

УДК 577.218

Цис-регуляторная функция промотора гена *Pou5f1* в МНС-локусе мыши

В. В. Ермакова[#], Е. В. Александрова[#], А. А. Кузьмин^{*}, А. Н. Томилин^{**}

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

^{*}E-mail: a.kuzmin@incras.ru; ^{**}e-mail: a.tomilin@incras.ru[#] Равный вклад.

Поступила в редакцию 24.12.2024

Принята к печати 28.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27596

РЕФЕРАТ Ген *Pou5f1* кодирует белок Oct4 – один из ключевых транскрипционных факторов, необходимых для поддержания плюрипотентного состояния клеток эпибласта и жизнеспособности половых клеток. Однако с использованием методов функциональной генетики были получены убедительные данные, свидетельствующие о более широком спектре функций *Pou5f1* в онтогенезе мыши, в частности, в сдерживании атеросклеротических процессов. При изучении данного аспекта акцент делался на функциях белка Oct4, тогда как вклад регуляторных последовательностей, расположенных в границах гена *Pou5f1*, в реализацию этих неканонических функций не рассматривался. В настоящей работе на основе эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши нами создана генетическая модель, позволяющая оценить влияние промотора гена *Pou5f1* на транскрипцию окружающих его генов Major Histocompatibility Complex (МНС)-локуса. Нами показано, что делеция этого промотора не оказывает существенного влияния на экспрессию ряда генов данного локуса ни в ЭСК, ни в трофобластных производных этих клеток. Важное исключение составил ген *Tcf19*, который активировался при такой делеции и который может быть ассоциирован с патологией атеросклероза через свое провоспалительное действие. При дальнейшем использовании разработанная генетическая модель позволит оценить вклад цис-регуляторной связи *Pou5f1* с *Tcf19* и, возможно, с другими генами в описанный ранее атеросклеротический фенотип мышей, несущих делецию промотора гена *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Pou5f1*, Oct4, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), Major Histocompatibility Complex (МНС), трофэктодерма, регуляция экспрессии генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ и ПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ТПК – трофобластоподобные клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; ММС – митомицин С; Fgf4 – фактор роста фибробластов 4; IFN γ – интерферон-гамма; LPS – липополисахарид; МНС – Major Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости); гРНК – гидовая (направляющая) РНК; GR – глюкокортикоидный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых факторов, ответственных за поддержание плюрипотентного состояния клеток эпибласта и их культивируемых аналогов – эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), – является белок Oct4, также известный как компонент «коктейля Яманаки» и используемый для репрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) [1]. ЭСК и иПСК, объединенные термином плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), обладают способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировке в любые типы соматических клеток. Указанные свойства делают эти клетки ценным инструментом для изучения ранних стадий эмбриогенеза, модели-

рования генетических заболеваний *in vitro* и разработки подходов для регенеративной медицины. Самоподдержание и выбор направления дифференцировки ПСК критически зависят от экспрессии Oct4 [2], даже небольшие изменения уровня этого белка оказывают существенное влияние на судьбу ПСК [3, 4].

Транскрипционный фактор Oct4 кодируется геном *Pou5f1*, расположенным в кластере генов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС). Ген *Pou5f1* находится на коротком плече хромосомы 6 человека и на хромосоме 17 мыши (рис. 1). В обоих случаях рассматриваемый локус является одной из самых плотных областей генома [5], включающей большое количе-

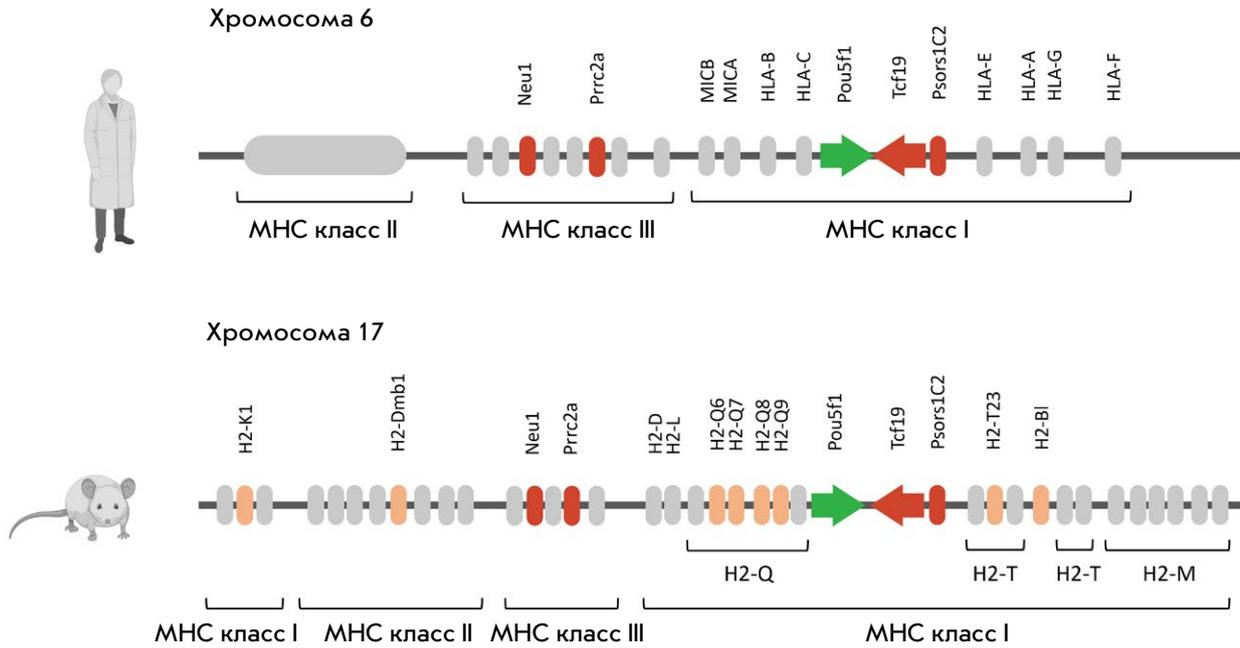


Рис. 1. Схема локуса *Pou5f1*-МНС. Схематическое изображение локусов *Pou5f1*-МНС человека (сверху) и мыши (снизу). Исследуемые в работе гены выделены цветом: *Pou5f1* – зеленым, гены МНС – оранжевым, гены, предположительно взаимодействующие с *Pou5f1*, включая *Tcf19*, – красным. Направление транскрипции генов *Pou5f1* и *Tcf19* обозначено дополнительно стрелками. Рисунок создан с использованием BioRender

ство генов, которые кодируют белки, участвующие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета, в частности, отвечающих за процессинг и презентацию антигенов [6].

