

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт Цитологии Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной
научно-квалификационной работы (диссертации)

**«Поиск и изучение возможных функций факторов плюрипотентности
в дифференцированных клетках»**

Кузьмин Андрей Анатольевич

03.01.03 Молекулярная биология

Искомая степень: кандидат биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Алексей Николаевич Томилин

ИНЦ РАН

Санкт-Петербург 2019

Актуальность исследования

Транскрипционный фактор Oct4 был охарактеризован в конце 80-х – начале 90-х годов 20 века [1, 2]. Он представляет собой октамер-связывающий белок, содержащий ДНК-связывающий ROU-домен и является необходимым для поддержания плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) [3-6]. Помимо культивируемых ЭСК и клеток эпибласта, экспрессия Oct4 была обнаружена в первичных половых клетках (ППК), что позволяет описать ее как экспрессию в зародышевой линии [7, 8]. Являясь важным игроком в биологии стволовых клеток, Oct4 интенсивно исследуется в последнее время. К настоящему моменту известно, что Oct4 является так называемым пионер-фактором, в чьи функции входит связывание с закрытыми регионами хроматина с возможностью привлечения других транскрипционных факторов и прочих участников ремоделирования хроматина [9]. Это свойство частично объясняет возможность Oct4 служить одним из факторов репрограммирования дифференцированных клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [10]. Кроме того, отходя от понятия плюрипотентности, было отмечено, что Oct4 способен увеличивать клеточную пластичность. Действительно, недавние исследования показали, что эктопическая экспрессия Oct4 способна репрограммировать фибробласты и клетки крови в нейрональные клетки без достижения состояния плюрипотентности [11, 12]. В дополнение, согласно проведенным исследованиям, Oct4 ответственен за переключение фенотипа гладкомышечных клеток в атеросклеротических бляшках, связываемое с увеличением клеточной пластичности [13]. Также существуют данные, согласно которым Oct4 является маркером раковых стволовых клеток [14]. Таким образом, Oct4 может быть вовлечён в различного рода патологии, и доказательство его участия в них могут послужить основой для будущей терапии.

Научная новизна работы

Для того чтобы максимально полно охарактеризовать органы и типы клеток, в которых возможна экспрессия Oct4, мы создали двухкомпонентную генетическую систему, позволяющую делать это в автоматическом режиме. Работа конструкций основывается на использовании двух сайт-специфичных рекомбиназ – FlpO и Cre – и объединяет в себе принципы индуцибельных и конститутивных систем, представленных ранее для отслеживания экспрессии генов. Созданная система успешно протестирована на культивируемых клетках мыши.

Теоретическое и прикладное значение работы

Спроектированная и протестированная система дополняет и расширяет возможности существующих на данный момент методов отслеживания экспрессии генов. В настоящий момент ведутся работы по получению линии трансгенных мышей, а также линий опухолевых клеток, несущих созданные нами конструкции. В случае обнаружения экспрессии Oct4 в клетках или тканях, в которых она ранее не детектировалась, наше исследование поможет по-новому взглянуть на работу транскрипционного фактора Oct4 и его роль в развитии. На практике полученные знания смогут быть использованы также для терапевтических целей.

Объект исследования

Мышь – в качестве модельного организма; эмбриональные стволовые клетки мыши; клетки линии нейробластомы мыши Neuro -2a.

Предмет исследования

Ген *Oct4 (Pou5f1)*, его экспрессия.

Цель и задачи исследования

Цель:

Создание системы мониторинга экспрессии транскрипционного фактора *Oct4* в клеточных линиях мышей.

Задачи:

- 1) Разработать систему детекции экспрессии гена *Oct4*
- 2) Сконструировать и протестировать разработанную систему
- 3) Применить сконструированную систему для анализа экспрессии гена *Oct4* в клетках мышцы, отличных от плюрипотентных стволовых и половых клеток

Материалы и методы

Плазмиды

Для CRISPR/Cas9-опосредованного нокина, была использована плаزمида pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (далее – pX330) с флуоресцентным маркером (EGFP или mCherry). Последовательность gRNA была подобрана с использованием онлайн-платформы Benchling и клонирована по сайтам BbsI в плазмиду pX330. В качестве основы для создания плазмиды Rosa26-TRE-CAG-Frt(Ert2CreErt2-STOP)Frt-tdTomato-PGKneo была использована плаزمида Ai65(RCFL-tdT) (Addgene #61577). В качестве источников для клонирования Ert2CreErt2 и FlpO рекомбиназ были использованы плазмиды pCAG-ERT2CreERT2 (Addgene #13777) и pPGKFLPobpA (Addgene #13793). В экспериментах по репрограммированию были использованы плазмиды M2rtTA и pHAGE2-OKSM [15].

Культивирование клеток

Все реагенты (если не указано иное) были приобретены у фирмы ThermoFisher Scientific. Мышиные ЭСК линии E14 Tg2a (BayGenomics) пассировали с использованием раствора 0.05% Трипсин-0.01% ЕДТА в стандартных условиях на покрытых 0.1% желатином культуральных чашках в ЭСК-среде: Knockout DMEM, 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100

Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, дополнительные аминокислоты, 50 мкМ бэта-меркаптоэтанол (Sigma) и ингибирующий фактор лейкемии (LIF). В экспериментах по репрограммированию использовали стандартную N2B27 среду, с добавлением LIF, ингибиторов: GSK3 – 3 мкМ CHIR99021 (Axon) и MEK – 1 мкМ PD0325901 (Axon) и 3мкг/мл доксициклина (Sigma). Дифференцировка в нейрональные стволовые клетки была достигнута путём образования тератом и последующего выделения и культивирования клеток на NSC-среде, состоящей из DMEM/F12 с добавлением N2, 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF, Peprotech), 20 нг/мл фактора роста фибробластов – 2 (FGF2, Peprotech).

