAAGGTAACCTC
Slug F	ATGAGGAATCTGGCTGCTGT
Slug R	CAGGAGAAAATGCCTTTGGA
IBSP F	TGCCACTCACTGCCTTGAGCC
IBSP R	GAGAAAGCACAGGCCATTCCCA
BGLAP F	TGGCCGCACTTTGCATCGCT
BGLAP R	TTGCTGGACTCTGCACCGCT
SPP1 F	GCCACATGGCTAAACCCTGACCC
SPP1 R	TGTGGTCATGGCTTTCGTTGGACT
Adipsin F	CATGCTCGGCCCTACATGG
Adipsin R	CACAGAGTCGTCATCCGTCAC
PPARG F	AGCCTTCCAACCTCCCTCATGGCA
PPARG R	TCCGGAAGAAACCCTTGCATCCT
GAPDH F	AATGAAGGGGTCATTGATGG
GAPDH R	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA

Результаты

Для подтверждения активации сигнального пути Notch в ММСК ЖТ человека мы проверили, будет ли происходить накопление транскриптов генов-мишеней Notch в ММСК в ответ на введение экзогенного домена NICD человека. Ранее было показано, что гены *HEY1*, *HES1*, *SNAIL*, *SLUG* являются основными мишенями Notch в ММСК мышцы, поэтому мы проверили накопление транскриптов этих генов в ММСК человека в ответ на введение NICD. Для этого ММСК трансдуцировали лентивирусами, несущими

Рис. 1. Активация экспрессии генов-мишени Notch при введении NICD в недифференцированных ММСК

По осям ординат — относительный уровень мРНК соответствующего маркера (данные ПЦР в реальном времени). Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. Уровень экспрессии нормировался на соответствующий уровень в недифференцированных клетках без трансдукции. + NICD — пробы с введением NICD, -NICD — пробы без введения NICD. Сделано 3 биологических повтора. То же для рис. 2, 4.



домен NICD. В качестве контроля использовали клетки без трансдукции. Полученные результаты показали, что при введении NICD в ММСК происходит активация транскрипции всех исследованных мишеней: *HEY1*, *HES1*, *SNAIL*, *SLUG* (рис. 1). Транскрипция гена *HEY1* — самой известной мишени Notch — повышалась почти в 90 раз, что соответствует высокому уровню активации сигнального пути Notch в исследуемых ММСК.

Для того чтобы выяснить, происходит ли активация сигнального пути Notch при дифференцировке ММСК и как на этот процесс влияет введение экзогенного NICD, мы проверили уровень экспрессии мишеней Notch — *HEY1* и *HES1* при дифференцировке ММСК, а также при одновременном воздействии индукторов дифференцировки и экзогенного NICD. Для этого в ММСК индуцировали дифференцировку в присутствии NICD (рис. 2). Из представленных данных видно, что индукция обоих исследованных

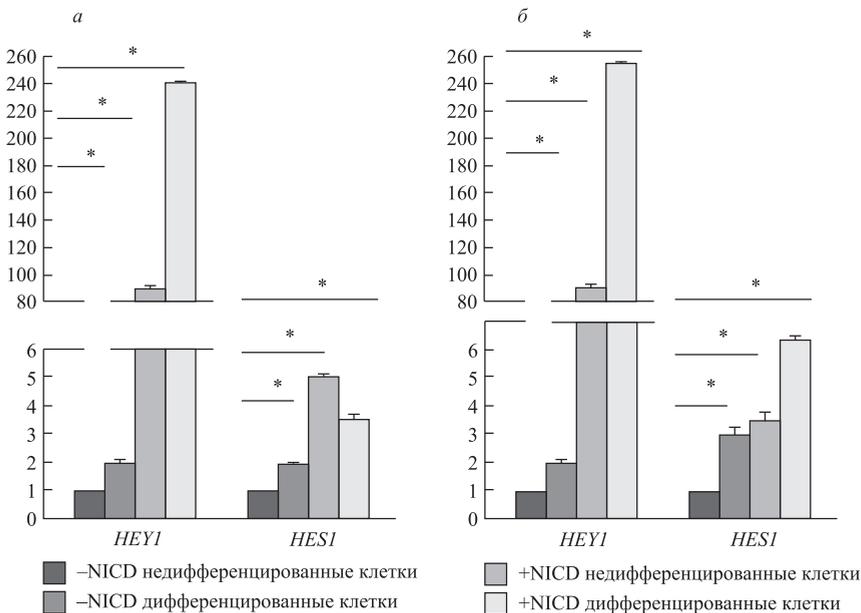


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии генов *HEY1* и *HES1* при введении NICD и запуске дифференцировки: а — остеогенная дифференцировка, б — адипогенная дифференцировка. Звездочка (*) — $P < 0,05$. То же для рис. 4.