Ранее считалось, что для регуляции уровня экспрессии *Pou5f1* и, как следствие, нормального функционирования ПСК и их корректного выхода из плюрипотентного состояния достаточно дистального энхансера, взаимодействующего с промотором *Pou5f1* в «наивных» ПСК, а также проксимального энхансера, активного в праймированных плюрипотентных клетках [7, 8]. Однако помимо классических регуляторных элементов гена *Pou5f1* (промотора, дистального и проксимального энхансеров), описанных еще в 1996 году Yeom и соавт. [9], развитие высокопроизводительных методов секвенирования привело к открытию множества ранее неизвестных *cis*-регуляторных элементов, влияющих на экспрессию этого гена [10, 11]. Таким образом, стало очевидным, что регуляция гена *Pou5f1* представляет собой значительно более тонко настроенный процесс, чем считалось ранее. В настоящий момент функциональная роль всех регуляторных элементов в системе контроля экспрессии *Pou5f1* остается недостаточно изученной. В исследовании Diao и соавт. показано, что 17 из 41 обнаруженного регуляторного элемента *Pou5f1* являются промоторами других белкокодирующих генов, включая ближайшего сосе-

да *Pou5f1-Tcf19* [10], однако не ясно, существует ли обратная *cis*-регуляторная взаимосвязь между *Pou5f1* и окружающими его генами. На мысль о существовании подобной взаимосвязи наталкивают также результаты работы, в которой обнаружили корреляцию между риском возникновения псориаза и наличием полиморфизмов в области промотора и первого экзона гена *Pou5f1* [12].

Интерес вызывает также отрицательная корреляция между экспрессией генов *Pou5f1* и МНС в ходе развития. Так, считается, что в ЭСК мыши экспрессия генов МНС первого и второго класса находится на низком уровне, возрастая в ходе дифференцировки [13, 14]. При этом экспрессия *Pou5f1*, согласно основной принятой гипотезе, ограничена ПСК и половыми клетками [9]. Исходя из этого можно предположить, что активность гена *Pou5f1* может переключаться с белкокодирующей на *cis*-регуляторную, необходимую для регуляции активирующихся генов МНС. Такой механизм действия согласуется с данными, полученными на животных, у которых делеция промотора *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках приводила к заметному ухудшению атеросклеротического фенотипа, а именно к уменьшению стабильности бляшек, накоплению липидов, воспалению, снижению митохондриального потенциала в эндотелиальных клетках и снижению миграции гладкомышечных клеток [15, 16].

В настоящей работе нами создана генетическая модель, позволяющая оценить *cis*-регуляторную функцию промоторной области *Pou5f1* в отношении генов локуса *Pou5f1*-*MHC* в ЭСК и их дифференцированных потомках. Добившись дифференцировки ЭСК в трофобластном направлении с помощью форсированной экспрессии *Cdx2*, мы не обнаружили роли промоторной области *Pou5f1* в регуляции экспрессии различных генов *MHC*-локуса. Однако наши данные выявили репрессорную активность промотора *Pou5f1* в отношении гена *Tcf19* как в ЭСК мыши, так и в трофобластных производных этих клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши

Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) выделяли в соответствии с действующими зоозащитными актами Российской Федерации при одобрении Совета по этике Института (протокол № 12/23).

МЭФ, полученные из эмбрионов мышей линии C57Bl6 на 12–14-й день развития, культивировали на адгезивном пластике, предварительно обработанном 0.1% раствором желатина (Sigma, США). Клетки культивировали в среде DMEM GlutaMAX (Gibco, США), содержащей 10% NuClone FBS (Cytiva, США) и 1×пенициллин/стрептомицин (Gibco). Спустя 4–5 пассажей, по достижении конfluence, МЭФ инкубировали в течение 2.5 ч в среде с добавлением 10 мкг/мл митомицина-С (MMC, Sigma). По окончании инкубации клетки промывали PBS и криоконсервировали для последующего использования.

Культивирование ЭСК

ЭСК мыши культивировали при температуре 37°C во влажной среде в атмосфере 5% CO₂ на адгезивных планшетах. В качестве подложки использовали фидерный слой митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши (MMC-МЭФ) плотностью 36 × 10³ клеток/см², высеваемых на лунки за сутки до внесения ЭСК. Клетки культивировали в стандартной ЭСК среде S/L, включающей KnockOut DMEM (Gibco), обогащенной 15% NuClone FBS (Cytiva), 1×NEAA (Gibco), 1×пенициллин/стрептомицин (Gibco), 0.1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 2 мМ L-глутамин (Gibco) и 1:5000 hLIF собственного производства.

Для перевода ЭСК в наивное плюрипотентное состояние использовали среду 2i/L, включающую N2B27 (смесь DMEM/F12 (Gibco) и Neurobasal (1 : 1), обогащенную 1× N2, 1× B27 (без ретиноевой кислоты, Gibco), 50 мкМ β-меркаптоэтанол (Sigma-

Aldrich), 0.005% BSA (Sigma), 1× пенициллин/стрептомицин (Gibco) и 2 мМ L-глутамин (Gibco)) с добавлением 3 мкМ CHIR99021 (Axon), 1 мкМ PD0325901 (Axon) и 1 : 5000 hLIF. Планшеты для культивирования обрабатывали 0.01% раствором поли-L-орнитина (Sigma).

Плазмиды

Плазмида Rosa26-GOF-2APuro-MUT была получена на основе плазмиды Rosa26-GOF-2APuro, описанной ранее [17]. Rosa26-GOF-2APuro-MUT содержит фрагмент 9.8 т.п.н. гена *Pou5f1* с его проксимальным и дистальным энхансерами, плечи гомологии к локусу *Rosa26* и ген устойчивости к селективному маркеру пурамицину. Также в PAM-сайт первого экзона гена *Pou5f1* в плазмиде Rosa26-GOF-2APuro была внесена точечная синонимичная мутация, предотвращающая нокаут экзогенного *Pou5f1*.

Плазмиду pRosa26-GR-Cdx2, содержащую последовательность *Cdx2*, «сшитую» с лигандсвязывающим доменом глюкокортикоидного рецептора (GR), лигировали с использованием ранее полученных конструкций [18]. Плазмида также содержит ген устойчивости к генетицину и плечи гомологии к локусу *Rosa26*.

Для внедрения конструкций в аллели локуса *Rosa26* использовали последовательность гидовой РНК (гРНК) 5'-ACTCCAGTCTTTCTAGAAGA-3' в паре с Cas9-никазой.

CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут *Pou5f1* проводили с помощью гРНК 5'-ACTCGTATGCGGGCGGACAT-3', кодируемой вектором pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9-EGFP. гРНК-последовательности были подобраны с помощью онлайн-ресурса Benchling (www.benchling.com).

Получение мутантных линий ЭСК

Для создания линии ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{Pou5f1/Cdx2} на первом этапе получали клетки *Pou5f1*^{+/+}; *Rosa26*^{Pou5f1/+}, содержащие в локусе *Rosa26* последовательность *Pou5f1* с синонимичной заменой в области первого экзона (в качестве донорской последовательности использовали вектор Rosa26-GOF-2APuro-MUT). Далее для нокаута эндогенного *Pou5f1* ЭСК *Pou5f1*^{+/+}; *Rosa26*^{Pou5f1/+} трансфицировали гРНК-/Cas9-кодирующей плазмидой. Трансфекцию проводили с использованием FuGene HD (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Нокаут эндогенных аллелей *Pou5f1* и интактность экзогенной конструкции в локусе *Rosa26* подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру TA-клонированных аллелей (рис. 2), для чего ампликоны этих аллелей клонировали в вектор pAL2-T («Евроген»).