Временная трансфекция

Эксперименты по временной трансфекции были проведены с использованием реагента FuGene HD (Promega) в стандартной среде для культивирования. За день до трансфекции, клетки были рассеяны в плотности $5 \times 10^3/\text{см}^2$ на лунки 24-луночного планшета. На следующий день среда была сменена на OptiMEM с добавлением LIF, 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и, спустя 2 часа, среда была заменена на трансфекционный микс (700 нг плазмидной ДНК, 2 мкл FuGene HD, 250 мкл OptiMEM). После 12 часов культивирования среда была снова сменена на стандартную ЭСК-среду и по истечении ещё 24 часов заменена на ту же среду с добавлением антибиотиков для отбора колоний.

Геномное редактирование

Для встраивания полученных конструкций в целевые локусы следующие ДНК-последовательности для синтеза sgRNA были использованы:

5'-GTCTCCCATGCATTCAAACCTG-3' для *Pou5f1*,

5'-ACTCCAGTCTTTCTAGAAGA-3' для *Rosa26*.

Первым этапом был отредактирован локус *Pou5f1* при помощи ко-трансфекции плазмидами pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (несущей sgRNA *Pou5f1*) и Oct4-FlpO с помощью трансфецирующего реагента FuGene HD (Promega). После селекции на пуромицине (Sigma, 1мкг/мл) в течении 4-х дней, полученные клоны были генотипированы. Отобранные клоны далее были модифицированы по локусу *Rosa26* путём ко-трансфекции плазмидами pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (несущей sgRNA *Rosa26*) и *Rosa26-Cre*. Последующий отбор проводился в течении недели на антибиотике G418 (500 мкг/мл), после чего колонии были генотипированы и проверены с помощью секвенирования для подтверждения корректного встраивания в оба аллеля.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Тотальная РНК из клеток была выделена с использованием TRIzol Reagent. Для синтеза кДНК использовалось 2-5 мкг тотальной РНК, синтез проводился M-MuLV обратной транскриптазой. Количественный ОТ-ПЦР был выполнен с использованием 5xqPCRmix-HS SYBR buffer (Evrogen) при помощи установки Bio-Rad CFX и сопряжённого с ним программного обеспечения.

Получение иПСК

Дифференцированные нейрональные стволовые клетки (НСК) мыши были высеяны за день до трансдукции на лунки 24-луночного планшета, покрытые фибронектином (10 мкг/мл), в NSC-среде. В день трансдукции клетки были заражены лентивирусами M2rtTA и pHAGE2-OKSM в той же среде. На следующий день среда была сменена с добавлением 3 мкг/мл доксицилина. Ростовая среда заменялась на свежую с добавлением доксицилина каждый день в течении 3-х дней, после чего клетки были пересеяны на лунки 6-луночного планшета, покрытые желатином и фидерными клетками (митомицин-инактивированные мышинные

эмбриональные фибробласты) [16]. Дальнейшее культивирование проводилось на N2B27 среде с добавлением доксициклина. Клетки визуализировали ежедневно при помощи EVOS™ FL Auto Imaging System.

Иммуноцитохимическая окраска клеток

Фиксирование клеток осуществляли параформальдегидом (4% раствор) с последующей пермеабиллизацией детергентом – 0.1% Triton X-100. Клетки блокировали в PBS с добавлением 1% БСА (Химмед) и 2% овечьей сыворотки (Sigma). Первичные антитела разводили в PBST с добавлением 1% БСА и 2% овечьей сыворотки и инкубировали ночь при +4. Далее раствор первичных антител отбирали и лунки промывали 5 раз PBST, после чего добавляли раствор вторичных антител (в PBST + 1% БСА + 2% овечьей сыворотки), меченых флуорохромом. Инкубировали со вторичными антителами 2 часа при комнатной температуре, дважды промывали PBST и дополнительно инкубировали с раствором DAPI 1нг/мл в PBS в течении 2 минут, после чего заменяли раствор на PBS и клетки визуализировали с помощью EVOS™ FL Auto Imaging System.

Методология исследования

Основами выбранной методологии исследования послужили методы геномного редактирования и известные методы отслеживания экспрессии генов.

Более 30 лет прошло с тех пор, как учёные при исследовании *iap* гена в геноме *Escherichia coli* впервые обратили внимание на повторяющиеся последовательности, разделёнными спейсерами [17]; больше 10 лет с момента первых публикаций, указывающих на вирусную природу таких спейсеров [18-20] и 6 лет с момента первых применений найденной системы для геномной инженерии [21-23]. К настоящему времени интенсивность использования системы CRISPR/Cas9 сильно увеличилась и продолжает расти. С её помощью возможно не только получение нокаутов по определённым генам и встраивание целевых конструкций в геном, но и,

например, мечение определённых локусов генома, активация или репрессия выбранных генов и даже манипуляция пространственной структурой хромосом [24, 25]. Система CRISPR/Cas9 – самая используемая и простая для геномного редактирования, была выбрана и нами для решения задач настоящей работы.

Что же касается методов отслеживания генной экспрессии, то они являются широко используемыми в исследованиях, посвященных биологии развития. Такие методы позволяют как отслеживать судьбу клеток, пути их миграции и дифференцировки, так и визуализировать активность генов в культуре и в процессе эмбрионального развития. Эти методы зачастую используют возможности сайт-специфичных рекомбиназ, таких как Cre, FlpO и Dre [26-28]. Эти рекомбиназы, помещённые под контроль регуляторных элементов выбранного гена, работают тандемно с репортерными генами, такими как флуоресцентные белки, бета-галактозидаза или люцифераза, экспрессирующимися под влиянием сильных конститутивных промоторов при удалении блокирующих их экспрессию стоп-сигналов (сигналы полиаденилирования), фланкированных сайтами loxP/FRT/Rox. Когда рекомбиназа начинает экспрессироваться и удаляет стоп-сигнал, активируя экспрессию репортерного гена, клетка и её потомки остаются мечеными соответствующей меткой. Однако, описанный подход не подходит для исследования генов, обладающих сложным паттерном экспрессии [29]. Для того, чтобы преодолеть такие ограничения, были разработаны индуцибельные сайт-специфичные рекомбиназы, например Cre-рекомбиназа, объединённая с лиганд-связывающим доменом эстрогенового рецептора (ERT) [30]. Такие системы позволяют выбрать временную точку, начиная с которой исследователь может отслеживать экспрессию интересующего его гена. Мы в своей работе объединили описанные принципы для создания максимально автономной системы, позволяющей детектировать экспрессию нашего гена в автоматическом режиме.

