

УДК 576.35:577.112.8:577.21:591.3

Молекулярные основы поддержания самообновления и плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток млекопитающих

С. П. Медведев^{1,2}, А. И. Шевченко^{1,2}, С. М. Закиян^{1,2,3*}¹Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10²Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8³Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. ак. Тимакова, 2

*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.07.2010 г.

РЕФЕРАТ Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) млекопитающих обладают рядом специфических свойств, делающих их уникальным объектом фундаментальных и прикладных исследований. Находясь в культуре, они способны неограниченно по времени поддерживать недифференцированное состояние и давать во время дифференцировки производные всех трех зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы, т.е. потенциально могут производить более 200 типов клеток, из которых состоит тело взрослого млекопитающего. Эти свойства ЭСК называются самообновлением и плюрипотентностью. В обзоре рассмотрены основные сигнальные пути, участвующие в поддержании плюрипотентности ЭСК, дается характеристика основных генов, входящих в подсистему «внутренних регуляторов плюрипотентности», описываются кодируемые ими белки, их регуляция и взаимодействие с другими факторами. Кроме того, в обзоре описываются роль эпигенетических механизмов и микроРНК в системе поддержания самообновления и плюрипотентности ЭСК, а также связь плюрипотентности и процесса инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, транскрипционные факторы, инактивация X-хромосомы.

СОКРАЩЕНИЯ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ТСК – трофобластные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ВКМ – внутренняя клеточная масса, ВКНП – высококонсервативные некодирующие последовательности.

ЭМБРИОГЕНЕЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Развитие организма любого млекопитающего начинается с единственной клетки – зиготы. В результате последовательного деления и дифференцировки клеток формируется организм, который состоит более чем из 200 типов клеток, каждый из которых, образуя при взаимодействии с другими типами клеток ткани и органы, выполняет специфическую функцию. Специфичность выполняемых функций, биохимии и физиологии каждого типа клеток обеспечивается характерным паттерном экспрессии генов. Все разнообразие РНК, транскрибируемое в ядре клетки,

носит название «транскриптом», который, в отличие от генома, различается между клетками разного типа в пределах организма. Транскриптом клетки определяется тесным взаимодействием генетической и эпигенетической систем. К генетической системе можно отнести систему белков – транскрипционных факторов, модулирующих экспрессию генов-мишеней на уровне транскрипции. В эпигенетическую систему входят белки, обеспечивающие дифференциальную транскрипцию генов через изменение и поддержание структуры хроматина путем химической модификации ДНК промоторных областей генов (метилирование цитозина в положении 5', в CpG-динуклеотидах), метилирования и ацетилирования гистонов и других

модификаций. В регуляции транскрипции генов участвует также система микроРНК, регулирующая экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [1].

На различных стадиях онтогенеза млекопитающих можно выделить типы клеток, стоящие особняком от всех остальных, так называемые стволовые клетки. Стволовые клетки характеризуются уникальным транскриптомом и совокупностью компонентов генетической и эпигенетической систем, которые позволяют им поддерживать самообновление, т.е. оставаться стволовыми клетками (ограниченное или продолжительное время, в зависимости от типа стволовых клеток), а также сохранять способность к дифференцировке в различные клеточные производные [2]. В зависимости от широты спектра клеточных типов, в которые могут дифференцироваться стволовые клетки, их разделяют на несколько видов [2].

Тотипотентные клетки – клетки, способные давать во время дифференцировки все возможные клеточные производные, из которых состоит организм. Клетки, обладающие свойством тотипотентности, также участвуют в формировании экстраэмбриональных органов и тканей, например, плаценты. У млекопитающих тотипотентными являются только зигота и бластомеры во время первых делений дробления.

Плюрипотентные клетки – клетки, способные производить во время дифференцировки производные трех примитивных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. В онтогенезе из плюрипотентных клеток может полностью сформироваться тело взрослого организма. Однако эти клетки не способны дать начало экстраэмбриональным органам и тканям. Плюрипотентными являются клетки внутренней клеточной массы и эпибласта эмбрионов млекопитающих, а также их производные – культивируемые *in vitro* эмбриональные стволовые клетки. Кроме того, плюрипотентными являются эмбриональные герминальные клетки – производные предшественников гамет, и эпибластные стволовые клетки, получаемые из эпибласта постимплантационных эмбрионов мыши [3–5]. В последние годы активно развиваются технологии получения плюрипотентных клеток из дифференцированных клеток взрослого организма путем экспрессии в них экзогенных факторов. Этот тип клеток получил название индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). К настоящему моменту получены ИПСК человека, мыши и ряда других млекопитающих [6–8].

Мультипотентные клетки – это региональные стволовые клетки (стволовые клетки взрослого организма, находящиеся среди дифференцированных клеток различных тканей), которые способны диф-

ференцироваться в несколько типов клеток. Пример клеток такого типа – гематопозитические стволовые клетки, дающие во время дифференцировки клетки крови.

Унипотентные клетки – это клетки, являющиеся предшественниками только лишь одного типа клеток. Например, сперматогониальные стволовые клетки – предшественники мужских гамет.

Как уже упоминалось, у млекопитающих зигота и бластомеры эмбриона вплоть до 8-клеточной стадии развития являются тотипотентными. Потенциально из каждого бластомера 8-клеточного эмбриона можно получить все возможные клеточные производные, включая клетки, из которых состоят экстраэмбриональные органы. Это свойство бластомеров подтверждается в экспериментах по получению агрегационных химер. Однако уже на стадии 8 бластомеров и при переходе к стадии 16 бластомеров (стадии морулы) происходит первое дифференцировочное событие в предимплантационном эмбриогенезе млекопитающих. Каждый из 8 бластомеров подвергается либо симметричному делению, образуя две полярные наружные клетки морулы, либо делится асимметрично, давая полярную наружную клетку и неполярную клетку меньшего размера, находящуюся внутри эмбриона. Таким образом, после четвертого деления зиготы образуется эмбрион, состоящий из двух первых специализированных групп клеток: наружных полярных и внутренних неполярных [9]. В ходе последующих двух клеточных делений наружные полярные клетки морулы формируют наружный клеточный слой бластоцисты – трофоэктодерму. Трофоэктодерма необходима для имплантации эмбриона в слизистую оболочку матки и формирования плаценты. При формировании трофоэктодермы клетки располагаются таким образом, что образуют шарообразную структуру с полостью внутри – бластоцелью. Внутренние неполярные клетки морулы преобразуются во внутреннюю клеточную массу (ВКМ) эмбриона, расположенную на одном из полюсов бластоцисты с внутренней стороны слоя трофоэктодермы. Перед имплантацией эмбриона в матку ВКМ разделяется на два слоя: эпибласт (примитивная/эмбриональная эктодерма) и гипобласт (примитивная/эмбриональная энтодерма). В ходе эмбрионального развития из эпибласта формируется тело эмбриона, все его ткани и органы, развивающийся гипобласт, в свою очередь, образует желточный мешок. Таким образом, предимплантационный эмбрион млекопитающих – бластоциста – состоит из трех компартментов: трофоэктодермы, гипобласта и эпибласта, два из которых (трофоэктодерма и гипобласт) дают начало экстраэмбриональным (внезародышевым) органам и тканям, а один

формирует во время эмбриогенеза все ткани тела эмбриона [10]. Структура предимплантационных эмбрионов очень схожа у различных видов млекопитающих. Так, бластоцисты приматов очень сходны по структуре с бластоцистами грызунов, различия заключаются лишь в большем числе клеток, из которых состоит эмбрион, и различной морфологии эмбриона после его имплантации. Однако, несмотря на схожесть структуры, бластоцисты приматов отличаются от эмбрионов грызунов по времени разделения компартментов (трофобласта, гипобласта и эпибласта), а также характеризуются более длительным предимплантационным развитием (7–10 сут у приматов против 4 сут у мыши) [11].

Все три компартмента предимплантационных эмбрионов млекопитающих: эпибласт, трофобласт и гипобласт – являются источниками стабильных линий стволовых клеток, названных соответственно эмбриональными стволовыми клетками, трофобластными стволовыми клетками и стволовыми клетками экстраэмбриональной энтодермы. Культивируемые стволовые клетки сохраняют большинство свойств, характерных для их предшественников. Это касается паттерна экспрессии генов, эпигенетических характеристик, многих биохимических и физиологических показателей. Наиболее наглядно «стволовой» статус и соответствие клеточных линий их предшественникам, существующим *in vivo*, доказывается путем инъекции клеток в реципиентную бластоцисту. После инъекции ЭСК, ТСК и клетки экстраэмбриональной энтодермы включаются в эмбриогенез, участвуя в формировании соответствующих эмбриональных либо экстраэмбриональных тканей и органов. Все три типа клеточных линий, получаемых из предимплантационных эмбрионов, нуждаются в специфических условиях культивирования для поддержания своего «стволового» статуса. К таким условиям относятся состав среды и наличие ростовых факторов, иногда требуется сокультивирование с другими типами клеток, выделяющими необходимые для поддержания недифференцированного состояния стволовых клеток факторы [12–18].

Среди трех типов стволовых клеток, получаемых из бластоцист, особое место занимают эмбриональные стволовые клетки, обладающие свойствами самообновления и плюрипотентности. Самообновление подразумевает способность бесконечно симметрично делиться, давая две плюрипотентные клетки. Как уже упоминалось выше, плюрипотентность – это свойство стволовых клеток дифференцироваться в производные всех трех примитивных зародышевых листков, но не внезародышевых тканей. Именно плюрипотентность делает ЭСК уникальной моделью для исследования процессов, происходя-

щих во время дифференцировки клеток, открывает широкие перспективы использования ЭСК в фундаментальных исследованиях биологических явлений, происходящих на ранних этапах онтогенеза млекопитающих (например, процесса инактивации X-хромосомы, эпигенетических изменений генома и др.). Кроме того, ЭСК находят применение и в прикладных исследованиях, их уникальные свойства могут использоваться при тестировании новых лекарственных препаратов, исследовании токсического эффекта химических соединений. ЭСК являются перспективным источником материала для заместительной клеточной терапии заболеваний человека, хотя безопасность их применения в данной области по сей день тщательно изучается и обсуждается научным сообществом.

В настоящее время ведется активное исследование молекулярных основ самообновления и плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток. На сегодняшний день известно, что поддержание плюрипотентного статуса клеток предимплантационных эмбрионов и ЭСК обеспечивается сложной системой клеточно-поверхностных белков, их молекулярных сигнальных путей и транскрипционных факторов, инициирующих или модулирующих транскрипцию генов-мишеней. В поддержании плюрипотентности ЭСК принимают участие несколько сигнальных каскадов, или путей. Эти пути можно объединить в подсистему «внешних регуляторов плюрипотентности». Многочисленные экспериментальные данные говорят о том, что эта подсистема эволюционно не консервативна. Сигнальные молекулы (например, LIF, BMP4) имеют противоположное влияние на самообновление ЭСК мыши и человека [19–21].

Помимо подсистемы «внешних регуляторов» существует подсистема «внутренних регуляторов плюрипотентности», в которую входят три основных транскрипционных фактора OCT4, SOX2 и NANOG. Данные факторы имеют широкий спектр генов-мишеней в ЭСК мыши и человека, и, в отличие от сигнальных путей, их действие направлено исключительно на поддержание самообновления и плюрипотентности клеток у различных млекопитающих [22, 23].

Недавние исследования показали, что данные подсистемы тесно взаимодействуют друг с другом, обеспечивая стабильность системы поддержания самообновления и плюрипотентности [24] (рис. 1). Кроме того, установлено, что подсистемы интегрированы не только между собой, но и с системами эпигенетической регуляции экспрессии генов (белками группы Polycomb и др.), а также системой микроРНК, специфичных для ЭСК и различных дифференцированных клеточных производных.

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, ЗАПУСКАЕМЫЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ LIF

Первые линии ЭСК мыши были получены с использованием в качестве питающего слоя митотически инактивированных эмбриональных фибробластов (фидерного слоя) либо кондиционной среды, на которой некоторое время культивировали клетки тератокарциномы или эмбриональные фибробласты [12, 13]. Культивирование ЭСК мыши без фидерного слоя либо в некондиционной среде вызывало дифференцировку клеток. Позже была выяснена природа действующего компонента, выделяемого эмбриональными фибробластами и необходимого для поддержания недифференцированного состояния ЭСК. Им оказался интерлейкин LIF (leukemia inhibitory factor), относящийся к семейству IL-6 [25]. В настоящее время рекомбинантный белок LIF активно применяется при получении и культивировании ЭСК мыши, что позволяет избежать использования фидера и кондиционной среды [26, 27]. Белок LIF, взаимодействуя с гетеродимерным рецептором LIFRβ-gp130, находящимся на мембране клетки, способен к активации трех сигнальных каскадов: каскада JAK (tyrosine kinase Janus)-STAT3, сигнального пути, опосредованного фосфатидилинозитол-3-ОН-киназой,

и каскада митоген-активируемой протеинкиназы. Среди данных сигнальных путей только JAK-STAT3 активируется исключительно LIF, остальные два запускаются множеством сигнальных молекул [24].

