

УДК 576

# Вальпроевая кислота может увеличивать потенциал гепатоцитарной дифференцировки клеток слюнной железы

О. С. Петракова<sup>1,2,5\*</sup>, В. В. Ашапкин<sup>3</sup>, В. Ю. Штратникова<sup>4</sup>, Л. И. Кутуева<sup>3</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>1,2,5</sup>, М. А. Борисов<sup>2</sup>, В. В. Терских<sup>5</sup>, И. Г. Гвазава<sup>2,5</sup>, А. В. Васильев<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

<sup>5</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

\*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2015

**РЕФЕРАТ** Изучение фенотипической пластичности и дифференцировочных способностей клеток является важной задачей клеточной биологии. В представленной работе исследована способность клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши к дифференцировке в гепатоцитарном направлении, а также проанализировано влияние вальпроевой кислоты, ингибитора гистон-деацетилаз, на эффективность дифференцировки. Показано, что после дифференцировки в клетках слюнной железы возрастает экспрессия генов гепатоцитарных маркеров (*Aat*, *Afp*, *Gbp*, *Perck*, *Tat*, *Cyp3a13*) и факторов транскрипции (*Hnf-3α*, *Hnf-3β*, *Hnf-4α*, *Hnf-6*). Вальпроевая кислота увеличивает специфичность гепатоцитарной дифференцировки, снижая экспрессию протоковых (*Krt19*, *Hhex1*, *Cyp7a1*) и ацинарных (*Ptf1a*) маркеров. После воздействия вальпроевой кислоты усиливается также эффективность гепатоцитарной дифференцировки, о чем говорит повышение уровня *Alb* и *Tdo2* и увеличение секреции мочевины дифференцированными клетками. Изменений в характере метилирования промоторных областей генов не обнаружено, однако обработка вальпроевой кислотой и гепатоцитарная дифференцировка в значительной степени затрагивают метилирование гистона H3, ассоциированного с генами, ключевыми для гепатоцитарной дифференцировки. Таким образом, клетки поднижнечелюстной слюнной железы мыши способны к дифференцировке в гепатоцитарном направлении, а вальпроевая кислота увеличивает специфичность и эффективность их дифференцировки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вальпроевая кислота, гепатоцитарная дифференцировка, клетки поднижнечелюстной слюнной железы, экспрессия генов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** VPA – вальпроевая кислота; КСЖ – клетки слюнной железы; КСЖ-диф – дифференцированные клетки слюнной железы; КСЖ-диф-VPA – дифференцированные клетки слюнной железы, прошедшие обработку вальпроевой кислотой; ПКП – прогениторные клетки печени; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение дифференцировочных способностей клеток представляет собой одну из наиболее важных проблем современной клеточной биологии. Получение необходимого количества клеток *in vitro*

и их последующая дифференцировка могут дать материал для регенеративной медицины, а также помочь в изучении регуляции развития или тестировании лекарственных средств. Считается, что с помощью малых молекул, способных менять

эпигенетический статус клеток, можно увеличить эффективность клеточной дифференцировки *in vitro* [1]. Малые молекулы облегчают репрограммирование клеток и увеличивают эффективность дифференцировки клеток различного типа [2–5].

Вальпроевая кислота (2-пропил-пентановая кислота, VPA) используется в клинической практике в качестве эффективного противоэпилептического средства с широким спектром действия [6]. VPA ингибирует гистон-деацетилазы и вызывает неспецифичное повышение экспрессии генов [7]. Идея применения ингибиторов гистон-деацетилаз для увеличения дифференцировочных способностей клеток основана на том, что ацетилирование гистонов приводит к повышению уровня экспрессии различных генов и увеличению транскрипционного пула клетки в целом, облегчая, таким образом, клеточную дифференцировку [8].

Одну из наиболее важных проблем представляет разработка методик клеточной терапии печени. VPA обладает способностью повышать эффективность гепатоцитарной дифференцировки как плюрипотентных, так и детерминированных клеток [9, 10]. В стандартном протоколе гепатоцитарной дифференцировки VPA увеличивает способность эмбриональных стволовых (ES) клеток мыши к дифференцировке в гепатоцитоподобные клетки и уменьшает степень их дифференцировки в протоковом направлении [9]. Клетки костного мозга человека эффективнее дифференцируются в гепатоцитарном направлении после обработки 5 мМ VPA. Эти клетки экспрессируют альбумин и секретируют мочевины более эффективно, чем клетки, не обработанные VPA [10]. Мезенхимные стволовые клетки пуповинной крови человека лучше подвергаются гепатоцитарной дифференцировке после воздействия 10 мМ VPA, причем прослеживается зависимость эффективности воздействия от концентрации VPA [11].

Разработка методов клеточной терапии печени осложнена недостатком клеток, способных с достаточной эффективностью восполнять функции гепатоцитов. Таким образом, поиск клеток, способных к гепатоцитарной дифференцировке, представляет важную задачу. Клетки поднижнечелюстной слюнной железы обладают высокими дифференцировочными способностями в энтодермальном направлении и могут стать перспективным источником клеток для терапии органов энтодермального происхождения [12–14]. Клетки слюнной железы (КСЖ), полученные от человека и различных животных (мышь, крыса, свинья), представляют собой активно пролиферирующую культуру *in vitro* и обладают способностью к дифференцировке в гепатоцитарном и панкреатическом направлениях [13, 15–17]. Нами

показано, что культивируемые КСЖ мыши проявляют фенотипическую конвергенцию с прогениторными клетками, полученными из печени [18]. Сравнительный *in vitro* анализ КСЖ и прогениторных клеток печени (ПКП) мыши выявил сходство в экспрессии генов клеточных маркеров: *ErCAM*, *CD29*, *c-Kit*, *Sca-1*, *c-Met*, цитокератинов 8, 18, 19, *Afr* и ряда регуляторных генов [18]. При определенных условиях культивирования КСЖ приобретают способность к синтезу инсулина или альбумина [14–16], однако гепатоцитарная и панкреатическая дифференцировка этих клеток неполная [16]. Обработка КСЖ мыши 5 мМ вальпроевой кислотой в течение 5 дней вызывает увеличение уровня экспрессии мРНК маркеров как гепатоцитарной (*G6p*, *Alb*, *Tdo*), так и панкреатической (*Ngn3*, *Pax4*, *Ins1*) дифференцировки [19]. Однако эффект от воздействия ингибиторов гистон-деацетилаз обратим и неспецифичен, поэтому целесообразно применять VPA совместно со специфическими дифференцировочными цитокинами. В представленной работе изучено влияние VPA на эффективность гепатоцитарной дифференцировки КСЖ мыши с использованием стандартного протокола [20, 21], включающего основные стадии, происходящие при созревании клеток печени. Перед гепатоцитарной дифференцировкой КСЖ обрабатывали 5 мМ вальпроевой кислотой в течение 5 дней, затем сравнивали эффективность дифференцировки клеток, подвергнутых и не подвергнутых воздействию VPA. В качестве контроля использовали культуру ПКП и КСЖ мыши на первом пассаже. Примененный подход поможет оценить влияние вальпроевой кислоты на эффективность гепатоцитарной дифференцировки КСЖ, а также изучить фенотипическую пластичность этих клеток.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 8–15-недельного возраста, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино». Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были проведены согласно правилам, установленным этическим комитетом Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.

### Выделение и культивирование клеток

Мышей анестезировали внутривенной инъекцией хлоралгидрата (Sigma) в дозе 300 мг/кг массы тела. Обе поднижнечелюстные слюнные

железы и печень были извлечены в стерильных условиях и помещены в фосфатно-солевой буфер (PBS) с 40 мкг/мл гентамицина. После измельчения органы инкубировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) (Gibco) с 0.1% коллагеназой типа IV (Sigma) в течение 30–40 мин при 37°C. Затем клетки пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм (Corning). Клеточные суспензии дважды промывали средой DMEM/F12, для осаждения клеток использовали мягкое центрифугирование (2 мин, 100 g). Клетки рассаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные флаконы (Corning) с плотностью  $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в стандартной среде DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone), 2 mM глутамина (Gibco), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ITS) (Invitrogen) и 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (Gibco). Среду меняли каждые 3 дня. После формирования монослоя (5–7 день культивирования) клетки промывали Версеном («ПанЭко»), снимали 0.25% раствором трипсина/EDTA (Gibco) и рассаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные флаконы с плотностью  $1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>.

