

Взаимодействие транскрипционного фактора Runx2 и сигнального пути NOTCH в условиях остеогенной дифференцировки клеток**Научный руководитель – Малашичева Анна Борисовна****Громова Екатерина Сергеевна***E-mail: kate.gromova01@mail.ru*

Runx2 – транскрипционный фактор, который является общепризнанным маркером и регулятором остеогенной дифференцировки. Он взаимодействует с такими сигнальными путями, как Wnt, Vmp, Msx2 и Notch [1]. Кроме того, сигнальный путь Notch является негативным модулятором Runx2 [2]. При этом механизмы регуляции Runx2, динамика активации в ходе остеогенной дифференцировки и взаимосвязь с другими генами, связанными с остеогенной дифференцировкой, остается неясной, а взаимодействие Runx2 и Notch интересно в изучении регенерации костной ткани из-за высоко консервативных механизмов сигнального пути Notch. Также известно, что несколько убиквитинлигаз E3 участвуют в убиквитинировании Runx2 и отрицательно влияют на остеодифференцировку остеобластов [3].

Для изучения взаимодействия Runx2 и Notch при остеогенной дифференцировке были использованы лентивирусные конструкции, несущие внутриклеточные домены Notch (*N1,2,3,4ICD*), ген *RUNX2* (*RUNX2full*), а также несущие малые РНК *shRUNX2* и *shCSL*, которые подавляют транскрипцию генов *RUNX2*. Для люциферазного анализа использовались люциферазные конструкции *RUNX2luc* и *CSLluc* для детекции активности промоторов соответствующих генов. Экспрессию генов *RUNX2*, *NOTCH1,2,3,4* активировали, либо ингибировали посредством лентивирусных конструкций. Эксперименты проводили на первичных культурах клеток человека: остеобластах, гингивальных и лёгочных фибробластах, интерстициальных клетках аортального клапана.

Изучение динамики Runx2 в процессе остеодифференцировки методом вестерн-блоттинга остеобластов на разных сроках показало снижение продукции Runx2 в дифференцировке по сравнению с контрольными клетками. А пиковый уровень белка достигался на точках 12 и 24 часа. В гингивальных фибробластах пик продукции Runx2 наблюдается через 12 часов с момента запуска остеодифференцировки. Эти данные подтверждаются анализом активности промотора *RUNX2*, где был показан спад активности промотора в условиях остеогенной дифференцировки. Для изучения феномена стабилизации уровня белка Runx2 в клетке и взаимодействия с сигнальным путём Notch в ходе остеодифференцировки, использовали ингибитор протеасом MG132, который препятствует деградации Runx2 и стабилизирует уровень белка в клетках. ПЦР в реальном времени продемонстрировала, что стабилизация Runx2 в клетках сильно повысила уровень экспрессии *HEY* (мишень Notch) в остеобластах.

Полученные данные позволяют утверждать, что для инициации клеточной дифференцировки в остеобластах требуется снижение изначально имеющегося уровня белка Runx2 для активации генов-мишеней, что сопровождается подавлением промоторной активности гена. Вероятно, спад активности на уровне транскриптов и белка можно расценивать, как сигнал предшественникам остеобластов к завершению пролиферации и формированию дифференцировочного паттерна. Также при постоянном уровне белка Runx2 происходит активация сигнального пути Notch.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 23-15-00320.

Источники и литература

- 1 . Rutkovskiy A., Stensløkken K.-O., Vaage I.J. Osteoblast Differentiation at a Glance//Medical Science Monitor Basic Research, 2016, T. 22, C. 95-106.
- 2 . Garg, Vidu, Alecia N Muth, Joshua F Ransom, Marie K Schluterman, Robert Barnes, Isabelle N King, Paul D Grossfeld, и Deepak Srivastava. 2005 «Mutations in NOTCH1 cause aortic
- 3 . Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of runx2 in osteogenesis. European Cells and Materials, 28, 269–286.