В сигнальном пути JAK-STAT3 LIF является первичной сигнальной молекулой в пути, активирующем транскрипционный фактор STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3). Связывание интерлейкина LIF с рецептором LIFRβ-gp130 вызывает активацию фосфопротеинкиназ. Тирозинкиназа Janus и иммунореактивная фосфотирозинкиназа фосфорилируют тирозиновые остатки цитоплазматической части гетеродимера LIFRβ-gp130. Транскрипционный фактор STAT3 связывается с фосфотирозиновыми остатками активированного гетеродимера LIFRβ-gp130, подвергаясь при этом фосфорилированию и димеризации. Фосфорилированные димеры STAT3 транспортируются в ядро клетки, где взаимодействуют с генами-мишенями [25, 28].

Исследования убедительно показывают важную роль LIF-STAT3-сигнального пути в поддержании самообновления ЭСК мыши [29]. Однако многочисленные факты говорят о том, что поддержание плюрипотентности ЭСК человека и других приматов происходит по LIF-STAT3-независимому механизму [21, 30].

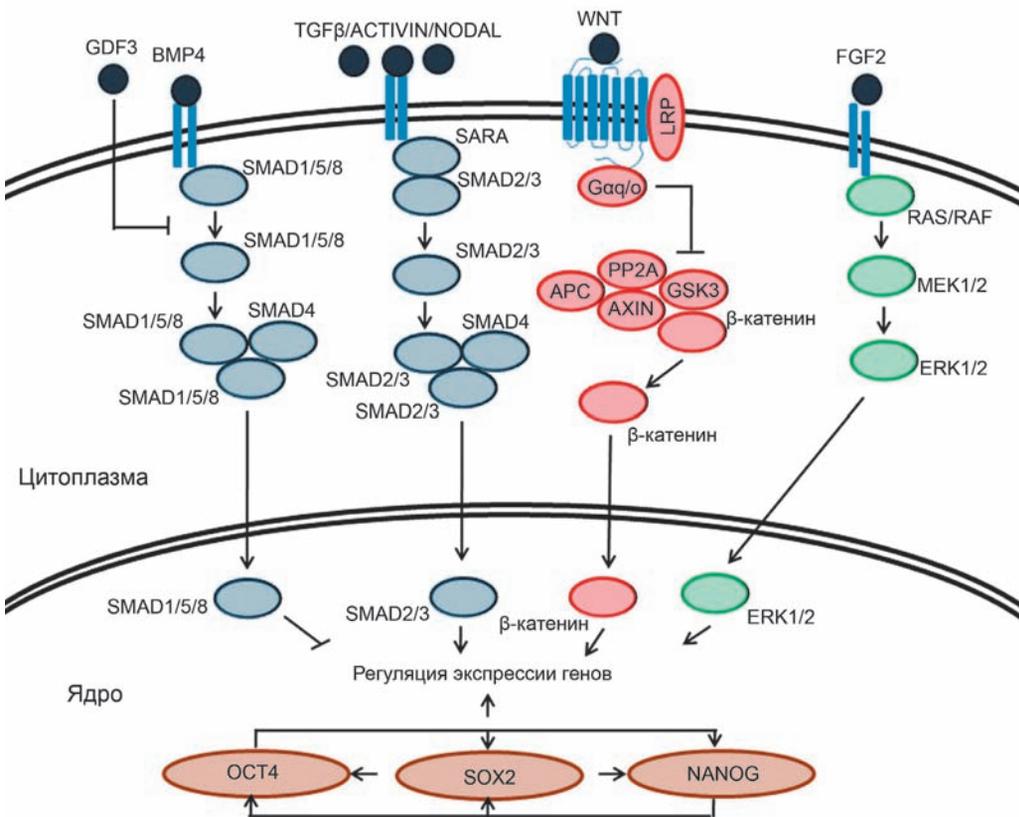


Рис. 1. Система действия «внешних» и «внутренних регуляторов плюрипотентности» ЭСК человека. Темными кругами показаны сигнальные молекулы, синими столбиками рецепторы на плазматической мембране клетки. Серыми, красными и зелеными овалами показаны молекулы, участвующие в передаче сигнала от рецепторов в ядро клетки и в регуляции экспрессии генов в ядре клетки совместно с транскрипционными факторами OCT4, SOX2 и NANOG. Стрелками показано активирующее действие факторов, линиями с тупыми окончаниями – подавляющее действие, а также активность SMAD1/5/8, вызывающая дифференцировку ЭСК человека.

До недавнего времени существовало относительно мало данных о том, каким образом интерлейкин LIF может участвовать в поддержании плюрипотентности ЭСК мыши. Недавние исследования, проведенные Нива с коллегами [24], показывают, что молекулярные каскады, запускаемые LIF, интегрированы в подсистему «внутренних регуляторов плюрипотентности», в которую входят гены *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* (рис. 1). Эта интеграция происходит благодаря двум параллельным путям: JAK-STAT3 и сигнальному пути, опосредованному фосфатидилинозитол-3-ОН-киназой (PI(3)K). В ходе исследования показано, что транскрипционный фактор STAT3 активирует экспрессию фактора KLF4, который, в свою очередь, позитивно регулирует ген *Sox2*. В то же время сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-ОН-киназы активирует ген, кодирующий другой транскрипционный фактор – TBX3. Данный фактор, в свою очередь, активирует ген *Nanog*. Кроме того, показано, что применение ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы, которая опосредует третий сигнальный каскад, активируемый LIF, вызывает аккумуляцию белка TBX3 в ядре клетки и активацию генов *Tbx3* и *Nanog* (рис. 2). Кроме того, LIF может активировать транспорт TBX3 за счет действия через киназу MAPK (рис. 2), однако данный путь, по-видимому, ингибируется какими-то третьими факторами.

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ TGFβ/ACTIVIN/NODAL, BMP И ФАКТОР bFGF (FGF2)

В суперсемейство TGFβ (transforming growth factor-β) входит большое число сигнальных молекул (в геноме человека обнаружено около 40 потенциальных белков-лигандов TGFβ). Данное суперсемейство можно разделить на две большие группы активаторов:

1) TGFβ/ACTIVIN/NODAL, активирующие транскрипцию генов транскрипционных факторов SMAD2/3 (similar to mothers against decapentaplegic homologue) посредством рецепторов ALK4, ALK5 и ALK7;

2) BMP (bone morphogenic protein)/GDF (growth differentiation factor) посредством рецепторов ALK1, ALK2, ALK3 и ALK6, активирующие факторы SMAD1/5. Кроме того, существуют два белка семейства SMAD, обладающие ингибирующими свойствами по отношению к белкам того же семейства: SMAD6, избирательно ингибирующий SMAD1/5, и SMAD7, подавляющий действие членов обеих групп суперсемейства TGFβ [31].

Показано, что сигнальный путь TGFβ/ACTIVIN/NODAL играет существенную роль в поддержании плюрипотентности ЭСК человека. Белки ACTIVIN и NODAL действуют через одни и те же ре-

цепторы, подавляя дифференцировку ЭСК человека [32–34]. ЭСК человека экспрессируют как рецепторы ACVR1B и ACVR1B и корецептор TDGF1(CRIPTO) для NODAL, так и сам NODAL [35]. В культурах ЭСК человека NODAL или ACTIVIN могут действовать совместно с другими белковыми факторами, например, bFGF (FGF2) или WNT при поддержании самообновления ЭСК человека [32, 34, 36, 37]. Белок ACTIVIN может активировать выработку bFGF, необходимого для поддержания самообновления ЭСК человека при культивировании клеток в отсутствие сыворотки [36]. Оба белка ACTIVIN и NODAL могут быть заменены TGFβ при культивировании ЭСК человека.

Белковый фактор NODAL выполняет множество различных функций во время раннего эмбриогенеза мыши. Он необходим для нормального развития эпибласта эмбрионов и поддержания экспрессии генов *OCT4* и *NANOG* человека. В недифференцированных ЭСК человека наблюдается высокая активность NODAL/ACTIVIN/TGFβ, направленная на активацию транскрипционных факторов SMAD2 и/или

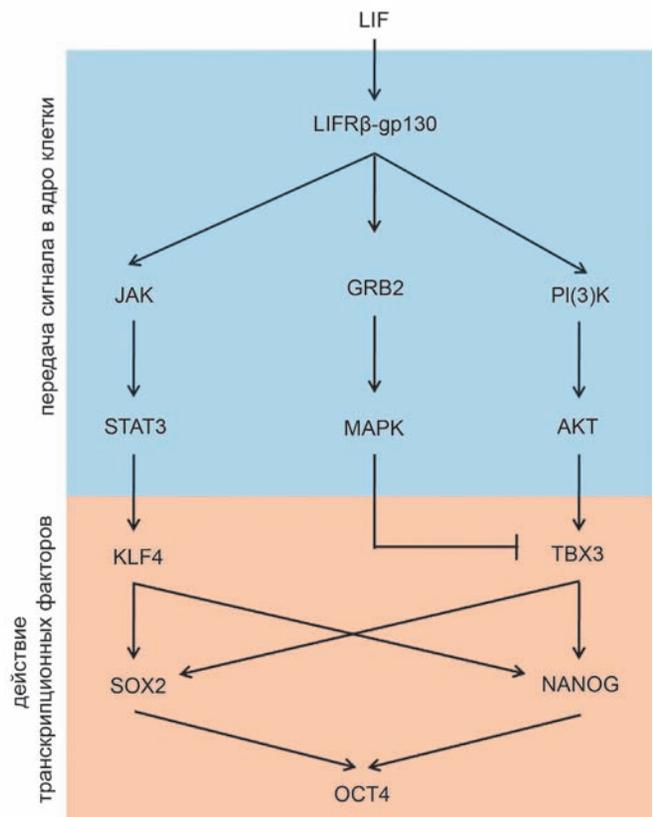


Рис. 2. Взаимодействие транскрипционных факторов и сигнальных путей, запускаемых LIF в эмбриональных стволовых клетках мыши [24].

SMAD3 (рис. 1). Транскрипционные факторы SMAD2 и SMAD3 участвуют в активации транскрипции гена *NANOG*. В недифференцированных ЭСК человека наблюдается высокий уровень фосфорилированной, т.е. активной формы SMAD2 и SMAD3. Подавление фосфорилирования SMAD2 и SMAD3 с помощью специфических ингибиторов вызывает уменьшение уровня экспрессии генов *OCT4* и *NANOG* [32]. Во время дифференцировки уровень активности SMAD2 и SMAD3 падает, при этом возрастает уровень SMAD1/5/8, которые активирует BMP (рис. 1). Белки SMAD1/5/8 подавляют транскрипцию гена *NANOG*. Кроме того, действие SMAD2 и SMAD3, а также сигнальный путь, запускаемый bFGF (bFGF), подавляет экспрессию BMP4, препятствуя спонтанной дифференцировке ЭСК человека [37].

В суперсемейство TGF β входит белок GDF, который не только является ингибитором BMP, но и усиливает действие NODAL (рис. 1). Ген *GDF* экспрессируется в плюрипотентных клетках человека и мыши, где участвует в подавлении дифференцировки, опосредованной BMP. В конечном итоге, GDF влияет на самообновление ЭСК через установление баланса между белками SMAD2 и SMAD3 с одной стороны и SMAD1/5/8 с другой [38, 39] (рис. 1).

Белковые факторы из группы BMP оказывают противоположное действие на самообновление ЭСК мыши. Присутствие в среде BMP4 подавляет нейтральную дифференцировку и в комбинации с LIF поддерживает симметричное самообновление ЭСК мыши в отсутствие слоя фидера и сыворотки. BMP4 мыши активирует экспрессию транскрипционного фактора SMAD4, который, в свою очередь, активирует транскрипцию генов, относящихся к семейству *Id* (inhibitor of differentiation). Вероятно, экспрессия генов *Id1*, *Id2* и *Id3* предотвращает эффект ранней экспрессии генов пронеуральных транскрипционных факторов (bHLH), таких, как гены группы *Mash* в ЭСК, тем самым препятствуя дифференцировке [40]. Однако в отсутствие LIF BMP4 может иметь противоположное действие, активируя факторы из семейства SMAD (SMAD1/5/8), которые оказывают ингибирующее действие на гены семейства *Id* [40].

