УДК 577.218

# *Цис*-регуляторная функция промотора гена *Pou5f1* в MHC-локусе мыши

В. В. Ермакова<sup>#</sup>, Е. В. Александрова<sup>#</sup>, А. А. Кузьмин<sup>\*</sup>, А. Н. Томилин<sup>\*\*</sup>

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.27602

**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 Осt4, 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 (MHC)-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 uuc-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 иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ТПК — трофобластоподобные клетки; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки; МЭФ — эмбриональные фибробласты мыши; ММС — митомицин С; Fgf4 — фактор роста фибробластов 4; IFN — интерферон-гамма; LPS — липополисахарид; МНС — Мајог 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 Осt4, 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, MHC). Ген Pou5f1 находится на коротком плече хромосомы 6 человека и на хромосоме 17 мыши ( $puc.\ 1$ ). В обоих случаях рассматриваемый локус является одной из самых плотных областей генома [5], включающей большое количе-

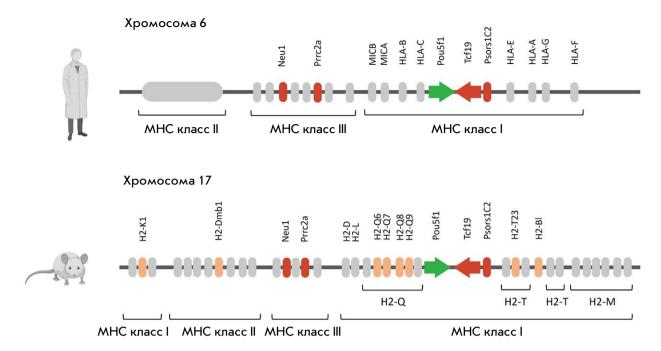


Рис. 1. Схема локуса Pou5f1-MHC. Схематическое изображение локусов Pou5f1-MHC человека (сверху) и мыши (снизу). Исследуемые в работе гены выделены цветом: Pou5f1 — зеленым, гены MHC – оранжевым, гены, предположительно взаимодействующие с Pou5f1, включая Tcf19, – красным. Направление транскрипции генов 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 цис-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 белоккодирующих генов, включая ближайшего сосе-

да Pou5f1-Tcf19 [10], однако не ясно, существует ли обратная цис-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 MHC 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 белоккодирующей на цис-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 *цис*-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 МНС-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, CША). Клетки культивировали в среде DMEM GlutaMAX (Gibco, США), содержащей 10% HyClone FBS (Cytiva, США) и 1×пенициллин/стрептомицин (Gibco). Спустя 4–5 пассажей, по достижении конфлюэнтности, МЭФ инкубировали в течение 2.5 ч в среде с добавлением 10 мкг/мл митомицина-С (ММС, Sigma). По окончании инкубации клетки промывали PBS и криоконсервировали для последующего использования.

#### Культивирование ЭСК

ЭСК мыши культивировали при температуре  $37^{\circ}$ С во влажной среде в атмосфере 5% СО $_2$  на адгезивных планшетах. В качестве подложки использовали фидерный слой митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши (ММС-МЭФ) плотностью  $36 \times 10^3$  клеток/см $^2$ , высеваемых на лунки за сутки до внесения ЭСК. Клетки культивировали в стандартной ЭСК среде S/L, включающей KnockOut DMEM (Gibco), обогащенной 15% HyClone FBS (Cytiva),  $1\times$ NEAA (Gibco),  $1\times$ пенициллин/стрептомицин (Gibco), 0.1 мМ  $\beta$ -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  $1 \times N2$ ,  $1 \times B27$  (без ретиноевой кислоты, Gibco),  $50 \text{ мкМ } \beta$ -меркаптоэтанол (Sigma-

Aldrich), 0.005% BSA (Sigma),  $1\times$  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 пуромицину. 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.

С R I S P R/С а s 9 - о п о с р е д о в а н н ы й н о к а ут Pou 5f 1 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  $\Theta C K Pou 5 f 1^{-/-};$  $Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$  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 rPHK-/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 ТА-клонированных аллелей (рис. 2), для чего ампликоны этих аллелей клонировали в вектор pAL2-T («Евроген»).