#### Гепатоцитарная дифференцировка клеток слюнной железы

После достижения монослоя КСЖ на первом пассаже (15–20 день после выделения клеток) подвергали гепатоцитарной дифференцировке. Клетки разделяли на две группы: первую группу инкубировали с 5 mM VPA в течение 5 дней в стандартной ростовой среде (среду с VPA меняли каждый день). Вторую группу инкубировали в течение 5 дней со стандартной ростовой средой без добавления VPA (среду также меняли каждый день). Затем в обеих группах среду заменяли на дифференцировочную, содержащую DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% FBS (HyClone), 2 mM глутамина (Gibco), 1% ITS (Invitrogen), 0.03 mM никотинамида (Sigma), 20 нг/мл EGF (Gibco) и 20 нг/мл гепатоцитарного фактора роста (HGF) (Invitrogen). Этот день считали первым днем дифференцировки. Дифференцировку проводили в обеих группах по одинаковому протоколу: с 1 по 5 день клетки инкубировали в дифференцировочной среде с добавлением 20 нг/мл BMP2 (Invitrogen), с 5 по 10 день – с добавлением 10 нг/мл онкостатина М (Invitrogen) и 0.1 мкМ дексаметазона (Sigma), с 10 по 15 день – с 1% N2 и 1% B27 (Invitrogen). Среду меняли каждые 3 дня. На 15-й день дифференцировки клетки анализировали в 2D- и 3D-условиях культивирования. Недифференцированные КСЖ и ПКП на первом пассаже использовали в качестве контроля.

#### Иммуноцитохимия

Перед проведением иммуноцитохимического окрашивания клетки рассаживали на культуральные чашки, покрытые коллагеном типа I, за 3 дня до фиксации. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma) в течение 10 мин, промывали PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин (Sigma) и 0.1% Тритон X-100 (Sigma). Клетки инкубировали с первичными антителами в течение 1 ч при 37°C. Антитела разводили в PBS в следующем соотношении: анти-альфа-фетопrotein (Afp), 1 : 200 (R&D; MAB1368); антиальбумин (Alb), 1 : 200 (R&D; MAB1455); антицитокератин 19 (Krt19), 1 : 100 (AbCam; ab15463-1). Затем клетки трижды промывали PBS и инкубировали с вторичными антителами (1 : 1000) в течение 40 мин при 37°C. Использовали вторичные антитела: Alexa Fluor® 488 антикроличьи IgG ослa (H + L) (Invitrogen; A-21206) и Alexa Fluor® 488 антимышьиные IgG козы (H + L) (Invitrogen; A-11029). Клетки промывали 3 раза по 10 мин PBS, во время последней отмывки добавляли DAPI (Sigma). Клетки анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IX51. В качестве негативного контроля использовали окраску только вторичными антителами.

#### Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК выделяли с использованием AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) по инструкции производителя. Концентрацию РНК измеряли с использованием мини-флуориметра Qubit и RNA Assay Kit (Invitrogen). Для обратной транскрипции использовали Superscript II kit (Invitrogen) со случайными праймерами по инструкции производителя. В реакцию брали 500 нг тотальной РНК.

#### Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили с использованием набора с красителем EVA Green («Синтол») на приборе CFX96 (BioRad) в следующем режиме. Предварительная инкубация – 95°C, 5 мин для активации ДНК-полимеразы; 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 57–59°C, 30 с; элонгация – 72°C, 45 с. Детекцию флуоресценции в канале Fam и первичную обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения прибора в автоматическом режиме. В качестве внутреннего стандарта для вычисления концентрации всех мРНК использовали мРНК гена домашнего хозяйства *Gapdh*. Список праймеров представлен в табл. 1 приложения.

### Исследование метилирования ДНК методом бисульфитного секвенирования

ДНК выделяли из замороженных клеток с помощью набора GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich G1N70) по инструкции производителя. ДНК после определения концентрации с помощью мини-флуориметра Qubit (Invitrogen) обрабатывали бисульфитом натрия с использованием набора EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen). Праймеры для амплификации участков генов на модифицированной бисульфитом геномной ДНК конструировали с помощью онлайн-сервиса BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/?m=search>). Выбирали участки, соответствующие CpG-островкам (CGI) вблизи точки инициации транскрипции или, при отсутствии островков, области, непосредственно предшествующей точке инициации транскрипции. Список праймеров представлен в табл. 2 приложения. Амплификацию осуществляли в два этапа с заменой одного из праймеров на внутренний на втором этапе. В качестве матрицы на втором этапе использовали 2 мкл ПЦР-смеси, полученной на первом этапе. ПЦР проводили на приборе ДТ-322 («ДНК-Технология») с использованием набора для амплификации qPCRmix-HS SYBR+ROX («Евроген»). Условия амплификации: денатурация матрицы и активация полимеразы: 95°C, 5 мин; затем 40 циклов: 95°C, 30 с; 52–56°C (в зависимости от температуры плавления праймеров), 30 с; 72°C, 45 с; последняя элонгация: 72°C, 2 мин. Продукты амплификации фракционировали электрофорезом в 2% агарозном геле, продукты ожидаемой длины вырезали под ультрафиолетом, ДНК экстрагировали и очищали с помощью набора GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich NA1111-1KT). Полученные фрагменты секвенировали в ЦКП «Геном» (<http://www.genome-centre.ru/>) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Визуализацию результатов секвенирования и их экспорт в формате fasta осуществляли с помощью программы Sequence Scanner (<http://www.lifetechnologies.com/global/en/home/technical-resources/software-downloads/sequence-scanner-software.html>), а дальнейшую обработку с помощью онлайн-сервиса Meth Tools 2.0 ([http://194.167.139.26/methtools/MethTools2\\_submit.html](http://194.167.139.26/methtools/MethTools2_submit.html)) [22].

### Анализ метилирования гистонов

Фракционирование хроматина (ChIP) осуществляли с помощью антител к метилированным формам гистона H3 (Abcam: H3K4me3, № ab1012, H3K9me3, № ab8898, H3K27me3, № ab6002) и набора Imprint

Chromatin Immunoprecipitation Kit (Sigma-Aldrich CHP1) по инструкции производителя. Фракции ДНК, ассоциированные с модифицированными гистонами, амплифицировали с помощью набора полногеномной амплификации REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen 150033) по инструкции производителя. Относительное содержание изучаемых генов в ассоциированных с модифицированными гистонами фракциях ДНК определяли с помощью ПЦР-РВ. Для сравнения использовали суммарную геномную ДНК из тех же самых клеток. ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+ROX («Евроген»), в реакцию брали 50 нг ДНК-матрицы. Праймеры для ПЦР-РВ представлены в табл. 3 приложения. По соотношению пороговых циклов в реакциях с H3Kme-ассоциированными образцами ДНК, с одной стороны, и контрольной геномной ДНК, с другой, определяли относительную степень обогащения каждой фракции участками изучаемых генов.

### Анализ секреции мочевины

Способность клеток секретировать мочевины анализировали в 3D-условиях культивирования в коллагеновом геле. Коллаген типа I растворяли в стерильной 0.1% уксусной кислоте до концентрации 5 мг/мл. В отдельную пробирку последовательно добавляли следующие компоненты: NaOH (Sigma) до концентрации 0.023 мМ, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> («ПанЭко») до 0.26%, ×10 DMEM (Sigma) до ×1, 100% GlutaMax (Gibco) до 2 мМ, 100% HEPES (Gibco) до 1%, FBS (HyClone) до 10%. Затем добавляли раствор коллагена до конечной концентрации 4%. Суспензию клеток вносили в PBS, концентрация клеток – 1 × 10<sup>6</sup> на 1 мл геля. Гель инкубировали в чашках Петри при 37°C в течение 30 мин, после полимеризации геля в чашки добавляли по 2 мл среды культивирования. Клетки в геле культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в стандартных условиях.