Таким образом, сигнальные пути, запускаемые BMP и LIF-JAK-STAT3, действуют разнонаправленно на самообновление ЭСК мыши и человека. Однако это не единственные примеры видоспецифического действия сигнальных молекул. Например, фактор bFGF является критичным для поддержания ЭСК человека в недифференцированном состоянии, но вызывает дифференцировку ЭСК мыши [41, 42]. ЭСК человека экспрессируют рецептор и сам bFGF [43, 44]. Действует bFGF через тирозинкиназные рецепторы (ERK1 и ERK2), ингибирование данного сиг-

нального пути вызывает дифференцировку ЭСК человека (рис. 1). Однако полностью механизм действия bFGF на ЭСК человека пока не расшифрован.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ WNT

Недавние исследования показали, что сигнальный путь, в котором ключевым участником является WNT, может участвовать в краткосрочном поддержании плюрипотентного состояния ЭСК мыши и человека [45]. Ингибирование гликогенсинтазы-3, которое вызывает активацию сигнального пути WNT, приводит к накоплению в ядрах клеток β -катенина и активации ряда генов-мишеней, при этом в клетках поддерживается экспрессия специфичных для плюрипотентных клеток генов транскрипционных факторов *Oct4*, *Rex1* и *Nanog* даже в отсутствие фактора LIF [46] (рис. 1). Однако позже было показано, что для стабильного поддержания самообновления ЭСК человека необходимо присутствие таких факторов, как TGF β и bFGF, а действие WNT сводится к усилению пролиферации [47, 48].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ OCT4, NANOG И SOX2

Транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 занимают центральное место в подсистеме «внутренних регуляторов плюрипотентности». В отличие от системы сигнальных путей, действие которых носит четко выраженный видоспецифичный характер, функции данных транскрипционных факторов при поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК человека и мыши существенно перекрываются. Большой консервативностью обладают геномная организация генов *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* и доменная организация белков OCT4, NANOG и SOX2, существенной схожестью обладают спектры генов-мишеней данных факторов в ЭСК мыши и человека. Как у мыши, так и у человека факторы OCT4, NANOG и SOX2 часто действуют совместно, образуя единую систему регуляции транскрипции генов, включая авторегуляцию собственных генов.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР OCT4

Белок OCT4 относится к V классу POU (PIT, OCT, UNC) семейства транскрипционных факторов. POU-домен состоит из двух структурно независимых субдоменов: POU-специфического (N-концевой, состоящий из 75 а.о.) и POU-гомеодомена (C-концевой, 60 а.о.). Оба субдомена соединены между собой варибельным по длине подвижным линкером [49–51]. Экспрессия белка OCT4 характерна для ранних стадий эмбриогенеза человека, мыши и других млекопитающих [52–56]. У мыши его экспрессия прослеживается от 2-клеточной стадии и ограничивается

плюрипотентными клетками ВКМ и эпибласта blastocysts. После имплантации эмбриона экспрессия *OCT4* сохраняется только в герминальных клетках. У человека на стадии blastocysts экспрессия *OCT4* обнаруживается не только в ВКМ, но и в клетках трофобласта [57]. Роль фактора *OCT4* в эмбриогенезе была показана в экспериментах по нокауту гена *Oct4* (также известному как *Pou5f1*, *Oct3*, *Oct3/4*, *OTF3*, *OTF4*). Эмбрионы мыши, гомозиготные по мутации *Oct4* (*Oct4^{-/-}*), погибали во время имплантации вследствие неспособности образовывать ВКМ, состоящую из плюрипотентных клеток, при этом трофобласт развивался нормально [53]. Позже Нива с соавторами продемонстрировали влияние уровня экспрессии *Oct4* на самообновление ЭСК мыши [58]. Было обнаружено, что 50% колебание уровня транскрипции *Oct4* вызывает дифференцировку ЭСК мыши в трофобластные либо энтодермальные производные [58]. Кроме того, активность *OCT4* необходима для нормальной жизнедеятельности герминальных клеток мыши [59]. Подавление экспрессии гена *Oct4* в ЭСК мыши и человека с помощью РНК-интерференции также вызывало дифференцировку в различные клеточные производные, экспрессирующие маркеры трофобласта и энтодермы: *Cdx2*, *Gata6*, *AFP* [60, 61]. Исследования геномной структуры, структуры регуляторной области и хромосомной локализации гена *Oct4* у человека и других млекопитающих показали высокую степень консервативности молекулярной организации данного гена. Кроме того, показано, что у ряда видов млекопитающих ген *Oct4* входит в состав схожей синтенной группы [62–65]. У мыши и других животных ген *Oct4* состоит из пяти экзонов и локализован в области главного комплекса гистосовместимости [62, 63, 65, 66]. Ген *OCT4* человека также локализован в пределах главного комплекса гистосовместимости, однако у него обнаружены три альтернативных варианта сплайсинга: *OCT4A*, *OCT4B* и *OCT4B1* [62, 67]. Белки, кодируемые данными изоформами, по-разному вовлечены в процесс поддержания плюрипотентности. Показано, что белок *OCT4B* не способен поддерживать плюрипотентность ЭСК и локализуется в основном в цитоплазме клеток [68]. Экспрессия *OCT4A* обнаружена на стадии компактной морулы и blastocysts человека, в то время как *OCT4B* экспрессируется во всех клетках эмбриона, начиная с 4-клеточной стадии. Кроме того, *OCT4B* не экспрессируется в ЭСК человека [69]. В отличие от гена *Oct4* животных, в настоящий момент в транскрипте гена *OCT4* человека выделяют четыре экзона. Второй экзон подразделяется на четыре субэкзона (2a, 2b, 2c, 2d), которые представлены в разных комбинациях в трех различных вариантах сплайсинга транскрипта. Вариант *OCT4A* состоит из экзонов 1,

2b, 2d, 3 и 4; вариант *OCT4B* – 2a, 2b, 2d, 3 и 4; вариант сплайсинга *OCT4B1* – 2a, 2b, 2c, 3 и 4. Таким образом, транскрипты гена *OCT4* идентичны в 3'-области (3–4 экзон), а все отличия касаются лишь 1–2 экзонов. Транскрипт *OCT4A* кодирует белок размером 360 а.о., размер белка *OCT4B* – 265 а.о., однако ввиду наличия полиморфизма в стартовом кодоне *OCT4B* (*AU/GG*) у части популяции не транслируется данный вариант белка *OCT4B* [62, 70]. Благодаря недавно обнаруженному альтернативному сайту посадки рибосом в области субэкзонов 2a–b с транскрипта *OCT4B* могут транслироваться еще две формы белка: *OCT4B-190* и *OCT4B-164*, которые состоят из 190 и 164 а.о. соответственно. Белкового продукта *OCT4B1* не обнаружено, возможно, благодаря наличию стоп-кодона *UGA* в субэкзоне 2c, который отсутствует в *OCT4B* [67]. Ранее было показано, что белок, кодируемый изоформой *OCT4A*, локализуется в ядре клетки и принимает участие в регуляции транскрипции генов, в то же время белок *OCT4B* локализуется в цитоплазме клеток и не способен поддерживать плюрипотентность [57, 68]. Позже было установлено, что белки *OCT4B-190* и *OCT4B-164*, кодируемые *OCT4B*, локализуются диффузно в ядре и цитоплазме [70], при этом уровень *OCT4B-190* существенно повышается в ЭСК человека в ответ на стрессовые условия и может оказывать подавляющее действие на процесс апоптоза. Экспрессия *OCT4B-265* и *OCT4B-164* в ЭСК человека не обнаружена [70].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР NANOG

Белок NANOG относится к транскрипционным факторам, содержащим гомеодомен, и наиболее близок по аминокислотной последовательности и структуре к белкам семейства NK2 [71]. Экспрессия гена *NANOG* характерна для плюрипотентных клеток предэмбриональных эмбрионов (ВКМ и эпибласта) и ЭСК мыши и человека [72–74]. Сверхэкспрессия гена *Nanog* способна поддерживать плюрипотентность ЭСК мыши даже в отсутствие интерлейкина LIF [72]. Мутационный анализ гена *Nanog* показал, что его экспрессия необходима для нормального развития эпибласта эмбриона и поддержания самообновления ЭСК мыши. ЭСК с генотипом *Nanog^{-/-}* дифференцировались в экстраэмбриональные производные [73]. Подавление экспрессии *NANOG* в ЭСК человека вызывает дифференцировку, сопровождающуюся повышением экспрессии маркеров энтодермы (*GATA4*, *GATA6*, *LAMININ B1*, *AFP*) и трофоэнтодермы (*CDX2*, *GATA2*, *hCG- α* и *hCG- β*).

В молекуле белка NANOG мыши выделяют несколько функциональных элементов, принимающих участие в трансактивации. Среди них гомеодомен, занимающий центральное положение в молекуле,

и три элемента в С-терминальной части молекулы: С-терминальный домен 1 (CD1), С-терминальный домен 2 (CD2) и триптофановый повтор (W-повтор), находящийся между CD1 и CD2. Наибольший вклад в трансактивацию NANOG мыши вносят гомеодомен, CD2 и W-повтор [75, 76]. Недавние исследования показывают, что W-повтор белка NANOG мыши обеспечивает трансактивацию. Он участвует в димеризации белка NANOG, которая необходима для LIF-независимого поддержания плюрипотентности ЭСК мыши [77, 78]. По всей видимости, функциональную роль играют именно остатки триптофана. Замена триптофана на аланин вызывает существенное снижение трансактивационной способности белка NANOG мыши, в то время как замена остальных аминокислот в пределах мономеров W-повтора не вызывает существенного изменения активности [76]. Еще одним важным трансактивационным элементом белка NANOG является CD2 [79]. Данный элемент необходим для NANOG-опосредованного самообновления ЭСК мыши. Обнаружено, что активность домена CD2 зависит от наличия в нем остатков ароматических аминокислот (фенилаланина и тирозина). Замена данных аминокислот вызывает падение активности CD2 и, как следствие, снижение активности целых молекул NANOG и дифференцировку ЭСК [79]. Однако сравнение аминокислотных последовательностей CD2 различных видов млекопитающих показало низкую эволюционную консервативность большинства остатков ароматических аминокислот [80].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР SOX2

Транскрипционный фактор SOX2 (SRY-related HMG box) содержит ДНК-связывающий HMG (high mobility group)-домен. Экспрессия SOX2, как и OCT4, характерна для клеток ВКМ, эпибласта и герминальных клеток эмбриона мыши [81].

Гомозиготные по мутации гена SOX2 эмбрионы гибнут во время имплантации вследствие недоразвития эпибласта. Из мутантных эмбрионов невозможно получить стабильные линии ЭСК, при этом линии ТСК и клеток экстраэмбриональной энтодермы получают нормально [81]. Кроме того, нормальная экспрессия гена *Sox2* необходима для поддержания самообновления ЭСК мыши и человека [82, 83]. Подавление и сверхэкспрессия SOX2 вызывают трофоэктодермальную дифференцировку ЭСК человека [83].

ГЕНЫ-МИШЕНИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ OCT4, NANOG И SOX2

OCT4, NANOG и SOX2 относятся к белкам, экспрессия которых необходима для поддержания плюрипотентности ЭСК мыши и человека в стандартных условиях культивирования. Безусловно, их важная

роль в поддержании основных свойств ЭСК заключается в функционировании как транскрипционных факторов. В настоящий момент существует огромный массив данных о спектре генов-мишеней данных белков.

Было выяснено, что транскрипционный фактор OCT4 является активатором и репрессором многих генов-мишеней, большинство из которых тем или иным образом участвуют в процессе раннего эмбрионального развития: генов *Fgf4*, *Opn*, *Utf1*, генов, кодирующих α - и β -субъединицы хорионального гонадотропина человека [84–88]. Транскрипционный фактор OCT4 может регулировать гены-мишени в виде мономера, гомо- и гетеродимера [89]. Например, образуя гомодимер, белок OCT4 регулирует транскрипцию гена *Opn*. Энксансерный элемент *Opn* содержит палиндромную последовательность, названную PORE (palindromic-oct-regulatory-element), которая включает в себя октамерный мотив ATGCAAAT (октамерный сайт посадки мономерной формы белка OCT4) и последовательность ATTTG, отделенную от октамерного мотива двумя парами нуклеотидов. Рядом с PORE локализуется сайт посадки фактора SOX2, однако он оказывает подавляющее действие на транскрипцию *Opn* [84].