типов дифференцировки приводит к усилению транскрипции генов *HEY1* и *HES1*, это свидетельствует об активации сигнального пути Notch в ходе дифференцировки. Дополнительное введение NICD приводит к многократному усилению транскрипции мишеней Notch, особенно — гена *HEY1*.

Для оценки роли сигнального пути Notch в дифференцировке МСК, мы проанализировали влияние NICD на дифференцировку этих клеток. При одновременном воздействии NICD и индукторов дифференцировки на 14-й день после индукции наблюдали морфологическую картину, соответствующую отсутствию запуска дифференцировки, а также гибель клеток как в случае остеогенной, так и в случае адипогенной дифференцировки (рис. 3).

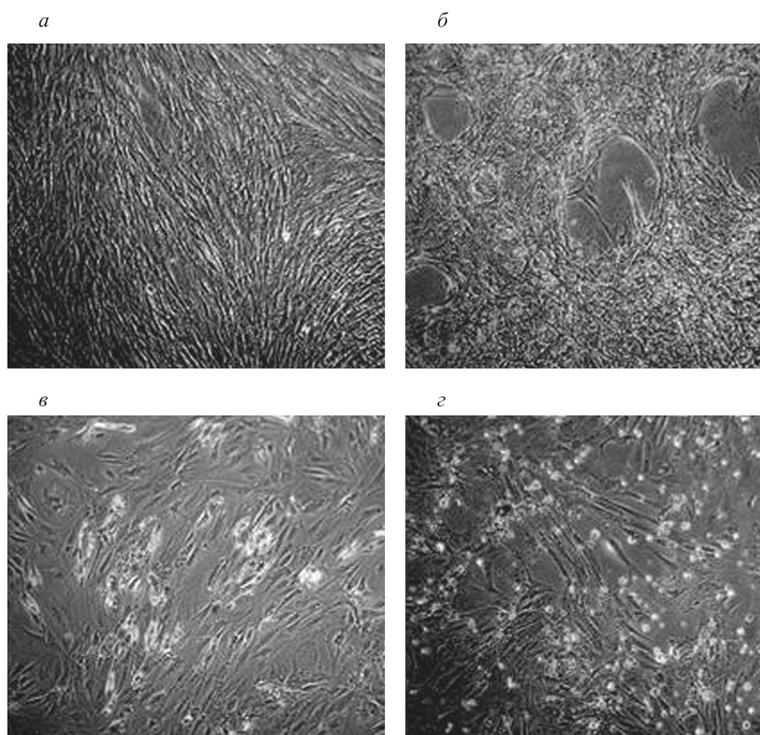


Рис. 3. Фотографии дифференцированных МСК жировой ткани (на 4-й день дифференцировки), сделанные на микроскопе Zeiss, $\times 20$, при введении NICD (а, в), без введения NICD (б, г), при остеогенной дифференцировке (а, б), при адипогенной дифференцировке (в, г)

Для того чтобы подтвердить наблюдаемое на морфологическом уровне отсутствие дифференцировки при действии NICD, мы проверили экспрессию специфических маркеров адипогенной и остеогенной дифференцировки при одновременном воздействии индукторов дифференцировки и NICD. В качестве маркеров остеогенной дифференцировки были использованы известные остеогенные маркеры — *IBSP*, *BGLAP*, *SPP1*, адипогенной — *CFD*, *PPARG*. Полученные данные, представленные на рис. 4, показали, что активация сигнального пути Notch с помощью введения экзогенного домена NICD