Концентрацию мочевины определяли в среде культивирования с помощью набора Urea Assay Kit (BioVision) по инструкции производителя. Пробы среды в 3D-условиях культивирования отбирали на 1, 5, 10 и 15 день инкубации клеток в геле. За 24 ч до взятия пробы среду культивирования заменяли средой DMEM/F12 без сыворотки. Количество мочевины определяли по интенсивности хромогенной реакции на планшетном ридере Start Fax 2100 (Awareness Technology Inc.).

### Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили на культурах, полученных от трех разных животных. Каждая процедура была проведена в трех технических повторах, осуществляемых в одинаковых условиях. При оценке



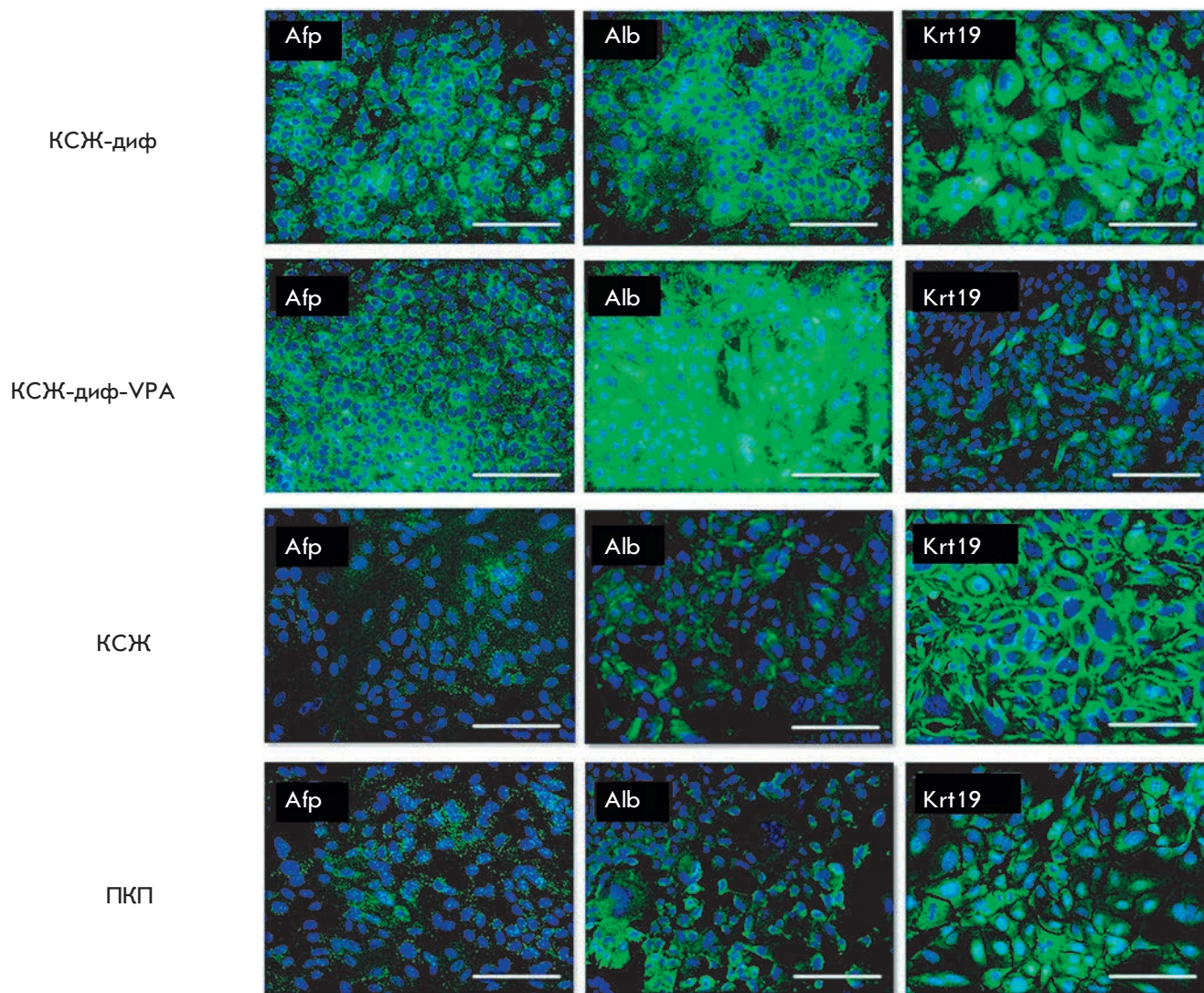


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ гепатоцитарной дифференцировки, флуоресцентная микроскопия. Ядра окрашены DAPI (синий), антигены окрашены антителами Alexa Fluor 488 (зеленый), размер шкалы 100 мкм

статистической значимости различий показателей использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Иммуноцитохимическое окрашивание и ПЦР-РВ выявляют увеличение экспрессии гепатоцитарных маркеров и уменьшение экспрессии протоковых маркеров в клетках слюнной железы, обработанных вальпроевой кислотой

На 15-й день гепатоцитарной дифференцировки клетки окрашивали антителами к альбумину (Alb, маркер гепатоцитов), альфа-фетопротейну (Afp, маркер прогениторных клеток печени) и цитокера-

тину 19 (Krt19, маркер прогениторных и протоковых клеток). Дифференцированные КСЖ, подвергнутые обработке ВРА, были названы КСЖ-диф-ВРА, дифференцированные КСЖ, не обработанные ВРА, названы КСЖ-диф.

КСЖ и ПКП на первом пассаже экспрессируют Krt19, слабо экспрессируют Afp и Alb (рис. 1). В ПКП Krt19 локализуется около ядра, а в КСЖ также под клеточной мембраной. После дифференцировки экспрессия Afp и Alb в КСЖ увеличивается, причем после воздействия ВРА уровень экспрессии Alb значительно возрастает (рис. 1), и происходит потеря локализации Krt19 под мембраной клетки. Кроме того, в КСЖ-диф-ВРА значительно снижается уровень экспрессии Krt19.

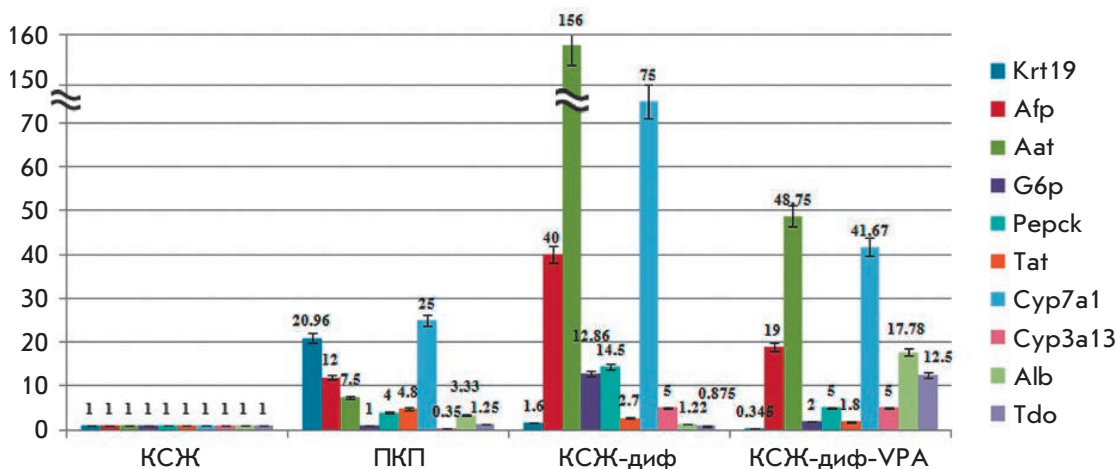


Рис. 2. Анализ методом ПЦР-РВ уровня экспрессии генов маркеров гепатоцитарной дифференцировки

Методом ПЦР-РВ в целом подтверждены результаты, полученные при иммуноцитохимическом исследовании. Для удобства интерпретации результатов после нормирования по *Gapdh* уровни экспрессии генов в КСЖ на первом пассаже принимали равными 1. В остальных культурах уровни экспрессии генов выражали относительно КСЖ на первом пассаже (рис. 2, 3).