Существуют примеры совместного действия факторов OCT4 и SOX2. Данные белки позитивно регулируют гены *Fgf4* и *Utf1*, их сайты посадки локализованы в энхансерах, расположенных в 3'-нетранслируемых областях этих генов [85, 86, 90]. Помимо PORE, существует еще один элемент, с которым взаимодействуют мономеры и димеры OCT-факторов, он был назван MORE (more of PORE, ATGCATATGCAT) [91, 92]. Элемент MORE существенно отличается от PORE по относительному расположению POU-специфического и POU-гомеодомена. Несмотря на то что MORE был изначально синтезирован искусственно, наличие подобных элементов было обнаружено в регуляторных областях реальных генов [91–93]. Показано, что транскрипционные факторы OCT1 и OCT4 могут действовать на транскрипцию генов-мишеней через элемент MORE в ответ на генотоксический и оксидативный стрессы [93].

Развитие методов высокопроизводительного анализа распределения транскрипционных факторов на уровне целого генома позволило существенно расширить наши знания о спектре генов-мишеней транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2. Две группы исследователей, используя методы ChIP-on-Chip и ChIP-PET (chromatin immunoprecipitation – paired-end ditag), локализовали OCT4, NANOG и SOX2 в геномах ЭСК человека и мыши [22, 23].

В работе Бойер [22] с соавторами проанализиро-

вано распределение сайтов посадки транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2 в геноме ЭСК человека линии H9. Среди генов, ассоциированных с данными транскрипционными факторами, большую часть составляют гены транскрипционных факторов и компоненты сигнальных путей, которые, как было установлено ранее, задействованы в раннем эмбриогенезе, дифференцировке клеток, органогенезе и поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК в культуре. Например, это такие гены, как OCT4, SOX2, NANOG, LEFTY2/EBAF, CDX2, HAND1, DPPA4, GJA1/CONNEXIN43, FOXO1A, CRIPTO/TDGF1 и ZIC3 [94–102]. Затем тем же образом было установлено распределение сайтов посадки факторов NANOG и SOX2. В ЭСК человека транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 совместно регулируют 353 гена, при этом они могут выступать и как активаторы, и как репрессоры транскрипции [22]. Среди генов, позитивно регулируемых OCT4, NANOG и SOX2, большую долю занимают гены, кодирующие транскрипционные факторы, включая гены OCT4, NANOG и SOX2, а также гены, кодирующие компоненты сигнальных путей, принимающих участие в поддержании самообновления клеток, например TGF β (TDGF1, LEFTY2/EBAF) и WNT (DKK1, FRAT2) [22]. В ЭСК мыши среди генов, совместно позитивно регулируемых факторами OCT4 и NANOG, также выявляются гены, кодирующие транскрипционные факторы, например *Rcor2*, *Esrrb* и *Phc1* [23]. Кроме того, в списке генов, позитивно регулируемых NANOG в ЭСК мыши, также были гены *Pou5f1* (кодирует транскрипционный фактор OCT4) и *Sox2*. Ранее полученные экспериментальные данные говорят о том, что факторы OCT4 и SOX2 принимают участие в регуляции генов *Pou5f1*, *Sox2* и *Nanog* [97, 99, 100, 103]. По всей видимости, авторегуляция является общим свойством системы поддержания плюрипотентности у мыши и человека. Наличие большого числа генов транскрипционных факторов (таких, как REST, SKIL, HESX1 и STAT3) среди позитивно регулируемых генов говорит о том, что OCT4, NANOG и SOX2 могут являться лишь вершиной более сложной системы регуляции транскрипции в ЭСК. Среди негативно регулируемых генов также много генов транскрипционных факторов (например, ESX1I, HOXB1, MEIS1, PAX6, LHX5, Lbx1, MYF5, ONECUT1), данные факторы задействованы в процессах дифференцировки во время эмбрионального развития [22]. Скорее всего, факторы OCT4, NANOG и SOX2 принимают участие в репрессии данных генов как *in vivo*, так и *in vitro*.

В двух исследованиях [22, 23] было показано, что сайты посадки транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2 ассоциированы с генами, кодирую-

щими микроРНК. В ЭСК человека сайты связывания транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2 обнаружены в промоторах 14 генов микроРНК, причем в промоторах двух генов *mir-137* и *mir-301* они присутствуют совместно. В ЭСК мыши сайты связывания фактора NANOG расположены в пределах 6 т.п.н. от 4 генов микроРНК: *mir-296*, *mir-302*, *mir-124a* и *mir-9-2*. Более того, в случае генов *mir-296*, *mir-124a* и *mir-9-2* в ближайшем окружении сайта NANOG не обнаружено каких-либо иных генов. Для гена *mir-135* сайт связывания NANOG обнаружен в пределах 30 т.п.н., транскрипционный фактор OCT4 связывается в непосредственной близости от сайта NANOG около генов *mir-296* и *mir-302*.

Сравнение данных по выявлению генов-мишеней транскрипционных факторов OCT4 и NANOG в ЭСК мыши и человека показывает, что только небольшая часть из них обнаруживается в геномах обоих видов одновременно. Так, только 9.1% OCT4-ассоциированных генов и 13% NANOG-ассоциированных генов перекрываются у этих двух видов. Это может говорить о существовании больших различий в составе сетей генов, контролируемых OCT4 и NANOG. Однако существует группа из 32 генов, регулируемых факторами OCT4 и NANOG у мыши и человека, 18 из них кодируют транскрипционные факторы, включающие OCT4, SOX2 и NANOG, что свидетельствует о важности этих генов для поддержания плюрипотентности [23]. Разница в составе генов-мишеней, представленная в этих двух работах, вполне может быть связана с техническими причинами, поскольку в работах применялись два различных метода (ChIP-on-Chip и ChIP-PET) получения данных и алгоритма их анализа.

Таким образом, транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 находятся в центре обширной сети регуляции, включающей транскрипционные факторы (гены которых позитивно или негативно регулируются), компоненты сигнальных путей, микроРНК. Ее стабильное функционирование, по всей видимости, необходимо для поддержания самообновления и плюрипотентности ЭСК человека и мыши.

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Исследования последних лет предоставляют множество доказательств того, что транскрипционные факторы, задействованные в поддержании самообновления ЭСК, не просто совместно регулируют транскрипцию генов-мишеней, но при этом физически контактируют друг с другом [104–108]. Например, было показано, что NANOG может подавлять индуцируемую BMP мезодермальную дифферен-

цировку ЭСК мыши, связываясь с белком SMAD1, и физически взаимодействовать с транскрипционным фактором SALL4, совместно позитивно регулируя энхансеры генов *Nanog* и *Sall4* [104, 106]. Однако это были лишь отдельные примеры белок-белковых взаимодействий транскрипционного фактора NANOG, направленных на поддержание самообновления ЭСК. Применение широкомасштабного анализа взаимодействий белка NANOG, проведенного на ЭСК мыши, показало, что данный белок имеет широкий спектр взаимодействий и совокупность белков, с которыми он физически контактирует, включает не только транскрипционные факторы, но и белки, задействованные в регуляции структуры хроматина [105]. В работе Ванга с соавторами [105] был применен метод, основанный на экспрессии белка NANOG, содержащего FLAG-эпитоп, а также короткую аминокислотную последовательность, являющуюся субстратом для биотинлигазы *Escherichia coli* – BirA. Белок NANOG, содержащий два дополнительных эпитопа, экспрессировали (на уровне примерно 20% от эндогенного) в ЭСК мыши, которые также экспрессировали BirA, при этом клетки сохраняли самообновление и плюрипотентность. Комплексы NANOG выделяли из ядерного экстракта при помощи стрептавидин-агарозы или посредством иммунопреципитации антителами к FLAG с последующей очисткой стрептавидин-агарозой. Анализ и идентификацию взаимодействующих с NANOG белков проводили с помощью масс-спектрометрии (whole-lane liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)).

По результатам данного эксперимента можно выделить несколько закономерностей. Во-первых, группа взаимодействующих с NANOG белков сильно обогащена факторами, необходимыми для нормальной жизнедеятельности и дифференцировки клеток ВКМ (плюрипотентный компартмент эмбриона) бластоцист мыши. Кроме того, согласно имеющимся литературным данным, более чем 80% взаимодействующих с NANOG белков необходимы для получения и сохранения основных свойств ЭСК [105]. Например, такие белки, как OCT4, DAX1, NAC1, ZFP281 и SALL4.

Во-вторых, большинство выявленных белков обладают сходным паттерном экспрессии, характерным для плюрипотентных клеток, и их экспрессия подавляется при дифференцировке ЭСК, что может говорить об их участии в схожих процессах и/или участии в одной системе регуляции [105].

В-третьих, выявлено, что значительная часть генов, кодирующих взаимодействующие с NANOG белки, являются потенциальными мишенями транскрипционных факторов OCT4 и NANOG в ЭСК че-

ловека и мыши [22, 23, 63]. Наличие авторегуляции, положительных и отрицательных обратных связей характерно для системы, направленной на поддержание самообновления и плюрипотентности ЭСК мыши и человека, и, по всей видимости, необходимо как для устойчивого поддержания недифференцированного состояния клеток, так и для реализации четкой программы дифференцировки в конкретном направлении [97, 99, 100, 103]. Поддержание плюрипотентности и/или направление дифференцировки клеток, вероятно, зависит от стехиометрических соотношений молекул различных факторов. Эту гипотезу подтверждают экспериментальные данные по разнонаправленной дифференцировке ЭСК, зависящей от уровня транскрипции генов *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* [58, 83, 109].

В-четвертых, NANOG через своих партнеров может взаимодействовать с множеством белков, задействованных в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Белок NANOG путем взаимодействия с OCT4, DAX1, NAC1, ZFP281 или SALL1/4 может образовывать комплексы с компонентами комплекса NuRD (P66B и HDAC2), обладающего гистон-деацетилазной активностью, белками группы Polycomb (YY1, RNF2 и RYBP) и компонентами ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF (BAF155) [105]. Взаимодействие NAC1 и SALL1 с деацетилазами гистонов было экспериментально доказано в более ранних работах [110, 111].

Комплексы NANOG с другими белками, по-видимому, являются функциональными, а не случайными существующими короткое время и выявленными в конкретном эксперименте. Например, показано, что комплекс NAC1, ZFP281 и NANOG взаимодействует с промотором гена *Gata6*, который является маркером энтодермальной дифференцировки, вероятно, подавляя его.

Взаимодействие транскрипционного фактора OCT4 с другими белковыми молекулами также было описано ранее в целом ряде работ [85, 112–114]. В данных работах в основном описываются взаимодействия OCT4 с транскрипционными факторами, необходимые для регуляции транскрипции генов-мишеней в виде гетеродимеров. Кроме того, с использованием дрожжевой двугибридной системы и коиммунопреципитации были найдены белки, взаимодействующие с OCT4 и оказывающие на него ингибирующее действие [115]. Показано, что с OCT4 взаимодействует SUMO-лигаза PIASy, а также белки PIAS1 и PIAS3, относящиеся к тому же семейству. Несмотря на то что PIASy является известной SUMO-лигазой и белок OCT4 содержит сайты сумоилирования, было экспериментально установлено, что ее ингибирующее действие не зависит от данной

активности. PIASy оказывает подавляющее действие на трансаKTивационную способность OCT4, действующего в виде мономера, гомо- или гетеродимера, в то время как PIAS1 и PIAS3 не обладают такой функцией. Кроме того, белки PIASy, PIAS1 и PIAS3 вызывают релокализацию OCT4, перемещая его на периферию ядра [115].