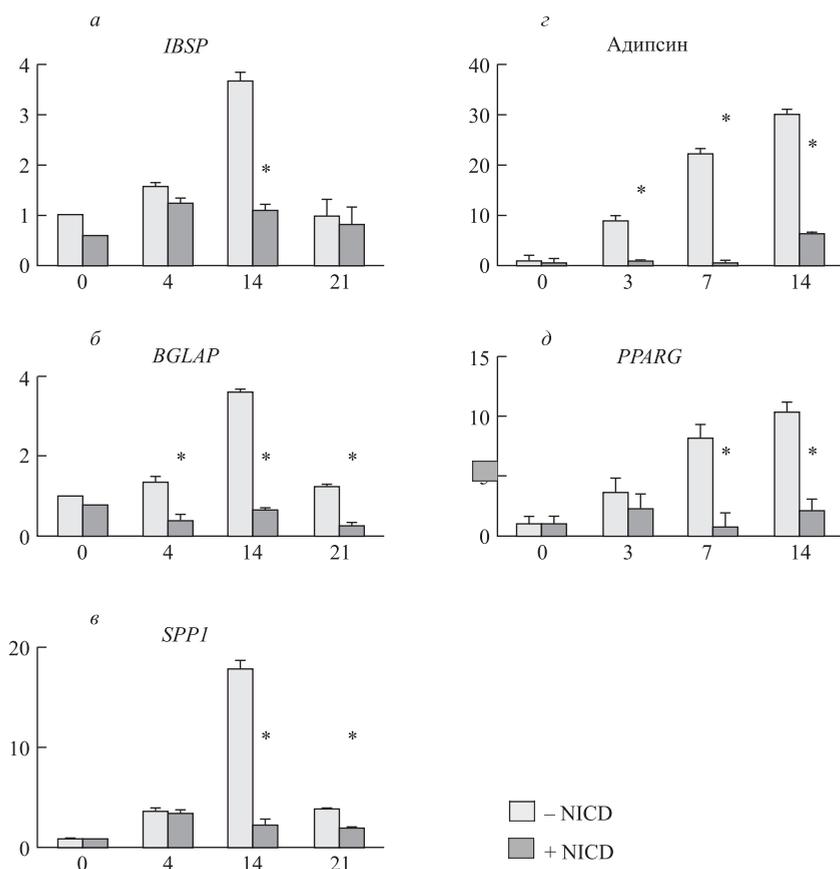


Рис. 4. Анализ влияния активации сигнального пути Notch при введении вектора NICD на экспрессию остеогенных: *IBSP* (а), *BGLAP* (б), *SPP1* (в), и адипогенных: адипсин (г), *PPARG* (д) маркеров дифференцировки с помощью ПЦР в реальном времени

По оси абсцисс цифрами обозначено время от начала дифференцировки (сутки).

приводит к значительному снижению уровней мРНК соответствующих специфичных маркеров и, следовательно, действительно подавляет адипогенную и остеогенную дифференцировки клеток.

Обсуждение

Сигнальный путь Notch является одним из ключевых в обеспечении межклеточной сигнализации и определении судьбы клетки в эмбриогенезе и во взрослом организме. Как и в случае многих других сигнальных путей, путь Notch действует в самых разных клетках и типах тканей, и результат его воздействия сильно зависит от клеточного окружения и типа ткани [23].

Роль сигнального пути Notch в остеодифференцировке изучали на разных клеточных системах, и полученные данные неоднозначны. С использованием ММСК человека было показано, что упоминавшийся лиганд *Jag1* способствует остеогенной

дифференцировке [11]. С другой стороны, было показано, что эффект Notch в клетках зависит от степени их дифференцировки в момент действия Notch. Notch подавляет созревание и функционирование зрелых остеобластов, когда компоненты пути экспрессируются на ранних стадиях остеобластной дифференцировки, что ведет к ингибированию формирования костной ткани и потере костной массы [4, 15, 24]. Также отмечено, что эффект Notch может зависеть от типа активированного рецептора. В то время как активация Notch1 подавляет процесс созревания зрелых остеокластов, активация Notch2 способствует остеокластогенезу [25, 26].

В данной работе нами был проведен анализ влияния активации сигнального пути Notch на процесс дифференцировки клеток в двух направлениях — остеогенном и адипогенном. Полученные данные свидетельствуют о том, что, во-первых, сигнальный путь Notch активируется в ММСК ЖТ в ответ на введение экзогенного домена NICD. Во-вторых, активация этого сигнального пути, по-видимому, принимает участие в самом процессе запуска дифференцировки клеток, так как уровень экспрессии его генов-мишеней повышается при индукции дифференцировки и в адипо-, и в остеогенном направлении. Наконец, активация сигнального пути Notch при введении NICD препятствует остеогенной и адипогенной дифференцировке клеток. Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект может быть связан с тем, что для запуска дифференцировки необходим некий пороговый уровень сигнализации при помощи Notch пути. Можно предположить, что превышение этого уровня приводит к инактивации сигналов дифференцировки и ее прекращению. С этим предположением согласуются данные других авторов, которые показали, что введение в ММСК лиганда рецептора Notch1 Jag1 способствует остеогенной дифференцировке МСК человека [11]. Подобные данные ранее были показаны и для дифференцировки в адипогенном направлении. Введение Jag1 в МСК жировой ткани способствовало адипогенной дифференцировке [27]. Возможно, воздействие лиганда намного слабее и приводит к меньшей активации *HEY1*, чем в том случае, когда в клетку напрямую вводится NICD. Таким образом, мы предполагаем, что имеется некое пороговое значение сигнализации пути Notch, и сдвиг этого баланса в ту или иную сторону обеспечивает либо дифференцировку, либо поддержание стволовых свойств мультипотентных клеток. При этом наши данные свидетельствуют о том, что реакция клетки, связанная с изменением каких-либо клеточных процессов в ответ на введение NICD, не зависит от типа дифференцировки клеток и, возможно, является универсальной.

