

# НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

## КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

### Экспрессия фактора Oct4 не требуется для самообновления соматических стволовых клеток

Транскрипционный фактор Oct4 является наиболее изученным регулятором самообновления стволовых клеток. Он экспрессируется в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты (ЭСК), где совместно с транскрипционными кофакторами Nanog и Sox-2 отвечает за супрессию дифференцировки клеток, защиту их от апоптоза и стимуляцию пролиферации [1]. При индукции дифференцировки ЭСК locus Oct4 претерпевает серию эпигенетических изменений, приводящих к его репрессии [2]. Вместе с тем Oct4 экспрессируется в ряде клеток-предшественниц различных тканей взрослого организма, где, по-видимому, выполняет те же функции, что и в ЭСК [3, 4]. Выявлена экспрессия Oct4 в мезенхимных стромальных клетках костного мозга (ММСК) и гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) [5], а также в клетках некоторых опухолей [6, 7].

Экспрессия Oct4 как в злокачественных, так и в недифференцированных клетках нормальных тканей позволяет предположить, что Oct4 не только играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК, но и отвечает за самообновление и защиту от апоптоза соматических стволовых и опухоль-иницирующих клеток. Чтобы проверить эту гипотезу, исследователи из группы С.Д. Lengner провели серию экспериментов по тканеспецифичной супрессии фактора Oct4. Были получены несколько линий мышей с делецией Oct4 в различных типах клеток: энтероцитах, ММСК, ГСК, гепатоцитах, клетках-предшественницах нейронов и глии, эпителии волосяных фолликулов. После этого авторы сравнили характеристики Oct4<sup>-</sup> популяций с популяциями дикого типа (Oct4<sup>+</sup>).

Для всех указанных типов клеток было показано, что фактор Oct4 не является необходимым для самообновления их популяций и поддержания тканевого гомеостаза, то есть способности клеток к физиологической и посттравматической регенерации ткани. Иммуногистохимическое исследование образцов Oct4<sup>-</sup> кишечного эпителия выявило нормальное распределение пролиферирующих клеток в криптах. Для ММСК было показано, что отсутствие экспрессии Oct4 никак не влияет на динамику их пролиферации и на их способность дифференцироваться в клетки мезенхимального ряда. Мутантные по Oct4 ГСК при трансплантации

их животным, подвергшимся сублетальному радиационному облучению, были способны полностью восстанавливать кроветворение. Для проверки регенерационного потенциала Oct4<sup>-</sup> гепатоцитов авторы произвели резекцию 75% ткани печени, однако восстановление органа заняло 2 месяца, как и в контрольной группе. Животные с делецией Oct4 в нервной ткани также не демонстрировали никаких нарушений двигательной активности и поведения (период наблюдения за ними составлял один год). Не повлияло отсутствие Oct4 и на функции эпителия волосяных фолликулов.

Проведя весьма тщательное и детальное исследование, включившее эксперименты как *in vitro*, так и *in vivo*, авторы работы смогли сформулировать обоснованную гипотезу о том, какую роль играет экспрессия Oct4 в стволовых клетках взрослого организма. Они отмечают, что экспрессия данного фактора в соматических клетках невысока. Более того, при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) она определяется только после 30–40 циклов амплификации кДНК, что может быть следствием присутствия в геноме млекопитающих нескольких Oct4-псевдогенов. Высока вероятность, что Oct4, выявляющийся в клетках-предшественницах тканей взрослого организма, неактивен. Авторы не определяли эффектов делеции Oct4 в клетках опухолей, но предполагают, что в злокачественных новообразованиях Oct4 также не играет ключевой роли в стимуляции пролиферации и защите клеток от апоптоза.

Авторы делают вывод о том, что транскрипционный фактор Oct4, экспрессирующийся на низком уровне в соматических клетках-предшественницах, не играет роли в поддержании их пролиферации и тканевого гомеостаза, как это характерно для ЭСК. Он также не играет роли при канцерогенезе, когда опухоли формируются из соматических клеток. Следует отметить, что всё же существует три типа опухолей, при которых достоверно повышена экспрессия активного Oct4, однако это связано с геномными перестройками, приводящими к перемещению локуса Oct4 под контроль активных промоторов, но не с реактивацией регуляторных элементов гена Oct4, задействованных в ЭСК [8]. Таким образом, экспрессию Oct4 в соматических стволовых клетках можно назвать рудиментом экспрессии эмбрионального генома.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–56.
2. Feldman N., Gerson A., Fang J. et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 188–94.
3. Moriscot C., De Fraipont F., Richard M.J. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the

endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells* 2005; 23: 594–603.

4. Morris R.J., Liu Y., Marles L. et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 411–7.

5. Pallante B.A., Duignan I., Okin D. et al. Bone marrow Oct3/4<sup>+</sup> cells differentiate into cardiac myocytes via age-dependent paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 2007; 100: e1–e11.

6. Ngan K.W., Jung S.M., Lee L.Y. et al. Immunohistochemical expression of OCT4 in primary central nervous system germ cell tumours. *J. Clin. Neurosci.* 2008; 15: 149–52.