В КСЖ-диф значительно увеличивается экспрессия мРНК ранних маркеров дифференцировки *Aat* и *Afp* (рис. 2). Возрастает также экспрессия маркеров гепатоцитов *G6p*, *Pcpk*, *Tat* и *Cyp3a13*, но не поздних дифференцировочных маркеров *Alb* и *Tdo*. В КСЖ-диф-VPA уровни экспрессии ранних маркеров *Aat* и *Afp* увеличиваются в меньшей степени, чем в КСЖ-диф, однако экспрессия поздних дифференцировочных маркеров *Alb* и *Tdo* значительно возрастает по сравнению с КСЖ-диф (рис. 2). Экспрессия гена протокового маркера *Krt19* в КСЖ-диф-VPA снижается, а характерного для протоковых клеток цитохрома P450 7a1 возрастает после дифференцировки, однако в КСЖ-диф-VPA в меньшей степени (рис. 2).

Экспрессию генов транскрипционных факторов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки, также анализировали методом ПЦР-РВ. На первом пассаже в культуре ПКП выявлен высокий уровень экспрессии гепатоцитарных ядерных факторов *Hnf-3β*, *Hnf-4α* и *Hnf-6*. Однако экспрессия раннего маркера энтодермы *Hnf-3α* была выше в КСЖ (рис. 3). В КСЖ-диф уровни экспрессии *Hnf-3β*, *Hnf-4α* и *Hnf-6* увеличивались до значений, наблюдаемых в культуре ПКП. Наряду с этим, в КСЖ-диф возрастает экспрессия раннего маркера дифференцировки (*Tbx3*), а также транскрипционных факторов, необходимых для протоковой (*Hhex1*) и ацинарной (*Ptf1a*)

дифференцировки (рис. 3). VPA неоднозначно влияет на экспрессию транскрипционных факторов. С одной стороны, экспрессия *Hhex1* снижается, а *Tbx3* и *Ptf1a* увеличивается незначительно, что может говорить о повышении специфичности дифференцировки. С другой стороны, экспрессия *Hnf-4α* не увеличивается.

В целом, в дифференцированных КСЖ мыши значительно возрастает экспрессия факторов транскрипции, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки, и ранних гепатоцитарных маркеров (*Afp* и *Aat*). Увеличение экспрессии более поздних дифференцировочных маркеров (*G6p*, *Pcpk*, *Tat*, *Alb* и *Tdo*) выражено слабее. Таким образом, в 2D-условиях культивирования инициируется гепатоцитарная дифференцировка и осуществляются ее начальные этапы. Эффект от воздействия VPA на дифференцировку КСЖ не однозначен. С одной стороны, экспрессия маркеров протокового направления (*Krt19* и цитохрома P450 7a1) снижается, а маркеров гепатоцитов – *Alb* и *Tdo* – повышается, что может говорить об ускорении процесса дифференцировки. С другой стороны, уровень экспрессии более ранних гепатоцитарных маркеров в КСЖ-диф-VPA, как правило, ниже, чем в КСЖ-диф. Не исключено, что КСЖ-диф-VPA находятся в более поздней стадии гепатоцитарной дифференцировки, для которой характерен низкий уровень экспрессии ранних дифференцировочных маркеров. Кроме того, известно, что гены *Afp* и *Aat* в норме экспрессируются в клетках слюнных желез. Увеличение экспрессии *Aat* в протоковых отделах слюнных желез наблюдается в процессе их дифференцировки и развития [23, 24]. Изначально культура КСЖ представлена малодифференцированными клетками. В ходе гепатоцитарной дифференцировки могут возникать более поздние диффе-



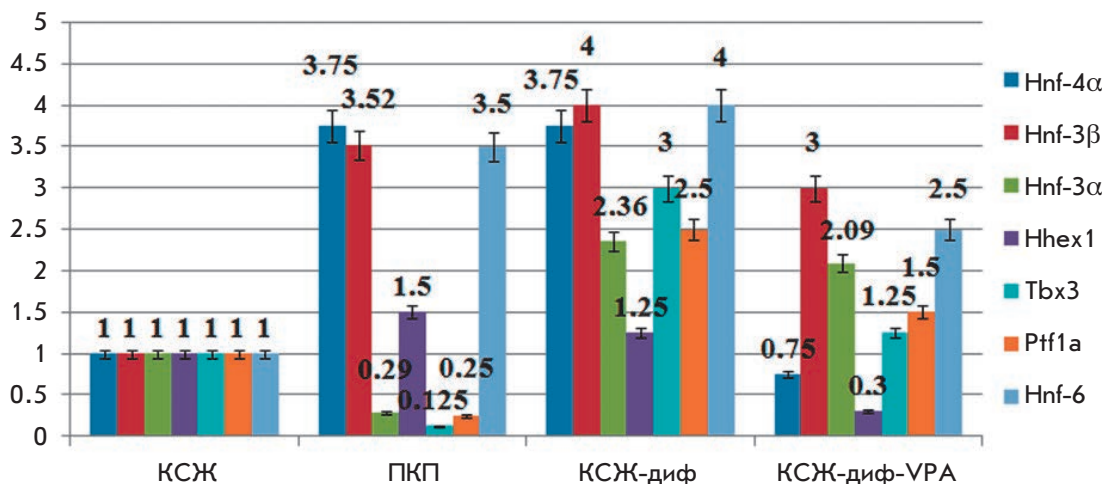


Рис. 3. ПЦР-РВ-анализ экспрессии генов транскрипционных факторов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки

ренцировочные стадии, характерные для слюнной железы, т.е. наблюдаемое нами различие в экспрессии *Afp* и *Aat* в культурах КСЖ-диф и КСЖ-диф-VPА может также отображать различную степень их собственной дифференцировки. В этом случае уменьшение экспрессии этих генов в КСЖ-диф-VPА может говорить о повышении специфичности гепатоцитарной дифференцировки и об уменьшении коммитирования, свойственного слюнным железам.

**Анализ метилирования ДНК не выявил значительных изменений метилирования промоторных областей генов, ключевых для гепатоцитарной дифференцировки, в дифференцированных клетках слюнной железы**

Проанализирован характер метилирования генов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки, в культурах КСЖ, ПКП и КСЖ-диф-VPА на первом пассаже. Анализировали участки, соответствующие CpG-островкам, вблизи точки инициации транскрипции или, в случае отсутствия островков, области, непосредственно предшествующей точке инициации транскрипции. В большинстве случаев метилирование именно этих областей наиболее существенно для экспрессии генов. В графическом виде, сгенерированном онлайн-сервисом Meth Tools 2.0, характер метилирования генов представлен на рис. 4.

Показано, что метилирование ДНК сходно во всех трех проанализированных культурах. Часть CpG-островка гена *Gata4*, находящаяся в промоторной области, практически не метилирована, а метилированные остатки цитозина расположены ниже точки инициации транскрипции. Ген *Gata6* практически не метилирован. Возможно, во всех трех культурах эти гены активны или находятся в преактивиро-

ванном состоянии. Промоторная область гена *Hnf-1α* сильно метилирована во всех культурах, однако она не является CpG-островком, а представляет собой спорадические CpG-сайты, поэтому не ясно, как данное метилирование влияет на экспрессию. Ген *Hnf-3β* метилирован сильно и одинаково во всех трех культурах, что может говорить о его устойчивой репрессии, хотя CpG-островок находится не в промоторной, а в начале кодирующей области. Известны случаи, когда подобное метилирование не препятствует транскрипции. Ген *Alb* метилирован довольно сильно и практически одинаково во всех культурах. Это может означать, что он устойчиво репрессирован в клетках всех трех типов, или метилирование данного участка не существенно для транскрипции.