В литературе не существует единого мнения о том, как же в действительности сигнальный путь Notch влияет на процесс дифференцировки клеток в разных тканях. Наши данные в случае адипогенной дифференцировки МСК жировой ткани человека согласуются с данными других авторов [28]. В случае остеогенной дифференцировки существуют данные, подтверждающие, что активация сигнального пути Notch способствует дифференцировке МСК в остеокласты, это запускает процессы в ММСК, связанные с разборкой костной ткани и снижением костной массы [29]. Однако существует и ряд противоположных данных. Так, например, было показано, что сигнальный путь Notch оказывает противоположное действие: способствует остеогенной дифференцировке и подавляет адипогенную при введении NICD и Jag1 в ММСК костной ткани человека [30]. В другой работе авторами было показано, что в случае множественной миеломы, связанной с деактивацией сигнального пути Notch, происходит ингибирование остеогенной дифференцировки ММСК [31].

Таким образом, исследования, затрагивающие данный вопрос, весьма противо-

речивы. Это неудивительно, если учесть то, что авторы таких исследований использовали разные типы и источники клеток, активировали Notch разными методами, затрагивающими разные типы лигандов и рецепторов Notch. Многие работы были сделаны только на моделях мышей. Ответ клеток на сигнализацию посредством лигандов и рецепторов Notch может быть разным и зависит от типа клеток, от типа активированного рецептора Notch, а также от пересечения сигнального пути Notch с другими важными сигнальными путями [23]. Следует учесть, что наше исследование имеет ряд ограничений, связанных, например, с тем, что все процессы изучали *in vitro* на модели культивированных клеток, и активация сигнального пути Notch происходила посредством введения лентивирусных конструкций в клетку. Дальнейшее выяснение особенностей регуляции дифференцировки ММСК при участии сигнального пути Notch является предметом наших следующих исследований.

Литература

1. Bray S. Notch signaling: a simple pathway becomes complex // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7. P. 678–689.
2. Pompa J. A., Epstein J. L. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease // *Dev. Cell.* 2012. Vol. 22. P. 244–254.
3. Ehebauer M., Hayward P., Martinez-Arias A. Notch signaling pathway // *Sci. STKE.* 2006. Vol. 364. P. 1–4.
4. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia / Zanotti S., Smerdel-Ramoya A., Stadmeier L., Durant D., Radtke F., Canalis E. // *Endocrinology.* 2008. Vol. 149. P. 3890–3899.
5. Fortini M. E. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation // *Dev. Cell.* 2009. Vol. 16. P. 633–647.
6. Iso T., Kedes L., Hamamori Y. HES and ERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway // *J. Cell Phys.* 2003. Vol. 194. P. 237–255.
7. Kopan R., Ilagan M. X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism // *Cell.* 2009. Vol. 137. P. 216–233.
8. Andersson E. R., Sandberg R., Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function // *Development.* 2011. Vol. 138. P. 3593–3612.
9. Zanotti S., Canalis E. Notch and the skeleton // *Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 30. P. 886–896.
10. Zanotti S., Canalis E. Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders // *Calcif. Tissue Int.* 2012. Vol. 90. P. 69–75.
11. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. // *Tissue Eng.* 2001. Vol. 7. P. 211–226.
12. Zanotti S., Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease // *Eur. J. Endocrinol.* 2013. Vol. 168. P. 95–103.
13. Zhu F., Sweetwyne M., Hankenson K. PKC δ is required for Jagged-1 induction of human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation // *Stem Cells.* 2013. Vol. 31. P. 1181–1192.
14. Deregowski V., Gazzerro E., Priest L. Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 6203–6210.
15. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation / Hilton M. J., Tu X., Wu X., Bai S., Zhao H., Kobayashi T., Kronenberg H. M., Teitelbaum S. L., Ross F. P., Kopan R. // *Nature Medicine.* 2008. Vol. 14. P. 306–314.
16. Salie R., Kneissel M., Vukevic M. Ubiquitous overexpression of Hey1 transcription factor leads to osteopenia and chondrocyte hypertrophy in bone // *Bone.* 2010. Vol. 46. P. 680–694.
17. The application of lentiviral vectors for tissue-specific gene manipulations / Malashicheva A. B., Kanzler B., Tolkunova E. N., Trono D., Tomilin A. N. // *Tsitologiya.* 2008. Vol. 50. P. 370–375.
18. Bone marrow and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities / Dmitrieva R. I., Minulina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Anisimov S. V., Zaritskey A. Y. // *Cell Cycle.* 2012. Vol. 11. P. 377–383.