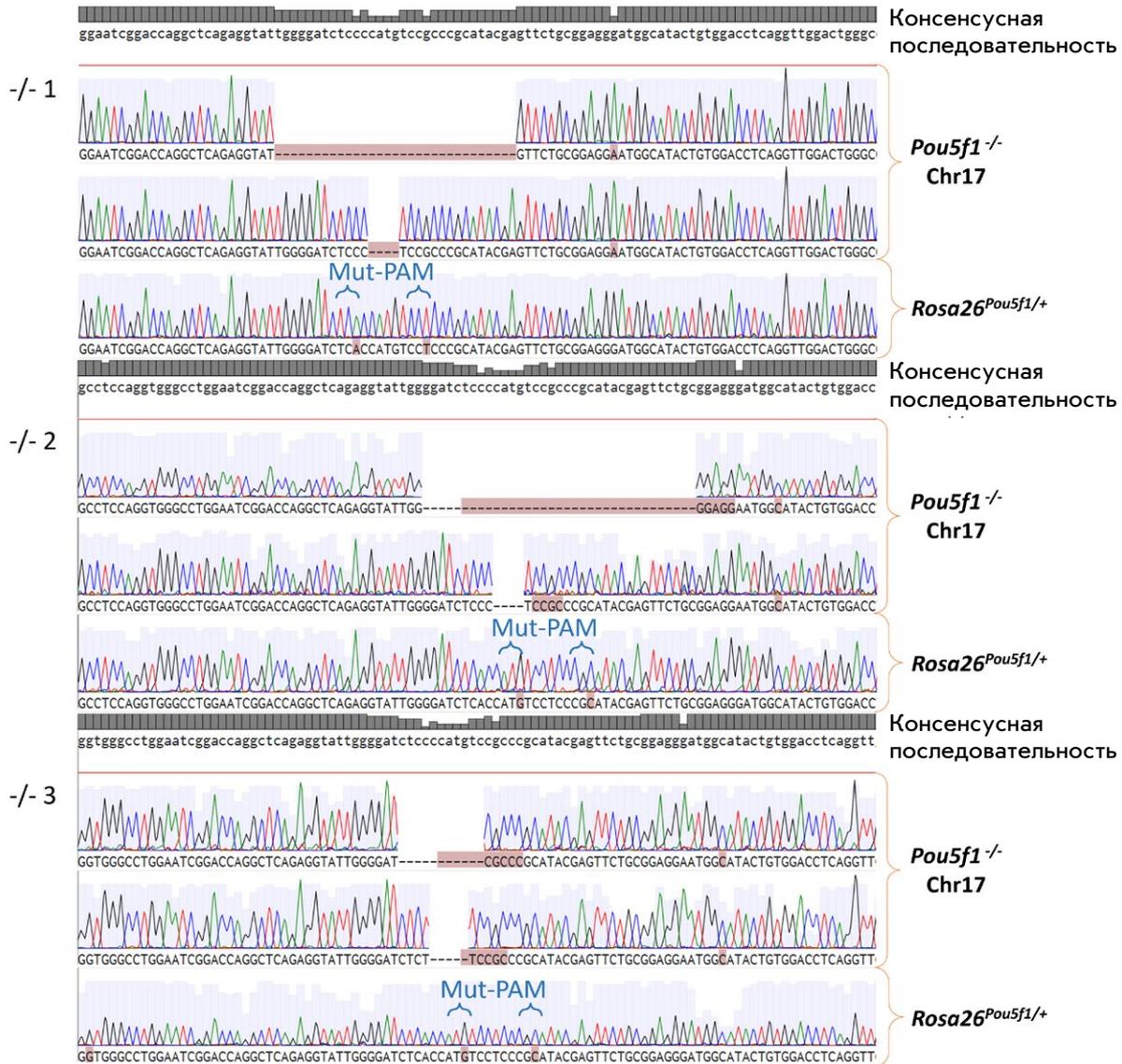


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности эндогенных аллелей *Pou5f1* в линии *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*+/+}, три биологических повторности. Обозначения: -/- 1–3 – номера клонов ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*+/+}

Для получения ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/*Cdx2*} и *Pou5f1* ^{Δ / Δ} ; *Rosa26*^{*Pou5f1*/*Cdx2*} во второй аллель *Rosa26* вышеописанных линий ЭСК помещали последовательность GR-*Cdx2*. В качестве донорской последовательности использовали вектор *Rosa26*-GR-*Cdx2*. Отбор колоний проводили в течение 6 дней с использованием антибиотика генетицина (G418) в концентрации 500 мкг/мл.

Трофобластная дифференцировка

Линии ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/*Cdx2*} и *Pou5f1* ^{Δ / Δ} ; *Rosa26*^{*Pou5f1*/*Cdx2*} культивировали в среде S/L с добавлением антибиотиков G418 (500 мкг/мл, Neofroxx)

и пурамицина (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich). Клетки затем переводили в наивное состояние, культивируя их в 2i/L-условиях на протяжении 7 дней, после чего пересевали на лунки, покрытые слоем ММС-МЭФ и культивировали в TS-среде, которую готовили на основе среды RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 20% HyClone FBS (Cytiva), 1 мМ пирувата натрия (Gibco), 1× пенициллин/стрептомицина (Gibco), 0.1 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 2 мМ L-глутамина (Gibco), 1 мкг/мл гепарина (Her) (Sigma-Aldrich) и 25 нг/мл фактора роста фибробластов 4 (Fgf4) (Peprotech). Среду предварительно кондиционировали на ММС-МЭФ на протяжении