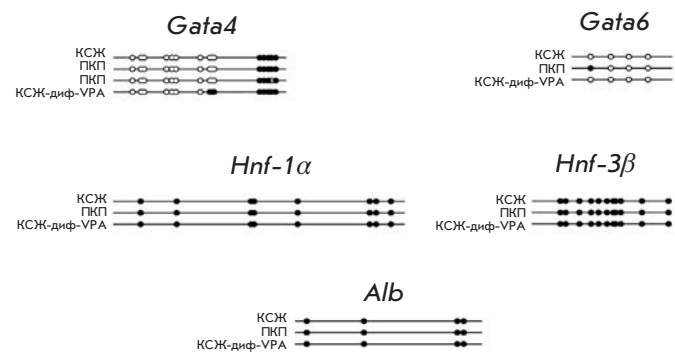


Рис. 4. Анализ метилирования ДНК в промоторной области генов, необходимых для гепатоцитарной дифференцировки. Пустой кружок – неметилированные динуклеотиды CpG, сплошной кружок – метилированные

Таким образом, не выявлено значительных различий в метилировании ДНК промоторных областей большинства исследованных генов в трех клеточных культурах. По всей видимости, специфический контроль транскрипции этих генов осуществляется в проанализированных клетках за счет других эпигенетических модификаций (возможно, модификаций гистонов).

**Обработка вальпроевой кислотой и последующая дифференцировка клеток слюнной железы изменяет метилирование гистона H3 на участках хроматина, ассоциированных с генами, ключевыми для гепатоцитарной дифференцировки**

Метилирование гистонов играет одну из наиболее важных ролей в эпигенетической регуляции транскрипции. Мы проанализировали три наиболее изученных типа метилирования гистона H3: H3K4me3, наиболее четко коррелирующего с транскрипционной активностью промоторов; H3K9me3, коррелирующего с инактивацией генов по механизму гетерохроматинизации; H3K27me3, вовлеченного в реализацию инактивирующего действия Polycomb-репрессорных комплексов второго типа (PRC2) на активность генов.

Показано, что характер метилирования гистона H3 на ранних энтодермальных генах *Gata4* и *Gata6* в КСЖ в целом сходен (рис. 5). В КСЖ на первом пассаже молекулы гистона H3, ассоциированные с этими генами, триметилированы по положению H3K9, что говорит об их гетерохроматиновой инактивации. В то же время в КСЖ на обоих генах выявлено триметилирование гистона H3 в положении H3K4. Низкий уровень экспрессии *Gata4* и *Gata6* в КСЖ, обнаруженный ранее методом глубокого секвенирования транскриптома [18], свидетельствует о том, что инактивирующая модификация H3K9me3 гистона H3 в этих клетках является доминантной. В ПКП уровень модификации H3K9me3 гистона H3 на генах *Gata4* и *Gata6* гораздо ниже, а модификация H3K27me3 практически отсутствует. Это коррелирует с относительно высокой экспрессией этих генов в прогениторных клетках печени, что показано ранее методом глубокого секвенирования транскриптома. В КСЖ-диф-VPА значительно снижается метилирование гистона H3 в положении H3K9me3 на генах *Gata4* и *Gata6*, при том что несколько увеличивается метилирование в положении H3K27me3. Это может свидетельствовать об активации транскрипции данных генов после дифференцировки и возможной их вторичной инактивации.

В КСЖ на первом пассаже выявлена сильная инактивация гена транскрипционного фактора *Hnf-*

*1a* по механизму гетерохроматинизации, а также повышение уровня H3K27me3-модификации гистона H3 на этом гене по сравнению с ПКП. После дифференцировки модификации H3K9me3 и H3K27me3 практически полностью исчезают. Метилирование H3K4me3 гистона H3 на гене *Hnf-1a* в КСЖ-диф-VPА соответствует уровню, характерному для ПКП на первом пассаже. Это может свидетельствовать об активации транскрипции данного гена после проведения гепатоцитарной дифференцировки.

Гены ядерных факторов гепатоцитов *Hnf-3β* и *Hnf-4a* характеризуются сходными особенностями метилирования гистонов. В КСЖ на первом пассаже молекулы гистона H3, ассоциированные с данными генами, метилированы по положениям H3K9me3 и H3K27me3, однако уровень H3K9me3-метилирования гена *Hnf-3β* несколько ниже, чем в ПКП. Эти данные коррелируют с результатами, полученными методами ПЦР-РВ и глубокого секвенирования транскриптома, согласно которым в КСЖ на первом пассаже экспрессируется *Hnf-3β*. В случае гена *Hnf-4a* уровень метилирования H3K9me3 соответствует уровню в ПКП. Однако уровень метилирования H3K27me3 в КСЖ на первом пассаже значительно выше, чем в ПКП. После дифференцировки метилирование H3K9me3 на генах *Hnf-3β* и *Hnf-4a* практически исчезает, а метилирование H3K27me3 сохраняется на низком уровне. Это может свидетельствовать об активации данных генов, что коррелирует с результатами ПЦР-РВ, согласно которым уровень экспрессии *Hnf-3β* в КСЖ-диф-VPА возрастает в 3 раза по сравнению с начальным значением.

Для *Hnf-6* в КСЖ характерен высокий уровень метилирования H3K9me3. После дифференцировки метилирование существенно уменьшается, однако уровень H3K27me3 немного возрастает. Это может свидетельствовать о вторичной инактивации гена *Hnf-6*.

Для гена *Alb* в КСЖ на первом пассаже характерно H3K9me3- и H3K27me3-метилирование гистона H3. После дифференцировки метилирование H3K9me3 практически исчезает, а уровень метилирования H3K27me3 немного снижается по сравнению с начальным значением. Уровень метилирования H3K4me3 в КСЖ-диф-VPА соответствует уровню в ПКП на первом пассаже. Это может свидетельствовать о некоторой активации транскрипции данного гена. По результатам ПЦР-РВ начальный уровень экспрессии *Alb* в КСЖ на первом пассаже незначителен. После дифференцировки уровень экспрессии *Alb* увеличивается почти в 18 раз, однако абсолютное значение экспрессии данного гена в КСЖ-диф-VPА остается довольно низким.