Результаты и обсуждение

Дизайн системы детекции экспрессии гена *Oct4*

Для достижения поставленной цели мы поставили задачей создать репортерную систему, которая будет конститутивно маркировать плюрипотентные клетки, которые могут временно экспрессировать *Oct4* (*Pou5f1*) ген, а также клетки, дочерные первым. Так как все клетки взрослой мыши происходят из *Oct4*-экспрессирующих клеток эпибласта, было необходимо создать условный репортер, который бы активировался индуцируемым образом после прохождения стадии эпибласта. Для этого мы спроектировали две генетические кассеты - *Oct4-Puro-2a-Floxed(tTR-STOP)-FlpO* и *Rosa26-TRE-CAG-Frt(Ert2CreErt2-STOP)Frt-tdTomato-PGKneo* (Рис. 1А,В). Вторая кассета работает таким образом, что экспрессия *tdTomato* запускается удалением стоп-последовательности, прилегающей с 5'-конца, при помощи *FlpO* рекомбиназы. В свою очередь, эта рекомбиназа помещена под транскрипционный контроль гена *Oct4*, но остаётся неактивной, пока её экспрессия не будет индуцирована (Рис. 1С). Кассета, содержащая *tdTomato*, была помещена в локус *Rosa26*, являющийся конститутивно активным во всех органах мыши, гарантируя максимальное покрытие детекции экспрессии *Oct4*. Чтобы иметь возможность запускать работу системы в интересующий нас момент времени по прошествии стадии плюрипотентности/эпибласта, мы использовали индуцируемую рекомбиназу *Ert2CreErt2* как наиболее надёжную версию *CreERT*. Использование 4-ОНТ (4-гидрокситамоксифен, далее - тамоксифен) позволяет активировать способность *Ert2CreErt2* проникать в ядро и удалять стоп-последовательность перед *FlpO*, сенсibiliзируя клетки для детекции *Oct4* экспрессии в выбранный момент времени (Рис. 1С). Кроме того, *tTR*-репрессор и TRE (Tet-response element) были добавлены в конструкции для минимизации вероятности ложной активации *Ert2CreErt2*.

Действие системы может быть разделено на три стадии. На первой стадии, соответствующей стадии плюрипотентности, система должна быть неактивной. На второй, после индукции, система потенцируется для детектирования экспрессии Oct4. Наконец, на третьей стадии, клетки, постоянно или временно экспрессирующие Oct4, а также дочерные им клетки permanently маркируются для последующей детекции (Рис. 1D).