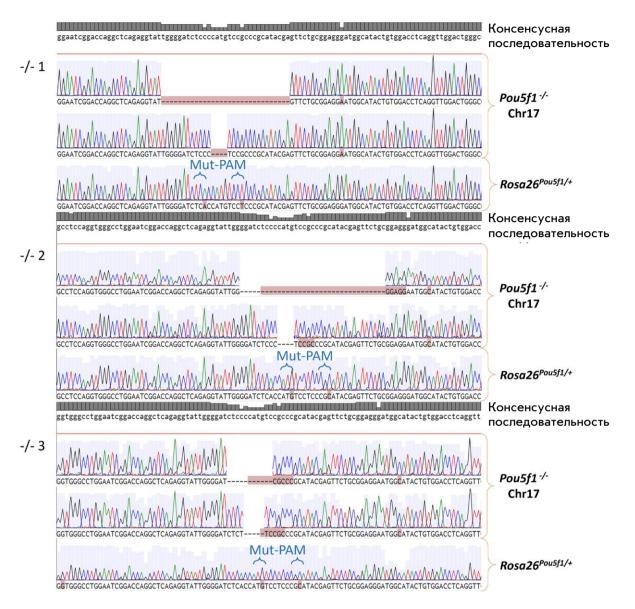


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности эндогенных аллелей Pou5f1 в линии  $Pou5f1^{-/-}$ ;  $Rosa26^{Pou5f1/+}$ , три биологических повторности. Обозначения: -/-1-3 – номера клонов ЭСК  $Pou5f1^{-/-}$ ;  $Rosa26^{Pou5f1/+}$ 

Для получения ЭСК  $Pou5f1^{-/-}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$ и  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$  во второй аллель Rosa26вышеописанных 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  $Pou5f1^{\triangle/\Delta}$ ;  $Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$  культивировали в среде S/L с добавлением антибиотиков G418 (500 мкг/мл, Neofroxx) и пуромицина (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 (Hep) (Sigma-Aldrich) и 25 нг/мл фактора роста фибробластов 4 (Fgf4) (Peprotech). Среду предварительно кондиционировали на ММС-МЭФ на протяжении

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

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	CGTCTCTCGTGGAAGGTGAAG	60	114
qTcfap2C-R	CCCCAAGATGTGGTCTCGTT		
qHand1-F	CCTACTTGATGGACGTGCTGG	60	129
qHand1-R	TTTCGGGCTGCTGAGGCAAC		
qElf5-F	CATTCGCTCGCAAGGTTACT	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	TCTCCTTGGTTCCGGGTTCT		
qH2-Bl-F	ACCGGCTCCAACATGGTAAA	60	114
qH2-Bl-R	AGGAAGGATGGCTATTTTCTGCT		
qH2-T23-F	ATAGATACCTACGGCTGGGAAATG	60	105
qH2-T23-R	AGCACCTCAGGGTGACTTCAT		
qTcf19-F	GATGATGAGGTCTCCCCAGG	60	107
qTcf19-R	TTTCCCTGTGGTCATTCCCC		
qPsors1C2-F	CTGTGTGCAGGAGGCATTTC	68	86
qPsors1C2-R	AGGGATCACCAGGGATTGGG		
Gm32362-F	GTCTGGAGAACCAAAGACAGCA	60	114
Gm32362-R	TTACAGCTTGGGATGCTCTTC		
Prrc2a-F	GAGATCCAGAAACCCGCTGTT	60	104
Prrc2a-F	TTCAGGCTTGGAAGGTTGGC		
Neu1-F	CCGGGATGTGACCTTCGAC	60	127
Neu1-R	CAGGGTCAGGTTCACTCGGA		
TNF-F	GTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	60	117
TNF-R	AGGCCATTTGGGAACTTCTCATC		

72 ч. Для культивирования клеток использовали смесь кондиционированной и свежей среды в соотношении 7: 3. На следующий день после пересева к клеткам добавляли дексаметазон (1 мкМ, Белмедпрепараты), а также G418 (500 мкг/мл, NeoFroxx). Спустя 4 дня клетки пересевали и культивировали в стандартной или моделирующей воспаление TS-среде. Последняя дополнительно включала 300 ед/мл интерферона-гамма (IFNγ, 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  $(T_{\circ})$  предварительно проверяли с помощью ПЦР и электрофореза в 4% агарозном геле. Последовательности праймеров, а также подобранные  $T_0$  приведены в maбл. 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 Сте-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  $Pou5f1 - Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/+}$  [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 indelмутаций в первом экзоне. Как и в случае с линией  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/+}$ , 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  $Pou5f1^{\triangle/+}$ . Важно подчеркнуть, что в аллеле  $Pou5f1^-$  сохранен интактный промотор, что позволяет оценить его функции при сравнении с аллелем *Pou5f1*<sup>Δ</sup>. Ранее мы обнаружили, что аллель  $Rosa26^{Pou5f1}$  может обеспечивать самоподдержание  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/+}$ ЭСК, однако такие клетки не способны нормально дифференцироваться, что, как мы заключили, обусловлено отсутствием в 9.8 т.п.н. *Pou5f1*-фрагменте иис-регуляторных элементов, ответственных за корректную регуляцию гена в ходе дифференцировки [17]. Таким образом, направленная дифференцировка  $Pou5f1^{\triangle/\Delta};Rosa26^{Pou5f1/+}$  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-MHC.