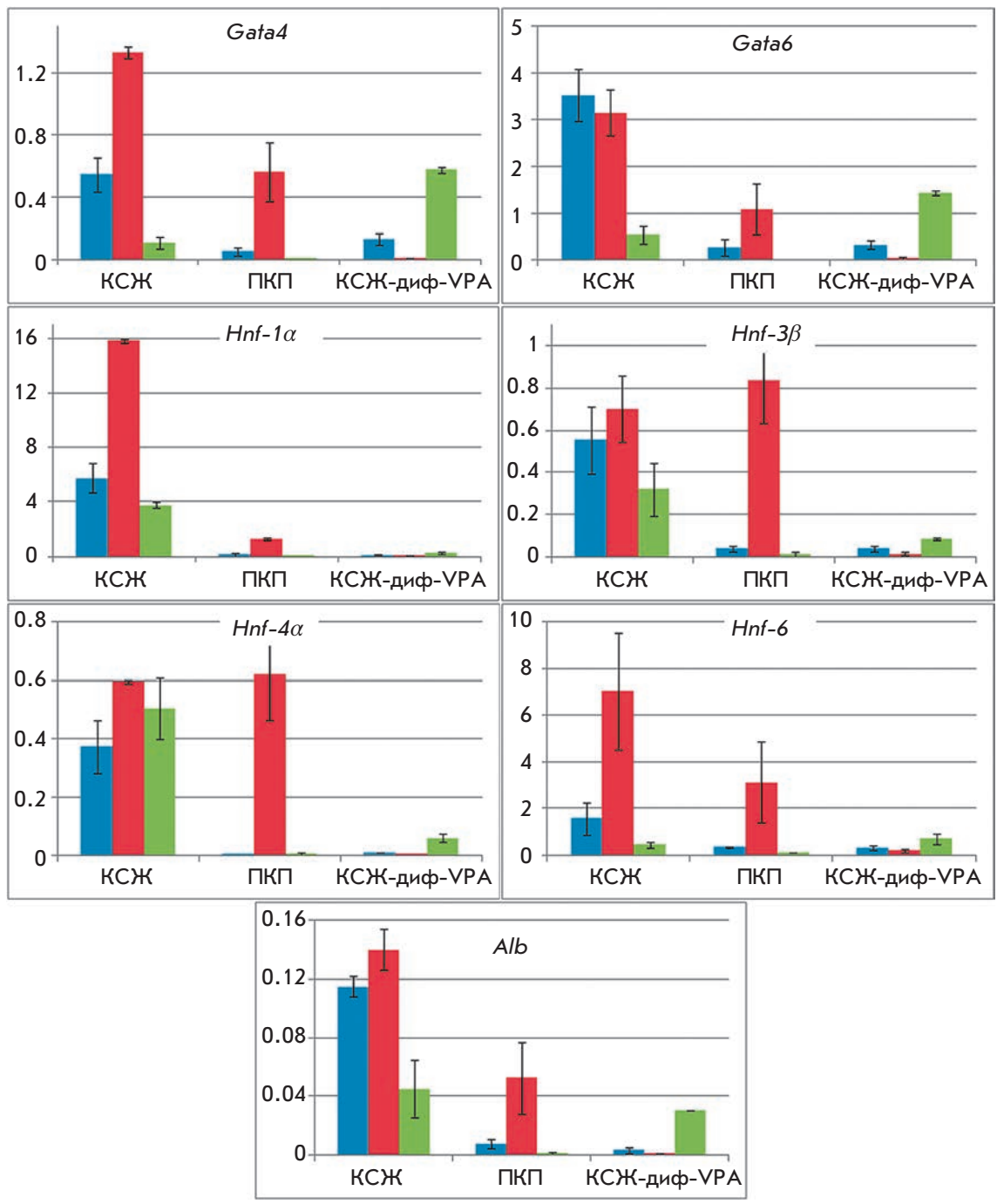


Рис. 5. Анализ метилирования гистона H3 в культурах клеток на первом пассаже. Синим цветом показано метилирование гистона H3 по положению H3K4me3, красным – H3K9me3, зеленым – H3K27me3

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка VPA и последующая процедура дифференцировки затрагивают механизмы эпигенетической регуляции генома. Метилирование ДНК промоторных областей генов в изучаемых клетках различается очень мало. Однако характер метилирования молекул гистона H3, ассоциированного с изученными генами, суще-

ственно различается. Гены ранних маркеров энтодермы *Gata4* и *Gata6* и ядерных гепатоцитарных факторов *Hnf-1α* и *Hnf-6* в КСЖ на первом пассаже инактивированы по механизму гетерохроматинизации. Гены *Hnf-3β*, *Hnf-4α* и *Alb*, помимо этого, по-видимому, могут подвергаться действию Polycomb-репрессорного комплекса второго типа. После дифференцировки в КСЖ практически во всех

случаях исчезает H3K9me3-метилирование гистона H3. Однако гены *Gata4*, *Gata6*, *Hnf-6* и *Alb* могут, вероятно, подвергаться вторичной инактивации посредством метилирования H3K27me3. В целом, выявлено хорошее соответствие результатов анализа метилирования гистонов и экспрессии генов.

**Вальпроевая кислота увеличивает секрецию мочевины клетками слюнной железы мыши в 3D-условиях культивирования**

Одна из детоксикационных функций печени – синтез мочевины из аммиака, осуществляемый гепатоцитами. Способность синтезировать мочевины широко используется в качестве теста на функциональную активность клеток при гепатоцитарной дифференцировке [25]. Для оценки степени гепатоцитарной дифференцировки *in vitro* определили уровень синтеза мочевины дифференцированными КСЖ в 3D-условиях (в коллагеновом геле). В качестве контроля использовали ПКП и КСЖ на первом пассаже, не подвергавшиеся дифференцировке.

На первом пассаже в 2D-условиях КСЖ и ПКП практически не синтезируют мочевины, но приобретают способность синтезировать ее в 3D-условиях культивирования. Увеличение уровня синтеза мочевины клетками в коллагеновом геле в течение всего периода наблюдения говорит о том, что 3D-условия культивирования способствуют дифференцировке данных клеток.

К 15-му дню инкубации КСЖ в геле уровень синтеза ими мочевины достигает 24 мМ на  $1 \times 10^6$  клеток за 24 ч (рис. 6), тогда как свежeweделенные гепатоциты мыши синтезируют около 350 мМ мочевины

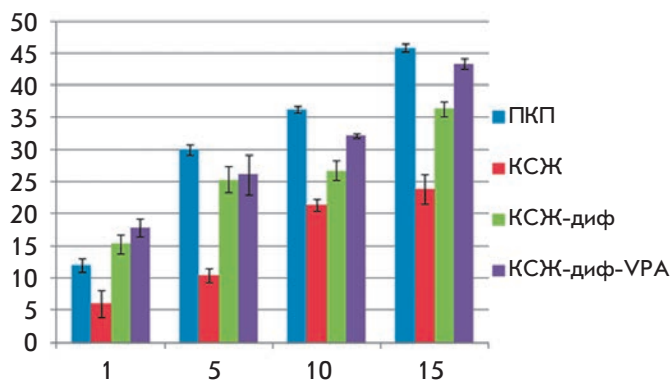


Рис. 6. Секреция мочевины дифференцированными КСЖ в сравнении с КСЖ и ПКП на первом пассаже в 3D-условиях. По оси X – время культивирования клеток в геле (сут), по оси Y – концентрация мочевины в среде культивирования (мМ на  $1 \times 10^6$  клеток за 24 ч)

на  $1 \times 10^6$  клеток за 24 ч. Высокий уровень синтеза мочевины КСЖ может отражать их значительную способность к дифференцировке в гепатоцитарном направлении при определенных условиях культивирования. ПКП активнее синтезируют мочевины в 3D-условиях: к 15-му дню уровень синтеза мочевины ПКП в 7.6 раза меньше, чем у первичной культуры гепатоцитов. Это говорит о высокой степени дифференцировки контрольных ПКП в гепатоцитарном направлении в 3D-условиях.

После гепатоцитарной дифференцировки способность КСЖ синтезировать мочевины возрастает, причем при использовании VPA КСЖ синтезируют мочевины на сопоставимом с контрольными ПКП уровне. Таким образом, использованный протокол гепатоцитарной дифференцировки затрагивает не только регуляторные гены КСЖ мыши, но влияет также на их функциональные характеристики. Гепатоцитарная дифференцировка КСЖ позволяет получить клетки, способные к выполнению некоторых функций гепатоцитов. VPA может повысить эффективность дифференцировки.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Использование малых молекул, способных влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов и вызывать увеличение эффективности дифференцировки, является перспективным подходом в клеточной биологии. VPA повышает эффективность дифференцировки различных типов клеток. Dong и соавт. [9] показали, что после воздействия VPA значительно увеличивается эффективность гепатоцитарной дифференцировки ES-клеток мыши и уменьшается степень их спонтанной дифференцировки в структуры, напоминающие клетки желчных протоков. Предполагается, что одним из механизмов, ускоряющих дифференцировку ES-клеток, может быть переход клеточного цикла в фазы G0/G1, который происходит при воздействии VPA. Замедление клеточного цикла способствует утрате плюрипотентности и дифференцировке ES-клеток.

VPA также может увеличивать эффективность дифференцировки детерминированных клеток. После 72 ч воздействия 5 мМ VPA на клетки костного мозга человека увеличивается ацетилирование гистонов H3 и H4, что способствует деметилированию ДНК данных клеток [10]. При последующей дифференцировке в гепатоцитарном направлении клетки костного мозга человека экспрессировали альбумин и запасали гликоген более эффективно, чем клетки, не подвергнутые воздействию VPA. Дифференцированные клетки костного мозга были способны к секреции мочевины, причем после обработки VPA синтез мочевины возрастал примерно

в 1.5 раза [10]. Предполагается, что увеличение эффективности дифференцировки клеток костного мозга связано с деметилированием генов, участвующих в гепатоцитарной дифференцировке.