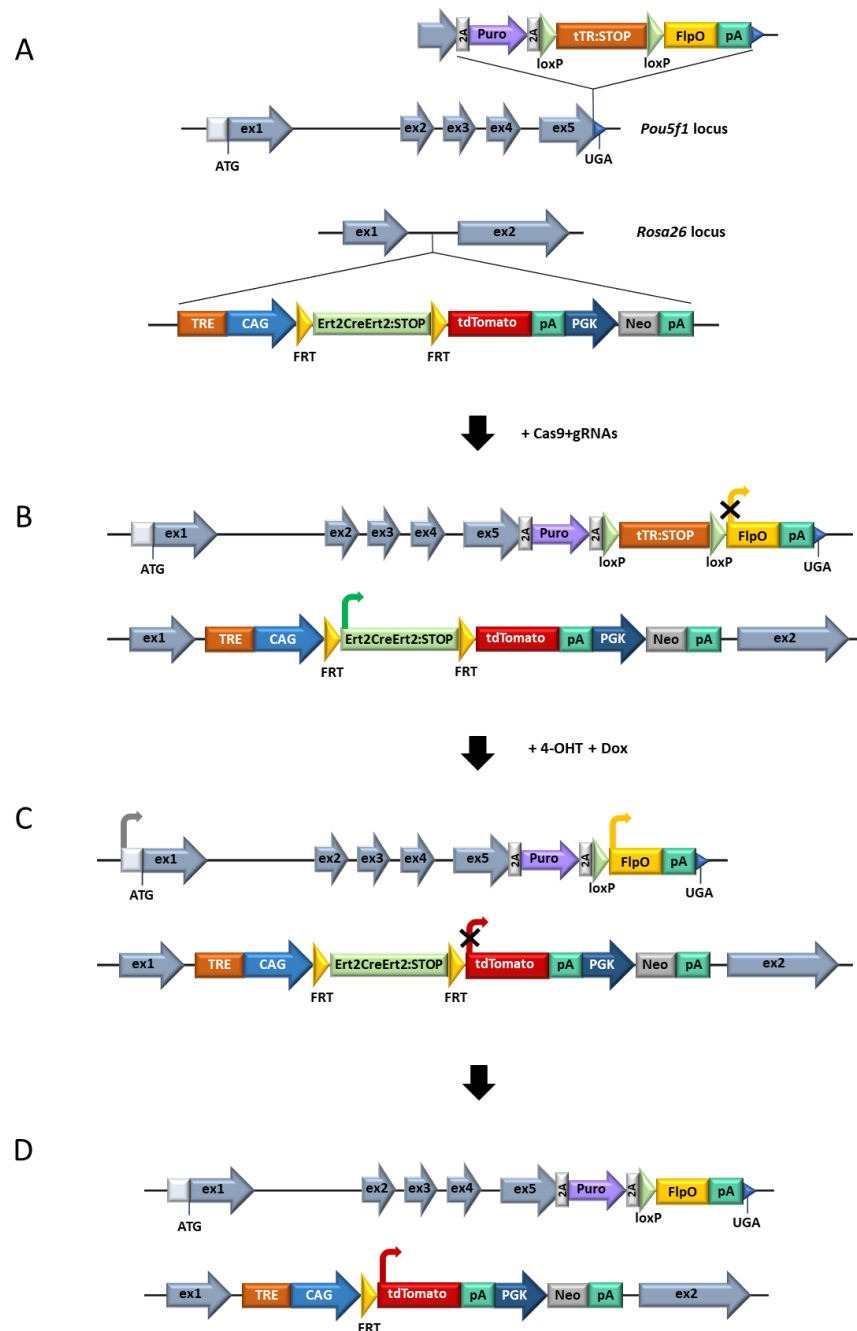


Рис. 1. Схема конструкций и работы системы для детектирования экспрессии гена *Oct4*. А) Схематическое изображение конструкций, встраиваемых в *Oct4(Pou5f1)* и *Rosa26* локусы при помощи системы CRISPR/Cas9. В) Конструкции были встроены в соответствующие локусы. Отмечено отсутствие экспрессии *FlpO*. С) После обработки тамоксифеном (4-ОНТ) и доксициклином (*Dox*) происходит удаление *tTR:STOP* последовательности. Начиная с этого момента последовательность *FlpO* может транскрибироваться. D) В случае активации экспрессии гена *Oct4*, *FlpO* опосредует удаление последовательности *Ert2CreErt2:STOP*, запуская экспрессию *tdTomato*, тем самым маркируя клетки.

Модификация ЭСК для тестирования разработанной системы

Сконструированные кассеты, фланкированные соответствующими плечами гомологии, были помещены в *Oct4* и *Rosa26* локусы с использованием CRISPR/Cas9 системы (Рис. 1а). *Oct4* локус был модифицирован, начиная с 5'-конца стоп-кодона кодирующей последовательности. Синхронная экспрессия элементов конструкции была достигнута при помощи добавления «саморазрезающихся» 2А сайтов, помещённых между последовательностями *Oct4*, пурамицин N-ацетилтрансферазы (*Puro*) и *tTR* белков (Рис 1а). Для модификации *Rosa26* локуса были выбраны широко используемые плечи гомологии, охватывающие последовательность между первым и вторым интроном. Синтетический СAG промотор был выбран как наиболее сильный, что было ранее показано в исследованиях *in vivo* и *in vitro* [31, 32]. После отбора на антибиотиках полученные клоны были генотипированы и отсеквенированы для подтверждения правильности модификаций интересующих нас локусов, затем отобранные клоны были прокариотипированы (Рис. 2А). Тесты на культуре клеток показали, что в отсутствии *Dox* и 4-ОНТ модифицированные клетки, содержащие Tet-репрессор (*tTR*) и

экспрессирующие Oct4, оставались tdTomato-негативными, активируя его экспрессию только после одновременного добавления как тамоксифена, так и доксициклина, что говорило об отлаженной работе всех компонентов системы (Рис. 2В). Работая менее эффективно, система, содержащая tTR, тем не менее, является более безопасной с точки зрения вероятности ложной активации (Рис. 2С).

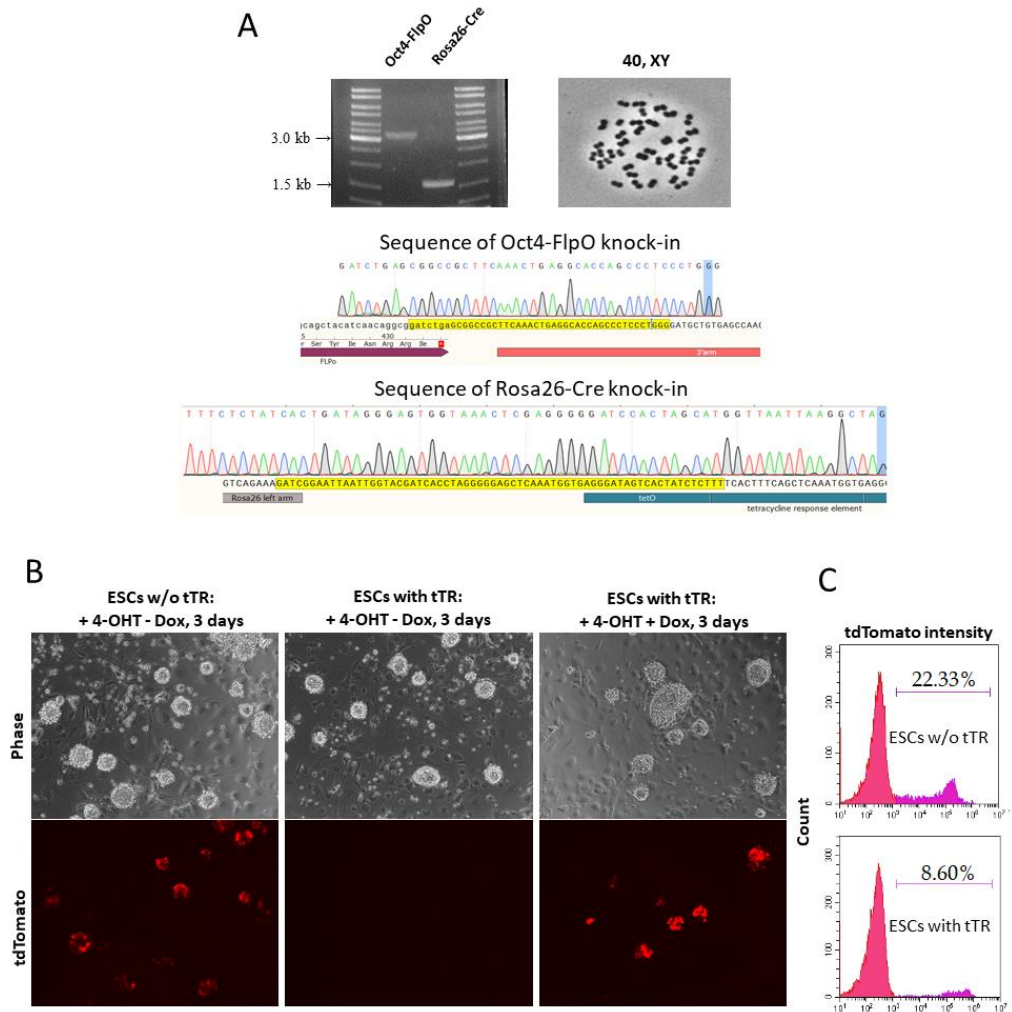


Рис. 2. Валидация полученной линии клеток и экспериментальная проверка работы системы на примере культуры ЭСК. А) Результаты генотипирования и секвенирования (слева и внизу) показывают корректную вставку в целевые локусы. Подсчёт количества хромосом (справа) говорит об интактности кариотипа. В) Показана способность клеток активировать экспрессию tdTomato после добавления тамоксифена и доксициклина. «ESCs with tTR» и «ESCs w/o tTR» - линии