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для количественной ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	T, °C	Размер ампликона, п.н.
qGAPDH-F	ACCCTTAAGAGGGATGCTGC	60	83
qGAPDH-R	CGGGACGAGGAAACACTCTC		
qOct4A-F	AGTGGAAAGCAACTCAGAGG	60	135
qOct4A-R	AACTGTTCTAGCTCCTTCTGC		
qCdx2-F	AGTCCCTAGGAAGCCAAGTGAA	60	96
qCdx2-R	AGTGAAACTCCTTCTCCAGCTC		
qCdx2GR-F	GCTGAAATCATCACCAATCAGATAC	60	134
qCdx2GR-R	CGCACGGAGCTAGGATACAT		
qCdx2endo-F	AGGCTGAGCCATGAGGAGTA	60	125
qCdx2endo-R	ctGAGGTCCATAATTCCACTCA		
qMash2-F	CGGGATCTGCACTCGAGGATT	65	86
qMash2-R	CCCCGTACCAGTCAAGGTGTG		
qTcfap2C-F	CGTCTCTCGTGAAGGTGAAG	60	114
qTcfap2C-R	CCCCAAGATGTGGTCTCGTT		
qHand1-F	CCTACTTGATGGACGTGCTGG	60	129
qHand1-R	TTTCGGGCTGCTGAGGCAAC		
qElf5-F	CATTGCTCGCAAGGTTACT	60	133
qElf5-R	GAGGCTTGTTCGGCTGTGA		
qH2-K1-F	TCCACTGTCTCCAACATGGC	60	113
qH2-K1-R	CCACCTGTGTTTCTCCTTCTCA		
qH2-Q6,8-F	CTGACCCTGATCGAGACCCG	60	112
qH2-Q6,8-R	TGTCCACGTAGCCGACGATAA		
qH2-Q7,9-F	GAGCTGTGGTGGCTTTTGTG	68	85
qH2-Q7,9-R	TGTCTTCATGCTGGAGCTGG		
qH2-Q10-F	ACATTGCTGATCTGCTGTGGC	60	120
qH2-Q10-R	GTCAGGTGTCTTCACACTGGAG		
qH2-Dmb1-F	ATGGCGCAAGTCTCATTCCT	68	95
qH2-Dmb1-R	TCTCCTTGTTCCGGGTTCT		
qH2-B1-F	ACCGGCTCCAACATGGTAAA	60	114
qH2-B1-R	AGGAAGGATGGCTATTTTCTGCT		
qH2-T23-F	ATAGATACCTACGGCTGGGAAATG	60	105
qH2-T23-R	AGCACCTCAGGGTGAATTCAT		
qTcf19-F	GATGATGAGGTCTCCCCAGG	60	107
qTcf19-R	TTTCCCTGTGGTCAATCCCC		
qPsors1C2-F	CTGTGTGCAGGAGGCATTTTC	68	86
qPsors1C2-R	AGGGATCACCAAGGATTGGG		
Gm32362-F	GTCTGGAGAACCAAGACAGCA	60	114
Gm32362-R	TTACAGCTTGGGATGCTCTTC		
Prrc2a-F	GAGATCCAGAAACCCGCTGTT	60	104
Prrc2a-R	TTCAGGCTTGAAGGTTGGC		
Neu1-F	CCGGGATGTGACCTTCGAC	60	127
Neu1-R	CAGGGTCAGGTTCACTCGGA		
TNF-F	GTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	60	117
TNF-R	AGGCCATTTGGGAACCTTCTCATC		

72 ч. Для культивирования клеток использовали смесь кондиционированной и свежей среды в соотношении 7 : 3. На следующий день после посева к клеткам добавляли дексаметазон (1 мкМ, Белмедпрепараты), а также G418 (500 мкг/мл, NeoFroxx). Спустя 4 дня клетки пересеивали и культивировали в стандартной или моделирующей воспалении TS-среде. Последняя дополнительно включала 300 ед/мл интерферона-гамма (IFN γ , ProSpec) или 1 мкг/мл липополисахарида *E. coli* (LPS, Sigma-Aldrich). Спустя сутки после индукции провоспалительного ответа в клетках анализировали экспрессию маркеров трофобласта.

Количественная ОТ-ПЦР

РНК выделяли при помощи набора RNA Solo («Евроген»), а для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК. Синтез кДНК проводили в присутствии ингибитора РНКаз RiboCare и ревертазы MMLV («Евроген»). ПЦР в реальном времени проводили с помощью системы LightCycler® 96 (Roche) с использованием 5 × qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Специфичность праймеров и оптимальные температуры отжига (T_0) предварительно проверяли с помощью ПЦР и электрофореза в 4% агарозном геле. Последовательности праймеров, а также подобранные T_0 приведены в табл. 1. В качестве референсного гена использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*. Для каждой линии использовали не менее трех биологических и двух технических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение линий контрольных ЭСК с нокаутом гена *Pou5f1*

Для исследования *цис*-регуляторной роли промотора гена *Pou5f1* в ЭСК и полученных из них дифференцированных клетках использовали созданную нами ранее линию ЭСК с Cre-опосредованной делецией фланкированных *loxP*-сайтами промотора и первого экзона гена *Pou5f1*. Эти клетки поддерживают плюрипотентное состояние благодаря экспрессии экзогенного, встроенного в локус *Rosa26* фрагмента гена *Pou5f1* – *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/+}* [17]. Делеция в созданной линии идентична делеции, полученной при исследовании роли транскрипционного фактора Oct4 в гладкомышечных и эндотелиальных клетках мыши, моделирующих атеросклероз [15, 16]. Для решения поставленной задачи мы дополнили полученную ранее линию новой, контрольной линией – *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/+}*, в которой нокаут эндогенного *Pou5f1* получен за счет *indel*-мутаций в первом экзоне. Как и в случае с линией

Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/+}, экспрессия Oct4 обеспечивалась за счет фрагмента 9.8 т.п.н. *Pou5f1*, помещенного в один из аллелей *Rosa26* (рис. 2). Таким образом, мы избавились от вариабельности в экспрессии Oct4 между двумя линиями ЭСК, которая бы неизбежно возникла при использовании линии *Pou5f1 $\Delta/+$* . Важно подчеркнуть, что в аллеле *Pou5f1* сохранен интактный промотор, что позволяет оценить его функции при сравнении с аллелем *Pou5f1 Δ* . Ранее мы обнаружили, что аллель *Rosa26^{Pou5f1}* может обеспечивать самоподдержание *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/+}* ЭСК, однако такие клетки не способны нормально дифференцироваться, что, как мы заключили, обусловлено отсутствием в 9.8 т.п.н. *Pou5f1*-фрагменте *цис*-регуляторных элементов, ответственных за корректную регуляцию гена в ходе дифференцировки [17]. Таким образом, направленная дифференцировка *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/+}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/+}* ЭСК представляет отдельную задачу, которую нужно было решить в ходе настоящего исследования.

Оценка способности полученных ЭСК к дифференцировке в трофобластном направлении

В качестве направления дифференцировки мы выбрали трофобластную дифференцировку. Известно, что клетки трофобласта, окончательно сегрегирующие на стадии поздней бластоцисты в виде трофэктодермы, после имплантации способствуют формированию иммунотолерантности организма матери к плоду за счет активного синтеза неклассических МНС [19]. Также известно, что сегрегация трофобласта сопровождается выключением гена *Pou5f1* [20], что, как мы ожидали, может способствовать переключению активности его промоторной области с регуляции самого *Pou5f1* на регуляцию окружающих генов МНС-кластера [21]. Исходя из этого мы заключили, что трофобластная дифференцировка может послужить подходящей моделью для оценки динамики экспрессии генов в локусе *Pou5f1*-МНС.

В основу протокола дифференцировки легла форсированная экспрессия Cdx2, ключевого мастер-регулятора трофобласта [22, 23], также встраиваемого в локус *Rosa26*. Форсированная экспрессия была выбрана в качестве самой логичной альтернативы дифференцировки при помощи сред и ростовых факторов из-за ее простоты и наличия опубликованных протоколов. Для управляемой трофобластной дифференцировки использовали Cdx2 в составе химерного белка с лигандсвязывающим доменом глюкокортикоидного рецептора (GR), активация которого требовала добавления в среду дексаметазона (Dex). Финальная конфигурация линий ЭСК