Помимо ингибирования гистон-деацетилаз, VPA способна вызывать активное деметилирование ДНК, не зависящим от репликации способом [7]. Этот эффект также может увеличивать транскрипционную активность генов. Кроме того, VPA активирует гены семейства *Wnt* [26]. Показано, что сигнальный путь *Wnt*/ $\beta$ -катенин необходим для формирования энтодермы и дифференцировки клеток печени и поджелудочной железы [27, 28].

Проведенное нами сравнительное исследование КСЖ и ПКП мыши дает представление о способности КСЖ к гепатоцитарной дифференцировке и о влиянии VPA на эффективность дифференцировки. Показано, что инициация и начальные этапы гепатоцитарной дифференцировки КСЖ проходят достаточно эффективно, затрагивая как широкий набор транскрипционных факторов, так и различные маркеры, характерные для клеток печени. Однако в 2D-условиях культивирования довольно сложно добиться терминальных дифференцировочных стадий. По этой причине эффективность дифференцировки мы оценивали в 3D-условиях культивирования, которые приближают клетки к условиям, в которых они находятся в организме. Культивирование клеток в коллагеновом геле способствует проявлению их морфогенетического и дифференцировочного потенциала [29, 30]. В 3D-условиях культивирования КСЖ-диф-VPA секретируют мочевины на высоком уровне, сопоставимом с контрольными ПКП. Это говорит об эффективной гепатоцитарной дифференцировке, влияющей на функциональные характеристики клеток.

Использованный протокол дифференцировки практически не влияет на метилирование ДНК промоторных областей ключевых для гепатоцитарной дифференцировки генов, что не удивительно, учитывая консервативный механизм метилирования ДНК. Однако обработка VPA и последующая дифференцировка в значительной степени влияют на метилирование гистона H3. Показано, что метилирование гистонов в большинстве случаев выше в контрольных КСЖ и, как правило, ниже в дифференцированных КСЖ. В целом, это можно объяснить прогениторной природой КСЖ: многие гены в прогениторных клетках имеют бивалентную конфигурацию, т.е. обо-

гащены и активирующими, и ингибирующими модификациями гистонов. Это позволяет им дифференцироваться в разных направлениях. Выявлена хорошая корреляция между метилированием гистонов в КСЖ и экспрессией генов.

Скорее всего, существует несколько путей воздействия VPA на дифференцировочный потенциал клеток. Эффективность дифференцировки зависит не только от приобретения ими маркеров целевых клеток, но и от потери дифференцировочных свойств исходной клеточной линии. Как известно из опыта перепрограммирования клеток, детерминированные клетки легче приобретают дифференцировочные маркеры целевых клеток, а потеря маркеров исходных клеток происходит медленнее [31]. Согласно полученным нами данным, VPA способна уменьшать экспрессию ряда маркеров, характерных для исходных КСЖ. Возможно, одним из механизмов воздействия VPA на эффективность дифференцировки является способность к стиранию эпигенетической программы исходной клеточной линии, что ускоряет дифференцировку. Помимо этого, вероятным механизмом влияния VPA на эффективность дифференцировки может быть модификация гистона H3 генов-мишеней и увеличение доступности этих генов для факторов роста и цитокинов, используемых в дифференцировочном протоколе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что клетки поднижнечелюстной слюнной железы мыши проявляют значительную фенотипическую пластичность и способны к дифференцировке в гепатоцитарном направлении. Вальпроевая кислота влияет на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов посредством модификации гистонов, она способна увеличивать специфичность и эффективность гепатоцитарной дифференцировки клеток слюнной железы мыши. Механизм воздействия вальпроевой кислоты на эффективность дифференцировки может заключаться в стирании коммитирования исходной клеточной линии и/или облегчении доступности целевых генов для факторов роста и цитокинов, используемых в процессе дифференцировки. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Российского научного фонда  
(проект № 14-50-00029).*



ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Праймеры к генам, использованные для проведения ПЦР-РВ

Ген	Расшифровка названия гена	Праймер, нуклеотидная последовательность	Размер ампликона, п.н.	Температура плавления, °С
Контроль				
<i>Gapdh</i>	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG GGGGTCGTTGATGGCAACA	95	62.6 62.6
Гепатоцитарные маркеры				
<i>Aat</i>	Альфа-1-антитрипсин	CTCGTCCGCTCACTAAACAAG GCTGTCTGAGAGTCAAGGTCTT	248	60.7 61.3
<i>Afp</i>	Альфа-фетопротеин	CCATCACSTTTACCCAGTTTGT CCCATCGCCAGAGTTTTTCTT	101	60.2 60.6
<i>Alb</i>	Альбумин	TGCTTTTTCCAGGGGTGTGTT TTACTTCCTGCACTAATTTGGCA	167	62.4 60.2
<i>Krt19</i>	Цитокератин 19	GGGGGTTCAGTACGCATTGG GAGGACGAGGTCACGAAGC	113	62.9 62.1
<i>Cyp7a1</i>	Цитохром P450 семейство 7, под-семейство а, полипептид 1	AACGGGTTGATTCCATACCTGG GTGGACATATTTCCCCATCAGTT	126	62.0 60.0
<i>Cyp3a13</i>	Цитохром P450 семейство 3, под-семейство а, полипептид 13	GATTCTTGCTTACCAGAAGGGC GCCGGTTTGTGAAGGTAGAGTA	170	61.0 61.7
<i>G6p</i>	Глюкозо-6-фосфатаза	CGACTCGSTATCTCCAAGTGA GGGCGTTGTCCAAACAGAAT	208	61.0 60.9
<i>Perck</i>	Фосфоенолпируват карбоксикиназа 1	TGACAGACTCGCCCTATGTG CCCAGTTGTTGACCAAAGGC	153	61.0 61.4
<i>Tat</i>	Тирозинаминотрансфераза	AGCCGAATCCGAACAAAACC GCCGATAGATGGGGCATAGC	146	60.9 61.3
<i>Tdo</i>	Триптофан 2,3-диоксигеназа	AATCCATGACGAGCACCTATTCA TCACSTTGAGCATGTTCTCT	140	61.4 60.8
Транскрипционные факторы, необходимые для гепатоцитарной дифференцировки				
<i>Hhex1</i>	Гемопозитический гомеобокс	CGAGACTCAGAAATACCTCTCCC CTGTCCAACGCATCSTTTTTTG	162	61.2 60.0
<i>Hnf-3α</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 3α (Foxa1)	GGAGTTGAAGTCTCCAGCGTC GGGGTGATTAAGGAGTAGTGGG	157	62.4 61.7
<i>Hnf-3β</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 3β (Foxa2)	TCCGACTGGAGCAGCTACTAC GCGCCACATAGGATGACA	176	62.8 61.8
<i>Hnf-4α</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 4α	ATGCGACTCTCTAAAACCSTTG ACSTTCAGATGGGGACGTGT	135	60.0 62.7
<i>Hnf-6</i>	Гепатоцитарный ядерный фактор 6	GCCCTGGAGCAAACCTCAAGT TTGGACGGACGCTTATTTTCC	231	62.4 60.6
<i>Tbx3</i>	T-бокс транскрипционный фактор 3	TGGAACCCGAAGAAGACGTAG TACCCCGCTTGTGAAACTGG	84	61.2 62.1
Маркер ацинарных клеток				
<i>Ptf1a</i>	Панкреатический транскрипционный фактор 1 субъединица альфа	GCTACACGAATACTGCTACCG CGCAGCAATAGCTGACGTTG	134	60.3 62.0