ЭС клеток, соответственно, с наличием или отсутствием *tTR*-репрессора в составе одной из кассет. С) Результаты проточной цитометрии, показывающие процент клеток (эмбриональные стволовые клетки мыши), маркированных *tdTomato* при активации двух видов систем.

Помимо проверки системы, проведённые эксперименты говорят о возможности использовать её для целей, отличных от поиска экспрессии гена *Oct4*. Например, мы можем анализировать влияние какого-нибудь фактора не на репрограммирование – сложный и многопараметрический процесс, а на скорость и эффективность запуска экспрессии *Oct4*, что упрощает интерпретацию результатов.

Проверка работоспособности системы в процессе клеточного репрограммирования

Дальнейшим шагом стала проверка разработанной системы *in vitro*. Для этого нами была смоделирована ситуация, при которой клетки, находясь на стадии плюрипотентности, остаются немечеными, после чего они подвергаются дифференцировке и сенсбилизации, позволяющей детектировать реактивацию гена *Oct4*. ЭСК, несущие описанные выше модификации в локусах *Oct4* и *Rosa26*, были дифференцированы в нейрональные стволовые клетки, а затем репрограммированы в иПСК. Успешность дифференцировки была подтверждена при помощи количественного ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентной окраски, показавших экспрессию маркеров нейрональных стволовых клеток – *Nestin* и *Sox2* при полном отсутствии экспрессии *Oct4* (Рис. 3А). Полученные клетки затем культивировали на протяжении 2-х дней в присутствии тамоксифена. Далее, клетки репрограммировали в иПСК с использованием лентивирусного коктейля репрограммирующих факторов ОКSM (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2*, *cMyc*). Согласно полученным результатам, экспрессия *tdTomato* детектировалась на 6-7 сутки после инфекции ОКSM (Рис. 3В). Эти результаты соотносятся с существующими в литературе данными, согласно которым эндогенная

экспрессия Oct4 активируется на 5-6 день после начала репрограммирования мышечных фибробластов [33]. Также мы показали, что экспрессия tdTomato сохраняется в дочерних дифференцированных клетках, полученных из маркированных ЭСК (Рис. 3С).

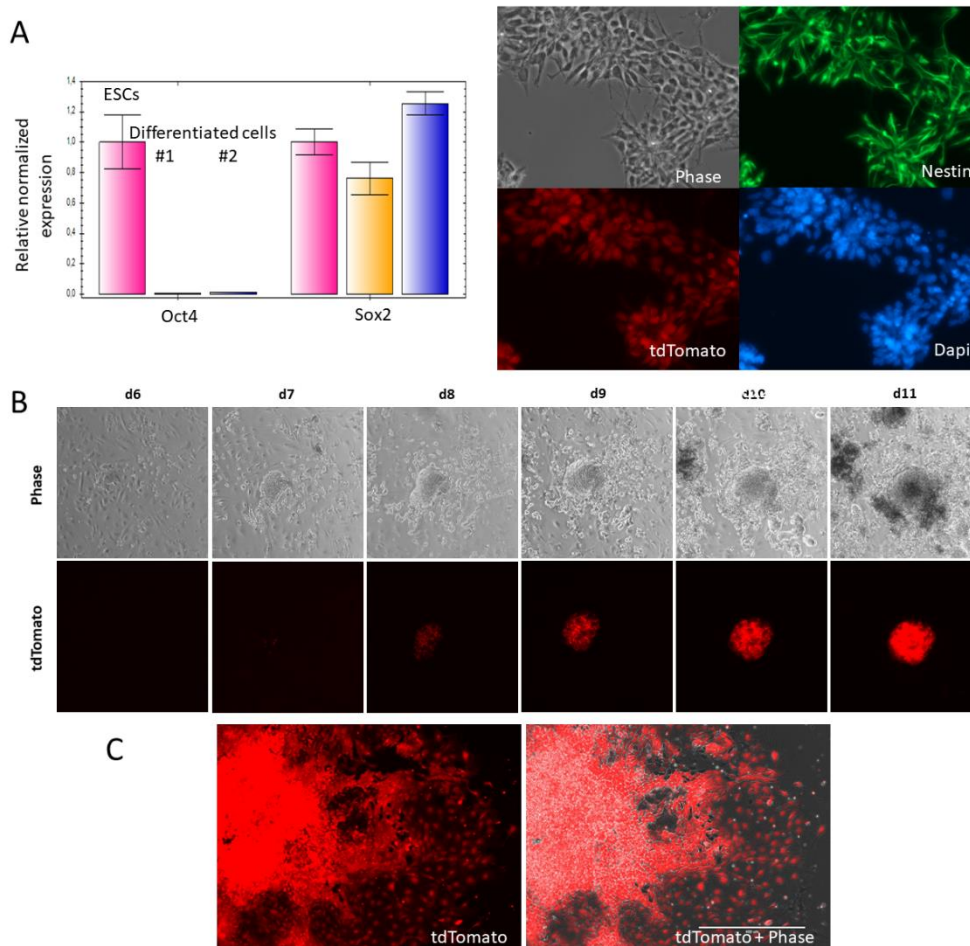


Рис. 3. Экспериментальная проверка работы системы на примере репрограммирования-дифференцировки. А) Количественный ПЦР-анализ на маркеры – Oct4 и Sox2 ЭСК и дифференцированных клеток(слева). Иммуноцитохимическая окраска дифференцированных клеток на маркеры – Sox2, Nestin (справа). В) Репрограммирование дифференцированных клеток при помощи конструкции OKSM. В нижнем ряду показана динамика активации экспрессии tdTomato в клетках, экспрессирующих эндогенный Oct4. С) Частично дифференцированная колония эмбриональных стволовых клеток сохраняет экспрессию tdTomato.