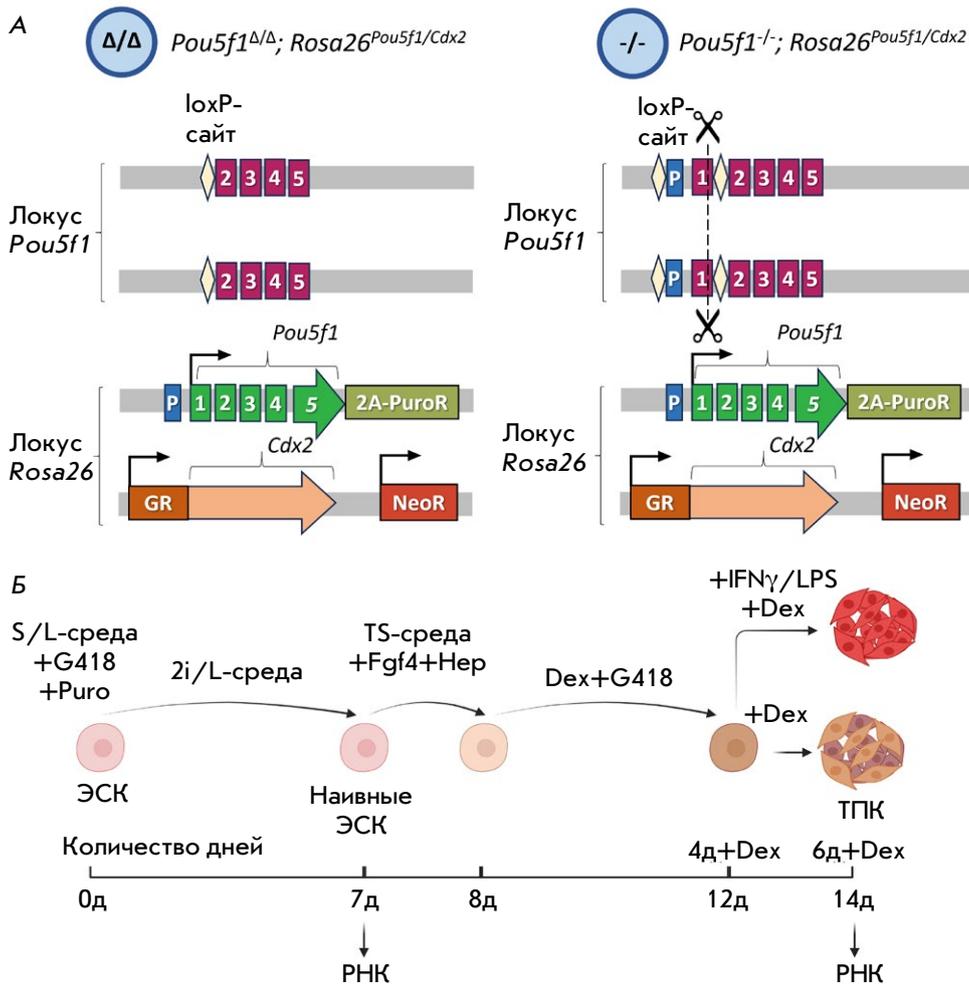


Рис. 3. Используемые линии клеток и протокол эксперимента. **А** – схематическое изображение сравнимых линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Обозначения: « Δ/Δ » – линия ЭСК *Pou5f1* ^{Δ/Δ} ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} с делецией эндогенного промотора *Pou5f1*; « $-/-$ » – линия ЭСК *Pou5f1* ^{$-/-$} ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} с интактным эндогенным промотором и инактивирующей indel-мутацией в первом экзоне гена; P – промотор, 1–5 – экзоны гена *Pou5f1*, 2A-PuroR – сайт P2A и ген устойчивости к пуромицину PuroR, GR – лигандсвязывающий домен глюкокортикоидного рецептора, NeoR – ген устойчивости к G418/неомицину. **Б** – схема дифференцировки ЭСК в трофобластном направлении (см. «Экспериментальную часть» для текстового описания). Обозначения: *Fgf4* – фактор роста фибробластов 4, *Hep* – гепарин, *Dex* – дексаметазон, IFN γ – интерферон-гамма, LPS – липополисахарид, ТПК – трофобластоподобные клетки. Рисунок создан с использованием BioRender

Pou5f1 ^{Δ/Δ} ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} и *Pou5f1* ^{$-/-$} ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} представлена на рис. 3А.

Так как эффективность дифференцировки ЭСК в трофэктодермальном направлении при форсированной экспрессии *Cdx2* зависит от стадии плюрипотентности, на которой находятся клетки [24], на первом этапе дифференцировки ЭСК *Pou5f1* ^{Δ/Δ} ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} и *Pou5f1* ^{$-/-$} ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} переводили в наивное состояние посредством 7-дневного культивирования в среде 2i/L. Кроме того, данную экспериментальную точку использовали в качестве дополнительной для отслеживания динамики изменения экспрессии исследуемых генов. Второй, основной, точкой исследования был 6 день культивирования клеток в присутствии дексаметазона, что соответствовало 14 дню всего эксперимента (рис. 3Б).

По мере прохождения стадий дифференцировки, клетки куполообразных колоний, характерных для ЭСК в сывороточной среде S/L, и шарообразных колоний, характерных для «наивных» ЭСК, к 6 дню

культивирования в присутствии *Dex* формировали плоские колонии с хорошо различимыми границами клеток угловатой формы, типичными для описанных ранее [22, 23] колоний трофобластных стволовых клеток (рис. 4А).

При анализе профиля экспрессии маркеров на 6-й день дифференцировки в присутствии дексаметазона в обеих линиях выявили существенное снижение уровня мРНК *Oct4* (в сравнении с наивными ЭСК) и повышение уровня мРНК трофэктодермальных маркеров. В качестве контроля уровня экспрессии мРНК трофобластных маркеров мы использовали плаценту мыши. Уровень общего *Cdx2* в обеих линиях ЭСК был значительно выше, чем в плаценте. При дифференциальном анализе уровня эндогенного *Cdx2* и мРНК, синтезированной за счет экзогенного GR-*Cdx2*, стало ясно, что подобное различие в уровне общего *Cdx2* обусловлено индуцированной сверхэкспрессией GR-*Cdx2*. При этом уровень эндогенного *Cdx2* также возрастал и был сопоставим с уровнем *Cdx2* в плаценте. Не обнару-