7. Webster J.D., Yuzbasiyan–Gurkan V., Trosko J.E., Chang C.C., Kiupel M. Expression of the embryonic transcription factor Oct4 in canine neoplasms: a

potential marker for stem cell subpopulations in neoplasia. *Vet. Pathol.* 2007; 44(6): 893–900.

8. Yamaguchi S., Yamazaki Y., Ishikawa Y. et al. EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43: 217–22.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K. et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 403–15

## Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

В настоящее время активно ведутся исследования в области получения плюрипотентных соматических клеток животных и человека. Принципиально описаны два пути, посредством которых это может быть достигнуто: использование методов клонирования (например, клеточного слияния, переноса ядер соматических клеток в овоцит второго деления мейоза (somatic cell nuclear transfer, SCNT)) [1–3] и индукция репрограммирования с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPS cells), сходных с ЭСК [4–7]. К настоящему времени уже получены iPS клетки мышей [7], а методом SCNT клонирован целый ряд животных от грызунов до приматов [1–3]. Предпринимались попытки получения плюрипотентных клеток, сходных с ЭСК человека, посредством слияния соматических и эмбриональных клеток. Однако данная методика приводила к формированию популяций тетраплоидных гибридных клеток, свойства которых не в полной мере соответствовали стандартным характеристикам ЭСК [8].

Концентрирование интересов клеточных технологов вокруг исследований, связанных с выделением совместимых плюрипотентных клеток, обусловлено возможностью использования их в моделировании и изучении заболеваний человека, открытии, тестировании и совершенствовании лекарственных препаратов, биологически активных веществ, а также для терапевтического применения при большом спектре заболеваний [5].

Одновременно 20 ноября 2007 года S. Yamanaka и J.A. Thomson в on-line версиях журналов Cell и Science, соответственно, опубликовали материалы исследований по получению iPS клеток человека. В этих работах индукцию плюрипотентности производили на разных клеточных культурах и сравнивали полученные клетки между собой и с контролем – ЭСК человека. S. Yamanaka использовал взрослые дермальные фибробласты, веретеновидные синовиоциты и неонатальные фибробласты крайней плоти, а J.A. Thomson – фетальные и неонатальные фибробласты.

Схема репрограммирования предполагает внедрение в клетки исходной культуры дифференцированных клеток генов плюрипотентности, сверхэкспрессия которых призвана вернуть дифференцированную клеточную популяцию к плюрипотентному состоянию. В качестве индукторов репрограммирования K. Takahashi и S. Yamanaka в 2006 году предложили квартет транскрипционных факторов, выявленных ими из 24 претендентов: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 [7], который и был использован ими в описываемой работе. Oct4 и Sox2 являются ключевыми факторами регуляции пролиферации и плюрипотентности стволовых клеток и характеризуются

высоким уровнем экспрессии в ЭСК, снижающимся в процессе дифференцировки [9]. Вовлечение Klf4 и c-Myc в процессы репрограммирования может быть связано с их ролью в качестве модификаторов хроматина, способствующих активации Oct4 и Sox2. В свою очередь, J.A. Thomson с коллегами на начальном этапе исследования выбирали гены, необходимые для инициации репрограммирования, из 14 кандидатов. В результате была осуществлена замена Klf4 и c-Myc, входящих в стандартный набор транскрипционных факторов «стволовости», на Nanog и Lin28. Роль Nanog, наряду с Oct4 и Sox2, общепризнанна в индукции плюрипотентности соматических клеток [9, 11], тогда как существенная значимость Lin28 в репрограммировании подтверждена не была. Однако необходимость замены c-Myc представляется вполне целесообразной. Выявлена его негативная роль, заключающаяся в индукции апоптоза ЭСК человека [12], а также стимуляции в 20% случаев опухолевой трансформации iPS клеток мышей при реактивации соответствующей области ретровирусного вектора [13]. Интересно, что в исследовании S. Yamanaka были внесены некоторые изменения в методику индукции плюрипотентности, не использованные в работе J.A. Thomson. В частности, были предприняты мероприятия для повышения эффективности использования пула ретровирусов: фибробласты предварительно трансдуцировались лентивирусными векторами, которые содержали гены мышиных рецепторов для ретровирусов – Slc7a1. Это повысило эффективность дальнейшего введения векторов с Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 на 60%. Кроме того, особенностью работы S. Yamanaka является использование с седьмого дня культивирования среды, обогащенной bFGF, который стимулирует пролиферацию ЭСК человека.

В исследованиях селекция культур iPS клеток проводилась на основании морфологического соответствия ЭСК человека (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, четкая визуализация ядер). Иммунофенотип полученных клеток в обоих исследованиях соответствует фенотипу ЭСК человека – показана экспрессия SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 и Tra-1-81. Методом ПЦР с обратной транскрипцией продемонстрирован характерный для ЭСК высокий уровень экспрессии эндогенных Oct4 и NANOG. К тому же S. Yamanaka с соавт. оценили экспрессию и других генов-маркеров ЭСК человека – REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, hTERT, указав на дополнительное соответствие полученных в работе культур.

В исследованиях было показано деметилирование цитозиндинуклеотидных последовательностей промоторных областей генов NANOG и Oct4 в подтверждение их высокой