Анализ экспрессии гена *Oct4* в неплюрипотентных клетках

Для анализа экспрессии гена *Oct4* в дифференцированных клетках была выбрана широко используемая линия нейробластомы мыши Neuro-2a.

Данная линия была выбрана по причине своей опухолевой природы. Кроме того, она обладает нейрональными стволовыми свойствами, что обусловлено способностью к нейрональной дифференцировке [34]. Важность обладания нейрональными свойствами следует из желания сравнить данные клетки с нормальными неопухолевыми, о которых будет сказано ниже.

Возвращаясь к опухолевым клеткам, стоит упомянуть, что в настоящий момент большой популярностью пользуется модель раковых стволовых клеток – особенно агрессивной популяции клеток, отличительной характеристикой которых является отсутствие нормальной регуляции их роста и способность к инвазии и разрушению нормальных тканей [35]. В гетерогенной структуре опухоли только часть клеток способна к самообновлению и возобновлению опухолевого роста, например, после химиотерапии и это также считается их отличительным свойством [36]. Помимо способности к самообновлению, ещё одним свойством раковых стволовых клеток может являться экспрессия фактора плюрипотентности *Oct4* [14]. Это и стало причиной выбора раковых клеток для достижения цели настоящего исследования.

Анализ экспрессии *Oct4* мы провели в условиях гипоксии, поскольку предполагается, что такие условия важны для поддержания раковой стволовой популяции опухолевых клеток [37]. В условиях гипоксии мы наблюдали экспрессию tdTomato в популяции опухолевых клеток Neuro-2a (Рис. 4), что может свидетельствовать о запуске экспрессии гена *Oct4* в этих клетках в условиях гипоксии и подтверждать литературные данные. Однако в этих клетках мы столкнулись с проблемой «подтекания», когда

экспрессия tdTomato запускалась спонтанно, в связи с чем окончательные выводы делать преждевременно и дополнительные изыскания необходимы.

При использовании на раковых клетках данная система позволит достаточно подробно проанализировать условия, в которых может запускаться экспрессия гена *Oct4*, а так же условия, от которых она может зависеть. Кроме того, такие клетки в дальнейшем возможно отобрать и проанализировать высокопроизводительными методами, что позволит охарактеризовать их на молекулярном уровне. Это может улучшить наше понимание того, какие условия влияют на развитие опухолей, какие факторы за это отвечают и в какую сторону двигаться, чтобы с ними бороться.

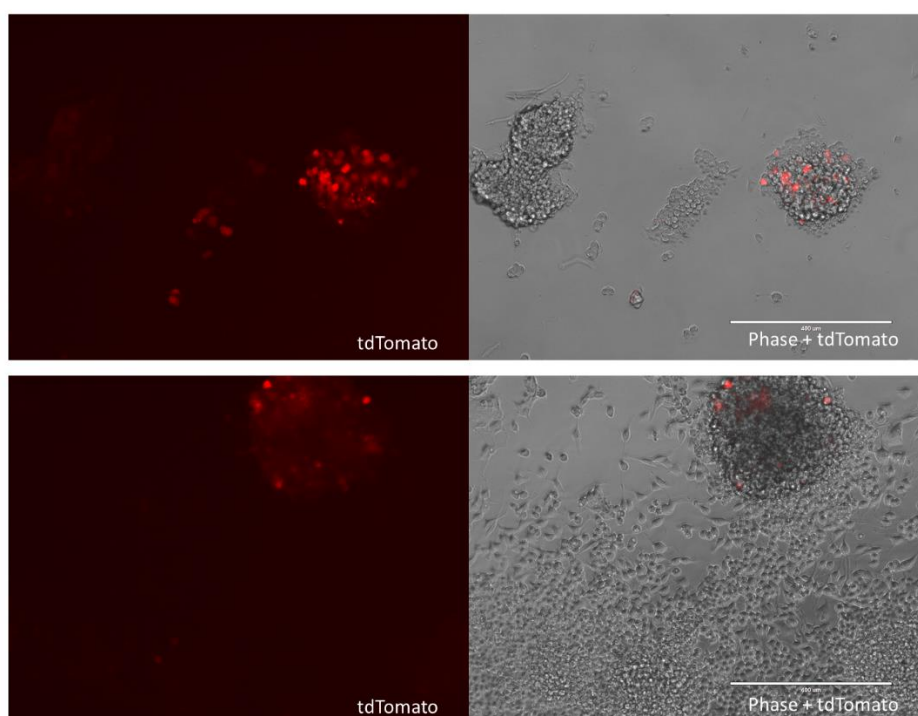


Рис. 4. Детектирование экспрессии *Oct4* в линии клеток мыши *Neuro-2a*. На рисунке показана культура клеток *Neuro-2a* в условиях гипоксии. Видно, что внутри образованных колоний наблюдается экспрессия *tdTomato*, что может свидетельствовать о запуске экспрессии *Oct4* в этих клетках.

Многообещающим кандидатом для поиска индукции экспрессии гена *Oct4* в неопухолевых клетках, по нашему мнению, являются нейрональные стволовые клетки, которые, согласно литературным данным способны к дедифференцировке [38], по аналогии с гладкомышечными клетками в атеросклеротических бляшках [13]. Эксперименты с применением разработанной системы детекции активности гена *Oct4* в нейрональных стволовых клетках ведутся в настоящий момент. В случае обнаружения экспрессии гена *Oct4* в этих клетках, мы ещё раз подтвердим, что его функционирование не ограничено эмбриональными стволовыми клетками и клетками полового пути. Это будет важное наблюдение, способствующее новому взгляду на функционирование клеток внутри организма.