Таблица 2. Праймеры для бисульфитного секвенирования

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура плавления, °С	Размер ампликона, п.н.
<i>Alb</i>	<i>AlbF1</i>	TTGGTAAAGATGGTATGATTTTG	58.4	397
	<i>AlbF2</i>	ATTTTGTAATGGGGTAGGAAT	58.7	381
	<i>AlbR</i>	ACCACCTAAAAATTCTCAA	57.3	
<i>Hnf-3β</i>	<i>Hnf-3βF</i>	AATGTGTATTTAAAAGGGAGGAAA	60.0	
	<i>Hnf-3βR1</i>	CCRAACAACCCATTTAAATAATC	59.2	378
	<i>Hnf-3βR2</i>	CCCAAAAACCTAAAATCAA	57.9	180
<i>Gata4</i>	<i>Gata4F1</i>	TATTGAGAGTAGGGAGGAAAGA	60.0	261
	<i>Gata4F2</i>	AGGAAAGAGAAGGAGAATAAATA	58.8	247
	<i>Gata4R</i>	CTAACTAACCTAAAAAATCAC	57.2	
<i>Gata6</i>	<i>Gata6F1</i>	ATTTAGTAGTTTGTAGAGAGTAG	57.1	405
	<i>Gata6F2</i>	TTTYGATTTATAGTTTGGTATTTT	57.5	381
	<i>Gata6R</i>	AATCCCTACAATCTTCTAAA	55.7	
<i>Hnf-1α</i>	<i>Hnf-1αF1</i>	ATAGGGGTTTTTTTTTTTTTTGGG	62.3	373
	<i>Hnf-1αF2</i>	GGGTGTAGTGATTTATTTTA	55.3	325
	<i>Hnf-1αR</i>	ACTTTAAACTTCAACCTTAC	56.7	
<i>Hnf-4α</i>	<i>Hnf-4αF</i>	TTTGGTTTTTATAGGTATTAGGT	58.9	
	<i>Hnf-4αR1</i>	CTCTTCTTTCTTTCTTTCTTTC	59.2	399
	<i>Hnf-4αR2</i>	CTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTC	60.8	365
<i>Hnf-6</i>	<i>Hnf-6F</i>	TTTTTTYGGTTTATTTGTGTTGG	60.1	
	<i>Hnf-6R1</i>	ATATCTTACCTTCTCTCTTACT	56.8	390
	<i>Hnf-6R2</i>	TTCCCTCTATCTTTTTTTTTTTC	60.6	363

Таблица 3. Праймеры для анализа метилирования гистонов

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
<i>Alb</i>	<i>AlbF</i>	GGGGTAGGAACCAATGAAATG
	<i>AlbR</i>	GAGGAGGAGGAGAAAGGTTA
<i>Hnf-3β</i>	<i>Hnf-3βF</i>	CACCTGCTTGTGTTTTTGAC
	<i>Hnf-3βR</i>	AGTCCCTTCCTTTACGTCCA
<i>Gata4</i>	<i>Gata4F</i>	TTGGGGGAGCTTTGGGAAGA
	<i>Gata4R</i>	GGAAAAGAGCAGGGACTCGG
<i>Gata6</i>	<i>Gata6F</i>	TACCACCACCACCATCACCAT
	<i>Gata6R</i>	TCTGATCTTTACCTGTGCTG
<i>Hnf-1α</i>	<i>Hnf-1αF</i>	TGATGTTGGGCTAGGACTGA
	<i>Hnf-1αR</i>	CAATTGGGAGTGAGCAGAAG
<i>Hnf-4α</i>	<i>Hnf-4αF</i>	AGACAGGGTGGATAGATAGC
	<i>Hnf-4αR</i>	GACAGTGTGAGTATGTGTGCAG
<i>Hnf-6</i>	<i>Hnf-6F</i>	CCACCACCTACACTACCTTA
	<i>Hnf-6R</i>	GGTTATTCATAGAGGCCAGC

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Snykers S., Henkens T., De Rop E., Vinken M., Fraczek J., De Kock J., De Prins E., Geerts A., Rogiers V., Vanhaecke T. // *J. Hepatol.* 2009. V. 51. № 1. P. 187–211.
2. Haumaitre C., Lenoir O., Scharfmann R. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. № 20. P. 6373–6383.
3. Vaes B.L., Lute C., van der Woning S.P., Piek E., Vermeer J., Blom H.J., Mathers J.C., Müller M., de Groot L.C., Steegenga W.T. // *Bone.* 2010. V. 46. № 2. P. 514–523.
4. Jeong S.G., Ohn T., Kim S.H., Cho G.W. // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 554. P. 22–27.
5. Mike A.K., Koenig X., Koley M., Heher P., Wahl G., Rubi L., Schnürch M., Mihovilovic M.D., Weitzer G., Hilber K. // *Cell Physiol. Biochem.* 2014. V. 33. № 1. P. 205–221.
6. Perucca E. // *CNS Drugs.* 2002. V. 16. P. 695–714.
7. Detich N., Bovenzi V., Szyf M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 30. P. 27586–27592.
8. Liu J., Liu Y., Wang H., Hao H., Han Q., Shen J., Shi J., Li C., Mu Y., Han W. // *Sci. Rep.* 2013. DOI: 10.1038/srep01185.
9. Dong X.J., Zhang G.R., Zhou Q.J., Pan R.L., Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. // *World J. Gastroenterol.* 2009. V. 15. № 41. P. 5165–5175.
10. Dong X., Pan R., Zhang H., Yang C., Shao J., Xiang L. // *PLoS One.* 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0063405.
11. An S.Y., Han J., Lim H.J., Park S.Y., Kim J.H., Do B.R., Kim J.H. // *Tissue Cell.* 2013. DOI: 10.1016/j.tice.2013.12.006.
12. Shubnikova E.A., Pogodina L.S. // *Ontogenez.* 2000. V. 31. № 6. P. 476–480.
13. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // *Cloning Stem Cells.* 2007. V. 9. № 2. P. 191–205.
14. Baek H., Noh Y.H., Lee J.H., Yeon S.I., Jeong J., Kwon H. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. DOI: 10.1002/term.1572.
15. Okumura K., Nakamura K., Hisatomi Y., Nagano K., Tanaka Y., Terada K., Sugiyama T., Umeyama K., Matsumoto K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology.* 2003. V. 38. P. 104–113.
16. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology.* 2004. V. 39. № 3. P. 667–675.
17. Schwarz S., Rotter N. // *Meth. Mol. Biol.* 2012. V. 879. P. 403–442.
18. Petrakova O.S., Terskikh V.V., EChernioglo E.S., Ashapkin V.V., Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Gvazava I.G., Sukhanov Y.V., Vasiliev A.V. // *SpringerPlus.* 2014. DOI: 10.1186/2193-1801-3-183.
19. Petrakova O.S., Gvazava I.G., Ashapkin V.V., Shtratnikova V.Y., Terskikh V.V., Sukhanov Y.V., Vasiliev A.V. // *Doklady Biological Sciences.* 2013. V. 453. P. 397–400.
20. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Caballero-Corbalan J., Tanaka N., Kobayashi N. // *Acta Med. Okayama.* 2008. V. 62. № 2. P. 63–68.
21. Yi F., Liu G.H., Izipisia Belmonte J.C. // *Cell Res.* 2012. V. 22. P. 616–619.
22. Grunau C., Schattevoy R., Mache N., Rosenthal A. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 5. P. 1053–1058.
23. Tsuji T., Nagai N. // *Int. J. Dev. Biol.* 1993. V. 37. № 3. P. 497–498.
24. Chi J.G. // *J. Korean Med. Sci.* 1996. V. 11. № 3. P. 203–216.
25. You J., Shin D.S., Patel D., Gao Y., Revzin A. // *Adv. Healthcare Mater.* 2014. V. 3. № 1. P. 126–132.
26. Hrebackova J., Hrabeta J., Eckschlager T. // *Curr. Drug Targets.* 2010. V. 11. № 3. P. 361–379.
27. Zaret K.S., Grompe M. // *Science.* 2008. V. 322. № 5907. P. 1490–1494.
28. Engert S., Burtscher I., Liao W.P., Dulev S., Schotta G., Lickert H. // *Development.* 2013. V. 140. № 15. P. 3128–3138.
29. Давыдова Д.А., Воротеляк Е.А., Брагина Е.Е., Терских В.В., Васильев А.В. // *Цитология.* 2011. Т. 53. № 4. С. 325–331.
30. Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Gnedeva K.Y., Moldaver M.V., Yegorov Y.E., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. // *Histochem. Cell Biol.* 2010. V. 133. P. 567–576.
31. Sekiya S., Suzuki A. // *Nature.* 2011. V. 475. № 7356. P. 390–393.