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

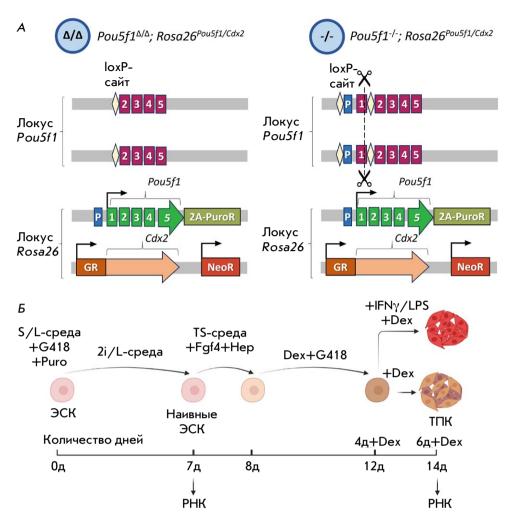


Рис. 3. Используемые линии клеток и протокол эксперимента. А - схематическое изображение сравниваемых линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Обозначения: « $\Delta/\Delta$ » – линия ЭСК Pou5f1<sup>Δ/Δ</sup>;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> с делецией эндогенного промотоpa Pou5f1; «-/-» - линия ЭСК Pou5f1-/-;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> с интактным эндогенным промотором и инактивирующей indelмутацией в первом экзоне гена: P - промотор, 1-5 - экзоны гена *Pou5f1*, 2A-PuroR – сайт Р2А и ген устойчивости к пуромицину PuroR, GR лигандсвязывающий домен глюкокортикоидного рецептора, NeoR - ген устойчивости к G418/неомицину. E – cxeма дифференцировки ЭСК в трофобластном направлении (см. «Экспериментальную часть» для текстового описания). Обозначения: Fqf4 фактор роста фибробластов 4, Нер - гепарин, Dex - дексаметазон, IFNу – интерферон-гамма, LPS - липополисахарид, ТПК – трофобластоподобные клетки. Рисунок создан с использованием BioRender

 $Pou5f1^{\Delta/\Delta};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$  и  $Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$  представлена на puc.~3A.

Так как эффективность дифференцировки ЭСК в трофэктодермальном направлении при форсированной экспрессии Сdx2 зависит от стадии плюрипотентности, на которой находятся клетки [24], на первом этапе дифференцировки ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ;  $Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$  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 (puc. 3E).

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. 4A).

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-

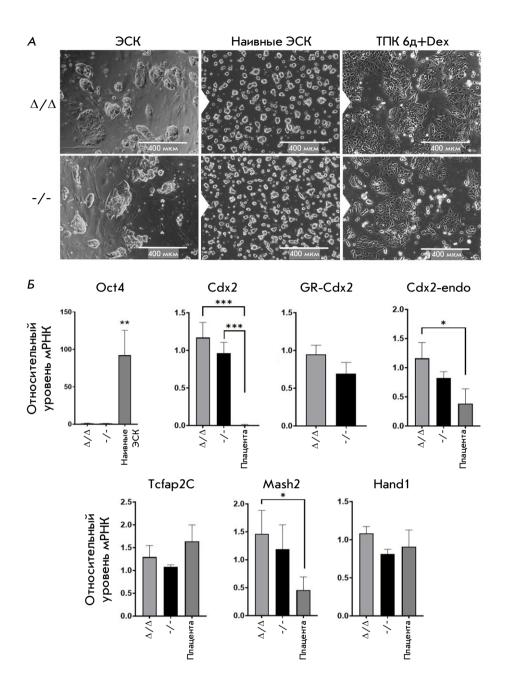
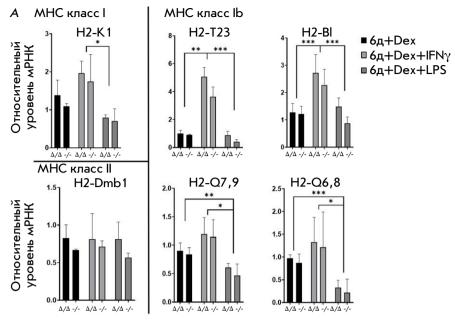