19. Lamin A/C mutations alter differentiation potential of mesenchymal stem cells / Malashicheva A. B., Zabirnik A. S., Smolina N. A., Dmitrieva R. I., Kostareva A. A. // *Tsitologiya*. 2013. Vol. 55. P. 313–317.
20. Nuclear lamins regulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / Bogdanova M. A., Gudkova A. Y., Zabirnik A. S., Ignatieva E. V., Dmitrieva R. I., Smolina N. A., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. // *Tsitologiya*. 2014. Vol. 56. Accepted.
21. Burns M. J., Nixon G. J., Foy C. A., Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods — evaluation of outliers and comparison of calibration curves // *BMC Biotechnol.* 2005. Vol. 5. P. 31–35.
22. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. P. 1101–1108.
23. Hori K., Sen A., Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance // *J. Cell Sci.* 2013. Vol. 126. P. 2135–2140.
24. Osteosclerosis owing to Notch gain of function is solely Rbpj-dependent / Tao J., Chen S., Yang T., Dawson B., Munivez E., Bertin T., Lee B. // *J. Bone Miner. Res.* 2010. Vol. 25. P. 2175–2183.
25. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells / Bai S., Kopan R., Zou W., Hilton M. J., Ong C. T., Long F., Ross F. P., Teitelbaum S. L. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 6509–6518.
26. The association of Notch2 and NF- κ B accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis / Fukushima H., Nakao A., Okamoto F., Shin M., Kajiya H., Sakano S., Bigas A., Jimi E., Okabe K. // *Mol. Cell Biol.* 2008. Vol. 28. P. 6402–6412.
27. Jagged-1-mediated activation of notch signalling induces adipogenesis of adipose-derived stem cells / Ba K., Yang X., Wu L., Wei X., Fu N., Fu Y., Cai X., Yao Y., Ge Y., Lin Y. // *Cell Prolif.* 2012. Vol. 45. P. 538–544.
28. Osathanon T., Subbalekha K., Sastravaha P., Pavasant P. Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated from human adipose tissue // *Cell Biol. Int.* 2012. Vol. 36. P. 1161–1170.
29. Duan L., de Vos P., Fan M., Ren Y. Notch is activated in RANKL-induced osteoclast differentiation and resorption // *Front Biosci.* 2008. Vol. 13. P. 7064–7071.
30. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells / Ugarte F., Ryser M., Thieme S., Fierro F. A., Navratil K., Bornhäuser M., Brenner S. // *Exp. Hematol.* 2009. Vol. 37. P. 867–875.
31. Impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients is associated with a blockade in the deactivation of the Notch signaling pathway / Xu S., Evans H., Buckle C., De Veirman K., Hu J., Xu D., Menu E., De Becker A., Vande Broek I., Leleu X., Camp B. V., Croucher P., Vanderkerken K., Van Riet I. // *Leukemia*. 2012. Vol. 26. P. 2546–2549.

Расшифровка названий генов:

- CFD* (Complement factor D) — адипсин;
PPARG (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) — активатор пероксисомальной пролиферации гамма;
SPPI (secreted phosphoprotein 1) — остеопонтин;
IBSP (integrin binding sialoprotein) — сиалопротеин;
BGLAP (bone gamma carboxylglutamate protein) — остеокальцин;
HES1 (hairy/enhancer of split-1);
HEY1 (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1).

Статья поступила в редакцию 17 января 2014 г.

Сведения об авторах

Богданова Мария Андреевна — студент
Костарева Анна Александровна — кандидат медицинских наук
Малашичева Анна Борисовна — кандидат биологических наук, доцент

Bogdanova Maria A. — graduate student
Kostareva Anna A. — Ph.D.
Malashicheva Anna B. — Ph.D., Associate Professor