Недавно двумя группами исследователей было проведено исследование паттерна белок-белковых взаимодействий фактора OCT4, а также его известных партнеров: SALL4, TCF2L1, DAX1 и ESRRB – в ЭСК мыши [107, 108]. В своих исследованиях авторы также использовали подход, основанный на экспрессии химерного белка (в данном случае OCT4), содержащего известные эпитопы, необходимые для выделения его комплексов с другими белками из клеточного или ядерного экстракта. В одной из работ использовалась экспрессия *Oct4* под его естественным промотором [107]. Как и в работе Ванга с соавторами [105], среди белков, взаимодействующих с OCT4, обнаружены компоненты комплексов NuRD, SWI/SNF и PRC1, участвующие в регуляции структуры хроматина [107, 108]. Кроме того, в комплексах OCT4 обнаружены отдельные ферменты, принимающие участие в эпигенетической регуляции экспрессии генов, такие, как MYST2 (гистон-ацетилтрансфераза H4), DNMT3A (*de novo* ДНК-метилтрансфераза) и другие. Обнаружены также белки, участвующие в посттрансляционной модификации самого OCT4, например OTG, фермент, присоединяющий O-связанный N-ацетилглюкозамин, который модифицирует OCT4 в ЭСК человека [107, 108, 116]. Среди партнеров OCT4 также выявлены транскрипционные факторы, необходимые для поддержания самообновления ЭСК, такие, как KLF4, SOX2, SALL4 и ZFP281. Анализ функций партнеров OCT4 с помощью информации, представленной в базах данных, показал, что значительная их часть вовлечена в процессы раннего развития и дифференцировки клеток и их нокаут вызывает гибель во время раннего развития эмбриона [107]. Все гены, определенные как партнеры OCT4 в ЭСК мыши, имеют гомологи у человека. Более того, аминокислотные последовательности белков, кодируемых данными генами, имеют очень высокую (около 94%, средняя гомология на уровне геномов 77%) гомологию между мышью и человеком. У человека эти гены тесно связаны с развитием наследственных заболеваний (в основном с нарушением развития) и раковыми заболеваниями [107].

Таким образом, регуляция генов, направленная на поддержание самообновления и плюрипотентности, является более комплексным процессом, чем представлялось ранее. В регуляции задействованы не просто подавление или активация генов-мишеней

отдельными белковыми молекулами транскрипционных факторов. В регуляции принимают участие комплексы молекул, в которые, помимо транскрипционных факторов, могут входить белки, меняющие структуру хроматина. Количественное соотношение молекул в каждой отдельной клетке может непосредственно или опосредованно влиять на самообновление и направление дифференцировки.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТОК

ЭСК обладают практически неограниченным потенциалом к самообновлению и дифференцировке в самый широкий спектр клеточных типов. При дифференцировке клеток происходит глобальное изменение морфологии, физиологии, скорости деления клеток и других параметров. Данные изменения обусловлены и сопровождаются глобальной сменой паттерна экспрессии генов. В настоящий момент известно, что экспрессия генов жестко регулируется на эпигенетическом уровне. Эпигенетическая регуляция включает в себя ковалентные модификации гистонов (белков, образующих нуклеосомы) и метилирование ДНК промоторных областей генов. Известно множество видов модификаций гистонов, заключающихся в присоединении химических групп и регуляторных пептидов (убиквитин, SUMO) к аминокислотам в составе молекул гистонов, например ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование и др. Модификации гистонов меняют физические свойства нуклеосом, делая хроматин более или менее доступным для факторов, обеспечивающих транскрипцию генов. Выделяют модификации, ассоциированные с активным хроматином и активно транскрибирующимися генами, и модификации, ассоциированные с неактивным хроматином и чаще всего связанные с подавлением транскрипции. К «активным» модификациям, в частности, относятся ацетилированные формы гистонов H3 и H4, а также триметилированный гистон H3 в положении K4 (H3K4me3) (K – аминокислота лизин согласно однобуквенной номенклатуре). «Неактивными» модификациями хроматина являются метилирование гистона H3 в положении K9 (H3K9me2 и H3K9me3) и ди- и триметилирование гистона H3 в положении K27 (H3K27me2 и H3K27me3). Кроме того, «неактивный» хроматин характеризуется деацетилированием гистонов.

При метилировании ДНК у млекопитающих модификации подвергаются цитозины в пределах CpG-динуклеотидов. Наличие скоплений, или «островков», CpG-динуклеотидов часто наблюдается в промоторных областях генов, и их гиперметилирование чаще всего связано с подавлением транскрипции.

Исследования по локализации модифицированных форм гистонов в геномах эмбриональных стволовых клеток показывают, что распределение активных и неактивных модификаций является довольно необычным и специфичным для плюрипотентных клеток.

Так, в геномах ЭСК мыши было показано наличие бивалентных доменов, одновременно содержащих метки активного и неактивного хроматина (H3K4me3 и H3K27me3) [117]. Анализ распределения активной и неактивной модификаций гистона H3 осуществлялся в пределах 56 областей, обогащенных высококонсервативными некодирующими последовательностями (ВКНП). Области, богатые ВКНП, относительно бедны генами, однако в них содержится сравнительно большое число генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые участвуют в регуляции развития. Например, в данных областях расположены все четыре кластера генов семейства НОХ. В работе Бернтейна с соавторами [117] в пределах ВКНП было обнаружено 343 области обогащения H3K4me3 со средним размером 3.4 т.п.н., 63% которых соколлализуются с точками старта транскрипции известных генов. Кроме того, в ВКНП были обнаружены 192 области обогащения H3K27me3, которые имели максимальный размер 18 т.п.н. в кластерах генов семейства НОХ. Сравнение данных по распределению H3K4me3 и H3K27me3 выявило домены, содержащие обе модификации. В кластерах НОХ обнаружено 9 подобных доменов, в других обогащенных ВКНП областях – 95, в контрольных локусах идентифицировали только 5 бивалентных доменов [117].

Большинство бивалентных доменов обогащенных ВКНП областей ассоциированы с точками начала транскрипции генов, кодирующих транскрипционные факторы. Данные гены входят в состав семейств SOX, FOX, PAX, IRX и POU, отдельные члены которых играют важные роли в дифференцировке клеток в развитии. 26 бивалентных доменов обнаружено вне точек старта транскрипции генов, однако они также ассоциированы с участвующими в развитии генами. Например, бивалентные домены обнаружены в 3'-областях генов *Npas3*, *Meis2*, *Pax2* и *Wnt8b*. Бивалентные домены выявлены в пределах генов, не кодирующих транскрипционные факторы, однако участвующих в развитии нервной системы – *Fgf8* и *Prok1* [117].

В исследованных авторами дифференцированных клетках: эмбриональных фибробластах, первичных фибробластах легкого, миоблестах C2C12 и клетках линии нейробластомы Neuro2a – было обнаружено крайне небольшое число бивалентных доменов. В то же время обнаружены протяженные районы, обогащенные H3K4me3 или H3K27me3 по отдель-

ности. Среди бивалентных доменов, определенных в ЭСК мыши, в дифференцированных клетках подавляющее большинство доменов содержат протяженные области, представленные только одной из изученных модификаций в зависимости от типа клеток [117].

Гены, точки старта транскрипции которых ассоциированы с бивалентными доменами, характеризуются низким уровнем транскрипции, несмотря на наличие метки активного хроматина H3K4me3, что говорит о «доминировании» H3K27me3 по отношению к H3K4me3. Авторы изучили распределение модификаций в бивалентных доменах, ассоциированных с точками старта транскрипции генов при направленной дифференцировке ЭСК в предшественники нейральных клеток. Оказалось, что гены, транскрибирующиеся после дифференцировки на высоком уровне, теряли модификацию H3K27me3, гены, транскрибирующиеся на низком уровне, увеличивали обогащение H3K4me3, сохраняя H3K27me3, а нетранскрибирующиеся гены сохраняли H3K27me3 и теряли H3K4me3 [117].

Таким образом, в ЭСК существует специфическая система эпигенетической регуляции генов, задействованных в дифференцировке клеток. По всей видимости, она позволяет плюрипотентным клеткам сохранять определенные гены в состоянии «низкого старта» и быстро запускать их транскрипцию в зависимости от программы дифференцировки и типа образующихся дифференцированных клеток.

Молекулярные механизмы, которые лежат в основе эпигенетической регуляции экспрессии генов в ЭСК, активно изучаются. Одними из основных участников системы эпигенетической регуляции в эмбриональном развитии организмов и ЭСК являются белки группы Polycomb [118]. Многочисленные биохимические и генетические исследования показывают, что белки группы Polycomb образуют два независимых комплекса: PRC (Polycomb repressive complex) 1 и PRC2. Основные компоненты данных комплексов проявляют большую эволюционную консервативность и необходимы для нормального эмбрионального развития различных организмов от дрозофилы до мыши и человека [118–122].

В работе Бойер с соавторами был проведен анализ локализации основных компонентов комплексов PRC1 (PHC1, RNF2) и PRC2 (SUZ12, EED) в областях, фланкирующих точки старта транскрипции (от -8 до +1 т.п.н) около 16 тыс. генов в ЭСК мыши [123]. Авторы данной работы обнаружили, что белки PRC1 и PRC2 в основном локализируются в пределах 1 т.п.н от точек старта транскрипции 512 генов, что может говорить об их участии в регуляции данных генов. Ранее было показано, что PRC2 отвеча-

ет за установление маркера неактивного хроматина H3K27me3. Исследование показало, что все 512 генов, в 5'-областях которых локализуются белки PRC1 и PRC2, имеют обогащение H3K27me3. Среди них значительную долю занимают гены, кодирующие содержащие гомеодомен транскрипционные факторы. Сюда относятся и ранее известные мишени белков группы Polycomb – факторы из семейства HOX и другие транскрипционные факторы из таких семейств, как DLX, IRX, LHX, POU, PAX и SIX. Общей чертой факторов, относящихся к данным семействам, является их участие в процессах дифференцировки клеток, регуляции эмбрионального развития и органогенеза. Кроме того, были выявлены гены, продукты которых хотя и не содержали гомеодомен, также были вовлечены в регуляцию развития. Это белки из семейств FOX, SOX, GATA и TBX. В клетках, гомозиготных по мутации EED (одного из компонентов PRC2), наблюдается повышение экспрессии генов, относящихся к различным семействам, которые подвергаются сайленсингу в ЭСК без мутации [123].

Таким образом, было показано, что в ЭСК мыши множество генов, участвующих в дифференцировке и эмбриональном развитии, являются мишенями для PRC. Следовательно, PRC1 и PRC2 могут играть существенную роль в поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК.

Схожие результаты были получены в работе по локализации белка SUZ12 (еще одного компонента PRC2) в геноме ЭСК человека [124]. Авторам этой работы также удалось показать, что компоненты PRC2 локализуются вблизи точек старта транскрипции генов, вовлеченных в многочисленные процессы, связанные с дифференцировкой клеток во время эмбрионального развития. Кроме того, в ЭСК человека белок SUZ12 был локализован в промоторах генов, кодирующих белки, которые являются компонентами сигнальных путей, задействованных в процессах гастрюляции, дифференцировки в онтогенезе, а также в процессах самообновления и дифференцировки ЭСК в культуре. Среди данных генов встречаются компоненты сигнальных путей, запускаемых TGF β , BMP, WNT, FGF. SUZ12 локализован как в отдельных промоторных областях, так и в довольно протяженных участках, захватывающих несколько генов, являющихся компонентами одного сигнального пути, например WNT (WNT1, WNT2, WNT6) и TGF β (BMP2, GDF6). Ранее было показано, что данные сигнальные пути участвуют в регуляции самообновления и плюрипотентности ЭСК мыши и человека [46]. Следовательно, PRC2, регулируя компоненты этих сигнальных путей, может непосредственно влиять на свойства ЭСК. Одна-

ко позже были получены данные, согласно которым ЭСК мыши, мутантные по EED, сохраняют плюрипотентность [125]. ЭСК, гомозиготные по мутации EED, экспрессируют транскрипционные факторы OCT4 и NANOG, а также образуют химеры. Хотя в данной работе взрослых химерных животных получено не было, высокая степень химеризации наблюдалась в 12.5-дневных эмбрионах. Попытка получить культуру эмбриональных фибробластов, являющихся производными мутантных ЭСК, потерпела неудачу, по-видимому, вследствие низкой жизнеспособности дифференцированных мутантных клеток. Химерные эмбрионы (с большим процентом химеризации) также имели ряд дефектов: гипертрофированный аллантоис, недоразвитую нейроэктодерму и эмбриональную мезодерму, что, вероятно, являлось причиной эмбриональной гибели на стадии около 10.5 дней после оплодотворения [125].

Одной из интересных закономерностей, описанных в работе Ли с соавторами [124], является высокая частота солокализации SUZ12 с уже упоминавшимися ранее высококонсервативными некодирующими последовательностями (ВКНП), в зонах обогащения которыми локализованы бивалентные хроматиновые домены. Примерно 8% из ранее обнаруженных 14 тыс. ВКНП [126] содержат обогащение SUZ12, причем, чем выше эволюционная консервативность элемента, тем выше степень обогащения [124].