Заключение

Появляются экспериментальные данные, указывающие на то, что *Oct4* может действовать вне парадигмы плюрипотентности, увеличивая клеточную пластичность *in vitro* и *in vivo*. Показано, например, что *Oct4* ответственен за переключение фенотипа гладкомышечных клеток в атеросклеротических бляшках. Мы полагаем, что функционирование *Oct4* не ограничено вовлечением в поддержание стабильности атеросклеротических бляшек, и может распространяться и на другие типы клеток, ткани и органы. Линии клеток и мыши, которые мы создаём, будут крайне полезны в попытках пролить свет на этот вопрос. Основное отличие нашей системы от широко распространённых в настоящий момент *Oct4*-EGFP репортеров состоит в том, что она способна детектировать временную экспрессию *Oct4*. Эта характеристика связана с двумя полезными свойствами системы: первое – детектирование экспрессии *Oct4* должно происходить в автоматическом режиме в любое время развития и жизни мыши, второе – потенциально высокая чувствительность системы, т.к. клетки, однажды начав экспрессировать tdTomato продолжают накапливать сигнал, делясь и пролиферируя. Очевидно также, что разработанная нами

система может быть использована для изучения паттернов экспрессии и других генов (Рис. 5).

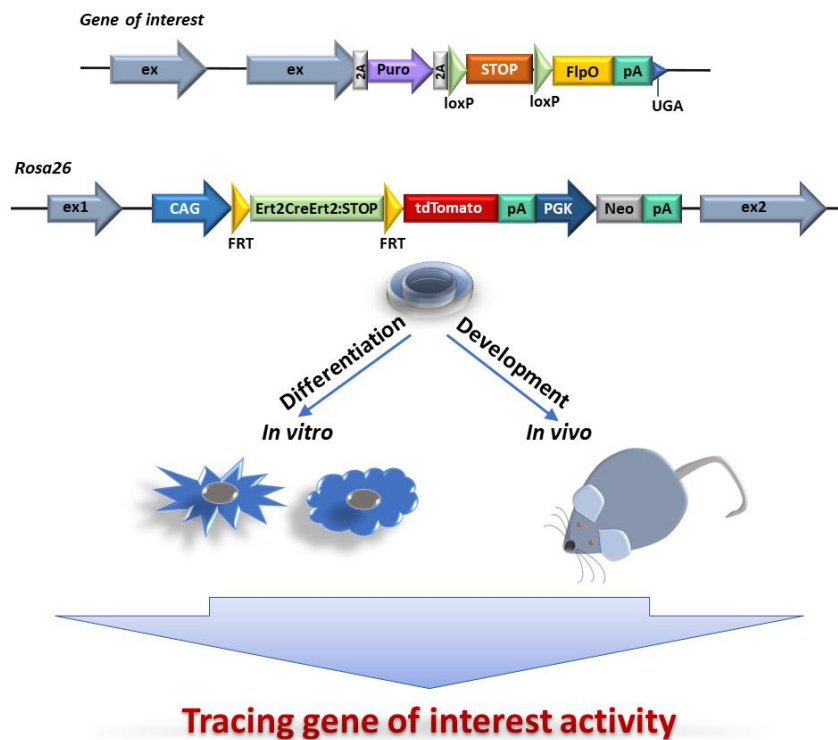


Рис. 5. Перспективы использования разработанной системы. Помимо гена *Ost4*, система может быть адаптирована и для других генов, активность которых может быть проверена в разных условиях *in vitro* и *in vivo*.

Выводы

- 1) Разработана система автоматического детектирования экспрессии транскрипционного фактора *Ost4*
- 2) Разработанная система была сконструирована и протестирована на линии ЭСК мыши и в клетках мыши в процессе клеточного репрограммирования
- 3) Получены первоначальные данные относительно экспрессии *Ost4* в опухолевых клетках

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) *Ost4* как фактор пластичности в дифференцированных клетках

- 2) Создание системы для детектирования экспрессии гена *Oct4*
- 3) Поиск потенциальных кандидатов – типов клеток или клеточных линий для проверки наличия экспрессии *Oct4*
- 4) Создание и тестирование системы на линиях мышинных клеток: эмбриональных стволовых и дифференцированных
- 5) Получение линии трансгенных мышей, несущих разработанную конструкцию

Список публикаций по теме работы

Статьи

Kuzmin AA, Ermakova VV, Sinenko SA, Ponomartsev SV, Skvortsova EV, Starkova TY, Cherepanova O, Tomilin AN. Genetic tool for fate mapping of *Oct4 (Pou5f1)*-expressing cells and their progeny past pluripotency stage. *Stem Cell Research & Therapy* (WoS IF=4.62, Q1), отослана на повторную рецензию.

Bakhmet E.I., Nazarov I.B., Gazizova A.R., Vorobyeva N.E., Kuzmin A.A., Gordeev M.N., Sinenko S.A., Aksenov N.D., Artamonova T.O., Khodorkovskii M.A., Alenina N., Onichtchouk D., Wu G., Schöler H.R., Tomilin A.N. 2019. hnRNP-K Targets Open Chromatin in Mouse Embryonic Stem Cells in Concert With Multiple Regulators. *Stem Cells* 37:1018–1029, (WoS IF=5.58, Q1). doi: 10.1002/stem.3025.

Sinenko SA, Skvortsova EV, Liskovykh MA, Ponomartsev SV, Kuzmin A.A., Khudiakov A.A., Malashicheva A.B., Alenina N., Larionov V., Kouprina N. and Tomilin AN. (2018) Transfer of synthetic human chromosome into human induced pluripotent stem cells for biomedical applications. *Cells* 7, 261, doi:10.3390/cells7120261, WoS IF=4.8

Тезисы

A. Kuzmin, S. Sinenko, E. Skvortsova, E. Sytnik, A. Tomilin. «Searching for Oct4: still active in differentiated cells?» Abstracts for Cell Technologies at The Edge: Research & Practice (CTERP). 2016. P 40.