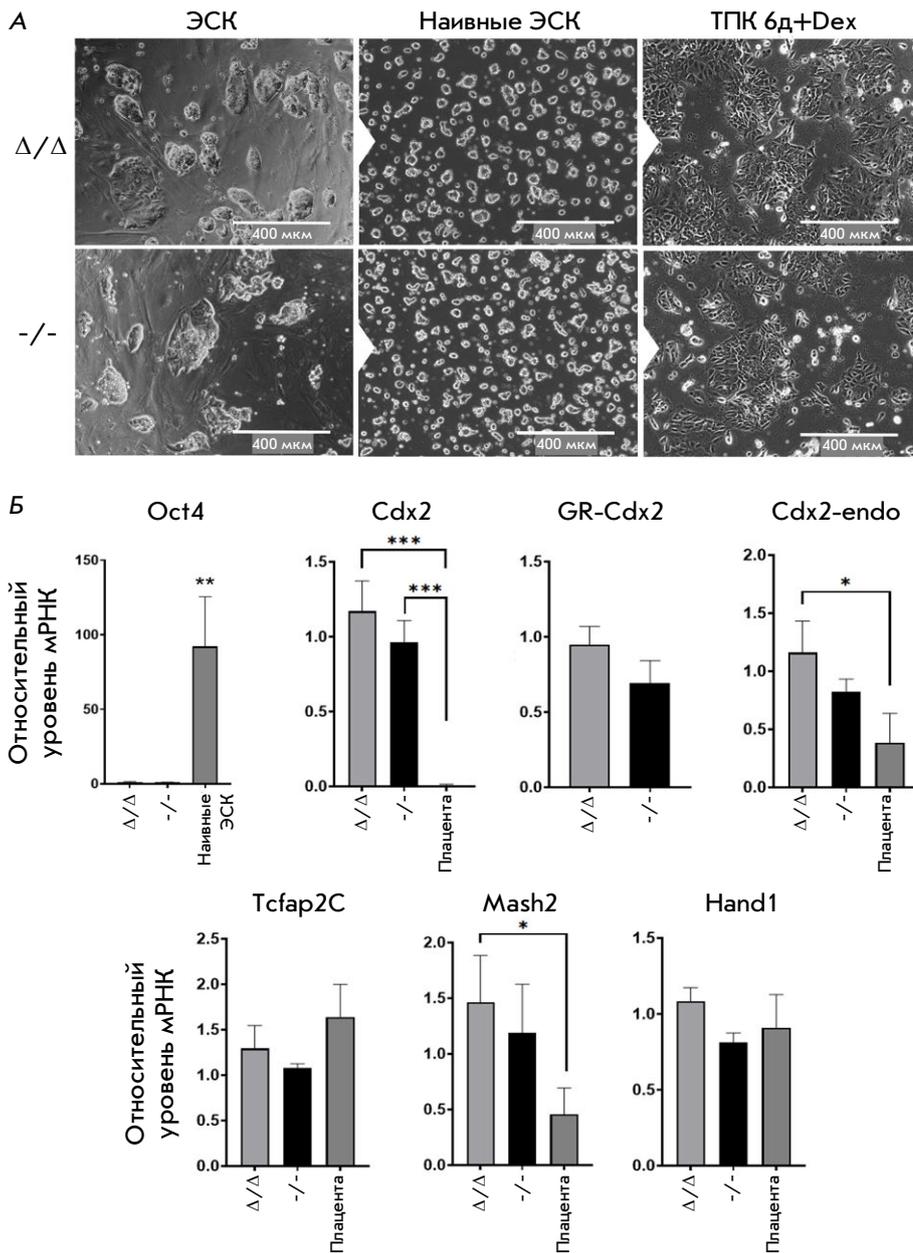


Рис. 4. Подтверждение способности линий ЭСК *Pou5f1^{Δ/Δ};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* к дифференцировке в трофобластном направлении. **А** – морфологические характеристики клеток на разных этапах дифференцировки: сывороточные (S/L) условия культивирования (слева), наивные (2i/L) условия культивирования (в центре) и индуцированные обработкой Dex в течение 6 дней трофктодермальные клетки (справа). **Б** – анализ экспрессии трофобластных маркеров (*Cdx2*, *Tcfap2C*, *Mash2*, *Hand1*) в ходе дифференцировки в сравнении с плацентой. Обозначения как на рис. 3А. **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001 по ANOVA

жено статистически значимых различий в экспрессии *Cdx2* между линиями *Pou5f1^{Δ/Δ};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}*, что важно для правильной интерпретации результатов. Показана также экспрессия других трофоэктодермальных маркеров в полученных ТПК (*Tcfap2C*, *Mash2*, *Hand1*) (рис. 4Б).

Оценка влияния промоторной области *Pou5f1* на экспрессию генов локуса *Pou5f1*-МНС

В ходе эксперимента клетки были разбиты на группы и подвергнуты воздействию IFN γ или липопо-

лисахарида (LPS). IFN γ и LPS часто используются в различных *in vitro* и *in vivo* моделях воспаления, исходя из чего мы предполагали, что индукция провоспалительных сигналов будет способствовать повышенной экспрессии генов, связанных с иммунным ответом, в том числе генов МНС, что позволит оценить различия в экспрессии исследуемых генов между клеточными линиями с большим разрешением. Тем не менее различия в экспрессии ряда генов МНС (*H2-K1*, *H2-T23*, *H2-B1*, *H2-Dmb1*, *H2-Q6,8*, *H2-Q7,9*) были вызваны только условиями культивирования, но не отличались между