Кроме того, было обнаружено, что одна треть генов, регулирующих развитие и связывающихся с PRC2, также регулируется хотя бы одним из трех транскрипционных факторов OCT4, SOX2 или NANOG, являющихся ключевыми в системе поддержания плюрипотентности ЭСК человека и мыши [22, 124]. Это гены, вовлеченные в развитие экстраэмбриональных тканей, а также экто-, мезо- и энтодермы (например, *ESX1L*, *ONECUT1*, *HAND1* и *HOXB1*). Транскрипционные факторы, входящие в систему поддержания плюрипотентности, могут напрямую регулировать гены, кодирующие компоненты PRC2. Так, показано, что транскрипционные факторы OCT4 и STAT3 (его активность зависит от присутствия интерлейкина LIF) позитивно регулируют ген *Eed* в ЭСК мыши [127]. В то же время установлено, что в ЭСК мыши транскрипционный фактор OCT4 негативно регулирует ген *Hdac4*, кодирующий гистондеацетилазу [128]. Эти факты являются примерами совместной работы системы эпигенетической регуляции экспрессии генов и системы поддержания плюрипотентности в ЭСК.

Гены, участвующие в поддержании плюрипотентности и самообновления ЭСК, подвергаются эпигенетическим изменениям во время дифференцировки в эмбриогенезе и при индуцированной или спонтанной дифференцировке *in vitro*. Ген *Oct4*

несколько выделяется в ряду остальных генов (*Dppa3/Stella/PGC7, Nanog* и *Sox2*), экспрессия которых характерна для плюрипотентных клеток, по механизму эпигенетического сайленсинга при дифференцировке [129]. В дифференцированных клетках эмбриональной карциномы P19 и постимплантационных эмбрионах мыши для промоторной области *Oct4* характерно наличие меток неактивного хроматина: метилированного H3K9 и гетерохроматинового белка HP1. Такой же тип эпигенетического сайленсинга наблюдается у гена *Rex1*, транскрипция которого позитивно регулируется транскрипционным фактором OCT4 (для генов *Nanog* и *Sox2* такого механизма не выявлено). Наличие H3K9me и HP1 способствует привлечению *de novo* ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B, которые производят метилирование ДНК в промоторном районе гена *Oct4*, что необходимо для полного и стабильного подавления транскрипции. То, что метилирование ДНК является вторичным процессом по отношению к метилированию H3K9, было доказано при исследовании дифференцировки ЭСК мыши, гомозиготных по мутациям генов, кодирующих гистон-метилтрансферазу G9a, и генов *Dnmt3a, Dnmt3b*, кодирующих ДНК-метилтрансферазы. Также было показано, что мутации, нарушающие метилирование H3K9 и метилирование ДНК, способствуют подавлению способности ЭСК к дифференцировке [129].

Недавно было установлено, что белки эухроматина также необходимы для поддержания плюрипотентности ЭСК мыши [130]. Репрессия транскрипции гена *Chd1* подавляет рост клеточной культуры ЭСК и активность промотора гена *Oct4*. Данный ген кодирует эухроматиновый белок, который локализуется с меткой активного хроматина - H3K4me3 и РНК-полимеразой II в ЭСК мыши. Подавление транскрипции *Chd1* приводит к повышению экспрессии нейтральных маркеров в ЭСК, а также к нарушению дифференцировки клеток в примитивную энтодерму и, как следствие, в мезодермальные кардиальные производные. При этом дифференцировка по эктодермальному типу происходит нормально. Кроме того, обнаружено, что подавление *Chd1* резко снижает эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из эмбриональных фибробластов [130]. Следует отметить, что в ЭСК в пределах гена *Chd1* локализуются транскрипционные факторы, необходимые для поддержания плюрипотентности клеток, таких, как OCT4, SOX2, NANOG, SMAD1, ZFX и E2F1 [131].

Связь плюрипотентности с эпигенетическими механизмами прослеживается и в экспериментах по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека. В нескольких

работах было показано, что использование специфических ингибиторов ферментов, участвующих в эпигенетической модификации гистонов и ДНК, существенно увеличивает эффективность получения ИПСК и даже способно заменить некоторые из «факторов плюрипотентности». В настоящий момент подобные свойства известны для ингибиторов деацетилаз гистонов (вальпроевая кислота (VPA), трихостатин А (TSA) и SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid)) [132, 133], ингибитора гистон-метилтрансферазы G9a – VIX-01294 [134, 135], а также ингибиторов ДНК-метилтрансфераз – 5-азациитидина и RG108 [132–136]. Кроме того, было показано, что использование РНК-интерференции против *Dnmt* увеличивает эффективность репрограммирования за счет усиления перехода частично репрограммированных клеток в полностью репрограммированное состояние [136]. Во множестве работ, посвященных получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и животных, показано, что репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию сопровождается деметилированием ДНК в промоторных районах генов *Oct4* и *Nanog*, в то время как в соматических клетках и ТСК мыши они гиперметилированы [137, 138].

МикроРНК и ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Многочисленные исследования показывают, что микроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии множества генов во время эмбрионального развития организмов. В частности, показано, что мутация в гене *Dicer*, кодирующем РНКазу, необходимую для процессинга малых некодирующих РНК, вызывает раннюю гибель эмбрионов мыши [139]. Подобный эффект наблюдается также при мутации гена *Dgcr8* (его белковый продукт входит в состав комплекса Microprocessor, который также участвует в биогенезе микроРНК). ЭСК, мутантные по генам *Dicer* и *Dgcr8*, характеризуются нарушениями клеточного цикла и способности к дифференцировке [140–142].

В настоящее время известно более 500 различных микроРНК, экспрессия которых характерна для различных тканей и типов дифференцированных клеток. Существуют семейства микроРНК, экспрессия которых ограничивается недифференцированными ЭСК. Для ЭСК мыши это семейство *mir-290* (*mir-290, mir-291a, mir-291b, mir-292, mir-293, mir-294, mir-295*) и кластер *mir-302* (*mir-302a, mir-302b, mir-302c, mir-302d, mir-367*). Для ЭСК человека характерна экспрессия микроРНК семейства *mir-302*, а также *mir-371* (*mir-371, mir-372, mir-373*), представители которого гомологичны представителям семейства *mir-290* мыши [143].

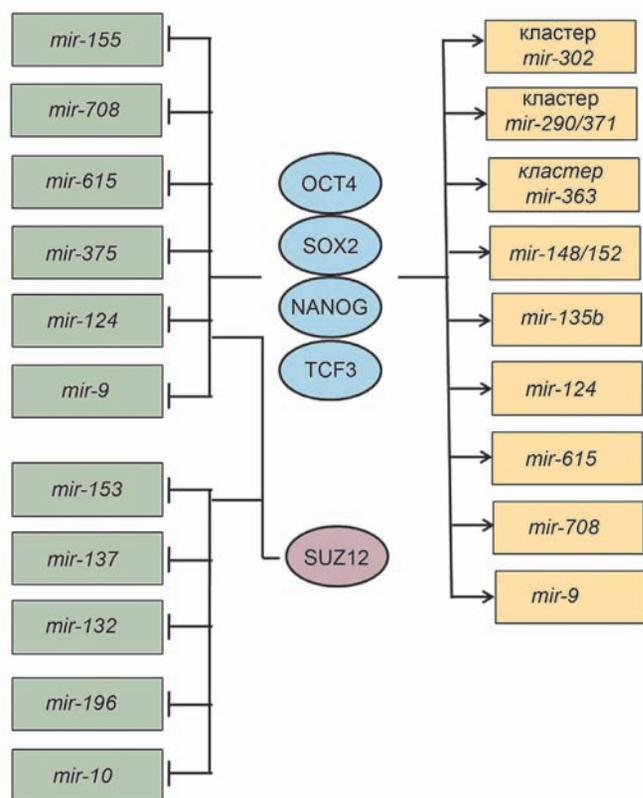


Рис. 3. Гены микроРНК, ассоциированные с транскрипционными факторами OCT4, SOX2, NANOG и TCF3 (показаны стрелками), также совместно регулируемые данными факторами и PRC1 (SUZ12) в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека [143].

На сегодняшний день имеется множество экспериментальных доказательств того, что система регуляции экспрессии генов, опосредованная микроРНК, и система транскрипционных факторов плюрипотентности, включающая OCT4, NANOG, SOX2 и др., тесно связаны между собой. Транскрипционные факторы могут регулировать транскрипцию отдельных генов и целых кластеров микроРНК, в то же время микроРНК способны регулировать экспрессию *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* на посттранскрипционном уровне [22, 23, 143]. Например, показано, что *mir-134*, *mir-296* и *mir-470*, экспрессия которых повышается при индуцированной дифференцировке ЭСК мыши, могут в разных комбинациях регулировать *Oct4*, *Nanog* и *Sox2*, вызывая снижение уровня соответствующих белков [144]. Повышение уровня транскрипции одной *mir-134* может вызывать дифференцировку ЭСК мыши по эктодермальному пути. Мишенями *mir-134* являются мРНК генов *Nanog* и *LRH1*, белковые продукты которых позитивно регулируют ген *Oct4* [145].

Позже было показано, что в ЭСК мыши микроРНК *mir-200c*, *mir-203* и *mir-183* способны совместно репрессировать *Sox2* и *Klf4*, которые также необходимы для поддержания плюрипотентности [146]. Индукция данной микроРНК вызывает снижение способности клеток к самообновлению и индукцию маркеров дифференцировки. Для ЭСК человека также обнаружена микроРНК, активация которой вызывает дифференцировку, – это *mir-145*. В недифференцированных ЭСК человека транскрипция *mir-145* репрессирована транскрипционным фактором OCT4 [147].

Локализация транскрипционных факторов в геномах ЭСК человека и мыши показала, что гены, кодирующие микроРНК, выявляются среди мишеней OCT4, SOX2 и NANOG [22, 23].

Высокоточное картирование распределения транскрипционных факторов OCT4, SOX2, NANOG и TCF3 в ЭСК мыши показало, что данные транскрипционные факторы локализируются в пределах 55 локусов микроРНК, включая три полицистронных кластера, что составляет 20% всех аннотированных микроРНК млекопитающих [143]. Среди этих микроРНК есть как активно транскрибирующиеся в ЭСК, так и молчащие. Следовательно, транскрипционные факторы плюрипотентности могут выступать как активаторы, так и репрессоры транскрипции микроРНК в ЭСК. В промоторных областях генов микроРНК, репрессированных OCT4, SOX2, NANOG и TCF3, кроме того, обнаружены белки группы Polysomb, производящие ди- и триметилирование гистона H3 в положении K27 (метка неактивного хроматина) (*рис. 3*). При дифференцировке клеток происходит перестройка транскрипции, в результате которой в каждом из типов дифференцированных клеток формируется специфический паттерн экспрессии микроРНК [143].

По всей видимости, микроРНК могут играть роль и при репрограммировании клеток. Было показано, что ЭСК-специфичные микроРНК *mir-291-3p*, *mir-294* и *mir-295* могут повышать эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши без использования гена *c-Myc* [148]. Кроме того, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека были успешно получены с использованием эктопической экспрессии генов OCT4, SOX2, KLF4 и LIN28. Белковый продукт гена LIN28 является ингибитором продукции микроРНК семейства let-7, которые участвуют в дифференцировке клеток [149].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ OCT4, SOX2 И NANOG И ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ

Система поддержания плюрипотентности и самообновления клеток, центральное место в которой занимают транскрипционные факторы OCT4, SOX2

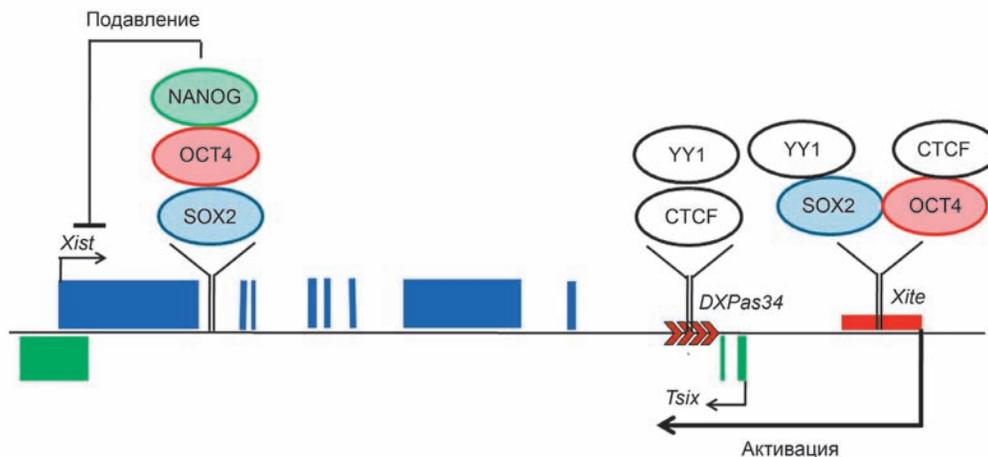


Рис. 4. Схема локуса *Xist/Tsix* мыши с расположением сайтов транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG, а также взаимодействующих с ними белков YY1 и CTCF. Синими прямоугольниками показаны экзоны гена *Xist*, зелеными прямоугольниками – экзоны *Tsix*. Красным прямоугольником обозначен энхансер *Xite*. Стрелками показаны направления транскрипции генов.