S. Sinenko, A. Kuzmin, I. Kozhuharova, A. Borodkina, E. Burova, E. Skvortsova, A. Tsimokha, G. Owens, O. Cherepanova, A. Tomilin. «Stress-induced function of Oct4 in murine smooth muscle cells: development of molecular biology tools to study stress induced reprogramming». Abstracts for Cell Technologies at The Edge: Research & Practice (CTERP). 2016. P 47.

Кузьмин, А. Создание и применение сенсibiliзирующих и визуализирующих генетических конструкций в контексте активности транскрипционного фактора Окт4 /А. Кузьмин [и др.]// XVIII зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 11–16 марта 2017 г.) : тез. Докл. – Гатчина, 2002. – С 99.

A.A. Kuzmin, M. A. Liskovykh, A.N. Tomilin. «Sensibilization methods in the field of pluripotency and regenerative medicine». Book of abstracts. 4th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures P. 240-241.

A. Kuzmin, E. Bakhmet, A. Selenina, A. Tomilin. “Creation of a set of dna constructs for genome editing of Oct4 locus with applications in stem cell biology”. ОНТОГЕНЕЗ, 2018, том 49, №4 ПРИЛОЖЕНИЕ, с. 22. Doi: 10.1134/S0475145018010081

A. Kuzmin, A. Tomilin. 2018 “Creation of a sensor system for independent detection of expression of the pluripotency factor Oct4” FEBS Open Bio, 8: P.05-019-Mon. doi:10.1002/2211-5463.12453

**Участие в научных конференциях, симпозиумах, семинарах,
выставках**

CTERP 2016 (international conference cell technologies at the edge: research & practice / recent achievements in stem cells research). Санкт-

Петербург. Россия. 6-8 апреля 2016 года. Постерный доклад: «Searching for Oct4: still active in differentiated cells?»

XVIII Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Гатчина. 11 - 16 марта 2017 г.

4th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures. April 3 – 6, 2017. Saint Petersburg, Russia. Abstract: “Sensibilization methods in the field of pluripotency and regenerative medicine”

The second international conference “Cell technologies at the edge: From research to practice» (CTERP) “Translational research in cell therapy”, Moscow, April 11 - 13, 2018. Poster session. Thesis: “Creation of a set of DNA constructs for genome editing of Oct4 locus with applications in stem cell biology”.

43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic. 7-12 July 2018. Poster session. Abstract: “Creation of a sensor system for independent detection of expression of the pluripotency factor Oct4”

Список литературы

1. Schöler HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. The EMBO journal. 1989;8(9):2551-7.
2. Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. The EMBO journal. 1989;8(9):2543-50.
3. Anderson R, Fässler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, et al. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the

- germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* (Cambridge, England). 1999;126(8):1655-64.
4. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379-91.
 5. Niwa H, Miyazaki J-i, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*. 2000;24(4).
 6. Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 1990;344(6265):435-9.
 7. Radzishchanskaya A, Silva J. Do all roads lead to Oct4? The emerging concepts of induced pluripotency. *Trends in Cell Biology*. 2014;24(5):275-84.
 8. Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration*. 2014;3(1):7.
 9. Iwafuchi-Doi M, Zaret KS. Pioneer transcription factors in cell reprogramming. *Genes & Development*. 2014;28(24):2679-92.
 10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
 11. Mitchell RR, Szabo E, Benoit YD, Case DT, Michael R, Alamilla J, et al. Activation of neural cell fate programs toward direct conversion of adult human fibroblasts into tri-potent neural progenitors using OCT-4. *Stem cells and development*. 2014;23(16):1937-46.
 12. Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*. 2010;468(7323):521-6.
 13. Cherepanova OA, Gomez D, Shankman LS, Swiatlowska P, Williams J, Sarmiento OF, et al. Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective. *Nature Medicine*. 2016;22(6):657-65.

14. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *International journal of cancer*. 2007;120(7):1598-602.
15. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*. 2009;27(3):543-9.
16. Skvortsova EV, Sinenko SA, Tomilin AN. Immortalized murine fibroblast cell lines are refractory to reprogramming to pluripotent state. *Oncotarget*. 2018;9(81):35241-50.
17. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1987;169(12):5429-33.
18. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(Pt 8):2551-61.
19. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*. 2005;60(2):174-82.
20. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005;151(Pt 3):653-63.
21. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23.
22. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*. 2013;10(10):957-63.
23. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*. 2013;2:e00471.

24. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(1):5-15.
25. Morgan SL, Mariano NC, Bermudez A, Arruda NL, Wu F, Luo Y, et al. Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping. *Nature communications.* 2017;8:15993.
26. Kranz A, Fu J, Duerschke K, Weidlich S, Naumann R, Stewart FA, et al. An improved Flp deleter mouse in C57Bl/6 based on Flpo recombinase. *genesis.* 2010;48(8):512-20.
27. Hsu YC. Theory and Practice of Lineage Tracing. *STEM CELLS.* 2015;33(11):3197-204.
28. Kretzschmar K, Watt FM. Lineage Tracing. *Cell.* 2012;148(1-2):33-45.
29. Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, et al. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell.* 2004;6(1):133-44.
30. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;237(3):752-7.
31. Chen C-mM, Krohn J, Bhattacharya S, Davies B. A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a Φ C31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PloS one.* 2011;6(8).
32. Tchorz JS, Suply T, Ksiazek I, Giachino C, Cloëtta D, Danzer C-PP, et al. A modified RMCE-compatible Rosa26 locus for the expression of transgenes from exogenous promoters. *PloS one.* 2012;7(1).
33. Greder LV, Gupta S, Li S, Abedin MJ, Sajini A, Segal Y, et al. Analysis of endogenous Oct4 activation during induced pluripotent stem cell reprogramming using an inducible Oct4 lineage label. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2012;30(11):2596-601.

34. Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoub M. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of neuroscience methods*. 2010;186(1):60-7.
35. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(11):899-904.
36. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275-91.
37. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell cycle*. 2009;8(20):3274-84.
38. Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*. 2004;430(6997):350-6.