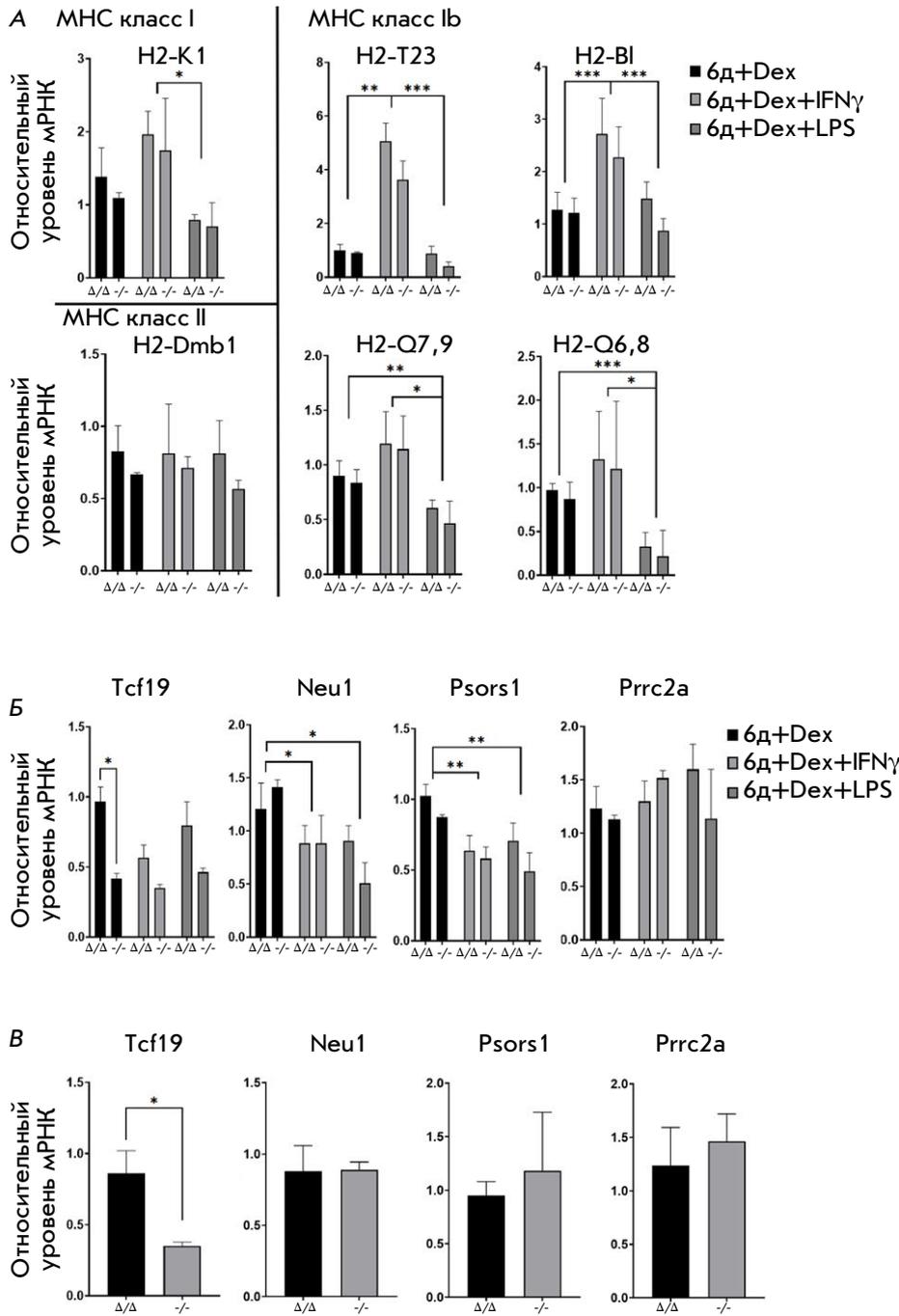


Рис. 5. Сравнение экспрессии генов локуса *Pou5f1*-МНС между линиями *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* в стандартных и провоспалительных условиях культивирования. **А, Б** – сравнение относительного уровня мРНК между линиями ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* спустя 6 дней культивирования с дексаметазоном (Dex) в стандартных и провоспалительных (с добавлением IFN γ или LPS) условиях. Представлены результаты анализа экспрессии генов МНС классов I и II (**А**) и генов локуса *Pou5f1*-МНС с ранее показанной *цис*-регуляторной активностью в отношении *Pou5f1* (**Б**). **В** – сравнение экспрессии генов из (**Б**) в недифференцированных ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}*, культивируемых в 2i/L-условиях. Обозначения как на *рис. 3А*; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ по ANOVA. С использованием теста Тьюки сравнивали линии Δ/Δ и $-/-$ при каждом условии культивирования, а также между условиями

Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2} и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* ЭСК (*рис. 5А*). Единственным из генов, чья экспрессия статистически значимо различалась между ЭСК двух генотипов, был *Tcf19* (*рис. 5Б*). Следует отметить, что в недифференцированных ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}*, культивируемых в наивных (2i/L) условиях, экспрессия *Tcf19* была уже повышена по сравнению с ЭСК *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* (*рис. 5В*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие активности гена *Pou5f1* вне общепринятой концепции плюрипотентности – вопрос, на который до сих пор нет однозначного ответа. С одной стороны, опубликованные работы свидетельствуют об отсутствии функциональной роли *Pou5f1* в дифференцированных клетках млекопитающих, обосновывая это отсутствием фенотипического ответа на нокаут этого гена и потенциальными ошибками в интерпре-

тации данных, полученных с использованием методов иммуноокрашивания и ОТ-ПЦР [25–27]. С другой стороны, достаточно убедительными выглядят и новые данные, полученные с использованием методов функциональной генетики, которые демонстрируют функцию *Pou5f1* в соматических клетках. К таким исследованиям относятся работы, в которых описан эффект нокаута *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках, а также работа Zalc и соавт., которые обнаружили реактивацию *Pou5f1* в краниальных клетках нервного гребня и обосновали ее роль в увеличении дифференцировочного потенциала этого типа клеток в ходе эмбриогенеза [15, 16, 28].

Наше предположение могло бы интегрировать описанные результаты с точки зрения *цис*-регуляторных свойств промотора *Pou5f1*, с одной стороны, подтверждая активность этого гена, а с другой – отвязывая ее от продукта этого гена, белка Oct4.

Выяснение точного механизма функционирования гена *Pou5f1* в контексте атеросклероза является актуальной задачей, решение которой представляет не только фундаментальный интерес, но и крайне важно для последующего использования в медицине. Так, если, например, эффекты, описанные на моделях атеросклероза, ассоциированы с транскрипционным фактором Oct4, то в качестве потенциального эффекторного белка в терапии этого заболевания следует рассматривать именно Oct4. Если же атеросклеротический фенотип связан с *цис*-регуляторной активностью промотора *Pou5f1*, то акцент в терапии должен быть смещен в сторону модуляции этой активности.

В отличие от подхода, представленного в настоящей работе, модели, созданные ранее для изучения гена *Pou5f1*, были разработаны прежде всего для исследования его функции в ПСК, а плюрипотентное состояние клеток поддерживали с помощью трансгенной кДНК *Pou5f1* под управлением промоторов с конститутивной экспрессией [3, 29]. Наш подход не только позволил получить изогенную пару линий с инактивируемой в процессе направленной дифференцировки экспрессией *Pou5f1*, но и дал возможность сравнивать их за счет идентичной локализации экзогенного *Pou5f1*, что было бы невозможно с использованием, например, лентивирусных векторов. Мы полагаем, что разработанная модель сможет помочь ответить на вопрос об активности гена *Pou5f1* в дифференцированных клетках. Эта работа стала первым шагом в этом направлении. И хотя мы не обнаружили масштабного влияния удаления промоторной области *Pou5f1* на экспрессию генов локуса МНС, один из исследуемых генов, *Tcf19*, оказался воспри-

имчивым к внесенным модификациям. Интересно, что этот ген является ближайшим соседом *Pou5f1*, что, возможно, облегчает взаимодействия между их регуляторными последовательностями. С другой стороны, учитывая, что наблюдаемые различия между линиями появляются на плюрипотентной стадии, наиболее вероятным можно считать механистический сценарий действия внесенной делеции. Так, в случае конкуренции со стороны транскрипционной машинерии расположенных друг напротив друга генов *Tcf19* и *Pou5f1*, блокируя транскрипцию одного из них – *Pou5f1* (за счет удаления его промотора), мы освобождаем пространство для экспрессии второго – *Tcf19*. И, хотя мы совершенно не ожидали такого точечного эффекта, он наиболее логичен с точки зрения основной концепции плюрипотентности. Являясь транскрипционно активным в плюрипотентных клетках, *Pou5f1*, изменяя свою активность (за счет, например, определенных мутаций), может влиять на экспрессию *Tcf19*, вызывая цепную реакцию нарушения в регуляции генов в дочерних клетках, в том числе не плюрипотентных, что уже в свою очередь может приводить к различным патологиям. Это неплохо объясняет результаты изучения полиморфизмов *Pou5f1*, ассоциированных с псориазом [12], особенно учитывая связь *Tcf19* с этим заболеванием [30, 31]. Интересно, что *Tcf19* также может участвовать в воспалительных реакциях, что связывает наши результаты с данными, полученными на моделях атеросклероза [32, 33]. Точкой расхождения в данном вопросе то, что в экспериментах, проведенных на мышечных моделях атеросклероза, нокаут *Pou5f1* был условным, т.е. индуцируемым в гладкомышечных или эндотелиальных клетках сосудов. Тем не менее, не исключено, что удаление даже метилированной области *Pou5f1* может приводить к усилению экспрессии *Tcf19*, что требует дополнительного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе мы смогли создать уникальную генетическую модель для исследования значимости последовательности промотора гена *Pou5f1* в регуляции активности генов, не играющих ключевую роль в плюрипотентных клетках и, как следствие, поиска его неклассических функций в дифференцированных клетках. Нам удалось частично подтвердить гипотезу о *цис*-регуляторной активности промоторной области *Pou5f1* в отношении генов локуса *Pou5f1*-МНС, а точнее, в отношении его ближайшего соседа – гена *Tcf19*. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение регуляторного ландшафта локуса *Pou5f1*-МНС в дифференцированных клетках других типов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 г.) –