и NANOG, имеет связь с фундаментальными генетическими процессами, происходящими в раннем эмбриогенезе млекопитающих, например с процессом инактивации X-хромосомы.

У самок высших млекопитающих одна из двух генетически эквивалентных X-хромосом подвергается инактивации, что выражается в гетерохроматизации и транскрипционном молчании большинства ее генов. Процесс инактивации состоит из нескольких стадий и управляется сложным генетическим локусом – центром инактивации, расположенным на X-хромосоме [150]. Во время самых ранних стадий развития во всех бластомерах эмбрионов мыши наблюдается импринтированная инактивация, т.е. инактивации подвергается исключительно X-хромосома, унаследованная от самца. После отделения плюрипотентного компартамента бластоцисты – ВКМ, в ней происходит реактивация инактивированной X-хромосомы. После имплантации импринтированная инактивация сохраняется в экстраэмбриональных тканях, в то время как в клетках эпибласта при дифференцировке устанавливается случайная инактивация X-хромосомы. Ключевую роль в процессе инактивации играют два гена центра инактивации: *Xist* и *Tsix*, которые транскрибируются антипараллельно с комплементарных цепей ДНК [151–153] (рис. 4). Оба гена кодируют не-транслируемые ядерные РНК. РНК гена *Xist* распространяется вдоль X-хромосомы, запуская инактивацию. Транскрипция *Tsix* оказывает подавляющее действие на транскрипцию гена *Xist* [152].

В ЭСК, как и в клетках ВКМ, обе X-хромосомы активны, уровень мРНК гена *Xist* в них крайне низок [154]. С помощью флуоресцентной *in situ*-гибридизации транскрипт *Xist* выявляется в виде точечного сигнала на обеих X-хромосомах. Во время дифференцировки ЭСК происходит случайная инактивация одной из родительских X-хромосом, так же

как и в клетках эпибласта эмбрионов после имплантации в матку. Таким образом, очевидно, что существует корреляция между плюрипотентностью и инактивацией X-хромосом в клетках самок. Молекулярная природа данной корреляции была до недавнего времени не выяснена.

Недавно была обнаружена связь между транскрипционными факторами OCT4, SOX2 и NANOG, играющими ключевую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК, и инактивацией X-хромосомы [155]. Показано, что белки OCT4, SOX2 и NANOG совместно связываются с участком ДНК в первом интроне гена *Xist*, подавляя его транскрипцию в недифференцированных ЭСК мыши (рис. 4). В ЭСК, гомозиготных по мутации гена *Nanog*, при нормальном связывании белков OCT4 и SOX2 с первым интроном *Xist* наблюдается обратимая, ограниченная активация гена *Xist*. В то же время репрессия всех трех факторов OCT4, SOX2 и NANOG сопровождается быстрой аккумуляцией РНК *Xist* в ядрах ЭСК. Таким образом факторы плюрипотентности могут напрямую репрессировать ген *Xist* по *Tsix*-независимому механизму.

Однако позднее было показано, что транскрипционные факторы OCT4 и SOX2 могут принимать участие в регуляции гена *Xist*, активируя транскрипцию его репрессоров – *Tsix* и *Xite* [156] (рис. 4). Использование биоинформационного анализа выявило один сайт посадки транскрипционного фактора SOX2 и два сайта посадки фактора OCT4 в центре инактивации X-хромосомы мыши. Один из сайтов OCT4 расположен в непосредственной близости к сайтам посадки факторов CTCF и YY1 (Сайт E) на расстоянии 1 т.п.н. от регуляторного элемента *DXPas34*, который также содержит несколько сайтов посадки CTCF и YY1 (Сайт D). Композиционный сайт посадки транскрипционных факторов OCT4 и SOX2 был обнаружен в пределах области размером 1.2 т.п.н., кото-

рая известна как энхансер *Xite* (рис. 4). Факт связывания фактора OCT4 с последовательностью сайта E, а также факторов OCT4 и SOX2 с нуклеотидной последовательностью *Xite* подтвержден *in vitro* с помощью гель-ретардации и *in vivo* методом иммунопреципитации хроматина. Было показано, что область энхансера *Xite*, содержащая нативные сайты OCT4 и SOX2, способна существенно повышать активность мажорного промотора гена *Tsix* в составе люциферазных репортерных конструкций, временно трансфицированных в ЭСК мыши. Мутация сайтов OCT4 и SOX2 существенно снижала способность энхансера *Xite* активировать промотор *Tsix*. Подавление экспрессии гена *Oct4* с помощью РНК-интерференции вызывало существенное снижение уровня РНК *Tsix* и *Xite* в ЭСК самок мыши. В то же время подавление экспрессии *Sox2* даже немного повышало уровень РНК *Tsix/Xite*. По всей видимости, транскрипционный фактор SOX2 играет гораздо менее существенную роль в трансактивации *Tsix*, чем OCT4.

Кроме взаимодействий белок–ДНК, OCT4 и SOX2 характеризуются и белок–белковыми взаимодействиями, которые напрямую связаны с процессом инактивации X-хромосомы. Транскрипционный фактор OCT4 взаимодействует с белком CTCF, в то время как SOX2 – с белком YY1 (рис. 4). Ранее было показано, что CTCF и его кофактор YY1 участвуют в сближении X-хромосом на стадиях подсчета и выбора будущей неактивной хромосомы. Подавление экспрессии *Oct4* в ЭСК мыши нарушает сближение X-хромосом так же, как это наблюдается при репрессии *Ctcf*, тогда как снижение уровня экспрессии *Sox2* не оказывает существенного влияния на данный процесс. При образовании эмбрионидных тел из ЭСК с подавленной экспрессией *Oct4* наблюдалась аберрантная, биаллельная экспрессия *Xist*, что могло быть вызвано нарушением процесса подсчета X-хромосом. Биаллельная экспрессия *Xist* не наблюдалась при подавлении экспрессии *Ctcf* и *Sox2* [156].

Если принимать во внимание результаты двух вышеописанных работ, можно предположить, что транскрипционный фактор OCT4 регулирует ген *Xist* двумя путями: напрямую репрессируя транскрипцию *Xist*, совместно с факторами SOX2 и NANOG, а также путем активации гена *Tsix*. Во время дифференцировки клеток фактор OCT4 в кооперации с CTCF опосредует нормальное спаривание X-хромосом в области *Tsix/Xite*, обеспечивая подсчет и выбор активной и неактивной хромосомы. Снижение уровня транскрипции гена *Oct4* вызывает потерю связывания фактора OCT4 на одной из X-хромосом, репрессию *Tsix* и активацию *Xist*, именно эта хромосома становится неактивной. На будущей активной X-хромосоме остаточное количество белка OCT4 по-

прежнему поддерживает экспрессию *Tsix* и репрессию *Xist*. Данная модель, безусловно, очень элегантно представляет связь между плюрипотентностью и статусом X-хромосом в клетках самок млекопитающих. Однако по-прежнему остается невыясненным ряд вопросов. Например, вопрос о том, как достигается разница в силе связывания или количестве белков OCT4, SOX2 и NANOG на будущих активной и неактивной X-хромосомах во время дифференцировки. Логично предположить, что при случайной инактивации X-хромосомы это тоже происходит случайно. Но как тогда быть с импринтированной инактивацией, когда инактивации подвергается только X-хромосома, пришедшая от самца? Активная и неактивная X-хромосомы генетически эквивалентны, т.е. разница в связывании белков не может объясняться различием в нуклеотидной последовательности. Очевидно, что необходим поиск дополнительных белковых молекул или эпигенетических факторов, которые могут модулировать данный процесс.

Другой интересный вопрос связан со статусом X-хромосомы в ЭСК человека. Первая полученная линия ЭСК человека (H9) имела две активные X-хромосомы, как это наблюдается в ЭСК мыши [15, 157], транскрипция гена *XIST* в данных клетках не детектировалась. Во время дифференцировки H9 наблюдалась случайная инактивация одной из X-хромосом и повышение экспрессии *XIST*. Однако позже было установлено, что отдельные субклоны H9 могут экспрессировать *XIST*, РНК которого покрывает неактивную хромосому даже в недифференцированных клетках [158]. Кроме того, были обнаружены другие линии ЭСК человека, экспрессирующие *XIST* и несущие неактивную X-хромосому [157–159]. По данным международного консорциума по стволовым клеткам, около половины из проанализированных линий ЭСК, полученных в разных лабораториях, экспрессируют ген *XIST* одновременно с маркерами плюрипотентного состояния, такими, как OCT4, SOX2 и NANOG [159]. Анализ одиннадцати линий ЭСК человека, проведенный Сильва с соавторами [160], позволил разделить ЭСК на три группы: 1) клетки, имеющие две активные X-хромосомы, одна из которых инактивируется в процессе дифференцировки; 2) клетки, имеющие одну неактивную хромосому в недифференцированном и дифференцированном состоянии; 3) клетки, не экспрессирующие *XIST* в недифференцированном и дифференцированном состоянии [160]. Последующие эксперименты показали, что, несмотря на отсутствие транскрипции *XIST*, клетки третьей группы имеют неактивную X-хромосому [160]. Все приведенные выше примеры говорят о том, что у человека транскрипция *XIST* и инактивация X-хромосомы все-таки не связаны на-

прямую с плюрипотентностью и действием факторов OCT4, SOX2 и NANOG.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки являются уникальным объектом фундаментальных и прикладных исследований. Их уникальность основана на двух свойствах – самообновлении и плюрипотентности. Современные методы клеточной биологии и молекулярно-генетического анализа позволили по-новому взглянуть на молекулярные основы и факторы, контролирующие самообновление и плюрипотентность. Было установлено, что основные свойства эмбриональных стволовых клеток контролируются

сложной, многокомпонентной системой, включающей транскрипционные факторы, сигнальные каскады, а также систему эпигенетической регуляции и микроРНК. Безусловно, полученные знания помогут понять природу многих процессов, происходящих в эмбриогенезе животных и человека. Кроме того, новые знания позволят полнее использовать ЭСК в прикладных исследованиях, понять причины многих наследственных заболеваний человека и, возможно, разработать методы их лечения. ●