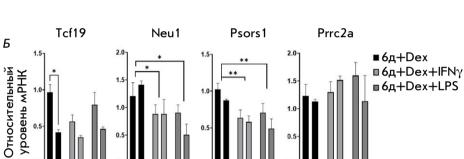
Рис. 4. Подтверждение способности линий ЭСК Pou5f1<sup>Δ/Δ</sup>;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> и Pou5f1-/-;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> к дифференцировке в трофобластном направлении. А – морфологические характеристики клеток на разных этапах дифференцировки: сывороточные (S/L) условия культивирования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

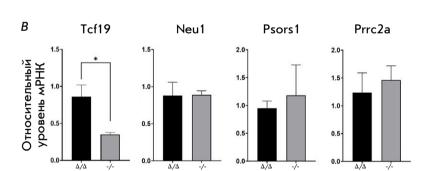
жено статистически значимых различий в экспрессии Cdx2 между линиями  $Pou5f1^{\Delta/\Delta};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$ и  $Pou5f1^{-/-}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}$ , что важно для правильной интерпретации результатов. Показана также экспрессия других трофоэктодермальных маркеров в полученных ТПК (Tcfap2C,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

#### Оценка влияния промоторной области Pou5f1 на экспрессию генов локуса Pou5f1-MHC

В ходе эксперимента клетки были разбиты на группы и подвергнуты воздействию IFN у или липополисахарида (LPS). IFNy 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-Bl*, *H2-Dmb1*, H2-Q6,8, H2-Q7,9) были вызваны только условиями культивирования, но не отличались между







 $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx^2}$  и  $Pou5f1^{-/-}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx^2}$  ЭСК (puc. 5A). Единственным из генов, чья экспрессия статистически значимо различалась между ЭСК двух генотипов, был Tcf19 (puc. 5B). Следует отметить, что в недифференцированных ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx^2}$ , культивируемых в наивных (2i/L) условиях, экспрессия Tcf19 была уже повышена по сравнению с ЭСК  $Pou5f1^{-/-}$ ; $Rosa26^{Pou5f1/Cdx^2}$  (puc. 5B).

#### 26Pou5f1/Cdx2 и Pou5f1-/-;Rosa-26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> в стандартных и провоспалительных условиях культивирования. A, E — сравнение относительного уровня мРНК между линиями ЭСК Pou5f1<sup>Δ/Δ</sup>;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> и Pou5f1<sup>-/-</sup>;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup>спустя 6 дней культивирования с дексаметазоном (Dex) в стандартных и провоспалительных (с добавлением IFNy или LPS) условиях. Представлены результаты анализа экспрессии генов МНС классов I и II (A) и генов локуса Pou5f1-MHC с ранее показанной цис-регуляторной активностью в отношении Pou5f1 (Б). В – сравнение экспрессии генов из (Б) в недифференцированных ЭСК Pou5f1<sup>Δ/Δ</sup>;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup> и Pou5f1<sup>-/-</sup>;Rosa26<sup>Pou5f1/Cdx2</sup>, культивируемых в 2і/L-условиях. Обозначения как на рис. 3А; \*P\le 0.05, \*\*P\le 0.01, \*\*\*P\le 0.001 по ANOVA. С использованием теста Тьюки сравнивали линии $\Delta/\Delta$ и -/- при каждом условии культивирования, а также между условиями

Рис. 5. Сравнение экспрессии генов локуса *Pou5f1-MHC* 

между линиями  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}$ ; Rosa-

#### 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 цисрегуляторных 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 иис-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 MHC, один из исследуемых генов, Tcf19, оказался восприимчивым 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, accoциированных 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 мышиных 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-MHC*, а точнее, в отношении его ближайшего соседа - гена Tcf19. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение регуляторного ландшафта локуса Pou5f1-MHC в дифференцированных клетках других типов.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

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.  $\mathbb{N}_2$  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.  $N_{2}$  4. P. 372–376. doi: 10.1038/74199.
- 3. Radzisheuskaya 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.
- 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., Kulski 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.
- 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., Sarmento 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.  $\mathbb{N}_2$  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., Rossant 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., Lomelí 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., Wacławczyk 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., Batycka-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.