получение и культивирование линий клеток, а также гранта Российского научного фонда № 24-75-10131, <https://rscf.ru/project/24-75-10131/> – дифференцировка и количественная ОТ-ПЦР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
2. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // Nat. Genet. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376. doi: 10.1038/74199.
3. Radziszewska A., Le Bin Chia G., Dos Santos R.L., Theunissen T.W., Castro L.F.C., Nichols J., Silva J.C.R. // Nat. Cell Biol. 2013. V. 15. № 6. P. 579–590. doi: 10.1038/ncb2742.
4. Strebinger D., Deluz C., Friman E.T., Govindan S., Alber A.B., Suter D.M. // Mol. Syst. Biol. 2019. V. 15. № 9. P. 9002. doi: 10.15252/msb.20199002.
5. Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R.C., Bruford E.A., Khodiyar V.K., Lush M.J., Povey S., Conover C.J., Wright M.W., et al. // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5. № 12. P. 889–899. doi: 10.1038/nrg1489.
6. Shiina T., Inoko H., Kulsji J. // Tissue Antigens. 2004. V. 64. № 6. P. 631–649. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x.
7. Nichols J., Smith A. // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. № 6. P. 487–492. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.015.
8. Choi H.W., Joo J.Y., Hong Y.J., Kim J.S., Song H., Lee J.W., Wu G., Schöler H.R., Do J.T. // Stem Cell Repts. 2016. V. 7. № 5. P. 911–926. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.09.012.
9. Yeom Y.I., Fuhrmann G., Ovitt C.E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hübner K., Schöler H.R. // Development. 1996. V. 122. № 3. P. 881–894. doi: 10.1242/dev.122.3.881.
10. Diao Y., Fang R., Li B., Meng Z., Yu J., Qiu Y., Lin K.C., Huang H., Liu T., Marina R.J., et al. // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 6. P. 629–635. doi: 10.1038/nmeth.4264.
11. Canver M.C., Tripathi P., Bullen M.J., Olshansky M., Kumar Y., Wong L.H., Turner S.J., Lessard S., Pinello L., Orkin S.H., et al. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 47. P. 15797–15809. doi: 10.1074/jbc.RA120.013772.
12. Chang Y.T., Hsu C.Y., Chou C.T., Lin M.W., Shiao Y.M., Tsai C.Y., Yu C.W., Shiue J.J., Lee Y.F., Huang C.H., et al. // J. Dermatol. Sci. 2007. V. 46. № 2. P. 153–156. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.01.003.
13. Liu X., Li W., Fu X., Xu Y. // Front. Immunol. 2017. V. 8. P. 645. doi: 10.3389/fimmu.2017.00645.
14. Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Eldor J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 15. P. 9864–9869. doi: 10.1073/pnas.142298299.
15. Cherepanova O.A., Gomez D., Shankman L.S., Swiatlowska P., Williams J., Sarmiento O.F., Alencar G.F., Hess D.L., Bevard M.H., Greene E.S., et al. // Nat. Med. 2016. V. 22. № 6. P. 657–665. doi: 10.1038/nm.4109.
16. Shin J., Tkachenko S., Chaklader M., Pletz C., Singh K., Bulut G.B., Han Y.M., Mitchell K., Baylis R.A., Kuzmin A.A., et al. // Cardiovasc. Res. 2022. V. 118. № 11. P. 2458–2477. doi: 10.1093/cvr/cvac036.
17. Kuzmin A.A., Ermakova V.V., Potapenko E.V., Ostroverkhova M.G., Guriev N.A., Tomilin A.N. // J. Dev. Biol. 2020. V. 51. № 6. P. 410–415. doi: 10.1134/S106236042006003X.
18. Tolkunova E., Cavaleri F., Eckardt S., Reinbold R., Christenson L.K., Schöler H.R., Tomilin A. // Stem Cells. 2006. V. 24. № 1. P. 139–144. doi: 10.1634/stemcells.2005-0240.
19. Rodgers J.R., Cook R.G. // Nat. Rev. Immunol. 2005. V. 5. № 6. P. 459–471. doi: 10.1038/nri1635.
20. Wu G., Schöler H.R. // Cell Regen. 2014. V. 3. № 1. P. 1–10. doi: 10.1186/2045-9769-3-7.
21. Malfait J., Wan J., Spicuglia S. // BioEssays. 2023. V. 45. № 10. P. 2300012. doi: 10.1002/bies.202300012.
22. Tanaka S., Kunath T., Hadjantonakis A.K., Nagy A., Rosant J. // Science. 1998. V. 282. № 5396. P. 2072–2075. doi: 10.1126/science.282.5396.2072.
23. Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K.J., Schöler H.R., et al. // EMBO Rep. 2004. V. 5. № 11. P. 1078–1083. doi: 10.1038/sj.embor.7400279.
24. Blij S., Parenti A., Tabatabai-Yazdi N., Ralston A. // Stem Cells Dev. 2015. V. 24. № 11. P. 1352–1365. doi: 10.1089/scd.2014.0395.
25. Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K., Welstead G.G., Zaidi S., Gokhale S., Schöler H.R., Tomilin A., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 403–415. doi: 10.1016/j.stem.2007.07.020.
26. Liedtke S., Enczmann J., Waclawczyk S., Wernet P., Kögler G. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 364–366. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.003.
27. Warthemann R., Eildermann K., Debowski K., Behr R. // Mol. Hum. Reprod. 2012. V. 18. № 12. P. 605–612. doi: 10.1093/molehr/gas032.
28. Zalc A., Sinha R., Gulati G.S., Wesche D.J., Daszczuk P., Swigut T., Weissman I.L., Wysocka J. // Science. 2021. V. 371. № 6529. P. eabb4776. doi: 10.1126/science.abb4776.
29. Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R., Halbritter F., Ng J.H., Weiße A.Y., Wong F.C., Gagliardi A., Mullin N.P., Festuccia N., et al. // Cell Stem Cell. 2013. V. 12. № 5. P. 531–545. doi: 10.1016/j.stem.2013.04.023.
30. Nedoszytko B., Szczerkowska-Dobosz A., Stawczyk-Macieja M., Owczarczyk-Saczonek A., Reich A., Bartosińska J., Batorycka-Baran A., Czajkowski R., Dobrucki I.T., Dobrucki L.W., et al. // Adv. Dermatol. Allergol. 2020. V. 37. № 3. P. 283–298. doi: 10.5114/ada.2020.96243.
31. Ling Y.H., Chen Y., Leung K.N., Chan K.M., Liu W.K. // PLoS One. 2023. V. 18. № 12. P. e0294661. doi: 10.1371/journal.pone.0294661.
32. Yang G.H., Fontaine D.A., Lodh S., Blumer J.T., Roopra A., Davis D.B. // Metabolites. 2021. V. 11. № 8. P. 513. doi: 10.3390/metabo11080513.
33. Ma X., Wang Q., Sun C., Agarwal I., Wu H., Chen J., Zhao C., Qi G., Teng Q., Yuan C., et al. // Cell Rep. 2023. V. 42. № 8. P. 112944. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112944.