Работа финансировалась Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Surani M.A., Hayashi K., Hajkova P. // Cell. 2007. V. 128. P. 747–762.
2. Jaenisch R., Young R. // Cell. 2008. V. 132. P. 567–582.
3. Durcova-Hills G., Ainscough J., McLaren A. // Differentiation. 2001. V. 68. P. 220–226.
4. McLaren A., Durcova-Hills G. // Reprod. Fertil. Dev. 2001. V. 13. P. 661–664.
5. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., et al. // Nature. 2007. V. 448. P. 196–199.
6. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
7. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.
8. Wernig M., Meissner A., Foreman R., et al. // Nature. 2007. V. 448. P. 318–324.
9. Johnson M.H., Ziomek C.A. // Cell. 1981. V. 24. P. 71–80.
10. Zernicka-Goetz M. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. P. 919–928.
11. Rossant J. // Cell. 2009. V. 138. P. 1047–1050.
12. Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
13. Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
14. Thomson A., Wajtacha D., Hewitt Z., et al. // Cloning Stem Cells. 2008. V. 10. P. 89–106.
15. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. // Science. 1998. V. 282. P. 1145–1147.
16. Tanaka S., Kunath T., Hadjantonakis A.K., et al. // Science. 1998. V. 282. P. 2072–2075.
17. Kunath T., Arnaud D., Uy G.D., et al. // Development. 2005. V. 132. P. 1649–1661.
18. Shevchenko A.I., Demina V.V., Mazurok N.A., et al. // Rus. J. Genetics. 2008. V. 44. P. 1280–1289.
19. Xu R.H., Chen X., Li D.S., et al. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1261–1264.
20. Xu R.H., Peck R.M., Li D.S., et al. // Nat. Methods. 2005. V. 2. P. 185–190.
21. Humphrey R.K., Beattie G.M., Lopez A.D., et al. // Stem Cells. 2004. V. 22. P. 522–530.
22. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., et al. // Cell. 2005. V. 122. P. 947–956.
23. Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 431–440.
24. Niwa H., Ogawa K., Shimosato D., Adachi K. // Nature. 2009. V. 460. P. 118–122.
25. Burdon T., Chambers I., Stracey C., et al. // Cells Tissues Organs. 1999. V. 165. P. 131–143.
26. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., et al. // Nature. 1988. V. 336. P. 688–690.
27. Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., et al. // Nature. 1988. V. 336. P. 684–687.
28. Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 2048–2060.
29. Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., et al. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 4261–4269.
30. Sumi T., Fujimoto Y., Nakatsuji N., Suemori H. // Stem Cells. 2004. V. 22. P. 861–872.
31. Shi Y., Massague J. // Cell. 2003. V. 113. P. 685–700.
32. James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. // Development. 2005. V. 132. P. 1273–1282.
33. Vallier L., Reynolds D., Pedersen R.A. // Dev. Biol. 2004. V. 275. P. 403–421.
34. Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A. // J. Cell Sci. 2005. V. 118. P. 4495–4509.
35. Assou S., Le Carrour T., Tondeur S., et al. // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 961–973.
36. Xiao L., Yuan X., Sharkis S.J. // Stem Cells. 2006. V. 24. P. 1476–1486.
37. Greber B., Lehrach H., Adjaye J. // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 455–464.
38. Chen C., Ware S.M., Sato A., et al. // Development. 2006. V. 133. P. 319–329.
39. Levine A.J., Brivanlou A.H. // Cell Cycle. 2006. V. 5. P. 1069–1073.
40. Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. // Cell. 2003. V. 115. P. 281–292.
41. Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., et al. // Dev. Biol. 2000. V. 227. P. 271–278.
42. Hamazaki T., Kehoe S.M., Nakano T., Terada N. // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. P. 7539–7549.
43. Dvorak P., Dvorakova D., Koskova S., et al. // Stem Cells. 2005. V. 23. P. 1200–1211.
44. Dvorak P., Hampl A. // Folia Histochem. Cytobiol. 2005. V. 43. P. 203–208.
45. Aubert J., Dunstan H., Chambers I., Smith A. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1240–1245.
46. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., et al. // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 55–63.
47. Dravid G., Ye Z., Hammond H., et al. // Stem Cells. 2005. V. 23. P. 1489–1501.

48. Lu J., Hou R., Booth C.J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 5688–5693.
49. Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., et al. // *Cell*. 1990. V. 60. P. 461–472.
50. Rosner M.H., Vigano M.A., Ozato K., et al. // *Nature*. 1990. V. 345. P. 686–692.
51. Scholer H.R., Balling R., Hatzopoulos A.K., et al. // *EMBO J*. 1989. V. 8. P. 2551–2557.
52. Palmieri S.L., Peter W., Hess H., Scholer H.R. // *Dev. Biol*. 1994. V. 166. P. 259–267.
53. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., et al. // *Cell*. 1998. V. 95. P. 379–391.
54. Kirchhof N., Carnwath J.W., Lemme E., et al. // *Biol. Reprod*. 2000. V. 63. P. 1698–1705.
55. Hansis C., Grifo J.A., Krey L.C. // *Mol. Hum. Reprod*. 2000. V. 6. P. 999–1004.
56. Mitalipov S.M., Kuo H.C., Hennebold J.D., Wolf D.P. // *Biol. Reprod*. 2003. V. 69. P. 1785–1792.
57. Cauffman G., van de Velde H., Liebaers I., van Steirteghem A. // *Mol. Hum. Reprod*. 2005. V. 11. P. 173–181.
58. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // *Nat. Genet*. 2000. V. 24. P. 372–376.
59. Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., et al. // *EMBO Rep*. 2004. V. 5. P. 1078–1083.
60. Velkey J.M., O'Shea K.S. // *Genesis*. 2003. V. 37. P. 18–24.
61. Hay D.C., Sutherland L., Clark J., Burdon T. // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 225–235.
62. Takeda J., Seino S., Bell G.I. // *Nucl. Acids Res*. 1992. V. 20. P. 4613–4620.
63. van Eijk M.J., van Rooijen M.A., Modina S., et al. // *Biol. Reprod*. 1999. V. 60. P. 1093–1103.
64. Nordhoff V., Hubner K., Bauer A., et al. // *Mamm. Genome*. 2001. V. 12. P. 309–317.
65. Medvedev S.P., Shevchenko A.I., Elisaphenko E.A., et al. // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 162.
66. Yeom Y.I., Ha H.S., Balling R., et al. // *Mech. Dev*. 1991. V. 35. P. 171–179.
67. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A., et al. // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 3068–3074.
68. Lee J., Kim H.K., Rho J.Y., et al. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 33554–33565.
69. Cauffman G., Liebaers I., van Steirteghem A., van de Velde H. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 2685–2691.
70. Wang X., Zhao Y., Xiao Z., et al. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 1265–1275.
71. Wang S.H., Tsai M.S., Chiang M.F., Li H. // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. P. 99–103.
72. Chambers I., Colby D., Robertson M., et al. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 643–655.
73. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., et al. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 631–642.
74. Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., et al. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 1035–1043.
75. Pan G.J., Pei D.Q. // *Cell Res*. 2003. V. 13. P. 499–502.
76. Pan G., Pei D. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 1401–1407.
77. Mullin N.P., Yates A., Rowe A.J., et al. // *Biochem. J*. 2008. V. 411. P. 227–231.
78. Wang J., Levasseur D.N., Orkin S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 6326–6331.
79. Wang Z., Ma T., Chi X., Pei D. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 4480–4489.
80. Medvedev S.P., Elisaphenko E.A., Shevchenko A.I., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2009. V. 425. P. 102–105.
81. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., et al. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 126–140.
82. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. P. 625–635.
83. Adachi K., Suemori H., Yasuda S.Y., et al. // *Genes Cells*. 2010. V. 15. P. 455–470.
84. Botquin V., Hess H., Fuhrmann G., et al. // *Genes Dev*. 1998. V. 12. P. 2073–2090.
85. Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 2635–2645.
86. Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 5453–5465.
87. Liu L., Roberts R.M. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 16683–16689.
88. Liu L., Leaman D., Villalta M., Roberts R.M. // *Mol. Endocrinol*. 1997. V. 11. P. 1651–1658.
89. Pesce M., Scholer H.R. // *Mol. Reprod. Dev*. 2000. V. 55. P. 452–457.
90. Ambrosetti D.C., Basilico C., Dailey L. // *Mol. Cell. Biol*. 1997. V. 17. P. 6321–6329.
91. Tomilin A., Remenyi A., Lins K., et al. // *Cell*. 2000. V. 103. P. 853–864.
92. Remenyi A., Tomilin A., Pohl E., et al. // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. P. 569–580.
93. Kang J., Gemberling M., Nakamura M., et al. // *Genes Dev*. 2009. V. 23. P. 208–222.
94. Abeyta M.J., Clark A.T., Rodriguez R.T., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2004. V. 13. P. 601–608.
95. Brandenberger R., Khrebtukova I., Thies R.S., et al. // *BMC Dev. Biol*. 2004. V. 4. P. 10.
96. Catena R., Tiveron C., Ronchi A., et al. // *J. Biol. Chem*. 2004. V. 279. P. 41846–41857.
97. Kuroda T., Tada M., Kubota H., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 2475–2485.
98. Niwa H. // *Cell Struct. Funct*. 2001. V. 26. P. 137–148.
99. Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 5307–5317.
100. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., et al. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 24731–24737.
101. Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., et al. // *Dev. Biol*. 2003. V. 260. P. 404–413.
102. Wei C.L., Miura T., Robson P., et al. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 166–185.
103. Chew J.L., Loh Y.H., Zhang W., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 6031–6046.
104. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 10294–10299.
105. Wang J., Rao S., Chu J., et al. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 364–368.
106. Wu Q., Chen X., Zhang J., et al. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 24090–24094.
107. Pardo M., Lang B., Yu L., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. P. 382–395.
108. van den Berg D.L., Snoek T., Mullin N.P., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. P. 369–381.
109. Hatano S.Y., Tada M., Kimura H., et al. // *Mech. Dev*. 2005. V. 122. P. 67–79.
110. Lauberth S.M., Rauchman M. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 23922–23931.
111. Korutla L., Wang P.J., Mackler S.A. // *J. Neurochem*. 2005. V. 94. P. 786–793.
112. Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi S., et al. // *Nucleic Acids Res*. 2002. V. 30. P. 3202–3213.
113. Brehm A., Ohbo K., Zwerschke W., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 2635–2643.
114. Guo Y., Costa R., Ramsey H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 3663–3667.

115. Tolkunova E., Malashicheva A., Parfenov V.N., et al. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 1200–1212.
116. Webster D.M., Teo C.F., Sun Y., et al. // *BMC Dev. Biol.* 2009. V. 9. P. 28.
117. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., et al. // *Cell.* 2006. V. 125. P. 315–326.
118. Ringrose L., Paro R. // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 413–443.
119. O'Carroll D., Erhardt S., Pagani M., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 4330–4336.
120. Pasini D., Bracken A.P., Jensen M.R., et al. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 4061–4071.
121. Shumacher A., Faust C., Magnuson T. // *Nature.* 1996. V. 383. P. 250–253.
122. Voncken J.W., Roelen B.A., Roefs M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 2468–2473.
123. Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., et al. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 349–353.
124. Lee T.I., Jenner R.G., Boyer L.A., et al. // *Cell.* 2006. V. 125. P. 301–313.
125. Chamberlain S.J., Yee D., Magnuson T. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 1496–1505.
126. Woolfe A., Goodson M., Goode D.K., et al. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. P. e7.
127. Ura H., Usuda M., Kinoshita K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 9713–9723.
128. Addis R.C., Prasad M., Yochem R.L., et al. // *J. Cell. Biochem.* 2010. [Epub ahead of print]
129. Feldman N., Gerson A., Fang J., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 188–194.
130. Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 863–868.
131. Chen X., Xu H., Yuan P., et al. // *Cell.* 2008. V. 133. P. 1106–1117.
132. Huangfu D., Maehr R., Guo W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 795–797.
133. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1269–1275.
134. Shi Y., Desponts C., Do J.T., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 568–574.
135. Shi Y., Do J.T., Desponts C., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 525–528.
136. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., et al. // *Nature.* 2008. V. 454. P. 49–55.
137. Hattori N., Nishino K., Ko Y.G., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 17063–17069.
138. Hattori N., Imao Y., Nishino K., et al. // *Genes Cells.* 2007. V. 12. P. 387–396.
139. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., et al. // *Nat. Genet.* 2003. V. 35. P. 215–217.
140. Kanellopoulou C., Muljo S.A., Kung A.L., et al. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 489–501.
141. Murchison E.P., Partridge J.F., Tam O.H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 12135–12140.
142. Wang Y., Medvid R., Melton C., et al. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 380–385.
143. Marson A., Levine S.S., Cole M.F., et al. // *Cell.* 2008. V. 134. P. 521–533.
144. Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., et al. // *Nature.* 2008. V. 455. P. 1124–1128.
145. Tay Y.M., Tam W.L., Ang Y.S., et al. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 17–29.
146. Wellner U., Schubert J., Burk U.C., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. P. 1487–1495.
147. Xu N., Papagiannakopoulos T., Pan G., et al. // *Cell.* 2009. V. 137. P. 647–658.
148. Judson R.L., Babiarz J.E., Venere M., Blueloch R. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 459–461.
149. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1917–1920.
150. Chureau C., Prissette M., Bourdet A., et al. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 894–908.
151. Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F., et al. // *Cell.* 1992. V. 71. P. 515–526.
152. Lee J.T., Davidow L.S., Warshawsky D. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. P. 400–404.
153. Lee J.T., Lu N. // *Cell.* 1999. V. 99. P. 47–57.
154. Wutz A., Jaenisch R. // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. P. 695–705.
155. Navarro P., Chambers I., Karwacki-Neisius V., et al. // *Science.* 2008. V. 321. P. 1693–1695.
156. Donohoe M.E., Silva S.S., Pinter S.F., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 128–132.
157. Dhara S.K., Benvenisty N. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 3995–4002.
158. Hoffman L.M., Hall L., Batten J.L., et al. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 1468–1478.
159. Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 803–816.
160. Silva S.S., Rowntree R.K., Mekhoubad S., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 4820–4825.